



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

**CLEIDIANE SAMARA MURARI**

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E APLICAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO  
CONVENCIONAIS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE  
COPRODUTOS GERADOS PELOS LATICÍNIOS**

São José do Rio Preto

2017

**CLEIDIANE SAMARA MURARI**

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E APLICAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO  
CONVENCIONAIS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE  
COPRODUTOS GERADOS PELOS LATICÍNIOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

São José do Rio Preto

2017

Murari, Cleidiane Samara.

Isolamento, seleção e aplicação de leveduras não convencionais para produção de bioetanol a partir de coprodutos gerados pelos laticínios / Cleidiane Samara Murari. -- São José do Rio Preto, 2017

175 f. : il., tabs.

Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Bioetanol. 2. Levedos. 3. Laticínios. 4. Fermentação. 5. Energia alternativa. I. Del Bianchi, Vanildo Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

**CLEIDIANE SAMARA MURARI**

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E APLICAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO  
CONVENCIONAIS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE  
COPRODUTOS GERADOS PELOS LATICÍNIOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi**

UNESP – São José do Rio Preto -SP  
Orientador

**Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez**

UNESP – São José do Rio Preto -SP

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gisele Ferreira Bueno**

São José do Rio Preto -SP

**Prof. Dr. Eloizio Julio Ribeiro**

Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marília Golçalves Cattelan**

UNESP – São José do Rio Preto -SP

São José do Rio Preto

22 de março de 2017

*Aos meus pais Maria Aparecida Murari e Dirceu Murari; e à minha avó Sebastiana Salatine Murari (in memoriam) dedico com amor este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela oportunidade de ter chegado até aqui e realizar um sonho, por me dar forças para seguir em frente e ser minha fortaleza em todos os momentos da minha vida;

Aos meus queridos pais, que me faltam palavras para agradecer. Obrigada pelo amor, carinho, paciência e confiança, por nunca terem desistido dos meus sonhos junto a mim, e por terem me motivado nos momentos mais difíceis, por terem acreditado em mim quando eu mesma pensava que não seria capaz de continuar;

Ao meu orientador professor Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, não somente pela dedicação, empenho e apoio realizado incansavelmente durante ao longo desses anos, mas também pelos ensinamentos, amizade, paciência e conselhos que serão levados para toda vida, além de seu exemplo pessoal e profissional, muito obrigada professor;

A professora Claudia Dorta pelo conhecimento transmitido, sua amizade e carinho, e que de certa forma por ter sido inspiração para ter me motivado a seguir a carreira acadêmica;

Aos meus queridos amigos Débora Cristina, Mariana Molina, Arturo Solis, Raphael Machado, Guilherme Lorencini, obrigada pela amizade, ajuda e companheirismo e pelos momentos alegres e de descontração e pelo apoio e incentivo, vocês foram fundamentais não somente em minha pesquisa, mas também em minha vida;

As alunas de iniciação científica Letícia Mozaner e Érika Mosinahti que estiveram comigo e me ajudaram, obrigada pelo apoio;

As minhas amigas Vivian Diamantino, Mariana Costa e Vanessa Diamantino, vocês se tornaram minha segunda família, obrigada pela amizade e companheirismo, tanto nas horas alegres, como nas horas tristes;

Aos meus amigos e familiares, pelo apoio, carinho e pela compreensão, em muitos momentos que precisei estar ausente. Em especial as amigas Bruna Tofolli e Michele Harumi, obrigada pelo incentivo de vocês;

Ao professor Dr. Crispin Humberto pelo uso cromatógrafo gasoso;

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, por proporcionar condições para a realização deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro por meio de bolsa concedida;

A todos membros da banca que aceitaram gentilmente participar deste momento, e por suas sugestões que foram muito bem-vindas;

A todos que de uma certa maneira participaram desta conquista.

Meus sinceros agradecimentos.

*“[...] Em paz com a vida e o que ela me traz, Na fé que me faz otimista demais. Se chorei ou se sorri, o importante é que emoções eu vivi...”*

*(Roberto Carlos)*

## RESUMO

O desenvolvimento da tecnologia de processos fermentativos associado à preocupação ambiental, decorrente das atividades industriais, tem incentivado o avanço de novas estratégias de geração de energia alternativa. O soro de queijo e o permeado de soro são coprodutos gerados por laticínios e constituem substratos ricos em nutrientes, com fonte de carbono e potencial para produção de etanol. O presente estudo teve por objetivo isolar e selecionar leveduras presentes no soro de queijo, para o desenvolvimento de um processo de produção de etanol, em comparação com uma levedura padrão *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086. Foi utilizado para o isolamento o soro obtido após a produção dos queijos tipo gorgonzola e minas frescal, além da coalhada. Após o isolamento, as leveduras que apresentaram maiores crescimento em meio lactose, foram submetidas à fermentação do soro de queijo e permeado de soro em condições aeróbias (100 rpm), microaeróbias (50 rpm) e anaerobiose a 30°C por 24 horas. Para que o processo fosse mais eficaz, após essa etapa, a levedura, a condição de cultivo e o substrato que apresentaram resultados de maior relevância para pesquisa foram submetidos à fermentação em diferentes tipos de suplementações do meio (com sais e extrato de levedura). Posteriormente foi realizado o melhoramento das condições de cultivo, variando pH, concentração da lactose e temperatura, seguida da ampliação de escala fermentativa (1 L, 6 L, 21 L e 36 L). Foram realizadas análises de etanol, biomassa, lactose, proteína e DQO. Foi possível isolar e selecionar duas leveduras aptas em desenvolverem-se e consumir o substrato de soro de queijo, sendo uma do soro gorgonzola (LSQG) e outra da coalhada (LCOA). Assim, das três leveduras estudadas (as isoladas e a padrão), a levedura LSQG, identificada como *K. marxianus* URM 7404, apresentou resultados mais satisfatórios para a produção de etanol e desenvolvimento em soro de queijo em condições anaeróbias e aeróbias, produzindo inicialmente ( $P_{max}$ ) 8,08 g.L<sup>-1</sup> de etanol e produtividade ( $Q_x$ ) de 0,81 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> em 10 horas, com rendimento etanólico ( $\eta$ ) de 76%. A LCOA obteve ( $P_{max}$ ) de 1,56 g.L<sup>-1</sup>, ( $Q_x$ ) de 0,09 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) 9,82% em 14 horas. Já a *K. marxianus* CCT 4086 apresentou ( $P_{max}$ ) de 7,54 g.L<sup>-1</sup> em 12 horas, ( $Q_x$ ) de 0,63 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) de 57,71%, todas em soro de queijo. Quanto a produção de biomassa, essa foi maior também pela *K. marxianus* URM 7404, porém, em aerobiose, chegando a produzir 8,88 g.L<sup>-1</sup> em 12 horas, com produtividade de 0,94 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, enquanto que a LCOA teve produção máxima de 6,40 g.L<sup>-1</sup> e produtividade máxima de 0,62 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. A levedura padrão obteve produção máxima de biomassa de 8,24 g.L<sup>-1</sup> em 10 horas, com produtividade de 0,82 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Assim, após a adaptação da levedura *K. marxianus* URM 7404 no substrato, seguiu-se para as etapas

posteriores, utilizando condições anaeróbias e soro de queijo suplementado com extrato de levedura. Nessas condições de cultivo, obteve-se aumento de 60,77% na produção de etanol, chegando a ( $P_{max}$ ) de 20,60 g.L<sup>-1</sup> de etanol, ( $Q_x$ ) de 2,58 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) de 95,70% em 8 horas. Com o melhoramento das condições posteriormente realizado, o ( $P_{max}$ ) de etanol chegou a 27,61 g.L<sup>-1</sup> com ( $\eta$ ) de 98,23% em 12 horas, utilizando concentração de lactose de 60 g.L<sup>-1</sup>, temperatura de 33°C e pH 5. Na ampliação de escala, utilizando as condições de cultivo obtidas no melhoramento, os resultados de produção de etanol foram próximos quando em 1, 6 e 21 e 36 litros, com ( $P_{max}$ ) de 28 g.L<sup>-1</sup>, 27,51 g.L<sup>-1</sup> e 26,90 g.L<sup>-1</sup> em 12 horas e 25,81 g.L<sup>-1</sup> (16 horas), e ( $\eta$ ) de 97,84%, 96,70%, 96,30% e 95,80% respectivamente. Com consumo de lactose de 95%, 94,7%, 94,5% e 93,3% respectivamente. Quanto a eficiência na redução da demanda química de oxigênio (DQO), essa foi de 85,18% em 1L, 86,54% em 6L, 80,90% em 21 L e 78,94% em 36 L, no final de 18 horas de fermentação. Representando uma alternativa promissora para a valorização dos coprodutos gerados pelo laticínio e uma alternativa efetiva para a obtenção de uma fonte renovável de biocombustível.

***Palavras-Chave:*** Coprodutos. Laticínios. Levedura. Bioetanol. Meio Ambiente

## ABSTRACT

*The development of the technology of fermentation processes associated to the environmental concern, due to industrial activities, has motivated the advancement of new alternative energy generation strategies. The cheese whey and permeate whey are co-products generated from dairy industrial and represent nutrient rich substrates, with carbon source for ethanol production. The aim of this study was isolate and select yeasts from cheese whey for the development of a ethanol production process, in comparison with a standard yeast, *Kluyveromyces marxianus*, CCT 4086. For the isolation, it was used cheese whey obtained from the production of gorgonzola cheese, fresh cheese and curd. After isolation, the yeasts that presented higher growth, were submitted to fermentation in cheese whey and whey permeate, in aerobic (100 rpm), microaerobic (50 rpm) and anaerobic conditions, at 30°C for 24 hours. After this stage, the yeast, the cultivate condition and the substrate that presented better results, were submitted to fermentation in different supplementation conditions (with salts and yeast extract). Subsequently, it was carried out the improvement of the cultivate conditions, varying pH, lactose concentration, and temperature, followed by the increase of fermentation scale (1 L, 6 L, 21 L, and 36 L). Analysis of ethanol, biomass, lactose, protein, and chemical oxygen demand (COD), were carried out. Then, it was isolated and selected two yeasts able to grow and consume the substrate of cheese whey. One yeast was isolated from the gorgonzola cheese whey (LSQG), and the another, from the curd (LCOA). Among the yeasts studied, the LSQG yeast, identified as *K. marxianus* (URM 7404) presented better results for ethanol production and cellular growth in cheese whey, in anaerobic and aerobic conditions. This yeast produced initially ( $P_{max}$ ) 8.08 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> of ethanol and a productivity of ( $Q_x$ ) 0.81 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> in 10 hours, with ethanolic yield ( $\eta$ ) of 76%. The LCOA yeast obtained ( $P_{max}$ ) of 1.56 g. L<sup>-1</sup>, ( $Q_x$ ) of 0.09 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> and ( $\eta$ ) of 9.82%, in 14 hours. Finally, the *K. marxianus* CCT 4086 presented ( $P_{max}$ ) of 7.54 g. L<sup>-1</sup> in 12 hours, ( $Q_x$ ) of 0.63 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> and ( $\eta$ ) of 57.71%, all in cheese whey. The production of biomass was also higher by *K. marxianus* URM 7404, even in aerobic condition, producing 8.88 g. L<sup>-1</sup> in 12 hours, with productivity 0.94 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, while the LCOA yeast had maximum production of 6.40 g. L<sup>-1</sup> and maximum productivity of 0.62 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. The standard yeast obtained maximum biomass production of 8.24 g. L<sup>-1</sup> in 10 hours, with productivity 0.82 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. After adaptation of the yeast *K. marxianus* URM 7404 in the substrate, it was tested anaerobic condition and cheese whey supplemented with yeast extract. In this cultivate condition, there was an increase in ethanol of 60,77%, reaching ( $P_{max}$ ) of*

20.60 g. L<sup>-1</sup> ethanol, ( $Q_x$ ) of 2.58 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) of 95.70%, in 8 hours. After the improvement of the conditions, the ( $P_{max}$ ) of ethanol reached 27.61 g. L<sup>-1</sup> with ( $\eta$ ) of 98.23% in 12 hours, using lactose concentration of 60 g.L<sup>-1</sup>, at 33°C and pH 5. In the increase of the fermentation scale up, using the cultivate conditions obtained after improvement, the results of ethanol production were close between them in 1, 6, 21, and 36 L with ( $P_{max}$ ) of 28 g. L<sup>-1</sup>, 27.51 g. L<sup>-1</sup> and 26.90 g. L<sup>-1</sup> (in 12 hours) and 25.81 g. L<sup>-1</sup> (in 16 hours) and ( $\eta$ ) of 97.84%, 96.70%, 96.30%, and 95.80%, and lactose consumption of 95%, 94.7%, 94.5%, and 93.3%, respectively. Finally, according to the efficiency in reducing COD it was 85.18% for 1L, 86.54% for 6L, 80.90% for 21L for 78.94% for 36L, at the end of 18 hours of fermentation. Representing a promising alternative for valorization of coproducts generated by dairy and an effective alternative to obtain a renewable source of biofuel.

**Keywords:** Coproducts. Dairy products. Yeast. Bioethanol. Environment.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Etapas de fabricação do queijo com posterior obtenção do soro de queijo e permeado de soro.....	32
<b>Figura 2.</b> Via de valorização e utilização do soro de queijo pelas indústrias.....	38
<b>Figura 3.</b> Representação molecular da lactose.....	39
<b>Figura 4.</b> Rotas tecnológicas para produção de bioetanol.....	43
<b>Figura 5.</b> Produtividade média de bioetanol por área para diferentes culturas .....	44
<b>Figura 6.</b> Gráfico da perspectiva de oferta e demanda de bioetanol combustível para o ano de 2020.....	45
<b>Figura 7.</b> Diversidade de áreas que envolvem a biotecnologia das leveduras.....	50
<b>Figura 8.</b> Esquema de isolamento de leveduras do soro de queijo, obtido da produção do queijo gorgonzola, minas frescal e coalhada.....	57
<b>Figura 9.</b> Esquema de ampliação de escala realizada no presente estudo.....	62
<b>Figura 10.</b> Viabilidade das leveduras isoladas do soro de queijo gorgonzola e coalhada em meio de lactose na etapa de seleção, em função do tempo de fermentação.....	71
<b>Figura 11.</b> N° de células por mL das leveduras isoladas do soro de queijo gorgonzola e coalhada em meio de lactose na etapa de seleção em função do tempo de fermentação.....	71
<b>Figura 12.</b> Consumo de lactose do soro de queijo obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).....	77
<b>Figura 13.</b> Consumo de proteínas do soro de queijo obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A) microaerobiose, (B) e anaerobiose (C).....	79
<b>Figura 14.</b> Produção de biomassa a partir soro de queijo obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose(C).....	81

<b>Figura 15.</b> Produção de etanol a partir do soro de queijo obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose(C).....	87
<b>Figura 16.</b> Acompanhamento do pH dos meios fermentados a partir do soro de queijo obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).....	92
<b>Figura 17.</b> Consumo de lactose do permeado de soro obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose(C).....	95
<b>Figura 18.</b> Consumo de proteína do permeado de soro obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose(C).....	97
<b>Figura 19.</b> Produção de biomassa a partir do permeado de soro obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).....	100
<b>Figura 20.</b> Produção de etanol a partir do permeado de soro obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).....	106
<b>Figura 21.</b> Acompanhamento do pH dos meios fermentados a partir do permeado de soro obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) anaerobiose (C).....	113
<b>Figura 22.</b> Proteína intracelular bruta obtida da biomassa das leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA.....	117
<b>Figura 23.</b> Consumo de lactose (A) e proteína (B) do soro de queijo <i>in natura</i> e dos meios suplementados, obtido pela levedura <i>K.marxianus</i> URM 7404 em anaerobiose.....	120
<b>Figura 24.</b> Perfil de produção de biomassa obtido pela isolada levedura isolada <i>K. marxianus</i> URM 7404 em anaerobiose no soro queijo <i>in natura</i> e nos meios suplementados.....	121
<b>Figura 25.</b> Perfil de produção de etanol obtido pela levedura isolada <i>K. marxianus</i> URM 7404 em anaerobiose no soro queijo <i>in natura</i> e nos meios suplementados.....	124
<b>Figura 26:</b> Curva de contorno para a resposta produção de etanol.....	133
<b>Figura 27:</b> Curva de contorno para a resposta rendimento.....	133
<b>Figuras 28:</b> Curva de contorno para a resposta produtividade em etanol.....	134

<b>Figura 29.</b> Valores médios de etanol, rendimento e produtividade etanólica no acompanhamento dos ensaios para validação do modelo matemático.....	135
<b>Figura 30.</b> Consumo de lactose (A) e proteína (B) obtido pela levedura <i>K. marxianus</i> em ampliação de escala fermentativa.....	137
<b>Figura 31.</b> Produção de biomassa obtida pela levedura <i>K. marxianus</i> em ampliação de escala fermentativa.....	138
<b>Figura 32.</b> Produção de etanol obtida pela levedura <i>K. marxianus</i> em ampliação de escala fermentativa.....	141
<b>Figura 33.</b> Acompanhamento do pH dos meios em ampliação de escala fermentativa.....	143
<b>Figura 34.</b> Consumo de lactose (A) e proteína (B) obtido pela levedura <i>K. marxianus</i> , utilizando o extrato comercial e o produzido.....	147
<b>Figura 35.</b> Produção de biomassa (A), etanol (B) e acompanhamento do pH (C) obtida pela levedura <i>K. marxianus</i> , utilizando o extrato produzido e o extrato comercial como suplemento do meio fermentativo de soro de queijo.....	149
<b>Figura 36.</b> Valorização e aproveitamento do soro de queijo por bioprocesso realizado no presente estudo.....	152
<b>Figura 37.</b> Curva padrão da lactose.....	157
<b>Figura 38.</b> Curva padrão da proteína.....	157
<b>Figura 39.</b> Curva padrão biomassa x D.O. da levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4089.....	157
<b>Figura 40.</b> Curva padrão biomassa x D.O. da levedura LSQG.....	158
<b>Figura 41.</b> Curva padrão biomassa x D.O. da levedura LCOA.....	158

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição média típica do leite de vaca e dos soros doce e ácido.....	30
<b>Tabela 2.</b> Composição mineral dos soros doce e ácido.....	30
<b>Tabela 3.</b> Produtos obtidos por fermentação do soro de queijo e respectivos micro-organismos utilizados no processo.....	36
<b>Tabela 4.</b> Produtos obtidos por modificação química ou enzimática da lactose.....	37
<b>Tabela 5.</b> Comparação do poder adoçante de diferentes açúcares.....	40
<b>Tabela 6.</b> Produção de bioetanol e uso de matéria-prima pelos principais países produtores.....	44
<b>Tabela 7.</b> Aplicação de diferentes leveduras na biotecnologia industrial.....	49
<b>Tabela 8.</b> Elementos nutricionais essenciais para as leveduras e suas funções.....	53
<b>Tabela 9.</b> Composição do meio de cultivo utilizado para a padronização do inóculo das leveduras.....	58
<b>Tabela 10.</b> Composição dos meios de cultivo a base de soro de queijo para fermentação.....	60
<b>Tabela 11.</b> Variáveis utilizadas na fermentação do soro de queijo.....	61
<b>Tabela 12.</b> Matriz do planejamento fatorial completo.....	61
<b>Tabela 13.</b> Número de unidades formadoras de colônias (UFC) isoladas do soro de queijo gorgonzola, coalhada e minas frescal obtidas da diluição seriada de $10^{-5}$ em meio PDAcloranfenicol.....	70
<b>Tabela 14.</b> Composição centesimal do soro de queijo e do permeado de soro utilizados como meio fermentativo.....	73
<b>Tabela 15.</b> Teor final de lactose do soro de queijo <i>in natura</i> obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA e com 24 horas de fermentação em diferentes condições de agitação.....	76
<b>Tabela 16.</b> Teor final de proteínas do soro de queijo <i>in natura</i> obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA após 24 horas em diferentes condições de cultivo.....	79

<b>Tabela 17.</b> Parâmetros cinéticos avaliados em relação à produção de biomassa, após a fermentação do soro de queijo pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.....	82
<b>Tabela 18.</b> Parâmetros cinéticos obtidos em relação à produção de etanol, após a fermentação do soro de queijo <i>in natura</i> pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.....	88
<b>Tabela 19.</b> Eficiência na redução de DQO do soro de queijo após 24 horas de fermentação obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.....	93
<b>Tabela 20.</b> Teor final de lactose do permeado de soro obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA após 24 horas de fermentação em diferentes condições de cultivo.....	95
<b>Tabela 21.</b> Teor final de proteínas do permeado de soro obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA após 24 horas de fermentação em diferentes condições de cultivo.....	98
<b>Tabela 22.</b> Parâmetros cinéticos avaliados em relação à produção de biomassa, após a fermentação do permeado de soro pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.....	101
<b>Tabela 23.</b> Comparação da produção máxima de biomassa obtida pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em soro de queijo e permeado de soro, em diferentes condições de cultivo.....	105
<b>Tabela 24.</b> Parâmetros cinéticos avaliados em relação à produção de etanol, após a fermentação do permeado de soro pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.....	107
<b>Tabela 25.</b> Comparação do rendimento etanólico máximo obtido pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em soro de queijo e permeado de soro em diferentes condições de cultivo.....	111
<b>Tabela 26.</b> Eficiência na redução de DQO do permeado de soro com 24 horas de fermentação pelas leveduras <i>K. marxianus</i> CCT 4086, LSQG e LCOA em condições de cultivo.....	114
<b>Tabela 27.</b> Composição média dos meios de cultivo suplementados antes da fermentação pela levedura <i>K.marxianus</i> URM 7404.....	119
<b>Tabela 28.</b> Parâmetros cinéticos obtidos em relação a produção de biomassa pela levedura <i>K. marxianus</i> URM 7404, a partir da fermentação do soro de queijo em diferentes suplementações.....	122

<b>Tabela 29.</b> Parâmetros cinéticos obtidos em relação a produção de etanol, pela levedura <i>K. marxianus</i> URM 7404, a partir fermentação do soro de queijo em diferentes suplementações.....	125
<b>Tabela 30.</b> Comparação da eficiência na redução de DQO do soro de queijo em diferentes suplementações, pela levedura <i>K. marxianus</i> URM 7404 em 24 horas de fermentação.....	128
<b>Tabela 31:</b> Delineamento composto central 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para maximização da condição de produção de etanol pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	130
<b>Tabela 32:</b> Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta etanol, rendimento e produtividade em etanol.....	131
<b>Tabela 33:</b> Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2 <sup>3</sup> .....	132
<b>Tabela 34:</b> Respostas da validação do modelo matemático.....	135
<b>Tabela 35.</b> Produção de biomassa e parâmetros cinéticos avaliados após a fermentação do soro de queijo pela levedura <i>K. marxianus</i> em ampliação de escala fermentativa.....	139
<b>Tabela 36.</b> Produção de etanol e parâmetros cinéticos avaliados após a fermentação do soro de queijo pela levedura <i>K. marxianus</i> em ampliação de escala fermentativa.....	141
<b>Tabela 37.</b> Comparação da eficiência na redução de DQO da levedura <i>K. marxianus</i> URM 7404 em ampliação de escala fermentativa.....	144
<b>Tabela 38.</b> Produção de biomassa e parâmetros cinéticos avaliados após a fermentação do soro de queijo pela levedura <i>K. marxianus</i> URM 7404, utilizando o extrato produzido e o extrato comercial como suplemento do meio fermentativo.....	148
<b>Tabela 39.</b> Produção de etanol e parâmetros cinéticos avaliados após a fermentação do soro de queijo pela levedura <i>K. marxianus</i> URM 7404, utilizando o extrato produzido e o extrato comercial como suplemento do meio fermentativo.....	150
<b>Tabela 40.</b> Comparação da eficiência na redução de DQO, nos meios suplementados com extrato comercial e produzido pela levedura <i>K. marxianus</i> URM 7404.....	151

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**BNDES:** Banco nacional de desenvolvimento econômico nacional

**CONAB:** Companhia nacional de abastecimento

**DQO:** Demanda química de oxigênio

**g. L.h<sup>-1</sup>:** grama por litro por hora

**g. L<sup>-1</sup>:** grama por litro

**g.g<sup>-1</sup>:** rendimento grama por grama

**GRAS:** Generally Recognized as Safe

**KM:** *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086

**LCOA:** Levedura isolada da coalhada

**LSQG:** Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola

**M1:** Meio soro de queijo *in natura*

**M2:** Meio soro de queijo *in natura* + Extrato de levedura

**M3:** Meio Soro de queijo *in natura* + Nutrientes (sais (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>; ZnSO<sub>4</sub>)

**M4:** Meio Soro de queijo *in natura* + Extrato de levedura + Nutrientes (sais (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>; ZnSO<sub>4</sub>)

**mg.L<sup>-1</sup>:** miligrama por litro

**nm:** nanômetro

**PDA:** Potate dextrose agar

**pH:** potencial hidrogeniônico

**pI:** ponto isoelétrico

**P<sub>max</sub>:** Produção máxima de etanol

**ppm:** parte por milhão

**Q<sub>P</sub>:** produtividade volumétrica de etanol

**Q<sub>X</sub>:** produtividade celular g.L.h.<sup>-1</sup>

**rpm:** rotação por minuto

**SPC:** Single cell protein

**UFC:** Unidade formadora de colônia

**Y<sub>P/S</sub>:** fator de conversão de substrato em etanol g.g<sup>-1</sup>

**Y<sub>X/P</sub>:** conversão proteínas em biomassa g.g.<sup>-1</sup>

**Y<sub>X/S</sub>:** conversão substrato em biomassa g.g<sup>-1</sup>

**η:** rendimento etanólico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivos Específicos.....	27
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>28</b>
3.1. Mercado do leite no Brasil.....	28
3.2. Soro de queijo: Composição e classificação.....	29
3.2.1. <i>Permeado de soro de queijo</i> .....	31
3.2.2. <i>Aspecto ambiental</i> .....	33
3.2.3. <i>Aproveitamento e valorização do soro de queijo</i> .....	34
3.2.4. <i>Lactose</i> .....	39
3.3. Geração de bioprodutos a partir de resíduos agroindustriais.....	40
3.4. Combustíveis renováveis e a sustentabilidade.....	41
3.4.1. <i>Bioetanol</i> .....	42
3.4.1.1. <i>O bioetanol no Brasil</i> .....	45
3.4.2. <i>Produção de etanol a partir do soro de queijo</i> .....	47
3.5. Leveduras não convencionais.....	49
3.5.1. <i>Isolamento de micro-organismos</i> .....	51
3.6. Composição de meios de cultura industriais.....	52
3.6.1. <i>Necessidade nutricional das leveduras</i> .....	52
3.7. Produção de extrato de levedura.....	54
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
4.1. Isolamento de leveduras a partir do soro de queijo e coalhada.....	56
4.1.1. <i>Meios de cultura para isolamento</i> .....	56
4.1.2. <i>Teste de utilização de lactose</i> .....	56
4.1.3. <i>Identificação da levedura</i> .....	58
4.1.4. <i>Meio de cultura e manutenção dos micro-organismos</i> .....	58
4.1.4.1. <i>Manutenção da cultura estoque</i> .....	58

4.1.4.2. Padronização do inóculo.....	58
4.2. Meio de fermentação.....	59
4.2.1. Preparo do soro de queijo e permeado de soro para fermentação.....	59
4.2.2. Desproteínização do soro de queijo para a obtenção permeado de soro.....	59
4.2.3. 1ª Fase do processo - Fermentação do soro de queijo e permeado de soro.....	59
4.2.4. 2ª Fase do processo - Suplementação do meio de cultivo.....	60
4.2.5. 3ª Fase do processo - Melhoramento do meio de cultivo e validação do processo.....	60
4.2.6. Ampliação de escala do processo.....	62
4.2.7. Produção de extrato de levedura.....	63
4.2.7.1. Processo de autólise.....	63
4.2.7.2. Fermentação do soro de queijo com extrato produzido e comercial.....	63
4.3. Métodos analíticos.....	63
4.3.1. Determinação da relação entre massa celular seca e densidade óptica.....	63
4.3.2. Multiplicação celular.....	64
4.3.3. Proteína total da biomassa de leveduras.....	65
4.3.4. Viabilidade celular.....	65
4.3.5. Caracterização do soro de queijo e permeado de soro.....	65
4.3.6. pH.....	66
4.3.7. Extrato seco total.....	66
4.3.8. Cinzas.....	66
4.3.9. Gordura.....	66
4.3.10. Lactose.....	66
4.3.11. Proteína.....	67
4.3.12. Etanol.....	67
4.3.13. Determinação da demanda química de oxigênio.....	68
4.4. Análise dos resultados.....	69
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
5.1. Parte 1- ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS.....	70
5.1.1. Isolamento de leveduras capazes de utilizar a lactose.....	70
5.2. Parte 2 - CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO E PERMEADO DE SORO.....	73

5.3. Parte 3- FERMENTAÇÃO DO SORO DE QUEIJO E PERMEADO DE SORO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	76
5.3.1. <i>Fermentação do Soro de Queijo</i> .....	76
5.3.1.1. <i>Consumo de Lactose e Proteína</i> .....	76
5.3.1.1.1. <i>Lactose</i> .....	76
5.3.1.1.2. <i>Proteína</i> .....	78
5.3.1.2. <i>Produção de biomassa e etanol</i> .....	81
5.3.1.2.1. <i>Biomassa</i> .....	81
5.3.1.2.2. <i>Etanol</i> .....	87
5.3.1.2.3. <i>Demanda química de oxigênio</i> .....	93
5.3.2. <i>Fermentação do permeado de soro de queijo</i> .....	94
5.3.2.1. <i>Consumo de lactose e proteína</i> .....	94
5.3.2.1.1. <i>Lactose</i> .....	94
5.3.2.1.2. <i>Proteína</i> .....	97
5.3.2.2. <i>Produção de biomassa e etanol</i> .....	100
5.3.2.2.1. <i>Biomassa</i> .....	100
5.3.2.2.2. <i>Produção de Etanol</i> .....	106
5.3.2.2.3. <i>Demanda química de oxigênio</i> .....	114
5.3.3. <i>Comparação entre os resultados</i> .....	115
5.3.4. <i>Proteína intracelular da biomassa de leveduras</i> .....	116
5.4. Parte 4 - SUPLEMENTAÇÃO SORO DE QUEIJO.....	119
5.4.1. <i>Fermentação soro de queijo suplementado</i> .....	119
5.4.2. <i>Consumo de lactose e proteína</i> .....	120
5.4.3. <i>Produção de biomassa e etanol</i> .....	121
5.4.3.1. <i>Biomassa</i> .....	121
5.4.3.2. <i>Etanol</i> .....	124
5.4.3.3. <i>Demanda química de oxigênio</i> .....	128
5.5. Parte 5- MELHORAMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	129
5.5.1. <i>Melhoramento das condições de cultivo para fermentação do soro de queijo pela levedura K. marxianus URM 7404</i> .....	129
5.5.2. <i>Verificação dos modelos para as respostas produção em etanol, rendimento e produtividade pela levedura Kluyveromyces marxianus</i> .....	130
5.5.3. <i>Validação do modelo para a produção de etanol com soro de queijo</i> .....	134

5.6. AMPLIAÇÃO DA ESCALA DE FERMENTAÇÃO.....	137
5.6.1. <i>Ampliação da escala fermentativa do soro de queijo pela levedura K. marxianus URM 7404</i> .....	137
5.6.2. <i>Consumo de lactose e proteína</i> .....	137
5.6.3. <i>Produção de Biomassa e Etanol</i> .....	138
5.6.3.1. <i>Biomassa</i> .....	138
5.6.3.2. <i>Etanol</i> .....	140
5.6.4. <i>Demanda química de oxigênio</i> .....	144
5.7. Parte 7- PRODUÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA.....	146
5.7.1. <i>Fermentação do soro de queijo suplementado com extrato de levedura comercial e extrato produzido</i> .....	146
5.7.2. <i>Consumo de lactose e proteínas</i> .....	146
5.7.3. <i>Produção de biomassa e etanol</i> .....	147
5.7.3.1. <i>Biomassa</i> .....	147
5.7.3.2. <i>Etanol</i> .....	149
5.7.4. <i>Demanda química de oxigênio</i> .....	150
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	153
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	155
<b>8. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	156
<b>APENDICE I</b> .....	157
<b>ANEXO I</b> .....	159
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	160

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O aumento mundial da população levou ao aumento da demanda por serviços como saúde, consumo natural de energia e a necessidade por alimentos, rações, habitação, energia e combustíveis. Diante desta perspectiva, o consumo de combustíveis passou a ser uma preocupação mundial, uma vez que sua produção basicamente ocorre a partir de matéria-prima fóssil, cujas reservas naturais estão cada vez mais limitadas.

Neste contexto, surge como uma possível solução o uso de biocombustíveis com reduzida emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa, como o CO<sub>2</sub>, que são os principais causadores de danos ao meio ambiente. Por tais motivos, a busca por substitutos dos combustíveis fósseis torna-se cada vez mais necessária, fazendo com que cresçam as pesquisas na área de combustíveis alternativos.

As crescentes demandas por um combustível renovável e ambientalmente adequado, associadas ao potencial que o bioetanol de cana-de-açúcar apresenta para atender a critérios objetivos de sustentabilidade, representam a existência de perspectivas interessantes para esse combustível. Assim, o bioetanol pode vir a ser um produto global, tomando por base sua demanda e oferta presentes e futuras, bem como as políticas e tendências relacionadas à sua produção e à sua comercialização.

O Brasil ocupa uma posição privilegiada na produção de etanol, considerando suas vantagens de tecnologia de produção e de sua agricultura. A matriz energética brasileira é um exemplo internacional de sustentabilidade, as tecnologias para produção de etanol podem ser de primeira geração, a partir de fontes sacaríneas ou amiláceas; e de segunda geração, a partir de fontes lignocelulósicas, ou seja, da celulose e hemicelulose.

No território brasileiro, existe uma grande biodiversidade de indústrias que geram resíduos variados, e representam uma fonte de pesquisas que focam seus objetivos na área de uso de resíduos agroindustriais como coprodutos para produção de bioetanol que por se tratar de matéria prima de baixo custo, acaba tornando o processo viável financeiramente, sem contar que não há necessidade de desmatamento para a ampliação de áreas plantadas para sua obtenção. Assim, com a crescente preocupação ambiental, a promoção de bioenergias modernas produzidas em condições ambientalmente corretas e a valorização de resíduos agroindustriais vêm ganhando cada vez mais espaço no cenário atual.

Um dos presentes desafios da biotecnologia é o desenvolvimento de novos processos para a utilização adequada de resíduos agroindustriais que são gerados no processamento de alimentos, fibras, madeira, açúcar, álcool etc. Estes resíduos apresentam em

geral grande concentração de matéria orgânica, por isso seu descarte em águas subterrâneas e no solo pode levar à diminuição de oxigênio dissolvido no meio, dependendo da concentração orgânica e quantidade lançada.

Dentre as principais indústrias alimentícias do Brasil, o setor de laticínio tem grande destaque, com uma produção de mais de 32,1 bilhões de litros de leite por ano, onde um dos principais produtos gerados é o queijo. No processo de fabricação de queijo, em torno de 85 - 95% do leite são descartados como soro de queijo, um coproduto com elevadas propriedades nutricionais e que, quando disposto de forma incorreta no meio ambiente, se torna um potencial poluidor. A utilização do soro tem sido um desafio desde que o homem começou a produção de queijos, e como a produção tem aumentado nos últimos anos, o volume de soro também cresceu, pois, as fábricas de queijo foram construídas próximas de corpos hídricos, para que a maioria do soro fosse desviada para córregos ou rios.

O soro de queijo retém cerca de 55% dos nutrientes do leite, sendo composto principalmente por lactose (5%), proteínas (1%), gordura (0,5%) e sais minerais (0,8%). Pela sua alta concentração de lactose, o soro de queijo apresenta potencial de aplicação como cristalização da lactose para fabricação de suplementos na alimentação infantil e em produtos farmacêuticos, uso constante na alimentação animal, na produção de proteínas do soro (whey protein concentrate – WPC), além de sua aplicação na fermentação direta da lactose ou fermentação da glicose e galactose (hidrólise da lactose), por micro-organismos para obtenção de outros bioprodutos, como bioetanol, biomassa, bioaroma, biosurfactante, enzimas  $\beta$  – galactosidase, lactase, proteínas, ribonucleotídeos, oligossacarídeos, gomas, dentre outros.

Mesmo que o uso de micro-organismos para o aproveitamento do soro de queijo seja uma alternativa eficaz e promissora para este resíduo, apenas algumas espécies são capazes de metabolizar a lactose de forma direta (sem a necessidade prévia de hidrólise) como fonte de carbono e energia, transformando-a em bioproduto de interesse comercial.

Dentre os micro-organismos estudados para tais finalidades e que apresentam metabolismo apto em se desenvolver em lactose, as leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, e *Candida pseudotropicalis* têm apresentado maior destaque, além de oferecerem vantagens no processo industrial quanto à velocidade de crescimento e alta atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, podendo ser explorada para a produção de etanol como um metabólito secundário a partir do soro de queijo, além de serem considerados micro-organismos padrão GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, seguro do ponto de vista da segurança alimentar e saúde pública.

Neste contexto há uma busca por micro-organismos, no caso leveduras presentes no ambiente que apresentam tais características, a fim de aumentar as possibilidades de melhorar e aumentar o aproveitamento do soro de queijo descartado pelas indústrias, com destaque para a produção de etanol, que tem sido estimulada pela crescente necessidade mundial de energia, além de representar uma forma simples de tratamento e disposição de grandes quantidades de soro de queijo produzidas pela indústria, reduzindo seu impacto ao meio ambiente

## 1. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi isolar e selecionar leveduras presentes em soro de queijo e coalhada, que sejam aptas em se desenvolver e produzir etanol a partir do próprio soro de queijo e do permeado de soro, comparando com a levedura utilizada em trabalhos anteriores *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, além do estudo da redução do teor de matéria orgânica destes coprodutos.

### 2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente estudo consistiram em avaliar:

1. A caracterização da composição do soro de queijo e do permeado de soro utilizado;
2. A produção de etanol pelas leveduras isoladas, usando o soro de queijo e permeado de soro de queijo como meio fermentativo;
3. As condições de cultivo aerobiose, microaerobiose e anaerobiose na produção de etanol e no crescimento celular;
4. A quantificação de proteínas intracelulares presentes em cada levedura isolada e na levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, para posterior reuso no processo fermentativo, com a produção do extrato de levedura;
5. A influência de diferentes suplementações do soro de queijo na produção de etanol pela levedura selecionada;
6. O melhoramento das condições de cultivo pela levedura em soro de queijo, avaliando concentração de lactose, pH e temperatura para as variáveis de produção de etanol, produtividade e rendimento etanólico;
7. O aumento da escala de fermentação do soro de queijo; e
8. A produção de extrato de levedura.

Em todas as etapas, foram avaliados o desempenho das leveduras quanto à produção celular, consumo de lactose, proteína, eficiência na redução de DQO, produção de etanol.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. Mercado do leite no Brasil

Dentre as diversas cadeias produtivas existentes no Brasil, a cadeia produtiva do leite pode ser considerada como uma das mais complexas e representativas do agronegócio brasileiro, representando a base de produção do país. O setor de lácteos no Brasil vem apresentando forte expansão em termos de produção e consumo. No que se refere à oferta de leite, investimentos em tecnologias na área de produção e de processamento têm trazido melhores resultados na produtividade do país, resultando não somente em aumento de produção do leite, como também na fabricação de produtos mais diferenciados (SANTINI; PEDRA; PIGATTO, 2009).

De acordo com os mesmos autores, o crescimento na produção e consumo de leite é decorrente de ordem técnica e econômica, assim os fatores técnicos estão relacionados ao aumento da produtividade média, atrelada ao importante papel da pesquisa agrícola voltada na área zootécnica e das inovações tecnológicas, que melhoraram a eficiência do uso dos fatores de produção. Além da abertura comercial da economia brasileira, aliada à consolidação do Mercosul, que leva a contribuição para o crescimento da demanda por produtos lácteos pelos consumidores brasileiros, permitindo ao consumidor o acesso a produtos antes considerados supérfluos ou com preços que impediam o acesso de grande maioria dos consumidores.

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento, 2014 (CONAB), o Brasil aumentou sua produção de leite a um ritmo de 3,2% aa no período 2009-2013; 3,0% em 2014 (35,0 milhões de toneladas), crescendo aproximadamente 3,2% em 2015-2016 (36,1 milhões de toneladas). Para os próximos dez anos (média entre 2011-13 e 2023), a taxa média anual estimada de aumento da produção é de 1,5% ano. Segundo Maia et al. (2014), este aumento pode ser devido a dois fatores: primeiro diz respeito ao aumento do número de vacas ordenhadas e, portanto, da capacidade produtiva. O segundo, ao crescimento da produtividade dos animais brasileiros, além da preocupação da população em consumir um alimento rico em nutriente importante para saúde, como é o caso do leite e seus derivados.

### 3.2. Soro de queijo: Composição e classificação

Dentre os principais efluentes existentes no setor de laticínios, o soro de queijo tem apresentado maior destaque; constitui um coproduto líquido de cor amarela-esverdeado, resultante da precipitação e remoção da caseína do leite durante a produção de queijo (SISO, 1996), sendo que a cor amarelada característica do soro de queijo é decorrente da presença de riboflavina (vitamina B2) (DE WIT, 2001). O soro de queijo é gerado em grandes quantidades, sendo que para cada 10 litros de leite, 1 kg de queijo é produzido e 9 litros de soro são gerados como produto secundário.

Este coproduto representa cerca 85-95% do volume de leite e retém 55% de seus nutrientes. Os principais nutrientes encontrados são principalmente lactose (4,5-5%) e proteínas solúveis (0,6-0,8%), além de lipídios (0,4-0,5%) e sais minerais (0,8-1,0% de extrato seco), como compostos de NaCl e KCl (mais de 50%), sais de cálcio (principalmente de fosfato) entre outros, além de conter quantidades significativas de outros componentes, como ácido láctico (0,05%) e ácido cítrico, compostos de nitrogênio não proteico (ureia e ácido úrico) e vitaminas do grupo B (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; SMITH, 2008).

O soro de queijo pode ser classificado de acordo com sua obtenção e grau de acidez em soro ácido ou doce. Segundo Sgarbieri (2004), o soro ácido (pH de aproximadamente 4,6) é obtido após a coagulação das caseínas por acidificação biológica, devida à fermentação microbiana da lactose do leite em ácido láctico, e/ou química, por adição de ácidos minerais ou orgânicos, o pH isoelétrico das caseínas, que se encontra em torno de 4,6, sendo este obtido na produção dos queijos tipo cottage, quark e requeijão cremoso. Este tipo de soro é menos utilizado quando comparado com o soro doce, devido ao seu alto teor de cinzas, elevada concentrações de sais e baixo conteúdo proteico, o que lhe confere *flavour* ácido que prejudica a sua aceitação nas indústrias alimentícias (SGARBIERI, 2004).

Já o soro doce (pH de aproximadamente 6,0) é produzido a partir do coágulo do leite, obtido por hidrólise enzimática das caseínas por ação da quimosina, como é o caso dos queijos minas frescal, muçarela, prato e outros (MOCKAITIS et al., 2006). O soro doce apresenta ainda maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres resultantes da ação da enzima sobre as caseínas (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001).

O soro doce apresenta um teor de lactose maior quando comparado com o soro ácido, pois, neste último, parte da lactose é transformada em ácido láctico. No entanto, o soro doce apresenta um teor mineral inferior ao do soro ácido, devido à solubilização do fosfato de

cálcio coloidal existente nas micelas de caseína (MOCKAITIS et al., 2006; SGARBIERI, 2004).

A composição do soro é variável e pode ser afetada de acordo com o tipo do queijo produzido ou pelo método empregado na produção da caseína, além do tratamento térmico do leite, manipulação e outros fatores, que também podem influenciar. Contudo, espera-se que os componentes solúveis do leite estejam presentes nas mesmas proporções que se encontravam inicialmente, uma vez que permeiam juntos com o soro durante a separação do mesmo. Deve-se levar em conta ainda que as quantidades destes componentes que ficam no queijo após o processo dependem em grande parte da quantidade de soro retida. As Tabelas 1 e 2 apresentam a composição típica do leite de vaca e dos soros doce e ácido e a composição mineral de cada um respectivamente (ROHLFES et al., 2011).

**Tabela 1.** Composição média típica do leite de vaca e dos soros doce e ácido.

Componentes	Leite (%)	Soros	
		Doce (%)	Ácido (%)
Sólidos totais	12 – 13	6,0 – 7,0	6,0 – 6,5
Lactose	4,5 – 5,0	4,2 – 5,0	4,2 – 4,9
Proteínas	3,2 – 3,3	0,7 – 0,9	0,7 – 0,8
Lipídeos	3,5 – 4,0	0,1 – 0,5	0,1
pH	6,6 – 6,7	5,6 – 6,3	4,4 – 4,7
Cinzas	0,8 – 1,0	0,50	0,40
Ácido Láctico	-	0,05	0,40

(Fonte: Adaptado ROHLFES et al., 2011).

**Tabela 2.** Composição mineral dos soros doce e ácido.

Minerais	Soro Doce (mg kg <sup>-1</sup> )	Soro Ácido (mg kg <sup>-1</sup> )
Cinzas Totais	5.252	7.333
Fósforo	412	649
Cálcio	466	1.251
Potássio	1.455	1.485
Sódio	505	528
Cloretos (NaCl)	2.195	2.208

(Fonte: Adaptado ROHLFES et al., 2011).

Quanto à composição mineral do soro, percebe-se que o soro ácido mantém maior quantidade (mg.kg<sup>-1</sup>), quando comparado com o soro doce (Tabela 2). A composição do leite também é afetada por fatores genéticos relacionados com a espécie, a raça e ao indivíduo, além de fatores fisiológicos, como por exemplo, a fase de lactação, idade do animal e a gestação, por

fatores ambientais e de manejo, tais como a alimentação, o clima, o sistema de ordenha e por estados patológicos (WALSTRA, 2001).

### 3.2.1. Permeado de soro de queijo

Outro coproduto obtido pelos laticínios é o permeado de soro de queijo, que é obtido quando o soro de queijo tem suas proteínas concentradas, normalmente ocorre por tratamento térmico, separação por membranas e por precipitação (Figura 1). A ultrafiltração, a osmose inversa e a eletrólise têm sido cada vez mais utilizadas pelas indústrias alimentícias para a obtenção de proteínas *in natura*. Entretanto, estes processos são dispendiosos devido à alta tecnologia de suas membranas e as pressões altíssimas utilizadas em suas operações (METSÄMUURONEN; MÄNTTÄRI; NYSTRÓM, 2011; RICHARDS, 2002).

O permeado de soro contém alto teor de lactose e sais minerais, podendo ser aproveitado na alimentação de animais devido suas características funcionais, produção de lactose, galactose, álcool, produtos farmacêuticos ou cosméticos, além de ser utilizado para a obtenção do permeado em pó através da desidratação. O permeado contém um teor aproximado de 6,8 - 8,5% de lactose e 0,8 - 2% de sais minerais, ou seja, um produto com alto valor nutricional, porém, com limitações por seu elevado teor de lactose e sais (ZACARCHENCO, 2012; BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; SMITH, 2008).

Para obtenção do permeado também podem ser utilizados agentes floculantes, como polifosfato sódico, hexametáfosfatosódico, diversos sais férricos e vários polieletrólitos, que são eficientes em termos de precipitação, entretanto, são impróprios para a indústria alimentícia (MACEDO, 2010).

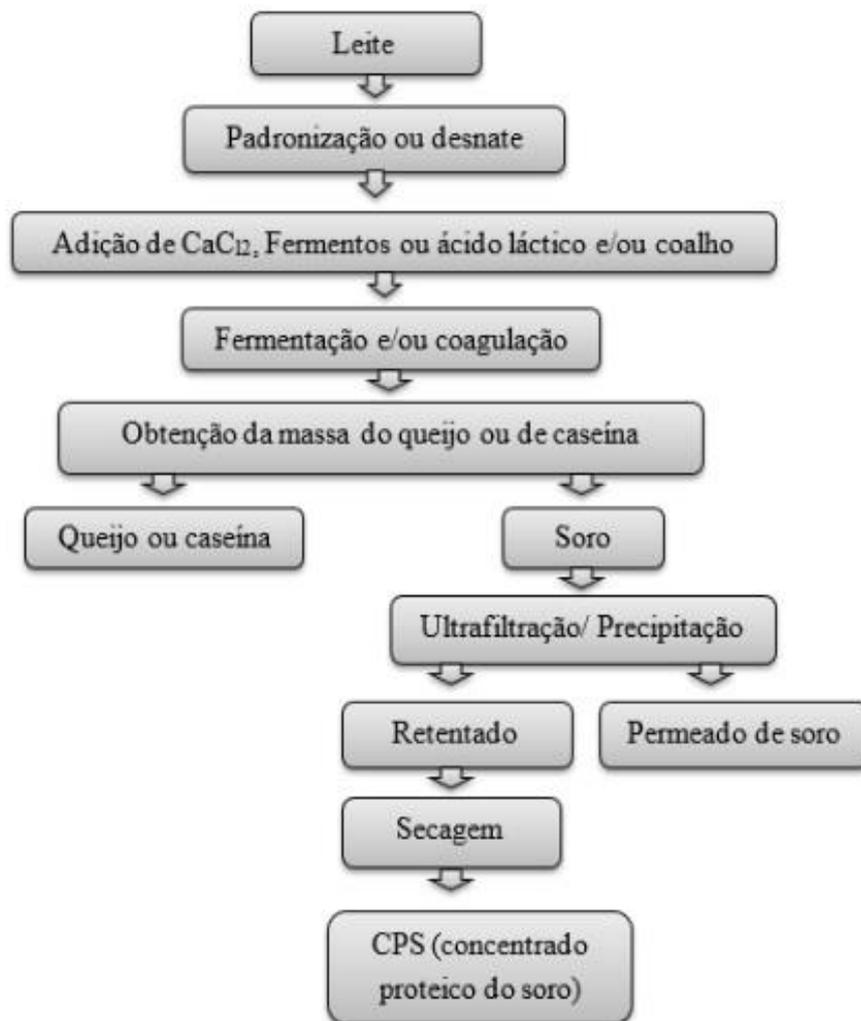
Outro método muito usado na obtenção do permeado de soro é o tratamento térmico, que consiste em um procedimento simples, basicamente na combinação do calor e ajuste de pH (coagulação ácida) até o ponto isoeletrico das proteínas, através de um ácido orgânico (SINGH, 2004).

Sabe-se que as proteínas têm múltiplas cargas situadas ao longo da cadeia proteica. Quando há excesso de um único tipo de carga a proteína apresenta uma estrutura aberta, devido à repulsão existente entre os sítios de uma mesma carga (LEMAN; KINSELLA, 1989). Por outro lado, quando o pH da solução envolvida se aproxima do ponto isoeletrico das proteínas (4,6), as cargas elétricas das partículas coloidais se unem formando o coágulo ou gel. Isto se deve à ação conjunta do calor e ácido, aumentando a taxa de colisão entre as partículas e

desidratando parcialmente as proteínas. Desse modo, a diminuição do pH é suficiente para acelerar a precipitação com formação de flocos ou grãos (RAPACCI, 1997).

Pela ação do calor são rompidas as ligações que asseguram as estruturas secundárias e terciárias das moléculas, sendo que o rearranjo das moléculas desnaturadas provoca a insolubilidade das proteínas (MACEDO, 2010; SILVA; ALMEIDA, 2004). A Figura 1 mostra as etapas que se seguem para obtenção do soro de queijo e do permeado de soro.

**Figura 1.** Etapas de fabricação do queijo com posterior obtenção do soro de queijo e permeado de soro.



(Fonte: ZACARCHENCO, 2012).

### 3.2.2. *Aspecto ambiental*

Com o avanço da tecnologia, a produção de queijo deixou de ser um processo tradicional, onde pequenas quantidades de soro produzidas eram despejadas nos campos ou usadas na ração alimentar, e se tornou um processo industrial onde são produzidos diariamente milhares de litros de soro, cujo escoamento tem acrescido dificuldades agravantes por tão elevada produção.

A descoberta dos inúmeros danos ambientais resultantes principalmente das práticas inadequadas das disposições dos resíduos, tem aumentado o conhecimento e a preocupação da população, fazendo com que esta preocupação fosse manifestada e concretizada através da promulgação de uma série de legislações federais, estaduais e municipais (MAZZER; CAVALCANTI, 2004).

Com a legislação ambiental cada vez mais rígida, os prejuízos advindos de seu não cumprimento podem apresentar um custo muito elevado aos infratores.

Dentre as atividades industriais, o setor de alimentos destaca-se pelo maior consumo de água e maior geração de efluentes por unidade produzida. A indústria de laticínios é um bom exemplo deste setor, onde as operações de limpeza, tanques, pasteurizadores, homogeneizadores, tubulações, entre outros acabam gerando um grande volume de efluente com uma elevada carga orgânica (RAMJEAWON, 2000).

Os impactos ambientais causados pelas indústrias de laticínios poderiam ser minimizados pela otimização e controle dos processos industriais através de medidas estabelecidas dentro da fábrica e de acordo com a legislação (MACHADO; FREIRE; SILVA, 2001). Paralelo a isso, as indústrias têm procurado cada vez mais por produtos com maior valor comercial, fazendo com que as mesmas procurem alternativas para o aproveitamento de seus efluentes. Esses aspectos vêm sendo incentivados diariamente, onde a indústria busca por sistemas eficazes que provoquem a redução de seus impactos ambientais, com custo de mercado compatível (MACÊDO, 2000).

A minimização do volume e da carga poluidora do efluente é um ponto fundamental no que se refere ao controle do impacto gerado para produção de laticínios. Para cada litro de soro são desperdiçados cerca de 50 g de lactose e 10 g de proteína com elevado valor nutricional e funcional (BARBOSA et al., 2010). Tais condições contribuem para o surgimento de novas alternativas de bioaproveitamento, valorizando o resíduo e reduzindo a poluição oriunda do seu descarte (SOUZA et al., 2010).

O soro possui uma DQO (Demanda Química de Oxigênio) de 50.000 - 80.000 mg. L<sup>-1</sup>, dependendo do processamento específico utilizado na fabricação de queijos e do conteúdo de lactose, sendo que este valor acaba sendo cerca de 100 vezes maior que a carga orgânica do esgoto doméstico. Portanto, o seu descarte em cursos d'água é preocupante (SILVA; ALMEIDA, 2004), pois quando é lançada grande quantidade de material orgânico oxidável nos corpos hídricos, as bactérias aeróbias que estabilizam o material orgânico presente no meio, passam a utilizar o oxigênio disponível, baixando assim sua concentração na água e podendo provocar a morte de peixes e outros animais aquáticos aeróbios por asfixia, provocando a exalação de maus odores e de gases agressivos, além de causar eutrofização de rios e lagos e dificultar o tratamento da água para o abastecimento público (MATOS, 2005; FARIA; RODRIGES; BORGES, 2004). Sendo assim, a sua disposição contínua pode ocasionar sérios problemas às estações de tratamento de esgotos e quando descartados em solos pode alterar a estrutura físico-química, reduzindo assim sua produtividade.

O efluente líquido é considerado um dos principais responsáveis pela poluição oriunda das atividades das indústrias de laticínios. Em muitos casos o soro de queijo é descartado junto dos demais efluentes líquidos, como esgotos sanitários gerados e águas pluviais captadas na respectiva indústria, se tornando um forte agravante ao meio ambiente. (SILVA, 1997).

### *2.2.3. Aproveitamento e valorização do soro de queijo*

Os estudos sobre o aproveitamento racional do soro se iniciaram na década de 1960, quando as indústrias começaram a enfrentar problemas para adequar o resíduo industrial às exigências dos órgãos de inspeção e saúde pública (KOSIKOWSKI, 1967; ZIMMER, 2006).

O aproveitamento dos coprodutos da indústria de laticínios, como o soro de queijo, apresenta como principal dificuldade o fato do soro ser visto como resíduo e não como matéria-prima. Dessa forma, não há uma preocupação em buscar maior conservação e estabilidade do mesmo, com a aplicação de baixas temperaturas ou sua concentração para garantir sua qualidade. No entanto, a identificação de alternativas para o adequado aproveitamento do soro aparece como primordial e de fundamental importância em função de sua qualidade nutricional e toda questão de preocupação com o meio ambiente (MACHADO; FREIRE; SILVA, 2001).

O soro de queijo pode ter basicamente três destinos principais. O primeiro é seu processamento para obtenção de diversos produtos, como soro em pó, bebida láctea, ricota, concentrado proteico, alimentos dietéticos, molhos, entre outros. O segundo seria seu uso na

alimentação animal, podendo ser na forma líquida, condensada ou como produto de soro seco. O terceiro destino seria o seu tratamento para posterior despejo em esgoto (CARMINATTI, 2001).

Com o auxílio de processos técnicos modernos de separação, o soro de queijo vem sendo transformado em produtos de ampla utilidade, pois o conteúdo nutricional do mesmo tem sido visto com bastante interesse pelas indústrias de alimentos, como exemplos podem ser citadas as operações de concentração, como a evaporação, a osmose inversa e a nanofiltração, permitem a obtenção de soro de queijo em pó, potencialmente utilizado em alimentação animal. As operações de desmineralização, como a eletrodialise, a nanofiltração, a osmose inversa e a cromatografia de troca iônica permitem a produção de soro desmineralizado, o qual após evaporação para obtenção do pó, pode ser incorporado, por exemplo, na produção de alimentos infantis. As operações de fracionamento de proteínas, como a cromatografia de troca iônica, a precipitação fracionada e o uso de processos combinados, como por exemplo, uma precipitação seletiva, seguida de uma separação por membranas, permitem separar as várias proteínas do soro, nomeadamente a lactoferrina, a lactoperoxidase, a  $\beta$  - lactoglobulina e a  $\alpha$  -lactalbumina, que podem ter aplicações em áreas diversas, como na medicina, na indústria alimentar, na indústria farmacêutica etc. (MACEDO, 2010).

Através de tais técnicas o soro de queijo é utilizado como aditivo alimentar (derivados diretamente do soro por simples tratamentos químicos ou físicos). O valor comercial deste produto está diretamente associado com seu teor proteico, podendo ser utilizado como aditivos na indústria de panificação ou de ingredientes na produção de alimentos infantis (DRAGONE et al., 2009; MAGENISIS et al., 2006).

Outra linha de aplicação do soro de queijo é seu uso como substrato de fermentação, através do uso de micro-organismos capazes de utilizar a lactose como fonte de carbono e energia, transformando-a em produtos de maior valor comercial, como a produção de etanol, SCP (*single cell protein*), enzimas, polímeros, bebidas, aromas etc (LANE; MORRISEY, 2010). Alguns destes produtos obtidos por via fermentativa estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Produtos obtidos por fermentação do soro de queijo e respectivos micro-organismos utilizados no processo.

<b>Produtos</b>	<b>Micro-organismos</b>
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante <i>Torulopsis kefir</i> , <i>Torula lactosa</i> <i>Torula cremoris</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Kluyveromyces sp.</i>
Proteína Microbiana (SCP)	<i>Escherichia coli</i> recombinante, <i>Kluyveromyces fragilis</i>
Biomassa	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>
Bebidas (vinho, cerveja, champanhe, bebidas não alcoólicas)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Ácido láctico	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Óleo	<i>Candida curvata</i> <i>Trichoporon beigeli</i>
$\beta$ - Galactosidase	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Candida pseudotropicalis</i>
Xantana	<i>Xantomonas campestris</i>
Glicerol	<i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>Kluyveromyces lactis</i>
Frutose difosfato	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante
Proteases	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>
Bioingredientes	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

(Fonte: Adaptado de LANE e MORRISEY, 2010).

A molécula da lactose, assim como outros carboidratos, possui sítios reativos (ligação glicosídica, grupo redutor de glicose, grupo hidroxila livres, ligações carbono-carbono, etc.) que a tornam suscetível de modificação química ou enzimática. Assim uma grande variedade de processos com significado valor comercial envolvendo a modificação química ou enzimática da lactose tem sido investigada conforme descrito na Tabela 4 (DOMINGUES, 2001).

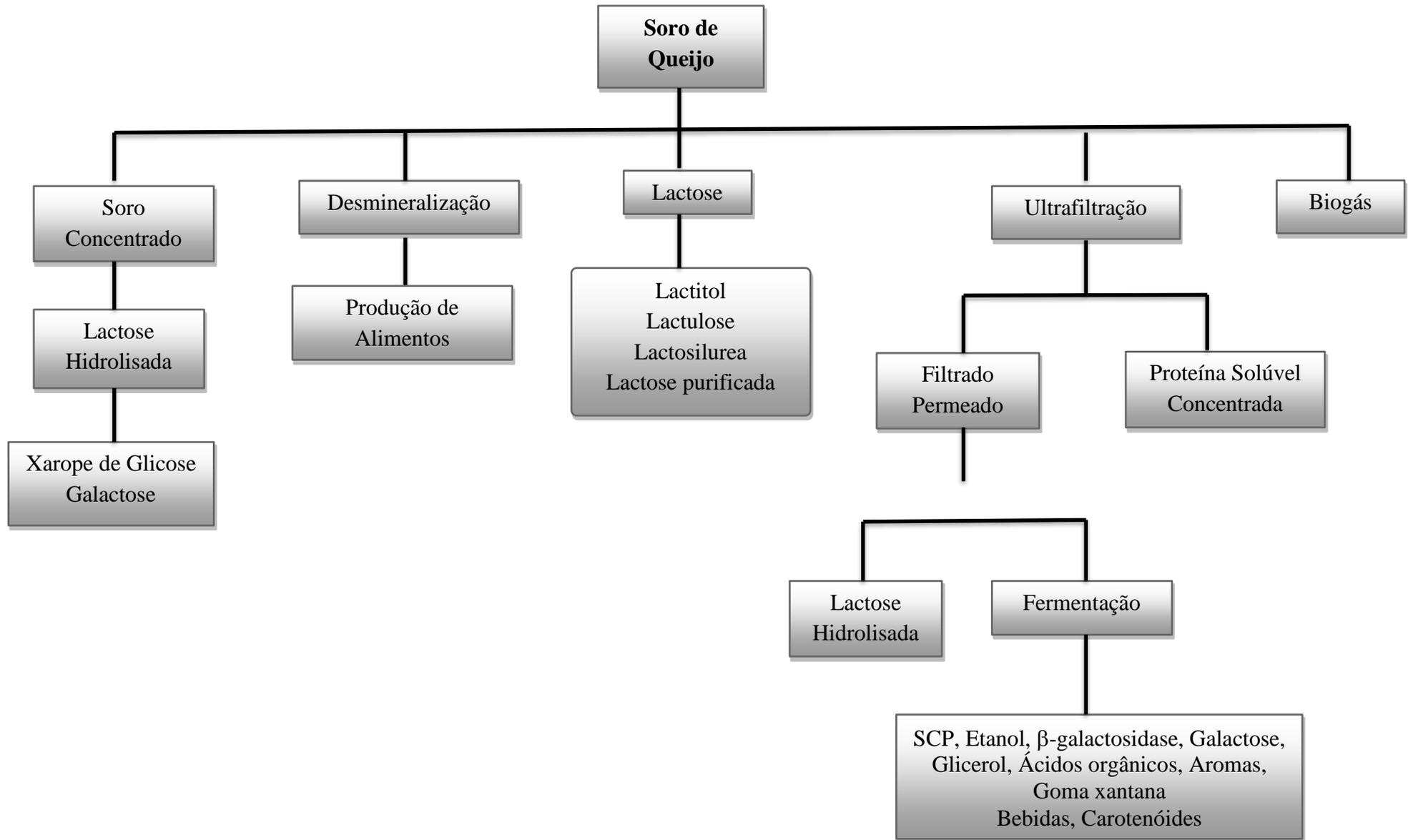
**Tabela 4.** Produtos obtidos por modificação química ou enzimática da lactose.

<b>Derivado</b>	<b>Processo</b>	<b>Uso Potencial</b>
Xarope de lactose hidrolisado	Hidrólise	Adoçante alimentar
Lactulose	Isomerização	Nutrição infantil, uso médico/farmacêutico
Lactitol	Hidrogenação/Redução	Adoçante não-nutritivo
Ácido lactobiônico	Oxidação	Agente quelante de metais pesados, constituintes de detergentes, conservação de fígado para transplante de órgãos.
Lactosilureia	Reação da lactose com a ureia	Alimentação animal
N- metilol-lactosilureia	Reação de lactosilureia com formaldeído	Alimentação animal
Lactitol palmitato	Esterificação de lactitol com ácidos graxos	Emulsionantes em alimentos e detergentes
Polímeros	Polimerização	Espuma poliuretano
Ácido ascórbico	Síntese	Vitamina C
Galacto-oligosacarídeos	Reação de transgalactosilação	Alimentos prebióticos
Galactose	Reação de hidrólise seguida de fermentação da glicose	Substituto de sorbitol

(Fonte: DOMINGUES, 2001).

A Figura 2 representa uma possível via de valorização do soro de queijo utilizada pelas indústrias.

**Figura 2.** Via de valorização e utilização do soro de queijo pelas indústrias.



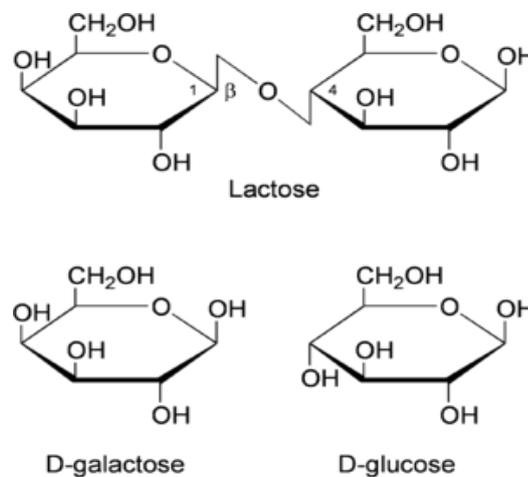
(Fonte: Adaptação ZOPPELLARI, 2013).

### 3.2.4. Lactose

A lactose é o principal carboidrato do leite de todos os mamíferos, sendo formado nas glândulas mamárias a partir da glicose do sangue (ANDRADE, 2005). É um dissacarídeo (presente também no soro de queijo) responsável por 40% do total de sólidos do leite. Nos leites desengordurados corresponde a 45% dos sólidos totais, já no soro é o composto sólido em maior quantidade, em torno de 70% em base seca (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; CARMINATTI, 2001).

Quimicamente é constituído por um resíduo D-glicose e outro de D-galactose, unidos por uma ligação  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4) glicosídica, como mostra a Figura 3. Por possuir grupo de hidroxila livre no carbono C anomérico, a lactose é um açúcar redutor e pode reagir com substâncias nitrogenadas, desencadeando a reação de Maillard (SOUZA; ANDRADE; ARAÚJO, 2005).

**Figura 3.** Representação molecular da lactose.



(Fonte: SOUZA et al. 2005).

A lactose apresenta baixa solubilidade e poder adoçante quando comparado com outros açúcares (Tabela 5), o que condiciona a sua aplicação em alimentos, pois altas concentrações apresentam a tendência de se cristalizar, desenvolvendo textura arenosa ou formação de depósitos.

**Tabela 5.** Comparação do poder adoçante de diferentes açúcares.

<b>Açúcares</b>	<b>Poder Adoçante</b>
Sacarose	100
Lactose	16
D- Galactose	32
D- Glicose	74
D- Frutose	173

(Fonte: SOUZA et al. 2005).

A lactose é o principal componente do soro e também um dos principais responsáveis pelas elevadas cargas orgânicas presentes neste produto (usualmente expressas em termos de demanda química de oxigênio e demanda bioquímica de oxigênio) logo, a sua recuperação torna-se fundamental.

### *3.3. Geração de bioprodutos a partir de resíduos agroindustriais*

A produção agrícola nos últimos anos vem se expandindo tanto pela ampliação da área agrícola como pelos avanços da biotecnologia que promovem desenvolvimento na obtenção de novas variedades de plantas, melhoria da qualidade de diversos alimentos e aumento do número de produtos do setor (CONAB, 2012; MENEZES et al., 2012).

Nos últimos anos a agricultura brasileira cresceu, e na mesma intensidade cresceu também a produção de resíduos agroindustriais. Os rejeitos gerados ao longo da cadeia produtiva, apesar de não possuírem valor econômico evidente, podem se tornar uma fonte importante para a produção de novos insumos. Neste sentido, o desenvolvimento e implementação de processos sustentáveis capazes de converter biomassa em produtos com elevado valor agregado tornam-se imprescindíveis para aproveitar resíduos agroindustriais e mitigar os impactos ambientais (MENEZES et al., 2012).

O aproveitamento de coprodutos agroindustriais está diretamente relacionado com o uso da biotecnologia, que engloba conceitos voltados à aplicação em processos biológicos, com o objetivo de criar possibilidades (novos produtos e processos) e resolver problemas ambientais. Está embasada na agricultura, medicina e ciências de alimentos, esta última com infindáveis possibilidades, tais como: novas linhagens microbianas, coprodução, engenharia metabólica, atividades fisiológicas e antimicrobianas de bioprodutos, suplementação de resíduos agroindustriais etc. (ANDRADE, 2013).

Os processos da indústria alimentícia geram resíduos nutricionalmente ricos, como por exemplo, bagaço e melaço de cana de açúcar, manipueira, palha de trigo, cevada, farelos

(arroz, soja, trigo etc.), soro de queijo, dentre outros, que no geral são descartados em cursos de água, queimados, vendidos como suplemento nutricional para ração animal, tratado e descartado adequadamente ou não (ANDRADE, 2013).

No entanto, se tais resíduos fossem utilizados em sistemas biotecnológicos de maneira adequada, provavelmente a indústria ingressaria em um novo mercado, podendo o novo processo tornar-se vantajoso.

Há vários trabalhos relatando a utilização de resíduos agroindustriais em fermentação submersa para produção de bioprodutos de interesse comercial, como por exemplo, Nistschke, Ferraz e Pastore (2004) estudaram a utilização do melaço, soro de queijo e manipueira como substrato para produção de biossurfactantes; Castro et al. (2011) avaliaram a produção de celulase a partir do uso de caldo de cana de açúcar e suco das cascas de abacaxi como meio de cultivo. Já Dareioti et al. (2009) fizeram uma codigestão de água residuária da indústria de azeite de oliva, esterco de vaca líquido e soro de queijo para produção de biogás. Brandão, Esperidião e Druzian (2010) utilizaram o soro de mandioca como substrato fermentativo para biossíntese de goma xantana.

### *3.4. Combustíveis renováveis e a sustentabilidade*

A partir da Revolução Industrial, a utilização de energia pela sociedade passou por uma fase de elevado crescimento, sendo a matéria-prima de origem fóssil a principal fonte geradora de energia, marcando uma modificação de grande importância na história da sociedade (CUSHION; WHITEMAN; DIETERLE, 2010).

O uso de combustíveis de origem fóssil gera grande quantidade de gases responsáveis pelo efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), os quais a concentração vem aumentando gradativamente na atmosfera, levando a mudanças climáticas e ambientais. Os combustíveis fósseis vêm atravessando uma fase delicada, devido ao aumento do preço do petróleo e aos prejuízos causados ao meio ambiente (ESCOBAR et al., 2009).

O desenvolvimento de fontes renováveis e limpas de energia vem recebendo destaque, onde busca-se novas fontes de energia para suprir a demanda exigida pela sociedade. Entre as pesquisas desenvolvidas, a produção de biocombustíveis mostra-se uma opção favorável, sendo que nos últimos anos vários pesquisadores têm se dedicado às pesquisas de produtos renováveis para solucionar problemas relacionados ao aquecimento global, associado com o uso de combustíveis fósseis e a exaustão das reservas dos mesmos (LEITE; CORTEZ,

2012; ESCOBAR et al., 2009). A escassez do petróleo foi prevista várias vezes, como nas décadas de 20, 30 e 40, por intermédio da teoria do pico de petróleo, que se confirmou em 1973 e 1979, com a crise do petróleo. Embora ainda não tenha se esgotado, é fato que o petróleo é um recurso finito (FRIEDRICHS, 2010).

O uso de biocombustíveis apresenta como um dos fatores positivos, o incentivo da agricultura familiar, a diminuição da emissão de gases poluentes e maior estabilidade econômica (LEITE; CORTEZ, 2012).

A preocupação com as mudanças climáticas e as medidas que vêm sendo adotadas no mundo para seu controle, conseqüentemente no decorrer dos anos, deverá ter impacto direto na atividade industrial. Esta perspectiva tem levado ao crescimento de investimento em tecnologias e produtos mais “limpos”, principalmente no setor de energia (COUTINHO; BOMTEMPO, 2011), criando uma aceção ampla de um modo cada vez mais decisivo, impondo que os sistemas energéticos não sejam apenas conceitualmente renováveis, mas também efetivamente sustentáveis. De acordo com a definição de sustentabilidade proposta pela Comissão Brundtland, nos anos 1980, espera-se que os sistemas energéticos sejam capazes de “satisfazer as necessidades das gerações atuais sem comprometer as futuras, atendendo ao equilíbrio social e ecológico”.

Assim, de acordo com Farrell et al. (2006), o principal objetivo do uso do bioetanol como combustível a substituição dos derivados de petróleo, permitindo diminuir a dependência por tais recursos fósseis e reduzir as emissões de gases de efeito estufa. Contudo, a extensão em que um biocombustível pode substituir um combustível fóssil depende essencialmente da maneira como é produzido. Como todas as tecnologias de produção envolvendo o uso de recursos fósseis, o benefício relacionado ao uso de um biocombustível depende da economia efetiva de energia não renovável que ele proporciona quando comparado ao seu equivalente fóssil.

#### *3.4.1. Bioetanol*

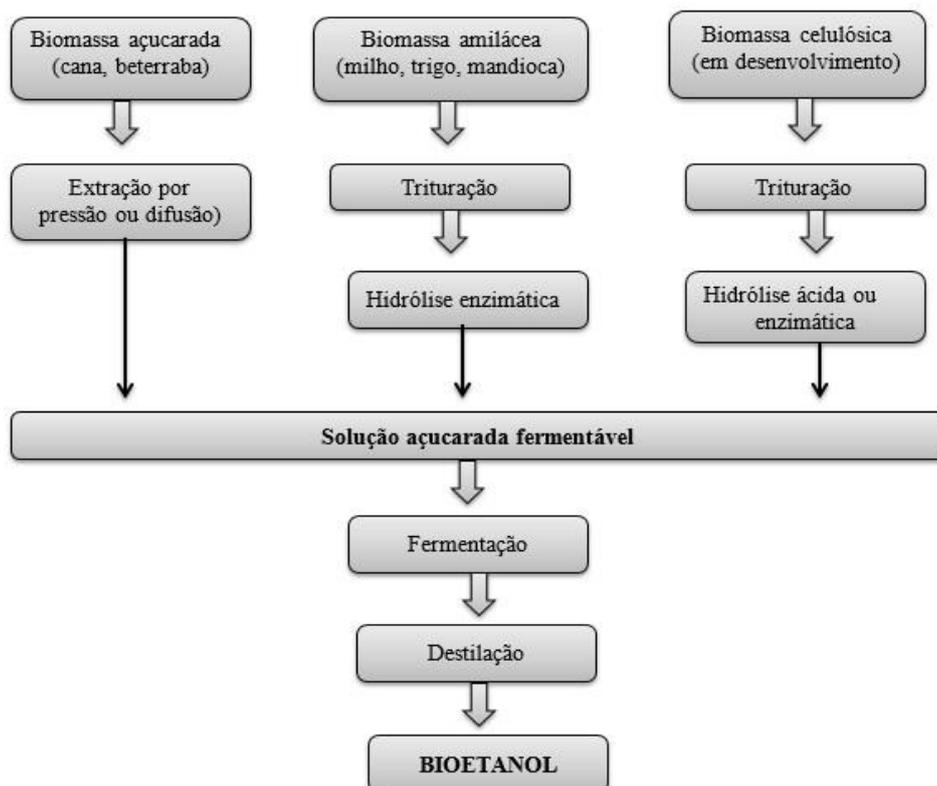
O termo biocombustível refere-se à fonte de combustível gerado a partir de produtos agrícolas, como culturas ou outro material orgânico, obtido a partir de resíduos de outras indústrias. Descreve a soma total de biomassa ou de produtos derivados da biomassa que têm características físico-químicas, tais como para tornar-se utilizável nos processos de combustão ou outro tratamento termoquímico. Os biocombustíveis, de acordo com o seu estado, podem ser classificados em: sólidos (de madeira, palha, peletes etc.), líquidos (óleos vegetais,

álcoois, éteres, ésteres etc.), gasosos (biogás de digestão anaeróbia etc.). Além disso, a produção de energia a partir de biomassa pode ser direta (por exemplo, para a combustão do mesmo) ou como um passo intermediário na conversão de biomassa de outros biocombustíveis (bioetanol, biodiesel, biohidrogênio, biogás) (ZOPPELLARI, 2013).

O bioetanol é produzido em bases comerciais por duas rotas tecnológicas, a partir de matérias-primas ricas em açúcar e amido, como a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) adaptada às regiões temperadas e às áreas tropicais – utilizada no Brasil (segundo maior produtor do mundo) – e a beterraba açucareira (*Beta vulgaris*) cultivada em áreas temperadas, principalmente na Europa (YUAN et al., 2008), ou matérias-primas amiláceas, como o milho (*Zea mays L.*) utilizado nos EUA (maior produtor mundial de bioetanol) e o trigo (*Triticum vulgare Vill.*) (Tabela 6). Sendo que estas duas últimas matérias-primas, o amido presente deve ser convertido em açúcares sacarificado antes da fermentação (TEIXEIRA, 2012; SOCCOL et al., 2005).

Uma terceira rota utilizando a biomassa disponível em materiais como o bagaço e a palha, hidrolisa as cadeias celulósicas e produz uma solução fermentável de açúcares, apresentando grande interesse graças ao baixo custo da matéria-prima. A Figura 4 mostra as rotas tecnológicas existentes para produção de bioetanol.

**Figura 4.** Rotas tecnológicas para produção de bioetanol.

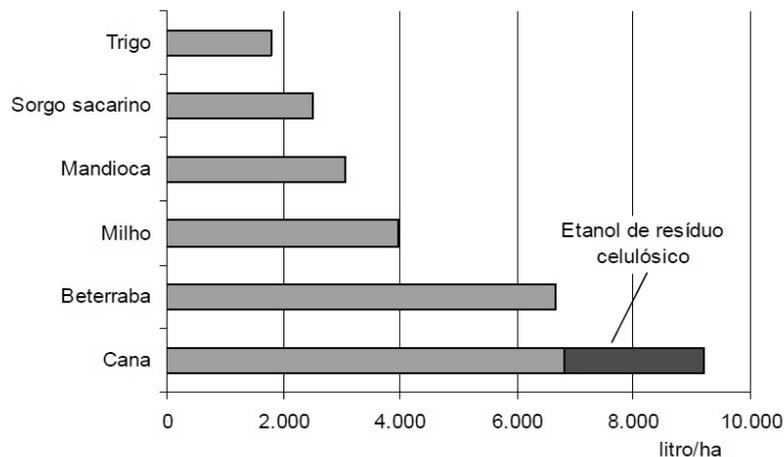


**Tabela 6.** Produção de bioetanol e uso de matéria-prima pelos principais países produtores.

País	Matéria-Prima utilizada	Rendimento etanol (L/hectares)	Quantidade do uso de matéria-prima (%)
Brasil	Cana-de-açúcar	6641	100
USA	Milho	3770	98
	Sorgo	1365	2
China	Milho	2011	70
	Trigo	1730	30
EU -27	Trigo	1702	48
	Açúcar da beterraba	5145	29
Canada	Milho	3460	70
	Trigo	1075	30

(Fonte: TEIXEIRA, 2012).

Em função das diferenças entre a produtividade agrícola e a produtividade industrial, os volumes de bioetanol produzido por unidade de área cultivada variam bastante, conforme demonstra a Figura 5.

**Figura 5.** Produtividade média de bioetanol por área para diferentes culturas.

(Fonte: Relatório executivo BNDES; CGEE, 2008).

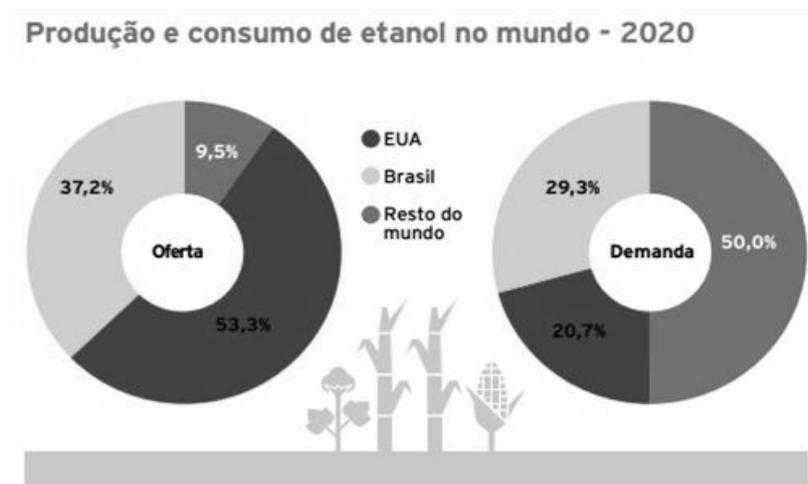
A existência de países com boas condições para a produção sustentável de bioetanol e a necessidade mundial de um combustível renovável e ambientalmente adequado sinalizam perspectivas interessantes para que esse biocombustível seja um produto global.

Como condição fundamental para que se desenvolvam nos próximos anos os potenciais de produção para o mercado global de bioetanol, a política voltada para a ascensão dos biocombustíveis tem sido proposta e implementada em diversos países, em grau variável

de objetividade. Uma análise clara dessas políticas mostra que o aumento da segurança energética e a mitigação de mudanças climáticas estão entre os mais importantes fatores de motivação para programas bioenergéticos na maioria dos países. As questões ambientais estão mais presentes nos países industrializados, enquanto a promoção do desenvolvimento rural é um objetivo relevante para os demais países (Relatório executivo BNDES; CGEE, 2008).

A Figura 6 mostra a perspectiva para produção de bioetanol para o ano de 2020, destacando-se Brasil e EUA, os principais produtores deste segmento.

**Figura 6.** Gráfico da perspectiva de oferta e demanda de bioetanol combustível para o ano de 2020.



(Fonte: ERNST; YOUNG TERCO, 2011).

Para os próximos anos, as projeções da produção de etanol de acordo com Ernst; Young Terco (2011), em função da crescente substituição de fontes fósseis de energia, o consumo de etanol crescerá até 2020, alcançando 2 milhões de boe/dia (barril por dia) ou 177,7 bilhões de litros/ano, um volume 148% superior ao consumido em 2010. À medida que países com demanda incipiente por etanol passam a obter uma fração de sua energia a partir dessa fonte, o resto do mundo (países fora EUA e Brasil) passa a consumir 50% do etanol produzido. Essa nova demanda irá gerar uma expansão na capacidade de produção ao redor do mundo.

#### 3.4.1.1. O bioetanol no Brasil

O Brasil tem uma posição de destaque no cenário mundial do etanol combustível, o país é líder na utilização de matérias-primas renováveis para fins energéticos, a indústria do etanol é referência mundial no setor, sendo um dos primeiros países a criar um programa de

produção de etanol acoplado às usinas de açúcar, com o objetivo de diminuir a preocupante dependência do petróleo e a de incentivar a economia rural. O intuito de reduzir a quantidade cada vez maior de CO<sub>2</sub> lançada na atmosfera foi possível com o avanço do programa Proálcool e o desenvolvimento pelas indústrias. Estimativas apontam que a produção e a queima do etanol de cana geram de 55 a 90% menos dióxido de carbono do que a gasolina (NASCIMENTO et al., 2011).

O Proálcool começou em meados da década de 1970, foi descrito como a resposta à primeira crise do petróleo, bem como uma solução para o problema da flutuação dos preços do açúcar no mercado internacional. O objetivo foi amenizar o consumo de energia, de modo a manter o crescimento econômico através da produção de etanol a partir de biomassa (cana de açúcar, mandioca e sorgo) para substituir a gasolina, sendo que a cana-de-açúcar foi o substrato escolhido para produção de etanol, devido à sua grande adaptação e as condições de solo e do clima brasileiro (SOCCOL et al., 2005).

O conjunto de incentivos adotados pelo Proálcool nessa época se mostrou efetivamente capaz de motivar os agentes econômicos, que incluía segundo Andrade et al. (2009) os seguintes pontos:

**a)** definição de níveis mínimos mais elevados no teor de bioetanol anidro na gasolina, que foram progressivamente elevados até atingirem 25%; **b)** garantia de um preço ao consumidor para o bioetanol hidratado menor do que o preço da gasolina; **c)** garantia de remuneração competitiva para o produtor de bioetanol, mesmo frente a preços internacionais mais atrativos para o açúcar do que para o bioetanol (subsídio de competitividade); **d)** abertura de linhas de crédito com empréstimos em condições favoráveis para os usineiros incrementarem sua capacidade de produção; **e)** redução dos impostos (na venda de carros novos e no licenciamento anual) para os veículos a bioetanol hidratado; **f)** estabelecimento da obrigatoriedade de venda de bioetanol hidratado nos postos; **g)** manutenção de estoques estratégicos para assegurar o abastecimento na entressafra.

Simultaneamente ao desenvolvimento do Proálcool foram surgindo alternativas de produção de etanol, podendo citar como exemplo, a utilização de coprodutos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, trigo, soja e milho, por micro-organismos para a bioconversão dos açúcares destes coprodutos em etanol. Com a perspectiva de crescimento da demanda de álcool combustível como aditivo de função ambiental (pela redução de emissões de CO<sub>2</sub>) em tecnologias capazes de melhorar o desempenho do processo ganharam importância fundamental no país (ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009; SILVEIRA, 2006).

No contexto brasileiro, a produção de bioetanol de cana-de-açúcar é efetuada geralmente em unidades agroindustriais que produzem também açúcar, dando origem a melaços que podem, junto com o caldo de cana, compor mostos fermentáveis, conseguindo uma boa sinergia entre os dois processos produtivos.

#### *3.4.2. Produção de etanol a partir do soro de queijo*

O aumento na produção de queijo exigiu a busca de novas alternativas para utilização do soro, o que significa predominantemente encontrar usos para lactose (GANZLE; HAASE; JELEN, 2008). Em paralelo a isto, a preocupação em obter fontes alternativas de energia tem sido amplamente pesquisada, incentivando estudos para novas rotas tecnológicas para obtenção de etanol.

O excedente de soro, resultante da produção de queijo, é uma fonte barata de biomassa para obtenção do etanol combustível, que além disso pode ser fonte de diversos outros produtos devido à presença das proteínas. Uma planta de produção de etanol de soro de queijo pode ser sustentável na medida em que se pode obter diversos produtos, matérias-primas para outros processos e que, o próprio resíduo gerado, possa ser reaproveitado no próprio processo produtivo. Nesse contexto, o conceito de biorrefinaria tem grande importância para a implementação de processos produtivos sustentáveis (FORTUNATO, 2012).

O princípio de conversão microbiológica de substratos em energia consiste no transporte da fonte de carbono para a célula e sua degradação a moléculas mais simples. A maioria dos micro-organismos possui quatro vias metabólicas consideradas principais para converter carbono e oxigênio em novas células e energia sob qualquer nível de oxigênio. Quando na ausência de oxigênio ocorre a fermentação levando a produção de etanol (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010; ZHANG; LYND 2010).

A fermentação da lactose do soro de queijo em etanol, em particular utilizando leveduras, foi muitas vezes referida na literatura desde 1940 (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010; GRBA et al., 2002). O teor relativamente elevado de lactose presente permite a bioconversão em etanol, de acordo com a reação, na qual se obtém um rendimento alcoólico teórico de 0,5368 g de etanol por grama de lactose consumida (SANSONETTI et al., 2009).

Assim, para obter uma produção de etanol viável economicamente, é necessário iniciar a fermentação com uma concentração de lactose alta, que pode ser obtida através de

processos como a ultrafiltração do soro de queijo ou osmose reversa (KARGI; OZMIHICI, 2006; OZMIHICI; KARGI, 2007); porém, por se tratar de processos caros, uma alternativa é a utilização de soro em pó que fornece excelente fonte de nutriente concentrado e melhora a economia do processo fermentativo, ou adição de outros substratos ricos em açúcares. No entanto, há necessidade de controlar a entrada de açúcar no meio fermentativo, pois o mesmo também pode causar efeito da pressão catabólica pela levedura, inibindo seu consumo de lactose (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010).

Para obter uma boa utilização da lactose do soro do leite é importante escolher uma linhagem de levedura com as características fisiológicas adequadas (ZAFAR; OWAIS, 2005).

A presença da lactose como único carboidrato fermentável limita a sua utilização em fermentação seletiva (ZAFAR; OWAIS, 2005). Apesar das leveduras que assimilam lactose aerobiamente serem muito disseminadas, não são muitas cepas capazes de fermentar-la em etanol (KARGI; OZMIHICI, 2006; GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010).

Os micro-organismos capazes de metabolizar a lactose são aqueles que apresentam dois genes *LAC12* e *LAC4*, que são responsáveis pela codificação das enzimas lactose-permease que atuam como intermediárias do transporte da lactose através da membrana citoplasmática para o interior da célula e a  $\beta$ -galactosidase, que é responsável pela hidrólise da lactose (dissacarídeo) em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose (GABARDO, 2011; GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010; RUSSEL, 1986). Essas duas fontes de açúcar são metabolizadas pela via glicolítica (Embden–Meyerhof–Parnas); contudo, antes de participar dessa rota metabólica, a galactose é convertida no intermediário glicolítico glicose-6-fosfato através da via Leloir, pela ação de três enzimas (galactocinase, galactose-1-P uridiltransferase e UDP-galactose 4-epimerase) (GABARDO, 2011).

Na produção de etanol a partir do soro de queijo, a dificuldade está na escolha do micro-organismo capaz de fermentar diretamente a lactose presente no soro. Atualmente *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, e *Candida pseudotropicalis* são os micro-organismos mais utilizados na fermentação direta, com um rendimento de até 80-85%. Há na literatura uma alternativa, a fermentação indireta, que consiste na hidrólise da lactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase, produzindo açúcares mais facilmente fermentáveis e, conseqüentemente, a fermentação dos monossacarídeos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (KARGI; OZMIHICI, 2006; ANDRADE, 2005), porém, o rendimento é inferior a 50%.

### 3.5. Leveduras não convencionais

É longa a história de associação das leveduras ao desenvolvimento da civilização, englobando o principal grupo de micro-organismos explorado pelo homem. As leveduras têm uma grande diversidade de aplicações industriais, como por exemplo, na indústria alimentar e cervejeira, e são também fornecedores de enzimas, proteínas e componentes químicos. Recentemente, a importância industrial das leveduras também se estendeu ao setor da saúde (biosensores, bioterapêutica, biofarmácia) (WALKER, 1998), estando ainda presentes na área ambiental, como por exemplo, no tratamento de efluentes industriais (CHOI; LEE, 1999).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a estirpe mais conhecida do seu grupo devido à sua vasta utilização, nomeadamente na produção de fermento biológico, de vinho e de cerveja. De fato, os termos “levedura” e *Saccharomyces cerevisiae* são utilizados muitas vezes como sinônimos. No entanto, as leveduras do gênero *Saccharomyces* são uma das poucas leveduras fermentativas que são capazes de se desenvolver em condições de anaerobiose, enquanto que leveduras fermentativas dos gêneros *Kluyveromyces* e *Candida* necessitam de quantidades substanciais de oxigênio para o seu metabolismo (WEUSTHUIS, 1994).

Outras leveduras, além da *Saccharomyces cerevisiae*, têm ganhado interesse industrial na biotecnologia moderna. Na Tabela 7 estão alguns exemplos de aplicações industriais de leveduras.

**Tabela 7.** Aplicação de diferentes leveduras na biotecnologia industrial.

Levedura	Aplicações biotecnológicas
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Biomassa para rações animais e etanol a partir de soro de queijo.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Biomassa e $\beta$ -gaactosidase.
<i>Candida utilis</i>	Proteína microbiana a partir de licor de sulfito e açúcares da madeira.
<i>Pichia pastoris</i> e <i>Hansenula polymorpha</i>	Proteína microbiana e proteínas recombinantes a partir do metanol.
<i>Candida paraffinica</i>	Proteína microbiana a partir de n-alcanos

(Fonte: Adaptado de LANE; MORRISEY, 2010).

A utilização de leveduras em processos fermentativos e alimentares pelo homem, apesar de casual, tem milhares de anos. Atualmente, a tecnologia de leveduras desenvolveu-se

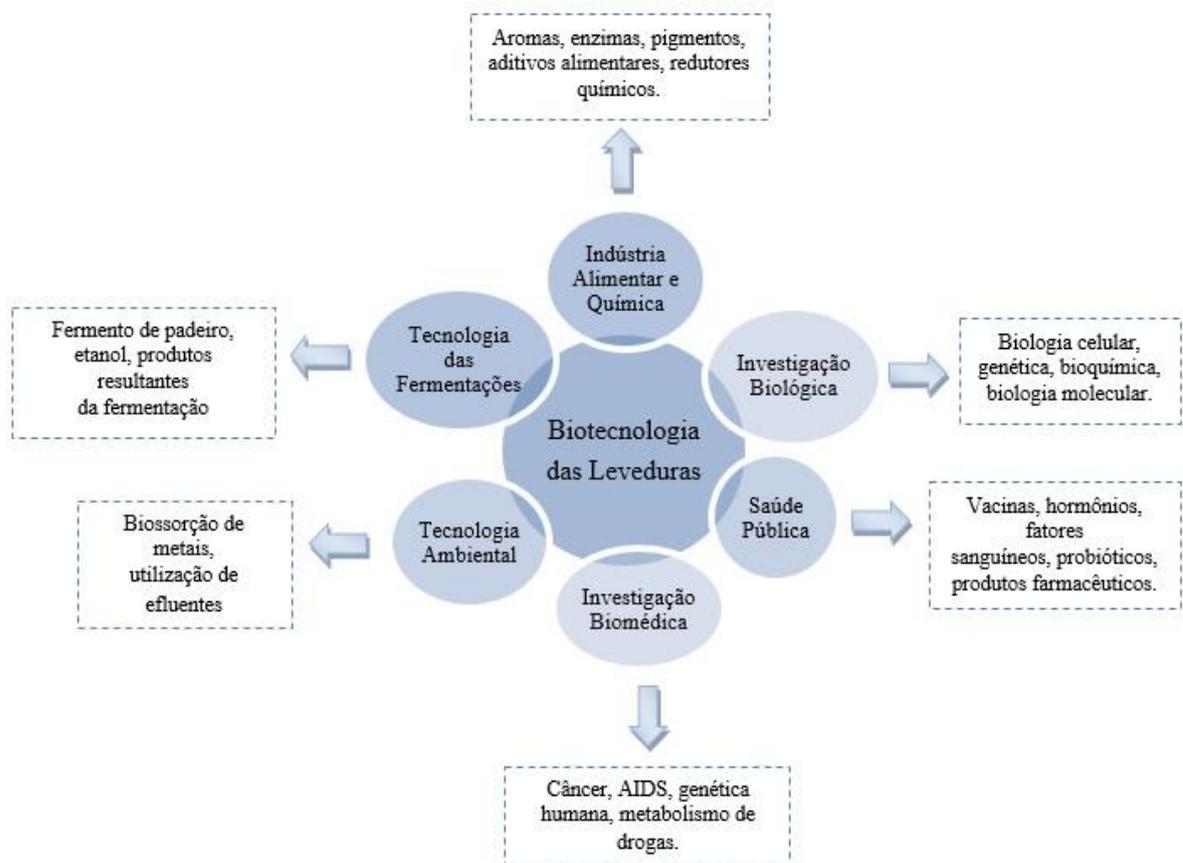
de maneira significativa e deixou de ser limitada a processos fermentativos tradicionais, e passaram a apresentar um papel de extrema relevância na nova biotecnologia.

A biotecnologia das leveduras engloba todos os processos industriais que exploram a atividade destes micro-organismos. Os produtos advindos por tal tecnologia abrangem diversos setores, tais como: alimentar, químico, enzimático, farmacêutico agricultura e meio ambiente (PINHEIROS, 2004; GRBA et al., 2002).

No processo biotecnológico em geral, e particularmente quando se envolve leveduras, a economia do processo é determinante para o sucesso do mesmo. Estudos relatam que podem conseguir um aumento da produtividade global de um processo biotecnológico, através da utilização de linhagens adaptadas e melhoradas, com a utilização de culturas de elevada densidade celular e melhoramento do processo de separação, dando destaque para a utilização de matérias-primas disponíveis que melhoram a economia de um processo (PINHEIROS, 2004; DOMINGUES, 2001).

A Figura 7 ilustra de um modo geral a aplicação biotecnológica das leveduras em diversas áreas científicas.

**Figura 7.** Diversidade de áreas que envolvem a biotecnologia das leveduras



(Fonte: adaptado de PINHEIRO, 2004).

### 3.5.1. Isolamento de micro-organismos

O isolamento de micro-organismos a partir de recursos naturais como o solo, água, plantas etc., sempre foi uma atividade de grande importância para a obtenção de novas linhagens de interesse industrial, que pode conduzir ao isolamento de linhagens melhores produtoras de dado produto, além de poder levar à descoberta de novos produtos de interesse; entretanto, o isolamento deve ter início definindo-se o que pretende-se obter, uma vez que o simples isolamento pode levar à disponibilidade de inúmeras espécies, o que dificulta o processo (BORZANI et al., 2001).

Atualmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal produtora de bioetanol industrial, devido à sua alta de produção de etanol a partir da glicose e sacarose e sua tolerância a este produto gerado. No entanto, várias desvantagens limitam o uso desta levedura na aplicação de bioprocessos industriais para a produção de etanol a partir de biomassa renovável e barata (como lignocelulósicos ricos em inulina) ou outras fontes provenientes da agroindústria, dentre as limitações estão: indisponibilidade do maquinário enzimático necessário, a incapacidade de fermentar açúcar C<sub>5</sub> compostos (por exemplo, xilose) e outros carboidratos como a lactose, além da intolerância a altas temperaturas (BORZANI et al., 2001).

O micro-organismo produtor é o fator mais determinante para o sucesso ou fracasso de um processo fermentativo, assim a cepa ideal deve apresentar características com elevada eficiência na conversão do substrato em produto, ser de fácil cultivo e manutenção, manter constância fisiológica, ser sensível às mudanças induzidas pela exposição controlada a agentes mutagênicos, não ser patogênica, não produzir substâncias incompatíveis com o produto, não exigir condições de processo muito complexas e permitir rápida liberação do produto para o meio (COLEN, 2006; BORZANI et al., 2001).

Neste contexto, a triagem e isolamento de novos micro-organismos, principalmente de novas leveduras, apresentando características inovadoras com maior tolerância térmica, maior tolerância ao etanol e outros inibidores é crucial para desenvolver um bioprocessos consolidado para a produção de bioetanol. No entanto, até o presente momento nenhum micro-organismo ou combinação compatível de micro-organismos apresenta características necessárias para obter maior produção e rendimento de etanol a partir de diferentes fontes de carbono e energia de maneira totalmente eficaz, como o que é obtido pelo processo padrão (*Saccharomyces cerevisiae*) (GIROTO; PIETROWSKI, 2001).

### 3.6. Composição de meios de cultura industriais

A economia dos processos industriais requer que as matérias-primas sejam baratas, o que depende da disponibilidade global e local, que sejam fáceis de armazenar, que tenham uma composição complexa de modo a satisfazerem o maior número possível de necessidades nutricionais do micro-organismo, que não tenham substâncias tóxicas, não provoque problemas na recuperação do produto e não cause dificuldades no tratamento final do efluente. A fonte de carbono é particularmente crítica, pois este elemento constitui cerca de metade do peso seco da biomassa (BORZANI et al., 2001).

Na indústria, recorre-se geralmente ao melaço como principal fonte de carbono ou aos efluentes agroindustriais (soro de queijo, licor de sulfito), ao amido (licor de milho, batata doce) e aos materiais celulósicos (celulose e hemicelulose), que são fundamentalmente utilizados na produção de etanol (WEUSTHUIS, 1994). O açúcar, presente em maior percentagem nestes tipos de meios de cultura complexos, é um oligossacarídeo. Nos melaços da cana do açúcar e da beterraba, a sacarose é o seu principal constituinte. Geralmente, os melaços são utilizados como matéria-prima principal na produção de biomassa, como é o caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e da levedura *Candida utilis*. No caso do soro de queijo, a lactose é o açúcar presente em maior quantidade, existindo apenas alguns micro-organismos capazes de metabolizá-la, como é o caso das leveduras do gênero *Kluyveromyces* (CHOI; LEE, 1999).

#### 3.6.1. Necessidade nutricional das leveduras

Os nutrientes são necessários para o bom desenvolvimento da fermentação, afetando a velocidade e a multiplicação da levedura. A concentração adequada de nutrientes é de grande importância, pois se presentes em quantidades insuficientes ou exageradas, podem refletir de forma negativa sobre o processo fermentativo, deixando a fermentação lenta e tornando a reprodução microbiana impossível (SILVA, 2010; KOTARSKA, 2005).

Além do carbono, oxigênio e hidrogênio, supridos pelos açúcares, outros elementos devem estar presentes normalmente na forma de sais. A Tabela 8 apresenta alguns nutrientes essenciais presentes nos meios de cultivo para os micro-organismos e suas respectivas funções.

Em alguns casos, para suprir necessidades de linhagens mais exigentes e em geral, com características nutricionais desconhecidas, utilizam-se certos componentes complexos, como é o caso do extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, peptona etc. Tais

componentes permitem introduzir no meio de cultivo os fatores faltantes em um meio definido, entretanto, por se tratar de materiais complexos em termos de composição, podem levar a oscilações no processo fermentativo e possíveis dificuldades nas operações de recuperação do produto final, além de se tratar de materiais onerosos (SILVA, 2010; BORZANI et al., 2001).

**Tabela 8.** Elementos nutricionais essenciais para as leveduras e suas funções.

<b>Elemento</b>	<b>Fonte</b>	<b>Funções celulares</b>
Carbono	Açúcares	Estrutura e fonte de energia
Hidrogênio	Prótons provenientes de meio ácido	Força para transporte de prótons através da membrana
Oxigênio	O <sub>2</sub> , ar	Substrato para respiração envolvendo enzimas oxidativas, bem como síntese de ergosterol e outros ácidos graxos insaturados
Nitrogênio	Sais de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , uréia, aminoácidos	Presentes em proteínas, enzimas e ácidos nucleicos
Fósforo	Fosfatos	Estrutura de membrana e ácidos nucleicos
Potássio	Sais de K <sup>+</sup>	Balanço iônico e atividade enzimática
Magnésio	Sais de Mg <sup>2+</sup>	Estrutura celular de organelas e atividade enzimática
Enxofre	Sulfatos	Aminoácidos e vitaminas
Cálcio	Sais de Ca <sup>2+</sup>	Mensageiro na modulação de respostas de crescimento e metabolismo
Cobre	Sais de Cu <sup>2+</sup>	Cofatores de enzimas da cadeia respiratória
Ferro	Sais de Fe <sup>3+</sup>	Citocromos, cofatores de enzimas da cadeia respiratória
Manganês	Sais de Mn <sup>2+</sup>	Atividade enzimática
Zinco	Sais de Zn <sup>2+</sup>	Atividade enzimática
Níquel	Sais de Ni <sup>2+</sup>	Atividade da urease
Molibdênio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Metabolismo do nitrato e vitamina B12

(Fonte: SILVA, 2010).

Por esta questão busca-se encontrar meios de suplementação mais viáveis econômica e nutricionalmente para serem empregados nos processos, como é o caso dos resíduos agroindustriais utilizados como substratos ou suplementos alternativos de baixo custo em processos fermentativos que permitem além de suprir as necessidades nutricionais, ajuda na redução dos custos de produção, minimizando problemas ambientais (MENEZES et al., 2012).

### 3.7. Produção de extrato de levedura

Durante o processo fermentativo, a quantidade de biomassa de levedura gerada é significativa, sendo que esta biomassa apresenta alto valor nutritivo e pode ser ainda reaproveitada na forma bruta (células íntegras de levedura) ou ser processada para obtenção de outros derivados, como autolisados e extratos.

O extrato de levedura apresenta em sua composição proteínas, aminoácidos, fibras, lipídeos, vitaminas do complexo B, ácidos ribonucleicos, nucleotídeos e nucleosídeos, sendo que a composição química do extrato de levedura depende da qualidade e composição da biomassa utilizada e, principalmente, do processo industrial de ruptura celular (DZIEZAK, 1987).

É um aditivo proteico natural amplamente utilizado em substituição ou combinação com o caldo de carne para o enaltecimento de sabores e complementação do valor nutricional de alimentos, além de poder ser utilizado para enriquecer dietas, como fonte proteica na ração animal, na produção de extratos, e assim evitar que se torne um resíduo (PINTO, 2011; GRANGEIRO et al., 2001).

Os extratos de levedura podem ser obtidos pelos métodos de autólise, plasmólise e de hidrólise, mas a prática mais frequentemente utilizada é autólise. A autólise é um processo de degradação efetuada por ativação das próprias enzimas degradativas da levedura, para solubilizar os componentes celulares encontrados no interior da célula (LIU et al., 2015; TANGULER; ERTEN, 2009).

As enzimas de degradação geralmente estão compartimentadas no interior da célula, sendo enzimas hidrolíticas, em especial proteases e nucleases, que quebraram macromoléculas insolúveis como proteínas e ácidos nucleicos para produtos solúveis de péptidos, aminoácidos (principalmente glutamato), nucleotídeos e derivados de aminoácidos (LIU et al., 2015; TANGULER; ERTEN, 2009; NADOGAWITHANA, 1994; REED; NADOGAWITHANA, 1991).

Normalmente são comercializados como líquido, pasta ou pó e produzidos a partir de leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* por autólise, mas outras leveduras, em particular, *Cândida utilis* e *Kluyveromyces marxianus* são também por vezes usadas, por apresentarem rápido crescimento (NADOGAWITHANA, 1992).

Uma vez que a levedura utilizada na indústria apresenta custo relativamente menor, sendo utilizada em grande parte na produção de extratos para satisfazer as necessidades das indústrias alimentícias e de fermentação (STAM; HOOGLAND; LANE, 1998) no Brasil, o

interesse pela produção de extratos de levedura tem sido cada vez mais motivado, sobretudo pela alta disponibilidade de matéria-prima, como resíduo das indústrias de fermentação e pelo crescente mercado de aplicação deste tipo de produto (OLIVEIRA;CASTRO-GÓMEZ, 2005).

### **Estrutura da Tese**

Esta tese está dividida nas seguintes etapas:

- 1- Isolamento e seleção de leveduras provenientes de diferentes tipos de soro de queijo e coalhada;
- 2- Fermentação de coprodutos gerados pelos laticínios (soro de queijo e permeado de soro) em diferentes condições de cultivo (aerobiose, microaerobiose e anaerobiose);
- 3- Suplementação do coproduto que apresentar resultados mais satisfatórios, e sua respectiva condição de cultivo e levedura;
- 4- Planejamento experimental, avaliando as seguintes condições: pH, temperatura e concentração de lactose;
- 5- Aumento da escala de fermentação;
- 6- Produção de extrato de levedura, e comparação com o extrato comercial.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Isolamento de leveduras a partir do soro de queijo e coalhada

#### 4.1.1. Meios de cultura para isolamento

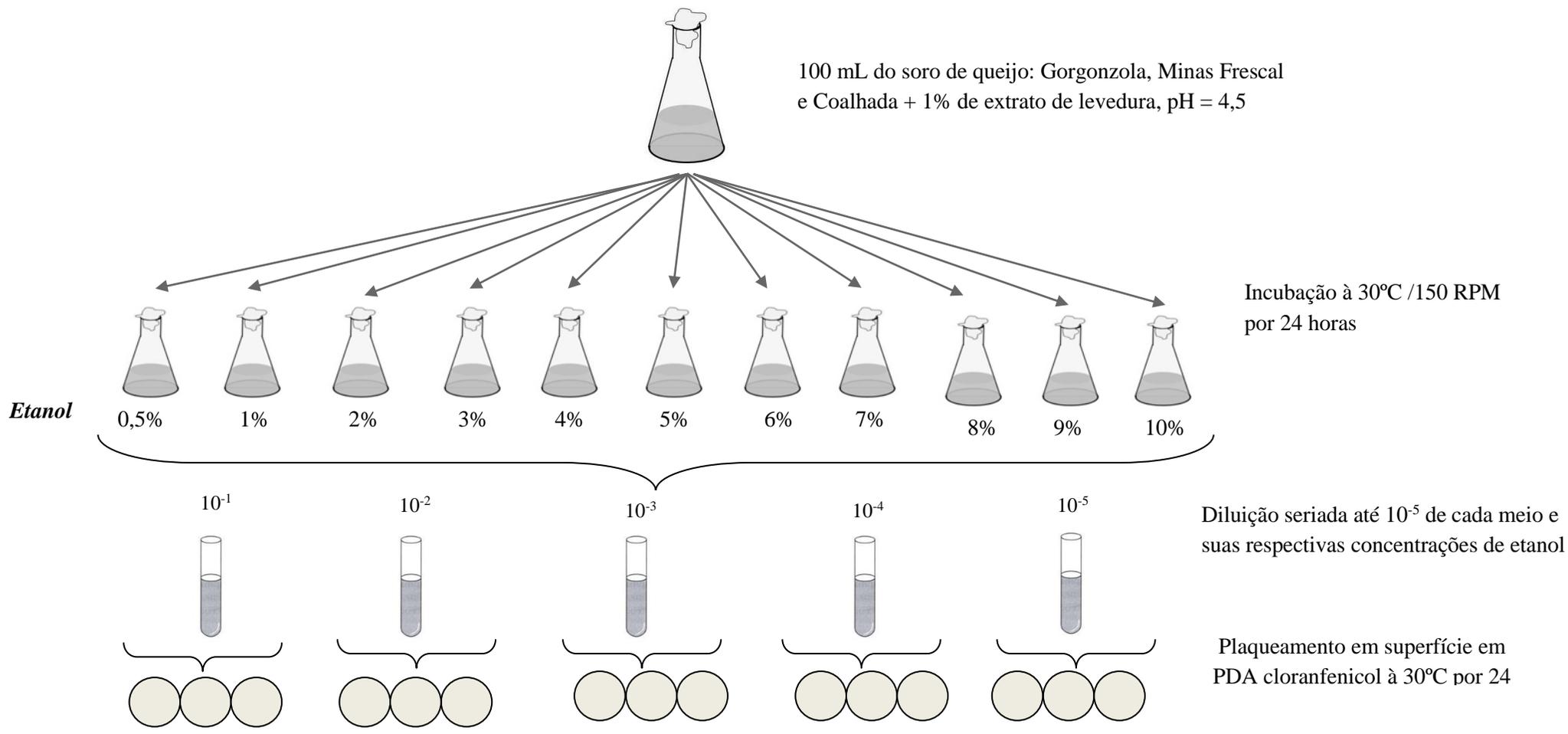
Foram utilizadas três matérias-primas para o isolamento das leveduras: o Soro de Queijo obtido da produção do queijo Gorgonzola, fornecido por um laticínio localizado em Frutal (MG); a coalhada utilizada como alimento para bovinos, fornecido pela Universidade de Marília; e o Soro de Queijo obtido da produção de queijo Minas Frescal, produzido artesanalmente. Após a obtenção dos soros de queijo e da coalhada, e a correção do pH com HCl 2N para 4,5 foram adicionados 100 mL dos soros em frascos Erlenmeyers esterilizados contendo  $1\text{g.L}^{-1}$  (1%) de extrato de levedura cada.

Para realizar o isolamento de leveduras aptas a desenvolverem-se, fermentar o soro de queijo e resistir ao etanol, foram adicionadas diferentes concentrações de álcool etílico P.A. no meio, em % (v/v), 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0. Após esta etapa, os meios foram incubados em *shaker* a 150 rpm e 30 °C por 24 horas. Antes de realizar o plaqueamento por superfície em meio PDA (Potato Dextrose Ágar) cloranfenicol, cada meio (soro de queijo Gorgonzola, Minas Frescal e Coalhada), em suas diferentes concentrações de etanol, passou por diluição seriada em água peptonada 0,1% ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ).

Para cada diluição, foram empregadas três placas de Petri contendo o meio PDA cloranfenicol 200 ppm, conforme metodologia descrita por Moraes (2012). Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa de DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) a 30 °C por 24 horas. As leveduras desenvolvidas e selecionadas no meio PDA cloranfenicol na diluição de  $10^{-5}$  passaram pelo teste de verificação de crescimento em meios com lactose, como única fonte de carbono, com o intuito de isolar apenas as que utilizem este dissacarídeo. A Figura 8 mostra o esquema de isolamento que foi utilizado no presente trabalho.

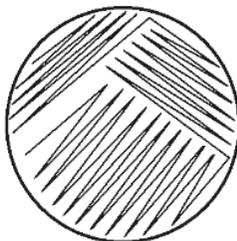
#### 4.1.2. Teste de utilização de lactose

As linhagens selecionadas em PDA cloranfenicol foram inoculadas em 100 mL de meio estéril composto por: lactose (3%), extrato de levedura (1%);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,05%);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05%);  $\text{MgSO}_4$  (0,05%) e incubadas a 30°C, 150 rpm por 24 horas. Posteriormente foi realizado o esgotamento por estria em meio YNB (Yeast Nitrogen Base), modificado com a adição de sulfato de amônio (0,05%), lactose (5%) e ágar bacteriológico (2%).



**Teste de Utilização de Lactose**

Linhagens seleccionadas  $10^{-5}$  → inoculadas em meio lactose e incubadas à 30°C, 150 rpm por 24 horas



Meio seletivo LYNB (Lactose Yeast Nitrogen Base) 24 - 48 horas a 30°C.



Manutenção em PDA cloranfenicol (*slant*), sobre refrigeração 5°C

#### 4.1.3. Identificação da levedura

Com base nos resultados obtidos no item 4.1.2, a melhor cepa de levedura selecionada passou por uma análise de DNA (PCR) feita pela Micoteca URM - Universidade Federal de Pernambuco, onde este micro-organismo foi identificado e armazenado, estando disponível para qualquer pesquisador (Anexo 1).

#### 4.1.4. Meio de cultura e manutenção dos micro-organismos

##### 4.1.4.1. Manutenção da cultura estoque

As leveduras isoladas e a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 (fornecida pelo Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro -SP), foram propagadas em tubos de ensaio com tampão de algodão no meio PDA, a 30 °C, por 24 horas, e posteriormente os tubos foram mantidos em refrigerador a 5 °C.

##### 4.1.4.2. Padronização do inóculo

Um volume de 8 mL da cultura estoque (que corresponde a um inóculo com densidade óptica de 0,8, medida a 600 nm) foi transferido para cultivo, cuja composição do meio está descrita na Tabela 9. Os cultivos foram conduzidos em incubadoras a 150 rpm e temperatura a 30°C por 24 horas para produção do inóculo. Após este período, 10 mL de cada cultura foram centrifugados a 3000 rpm por 20 minutos. O sedimento de células foi lavado duas vezes em água peptona 0,1%, antes de ser adicionado aos meios de cultivo (MURARI et al., 2013 adaptado de SILVEIRA et al., 2006).

**Tabela 9.** Composição do meio de cultivo utilizado para a padronização do inóculo das leveduras.

Compostos	Concentração (% p/v)
Lactose	3,0
Extrato de Levedura	1,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
MgSO <sub>4</sub>	0,1
CaCl <sub>2</sub>	0,2

## *4.2. Meio de fermentação*

### *4.2.1. Preparo do soro de queijo e permeado de soro para fermentação*

Foi utilizado o soro de queijo em pó, sendo que o mesmo foi reconstituído em água destilada até atingir concentração de aproximadamente 50 g.L<sup>-1</sup> (valor este que representa o valor teórico presente no soro de queijo obtido após a dessoragem do queijo pelos laticínios). Posteriormente, o soro foi esterilizado em autoclave sob vapor fluente por 10 minutos. Foi empregada esta técnica de esterilização, pois a autoclavação normal (121°C por 15 minutos) levaria à caramelização e/ou precipitação das proteínas do soro, além de poder ocorrer reação de Maillard, conforme observado em estudo anterior (MURARI, 2013).

### *4.2.2. Desproteínização do soro de queijo para a obtenção permeado de soro*

A desproteínização do soro de queijo utilizando o método ácido-térmico e ajuste do pH consistiu em realizar as seguintes etapas: inicialmente o pH do soro foi reduzido para 4,6 (ponto isoelétrico das proteínas) mediante a adição de 20 mL de ácido láctico em 1 litro de soro. Em seguida, este soro foi submetido a aquecimento até 100°C por 5 minutos, ocorrendo assim a formação do aglomerado proteico (FLORENTINO, 2006). O soro foi mantido em repouso até atingir a temperatura ambiente para a separação da proteína por filtração. Em seguida o soro e o permeado de soro foram caracterizados.

### *4.2.3. 1ª Fase do processo - Fermentação do soro de queijo e permeado de soro*

As primeiras fermentações foram feitas sem suplementações, ou seja, somente com os nutrientes desses coprodutos. Inicialmente, todas as fermentações foram conduzidas em regime de batelada, em condições aeróbias, microaeróbias e anaeróbias (sendo realizada análises do oxigênio dissolvido dos meios, para garantir que se encontravam nestas condições citadas). Antes de cada cultivo, as células foram ativadas durante a produção do inóculo, conforme descrito no item 4.1.4.2. Ao longo das fermentações, as amostras dos meios foram retiradas para realizar análises de crescimento populacional por DO a 600<sub>nm</sub>, e posteriormente centrifugadas para obtenção do sobrenadante que foi mantido sob refrigeração para posteriores análises de etanol, consumo de substrato, consumo de proteínas, biomassa e DQO.

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio de cultivo, vedados com tampão de algodão. Uma vez padronizado o inóculo inicial,

(10% adicionados aos meios de cultivo), os frascos foram conduzidos em incubadores rotatórios, em diferentes condições de cultivo: aerobiose (100 rpm), microaerobiose (50 rpm) e anaerobiose (mantido em estufa DBO), sendo todos submetidos à incubação de 30°C por 24 horas.

Foi escolhida essa temperatura para incubação das leveduras a princípio, por normalmente se tratar de um valor utilizado para fermentação alcoólica com linhagens como as empregadas no presente estudo (de acordo com a literatura).

#### 4.2.4. 2ª Fase do processo - Suplementação do meio de cultivo

Nesta fase da pesquisa, foram utilizados os meios de cultivos, as condições de fermentação e as leveduras que apresentaram resultados mais satisfatórios na primeira fase da fermentação (item 4.2.3), sendo realizadas suplementações dos meios com: extrato de levedura (1%); sais (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,05%), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,05%); MgSO<sub>4</sub> (0,06%) e ZnSO<sub>4</sub> (0,06%), sendo que estes valores foram fixos para todos meios.

Tais suplementações foram feitas separadamente e em combinação. Os meios foram denominados conforme descrito na Tabela 10.

**Tabela 10.** Composição dos meios de cultivo a base de soro de queijo para fermentação.

Experimento	Composições dos Meios
Meio 1	Soro de queijo <i>in natura</i>
Meio 2	Soro de queijo <i>in natura</i> + Extrato de levedura
Meio 3	Soro de queijo <i>in natura</i> + Nutrientes (sais: (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> ; ZnSO <sub>4</sub> )
Meio 4	Soro de queijo <i>in natura</i> + Extrato de levedura + Nutrientes (sais (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> ; ZnSO <sub>4</sub> )

Nesta etapa foram analisados a produção etanol e biomassa, consumo de substrato e proteína e DQO.

#### 4.2.5. 3ª Fase do processo - Melhoramento do meio de cultivo e validação do processo

Após a segunda fase da pesquisa foi realizada a fase de melhoramento das condições de cultivo no processo, utilizando como base o meio suplementado que apresentou resultados mais eficazes quanto ao tempo e produção de etanol.

Assim, a melhoria do processo (produção de etanol, rendimento e produtividade) foi avaliada segundo um delineamento composto central rotacional, com três repetições no ponto central.

A Tabela 11 mostra os tratamentos que foram realizados, evidenciando os níveis testados dos fatores temperatura, pH e concentração de lactose. Os resultados encontrados foram avaliados por meio de regressão linear testando o modelo quadrático completo com interação. Foram eliminados do modelo os parâmetros não significativos pelo teste *t* de *Student*, a um nível de 5% de significância.

**Tabela 11.** Variáveis utilizadas na fermentação do soro de queijo.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	30	31,3	33	34,7	36
pH	4,0	4,4	5,0	5,6	6,0
Lactose (g.L <sup>-1</sup> )	50	54	60	66	70

**Tabela 12.** Matriz do planejamento fatorial completo.

Experimento	X1	X2	X3	Temperatura (°C)	pH	Lactose (g.L <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	34,7	5,6	66
2	1	1	-1	34,7	5,6	54
3	1	-1	1	34,7	4,4	66
4	1	-1	-1	34,7	5,6	54
5	-1	1	1	31,3	4,4	66
6	-1	1	-1	31,3	4,4	54
7	-1	-1	1	31,3	5,0	66
8	-1	-1	-1	31,3	5,0	54
9	1,68	0	0	36	5,0	60
10	-1,68	0	0	30	5,0	60
11	0	1,68	0	33	5,0	60
12	0	-1,68	0	33	5,0	60
13	0	0	1,68	33	5,0	70
14	0	0	-1,68	33	5,0	50
15	0	0	0	33	5,0	60
16	0	0	0	33	5,0	60
17	0	0	0	33	5,0	60

\*X1: temperatura, X2: pH e X3: lactose

Após o melhoramento do processo, foi realizada a validação das condições obtidas para as variáveis de produção de etanol, produtividade e rendimento etanólico. Para tanto, o processo foi conduzido conforme descrito anteriormente no item 4.2.4.

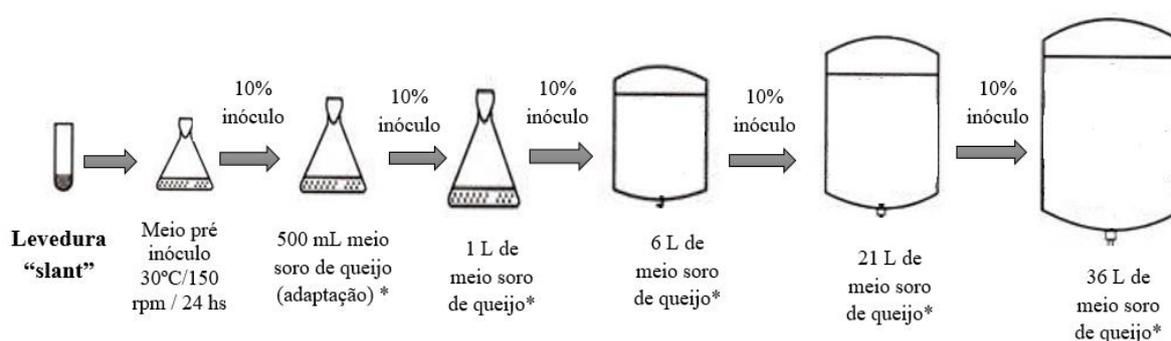
#### 4.2.6. Ampliação de escala do processo

Após o melhoramento das condições de cultivo (item 4.2.5), realizou-se a ampliação da escala do processo fermentativo (com as melhores condições estabelecidas a partir do melhoramento), sendo que o mesmo foi ampliado em 6 vezes em relação ao seu volume inicial, onde os meios, à base de soro de queijo foram estudados nos seguintes volumes: 1 litro, 6 litros, 21 litros e 36 litros, com agitação natural pela formação de CO<sub>2</sub>.

Inicialmente, foi realizada a padronização do inóculo, conforme descrita no item 4.1.4.2, sendo que, 10% do volume de 500 mL foi adicionado ao meio fermentativo, para melhor adaptação da levedura ao substrato, antes de seguir para ampliação. Em seguida, 10% do volume de 1 litro foi adicionado ao meio de cultivo, e assim em diante até os 36 litros finais fermentados, conforme ilustrado na Figura 9.

Uma adaptação com bomba peristáltica para retirada das amostras a cada 2 horas para análises de lactose, proteína solúvel, etanol, biomassa e DQO, foi acoplada aos reatores durante a fermentação de 18 horas, com o objetivo de evitar contaminação.

**Figura 9.** Esquema de ampliação de escala realizada no presente estudo.



\* Condições de cultivo obtido após o melhoramento (otimização) das condições de cultivo.

#### *4.2.7. Produção de extrato de levedura*

##### *4.2.7.1. Processo de autólise*

O processo de autólise foi utilizado para o rompimento das células e obtenção do extrato de levedura, que contém os componentes solúveis e nutrientes da célula. Primeiramente centrifugou-se a biomassa na concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> por 20 minutos, a 3000 rpm na proporção 1:1 biomassa/água destilada esterilizada para a lavagem das células. Repetiu-se duas vezes esse procedimento. Posteriormente foram adicionados 7% de etanol e 2% de NaCl e colocados em incubadora por 24 horas a 55 °C e 130 rpm. Em seguida, realizou-se a pasteurização do autolisado em banho-maria a 85 °C por 15 minutos (SGARBIERI, 1999).

Após a pasteurização, centrifugou-se por 15 minutos a 3000 rpm para separação dos componentes solúveis e o precipitado foi descartado. Concentrou-se em rotavaporizador por 1 hora a 80 °C. Após o esfriamento, congelou-se a amostra no ultrafreezer e realizou-se a secagem no liofilizador por dois dias, obtendo dessa forma o extrato.

##### *4.2.7.2. Fermentação do soro de queijo com extrato produzido e comercial*

Após a obtenção do extrato, suplementou-se o meio de soro de queijo com 1% do mesmo, e conduziu-se a fermentação com 10% de inóculo padronizado (item 4.1.4.2) nas condições de cultivo estabelecidas com o melhoramento do processo realizado anteriormente (item 4.2.5), em 20 horas de fermentação. Simultaneamente à fermentação com extrato produzido, foi realizada a fermentação do meio com extrato comercial, para comparação entre ambos. Alíquotas dos meios foram retiradas para análise de etanol, biomassa, lactose, proteína e DQO.

#### *4.3. Métodos analíticos*

##### *4.3.1. Determinação da relação entre massa celular seca e densidade óptica*

As leveduras estudadas foram ativadas para a produção do inóculo conforme descrito no item 4.1.4.2. Posterior à padronização do inóculo inicial em D.O. 600 nm de 0,8 em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL do meio de cultivo à base do soro de queijo, com concentração inicial de lactose de 50 g.L<sup>-1</sup>, as culturas foram inoculadas separadamente, e conduzidas para incubação a 150 rpm por 24 horas a 30 °C. Após 24 horas, as células ativadas foram separadas por centrifugação a 3000 rpm, por 20 minutos, e utilizadas para o preparo de

suspensão em 5 mL de água destilada. Foram retiradas alíquotas da suspensão para determinação de massa seca à 105 °C por 24 horas, conforme metodologia descrita pela AOAC (2005). Uma amostra de 1 mL da suspensão foi utilizada para a realização das seguintes diluições:  $2 \times 10^{-2}$ ,  $3 \times 10^{-2}$ ,  $4 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-2}$  e  $6 \times 10^{-2}$ . A regressão linear entre absorbância e massa seca celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) permitiu a determinação da massa celular seca correspondente a uma unidade de D.O. a 600 nm (Apêndice I) (SILVEIRA, 2004).

#### 4.3.2. Multiplicação celular

A multiplicação dos micro-organismos foi estimada pela medida da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm. O valor da D.O. foi convertido em massa celular, de acordo com a relação obtida no item 4.3.

Produtividade celular:

$$Q_x = \frac{X_f - X_0}{t_f} (\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (1)$$

Onde:  $X_f$  = concentração de biomassa final ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $X_0$  = concentração de biomassa inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $t_f$  = tempo de fermentação (horas),  $Q_x$  = produtividade em biomassa ( $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

Conversão substrato em biomassa:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_t - S_f} (\text{g.g}^{-1}) \quad (2)$$

Onde:  $X_f$  = concentração de biomassa final ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $X_0$  = concentração de biomassa inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $S_t$  = concentração de substrato total ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $S_f$  = concentração de substrato final ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $Y_{X/S}$  = fator de conversão substrato em biomassa ( $\text{g.g}^{-1}$ ).

Conversão proteína em biomassa:

$$Y_{X/P} = \frac{X_f - X_0}{P_t - P_f} (\text{g.g}^{-1}) \quad (3)$$

Onde:  $X_f$  = concentração de biomassa final ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $X_0$  = concentração de biomassa inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $P_t$  = concentração de proteína total ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $P_f$  = concentração de proteína final ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $Y_{X/P}$  = fator de conversão substrato em biomassa ( $\text{g.g}^{-1}$ ).

#### 4.3.3. Proteína total da biomassa de leveduras

A análise de proteína celular foi realizada conforme metodologia de Kjeldahl descrita pela AOAC (2005), consistindo em digestão, destilação e titulação das amostras de levedura.

Cálculo de quantificação de proteína intracelular:

$$\%NT = \frac{(A-B) * Ci * Fc * 1,4}{0,2} \quad (4)$$

Onde: % NT= teor percentual (m/v) de nitrogênio total; A= volume gasto na titulação da amostra; B= volume gasto na titulação do branco; Ci= concentração da solução de ácido clorídrico; Fc= fator de correção para a solução de ácido clorídrico; g= porção alíquota da amostra (0,2 g<sup>-1</sup>).

#### 4.3.4. Viabilidade celular

A viabilidade celular das leveduras durante a fermentação foi realizada usando a técnica de coloração com solução corante azul de metileno (g.L<sup>-1</sup>): citrato de sódio dihidratado (20); azul de metileno (0,1). Uma parte da amostra (0,5 mL) foi misturada a uma parte da solução de corante (0,5 mL) para a observação microscópica e para contagem de células vivas e mortas em câmara de Neubauer.

Cálculo viabilidade celular:

$$Viabilidade = \frac{CV * 100}{CV + CM} (\%) \quad (5)$$

Onde: CV= número total de células vivas; CM= número total de células mortas.

#### 4.3.5. Caracterização do soro de queijo e permeado de soro

Com o objetivo de conhecer a concentração dos componentes do soro de queijo, foi realizada a caracterização físico-química na sua forma *in natura* e desproteinizada, conforme descrito nos itens a seguir. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.3.6. pH

Utilizou-se o método eletrométrico baseado na determinação da concentração hidrogeniônica através de potenciômetro previamente calibrado com as soluções tampões de pH 4,0 e pH 7,0.

#### 4.3.7. Extrato seco total

O extrato seco total foi determinado através da secagem direta do soro em estufa a 105 °C até peso constante (IAL, 2008).

#### 4.3.8. Cinzas

O teor de cinzas foi quantificado por gravimetria. A primeira fase da determinação consistiu na carbonização da matéria orgânica, realizada em Bico de Bunsen, e a segunda fase na incineração em forno mufla a 550°C por 5 horas até obter uma cinza de cor clara. Em seguida, a amostra incinerada foi resfriada em dessecador e pesada (IAL, 2008).

#### 4.3.9. Gordura

Determinou-se o teor de gordura através do método de Gerber, que consiste na quebra da emulsão do leite através da centrifugação após digestão do material proteico com ácido sulfúrico (P.A.) e álcool isoamílico concentrado. A leitura do percentual de gordura é realizada de forma direta na escala do butirômetro de Gerber (IAL, 2008).

#### 4.3.10. Lactose

A análise de consumo de carboidrato foi realizada através da técnica de ADNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959), que mediu o teor de açúcares redutores. Tal técnica constituiu em retirar 0,5 mL da amostra diluída e adicionar o volume igual de solução de DNS nos tubos de ensaio, que foram fervidos durante 5 minutos. A amostra foi resfriada e em seguida foram adicionados 4 mL de água destilada. Simultaneamente foi feita uma curva de calibração com diferentes concentrações de lactose (Apêndice I). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

Cálculo do consumo de carboidratos:

$$\% \text{ consumo de lactose} = \frac{(S_t - S_f) * 100}{S_t} (\%)$$

(6)

Onde:  $S_f$ = concentração substrato final ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $S_t$ = concentração substrato total ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

#### 4.3.11. Proteína

Foi realizada através do método de Lowry (HÁRTRE, 1972), que mediu a concentração de proteínas presente no soro. Para tanto, foi preciso retirar 1 mL da amostra de soro e adicionar 0,9 ml da solução A (constituída de tartarato de sódio e potássio e carbonato de sódio anidro), seguido de tratamento em banho maria a 50 °C por 10 minutos, onde após resfriamento foi adicionado 0,1 mL da solução B (constituída de tartarato de sódio e potássio e sulfato de cobre pentahidratado) deixando em repouso por 10 minutos, adicionando posteriormente 3 mL da solução C (Folin-Ciocalteu), deixando em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Realizou-se, por fim, a leitura em espectrofotômetro a 620<sub>nm</sub>, sendo feita simultaneamente uma curva de calibração com diferentes concentrações de albumina bovina (Apêndice I).

Cálculo do consumo de proteínas:

$$\% \text{ consumo de proteínas totais} = \frac{(P_t - P_f) * 100}{P_t} (\%) \quad (7)$$

Onde:  $P_f$ = concentração de proteína final ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $P_t$ = concentração de proteína total ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

#### 4.3.12. Etanol

O etanol foi determinado por cromatografia gasosa, após separação das células por centrifugação, utilizando Cromatógrafo - HP-5890 Série II - detector FID (Flame Ionization Detector), coluna – HP-FFAP (25 m x 0,2 mm x 0,3  $\mu\text{m}$ ); temperatura do forno de 70 °C (mantendo esta temperatura por toda corrida - isotérmica); tempo da corrida de 3,2 min; temperatura do injetor de 250 °C; temperatura do detector de 250 °C; injeção de 40  $\mu\text{L}$  de

vapor da amostra. As amostras foram deixadas em “dry block” a de 40 °C (até atingir o equilíbrio).

Cálculos relacionados à produção etanólica:

Fator de conversão substrato em etanol

$$Y_{P/S} = \frac{E_f - E_0}{S_t - S_f} \text{ (g.g}^{-1}\text{)} \quad (8)$$

Onde:  $E_f$ = concentração de produto final (g.L<sup>-1</sup>);  $E_0$ = concentração de produto inicial (g.L<sup>-1</sup>);  $S_t$ = concentração de substrato total (g.L<sup>-1</sup>);  $S_f$ = concentração de substrato final (g.L<sup>-1</sup>);  $Y_{P/S}$ = fator de conversão substrato a produto (g.g<sup>-1</sup>).

Produtividade volumétrica de etanol

$$Q_P = \frac{E_f - E_0}{t_f} \text{ (g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} \quad (9)$$

Onde:  $E_f$  = concentração de produto final (g L<sup>-1</sup>);  $E_0$  = concentração de produto inicial (g.L<sup>-1</sup>);  $t_f$  = tempo total de fermentação (horas);  $Q_P$  = produtividade em etanol (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

Rendimento etanólico (%)

$$\eta = \frac{(E_f - E_0) * 100}{(S_t - S_f) * 0,5368} \text{ (%) } \quad (10)$$

Onde:  $E_f$ = concentração de produto final (g.L<sup>-1</sup>);  $E_0$ = concentração de produto inicial (g.L<sup>-1</sup>);  $S_t$ = concentração de substrato total (g.L<sup>-1</sup>);  $S_f$  = concentração de substrato final (g.L<sup>-1</sup>); 0,5368 = estequiometria para conversão da lactose em etanol.

#### 4.3.13. Determinação da demanda química de oxigênio

Para realização das análises de DQO, foi utilizado o método colorimétrico de refluxo fechado, utilizando um digestor e espectrofotômetro a 620<sub>nm</sub>, aparelho da Hach Co., segundo metodologia da APHA (1995).

Cálculo de eficiência na redução de DQO:

$$\% \text{ redução} = \frac{(DQO_{inicial} - DQO_{final}) * 100}{DQO_{inicial}} \quad (11)$$

#### 4.4. Análise dos resultados

Para os experimentos realizados em triplicata, os dados amostrais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey e Kramer através do programa GRAPHPAD INSTAT (Rutgers University, Camden, New Jersey). Os tratamentos foram considerados significativos para  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Parte 1- ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS

A Tabela 13 mostra o número de colônias de leveduras obtidas na primeira etapa de isolamento, na qual utilizou-se o soro de queijo ou de coalhada com diferentes concentrações de etanol e que foram isoladas em meio seletivo PDA cloranfenicol.

**Tabela 13.** Número de unidades formadoras de colônias (UFC) isoladas do soro de queijo gorgonzola, coalhada e minas frescal obtidas da diluição seriada de  $10^{-5}$  em meio PDA cloranfenicol.

Etanol (%)	Soro Gorgonzola	Coalhada	Soro Minas Frescal
0,5	10	9	5
1	8	7	3
2	7	6	2
3	5	4	1
4	3	3	-
5	2	3	-
6	-	2	-
7	-	2	-
8	-	1	-
9	-	-	-
10	-	-	-

Optou-se em selecionar as leveduras que cresceram na diluição de  $10^{-5}$  e em maior concentração de etanol.

#### 5.1.1. Isolamento de leveduras capazes de utilizar a lactose

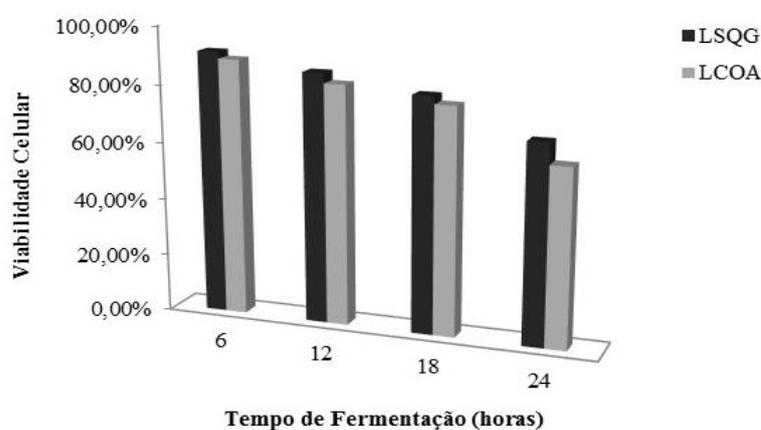
As duas colônias de leveduras que cresceram no soro de gorgonzola com 5% de etanol, uma da coalhada com 8% de etanol e uma do soro minas frescal com 3% de etanol, na diluição seriada de  $10^{-5}$  foram selecionadas para serem inoculadas em meio líquido à base de lactose, e posteriormente, esgotada por estrias e purificadas em meio YNB Agar modificado.

Nesta etapa foi possível selecionar uma levedura originada do soro de queijo gorgonzola, denominada como LSQG, cuja viabilidade em 24 horas encontrava-se a 68,60% e o número de células por mL em  $8,3 \times 10^6$ , e uma levedura da coalhada, denominada LCOA,

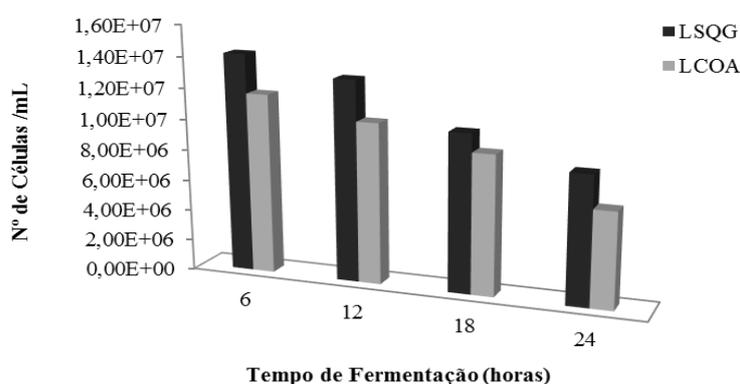
com uma viabilidade em 24 horas de fermentação de 61,40% e número de células de  $6,18 \times 10^6$  (Figura 10 e 11).

A levedura isolada do soro de queijo minas frescal com 3% de etanol não se desenvolveu em meio composto por lactose, e conseqüentemente em YNB, podendo indicar que esta levedura, mesmo estando presente no soro e suportando uma determinada concentração de etanol, não se apresentou apta para a utilização da lactose como fonte de carbono.

**Figura 10.** Viabilidade das leveduras isoladas do soro de queijo gorgonzola e coalhada em meio de lactose na etapa de seleção, em função do tempo de fermentação.



**Figura 11.** N° de células por mL das leveduras isoladas do soro de queijo gorgonzola e coalhada em meio de lactose na etapa de seleção em função do tempo de fermentação.



Apenas alguns trabalhos relatam estudo sobre o isolamento de micro-organismos a partir do soro de queijo capazes de metabolizar a lactose como fonte de carbono e energia. Dartora et al. (2003) estudaram o isolamento e seleção de micro-organismos presentes no soro

de queijo para produção de lipase, em seu trabalho foi possível isolar três leveduras, sendo elas *Cândida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula rubra*. Entretanto, os mesmos autores apenas isolaram as leveduras do soro de queijo *in natura* com posterior inoculação em meio YEPL, sem passar por qualquer meio seletivo. Já Hermes et al. (2013), ao isolarem micro-organismos do soro de queijo com potencial lipolítico para remoção da DQO, obtiveram de tal coproduto após a seleção, dois micro-organismos aptos para tais finalidades; porém, neste caso, os autores isolaram bactérias (não identificadas).

Como a lactose presente no soro de queijo é um dissacarídeo que poucos micro-organismos são capazes de metabolizar e converter em algum produto de interesse industrial como o etanol, enzimas como  $\beta$ -galactosidase, lipase, proteínas, biomassa, entre outros, o isolamento e seleção de micro-organismo, sobretudo leveduras (no caso de produção de etanol), provenientes do próprio soro, representam uma maneira de ampliar as possibilidades de obter linhagens diferentes capazes de metabolizar este substrato e de certa forma também tratá-lo de maneira mais compatível com o meio ambiente.

Através destes resultados, foi possível verificar a seleção de duas leveduras dos soros estudados. Este resultado foi devido às diferentes etapas de isolamento efetuados, sendo que em um primeiro momento, utilizou-se, nos próprios soros dois agentes seletivos, o etanol e o pH 4,5, onde foi possível isolar micro-organismos aptos às condições de fermentação etanólica.

Após esta etapa houve a seleção de leveduras em meio PDA cloranfenicol. O PDA é um meio usado para fungos e não é rico nutricionalmente, impedindo assim o crescimento de bactérias Gram positivas. O cloranfenicol por sua vez é um antibiótico que atua impedindo a síntese proteica em células procarióticas, impedindo o crescimento de bactérias, inclusive Gram negativas.

Para os estudos posteriores do presente trabalho, foi utilizada, além das leveduras isoladas LSQG e a LCOA, a levedura *K. marxianus* CCT 4086, já utilizada em trabalhos anteriores a este, como agente produtor de etanol a partir do soro de queijo, sendo, portanto, um padrão a ser comparado com as leveduras isoladas.

## 5.2. Parte 2- CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO E PERMEADO DE SORO

A caracterização do soro de queijo e do permeado de soro foi realizada com a finalidade de conhecer os seus constituintes e as suas respectivas concentrações. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 14.

**Tabela 14.** Composição centesimal do soro de queijo e do permeado de soro utilizados como meio fermentativo.

Componentes	Soro de Queijo*	Dados da Literatura **	Dados da Literatura ***
Lactose (%)	5,06 ± 0,04	5,10	4,25
Proteínas (%)	0,64 ± 0,03	0,54	1,25
Lipídeos (%)	0,47 ± 0,13	0,10	0,33
Cinzas (%)	0,62 ± 0,04	0,52	0,60
Sólidos Totais (%)	6,58 ± 0,16	6,73	6,43
DQO (mg.L <sup>-1</sup> )	44.700 ± 0,64	54.621	-
pH	6,20 ± 0,20	6,42	6,34
Componentes	Permeado de Soro*	Dados da Literatura **	Dados da Literatura ***
Lactose (%)	5,89 ± 0,18	6,59	3,60
Proteínas (%)	0,30 ± 0,04	0,08	0,33
Lipídeos (%)	0,14 ± 0,03	0,36	Traços
Cinzas (%)	0,43 ± 0,05	0,32	0,50
Sólidos Totais (%)	5,40 ± 0,30	-	4,43
DQO (mg.L <sup>-1</sup> )	55.300 ± 0,37	60.546	-
pH	6,00 ± 0,40	6,11	5,10

\* Média das repetições (autor) \*\* Burlani (2014) \*\*\* Florêncio (2008)

De acordo com a Tabela 14, observa-se que a composição centesimal do soro de queijo e do permeado de soro, obtidos e utilizados no presente estudo, está próxima ao encontrado pela literatura, conforme os resultados obtidos por Burlani (2014) e Florêncio (2008).

Outros autores também estudaram a composição do soro de queijo e do permeado de soro antes do processo fermentativo, tais como Vincenzi et al. (2014), que ao caracterizar o soro de queijo *in natura* para produção de bioetanol, obtiveram os seguintes resultados: 4,47% em relação ao teor de lactose; proteínas 0,49%; cinzas 0,51% e DQO de 51. 948 mg.L<sup>-1</sup>. Já Meneses (2009), também para o soro de queijo, apresentou os seguintes resultados: lactose 5,75%; proteína 0,69%; cinzas 0,63%; lipídeos 0,20%; sólidos totais 6,73%

e pH 5,52. Araújo (2013), para o teor de lactose obteve 3,73%; proteína 2,52%; gordura 0,46%; cinzas 0,41%; sólidos totais 6,90% e pH 6,59.

Para a caracterização da composição do permeado de soro de queijo, Araújo (2013) obteve: lactose 3,22%; proteína 0,65%; gordura 0,06%; cinzas 0,35%; sólidos totais 6,30% e pH 4,55. Barbosa et al. (2010), ao caracterizarem o permeado de soro para produção de aguardente, apresentaram os seguintes resultados: lactose 3,6%; proteína 0,33%; gordura: traços; cinzas: 0,50% e sólidos totais: 4,43% e pH 5,10. Smith (2008), obteve teor de lactose de 4,9%; proteínas 0,1% sólidos totais 5,5%, cinzas 0,5% e lipídeos 0,0.

As diferenças observadas podem ser em virtude do tipo e da qualidade da alimentação oferecida ao gado, o que por sua vez interfere na composição do leite e, conseqüentemente da composição do soro, além do tipo de processo tecnológico empregado, do leite utilizado e do tipo de queijo fabricado (MENESES, 2009).

Em relação ao teor de lactose, principal constituinte do soro de queijo, observa-se nos resultados do presente estudo que este carboidrato no permeado de soro apresentou uma concentração em torno de 14,10% maior que o teor de lactose do soro de queijo *in natura*. Também é observado maior concentração de DQO (compostos orgânicos), onde no permeado de soro esta foi cerca de 19,16% maior do que o encontrado no soro *in natura*. Esta diferença pode estar relacionada com o fato de que, para obtenção do permeado, foi preciso realizar aquecimento do soro de queijo, que resultou em uma concentração da lactose devido à evaporação da água.

O teor de sólidos totais e lipídeos dos meios foi maior para o soro de queijo *in natura*, quando comparado com o permeado de soro (semelhante ao encontrado por Burlani (2014) e Florêncio (2008), cerca de 17,93% e 70,21% respectivamente. Após a precipitação das proteínas pelo método ácido-térmico, observa-se que houve uma significativa redução dos lipídeos no permeado, tendo um resultado satisfatório, visto que a gordura não seria necessária no processo fermentativo, além de ser um dos compostos que mais polui nas indústrias de laticínio quando o soro é descartado sem tratamento prévio.

Já quanto ao teor de proteína, a diferença da mesma entre os dois coprodutos estudados foi maior, onde o teor de proteínas do soro de queijo *in natura* foi 53,12% maior do que o encontrado no permeado de soro. Esta diferença é devida a precipitação de boa parte das proteínas do soro durante o tratamento ácido-térmico que se baseia na adição de ácido orgânico para baixar o pH até o ponto isoelétrico das proteínas e aquecimento a 90 °C (item 4.2.2).

Ao atingir seu pI (ponto isoelétrico), as proteínas apresentam sua mais baixa solubilidade; as interações proteína-proteína aumentam, pois, as forças eletrostáticas das moléculas estão no mínimo, e assim menos água interage com essas moléculas, o que torna uma condição favorável para que se aproximem, se agreguem e possivelmente precipitem. Outro fator é a aplicação da temperatura que desenovelam a estrutura secundária e terciária das proteínas, fazendo com que diminua a ligação com água, e através das interações hidrofóbicas conduzem a agregação seguida de coagulação e precipitação (PELEGRINE; GASPARETTO, 2003).

Quanto ao teor de cinzas, houve um decréscimo de 30,6% do permeado de soro quando comparado com o soro de queijo *in natura*, sendo esta uma redução significativa, uma vez que estes são considerados de extrema importância para que ocorra a formação de álcool durante a fermentação, além de favorecer a ação das leveduras, aumentando o rendimento alcoólico da fermentação (SANTOS, 2008).

### 5.3. Parte 3- FERMENTAÇÃO DO SORO DE QUEIJO E PERMEADO DE SORO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.

#### 5.3.1. Fermentação do soro de queijo

Com as duas linhagens de leveduras isoladas, denominadas LSQG (levedura isolada do queijo gorgonzola) e LCOA (levedura isolada da coalhada), e a levedura padrão *K. marxianus* CCT 4086 foram realizadas as fermentações do soro de queijo *in natura*, em 24 horas de fermentação em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.

#### 5.3.1.1. Consumo de lactose e proteína

##### 5.3.1.1.1. Lactose

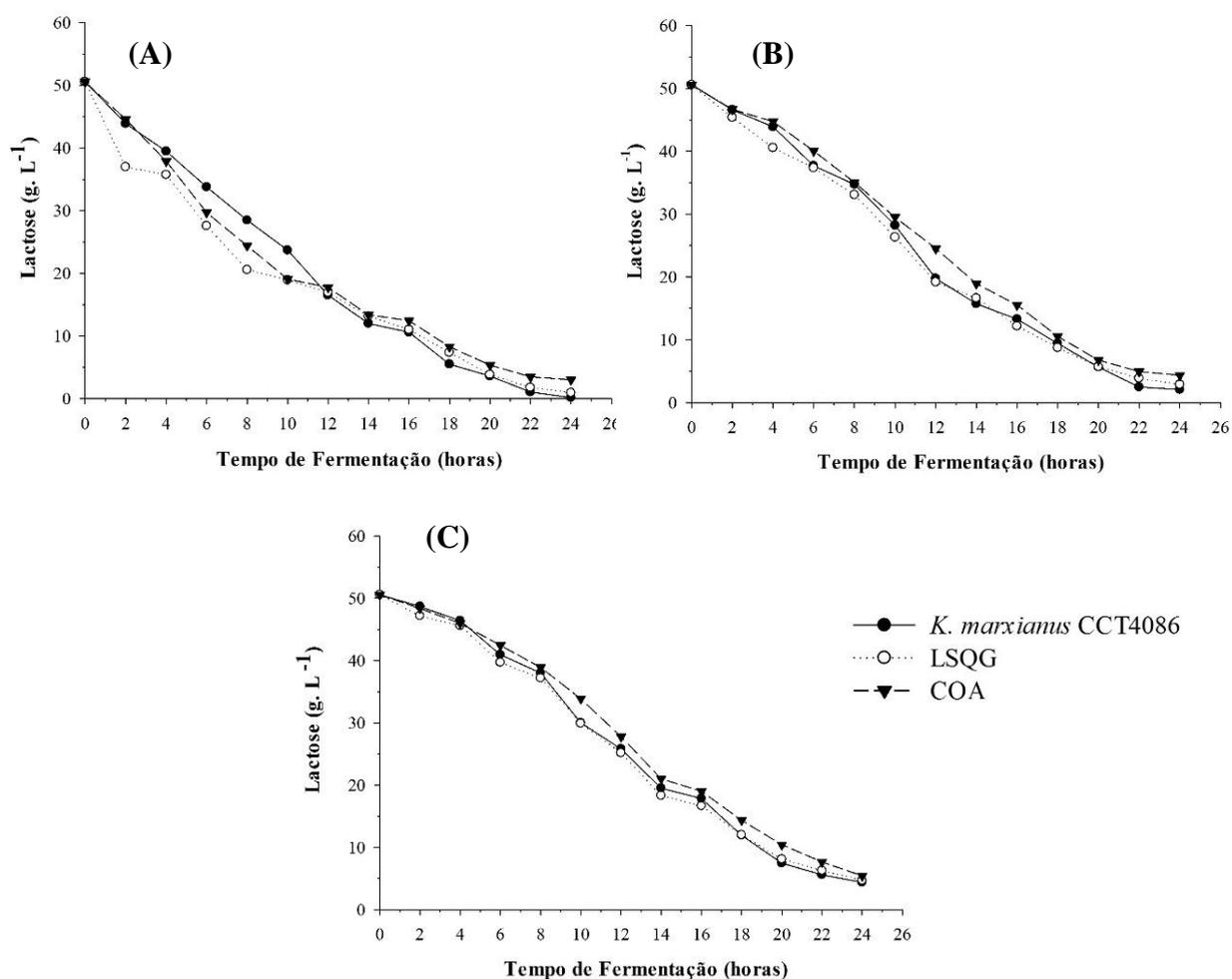
A principal fonte de carbono e energia para as leveduras estudadas provenientes do soro de queijo, é a lactose, que está em maior quantidade neste coproduto. O teor de lactose inicial no soro de queijo em pó utilizado após sua reconstituição era de 5,06%, o que representa uma concentração de 50,6 g.L<sup>-1</sup> de lactose. A Tabela 15 mostra o teor de lactose final em 24 horas de fermentação, e a Figura 12 mostra a curva de consumo deste substrato no decorrer da fermentação pelas leveduras.

**Tabela 15.** Teor final de lactose do soro de queijo obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA após 24 horas de fermentação em diferentes condições de cultivo.

	Aerobiose (100 rpm)			Microaerobiose (50 rpm)			Anaerobiose		
	KM	LSQG	LCOA	KM	LSQG	LCOA	KM	LSQG	LCOA
<b>Lactose</b>	0,16 ±	0,94 ±	3,01 ±	2,05 ±	2,87 ±	4,33 ±	4,37±	4,69 ±	5,42 ±
<b>Final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	0,10	0,08	0,09	0,10	0,06	0,11	0,13	0,21	0,20
<b>Consumo de Lactose (%)</b>	99,60	98,14	94,05	95,90	94,32	91,41	91,36	90,73	89,28

Legenda: KM: *Kluyveromyces marxianus* CCT4086; LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

**Figura 12.** Consumo de lactose do soro de queijo obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Observou-se que, em aerobiose, a levedura *K. marxianus* CCT 4086, apresentou consumo de lactose de 99,60%, seguida da levedura LSQG com 98,14%, havendo diferença significativa entre o consumo de lactose entre ambas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teor final de lactose em g.L<sup>-1</sup>. Já a levedura LCOA teve consumo de 94,05%, apresentando o menor resultado, havendo também diferença significativa entre as duas primeiras quando comparada com a LCOA ( $p < 0,05$ ).

Burlani (2014), ao fermentar o soro de queijo visando produção de etanol por *K. marxianus*, obteve consumo final de lactose em aproximadamente 55 horas, de 98,9% em aerobiose, partindo de uma concentração inicial de lactose de 47 g.L<sup>-1</sup>. Meneses (2009), também em aerobiose, obteve consumo final de lactose de 94% com 70 horas de fermentação, utilizando a levedura *K. lactis*, partindo de uma concentração inicial de lactose de 57,5 g.L<sup>-1</sup>.

No presente estudo, as leveduras apresentaram maior consumo de lactose, e em menor tempo de fermentação.

Em microaerobiose, a levedura *K. marxianus* CCT 4086 também apresentou maior consumo de lactose, com 95,90%, seguida da LSQG com 94,32% ( $p < 0,05$ ), enquanto que a levedura LCOA teve um consumo de 91,41%, havendo diferença significativa entre os resultados obtidos ( $p < 0,05$ ).

Zoppellari (2013), ao realizar a fermentação do soro de queijo em aerobiose e anaerobiose pela levedura *K. marxianus*, partindo de uma concentração inicial de lactose de 44 g.L<sup>-1</sup>, apresentou no final da fermentação consumo total deste substrato de 98% em aerobiose e 94,5% em anaerobiose, resultados estes semelhantes ao obtido pelas três leveduras testadas no presente estudo. Já Vincenzi et al. (2014), também utilizando a levedura *K. marxianus*, obtiveram consumo final de lactose 99,4% em 20 horas de fermentação, com concentração de substrato inicial de 47,7 g.L<sup>-1</sup>.

No presente trabalho, em anaerobiose, observa-se que não houve diferença significativa no teor de lactose final (g.L<sup>-1</sup>) entre as leveduras *K. marxianus* e LSQG ( $p > 0,05$ ), apresentando consumo de 91,36%, e 90,73% respectivamente, e a LCOA com 89,28%.

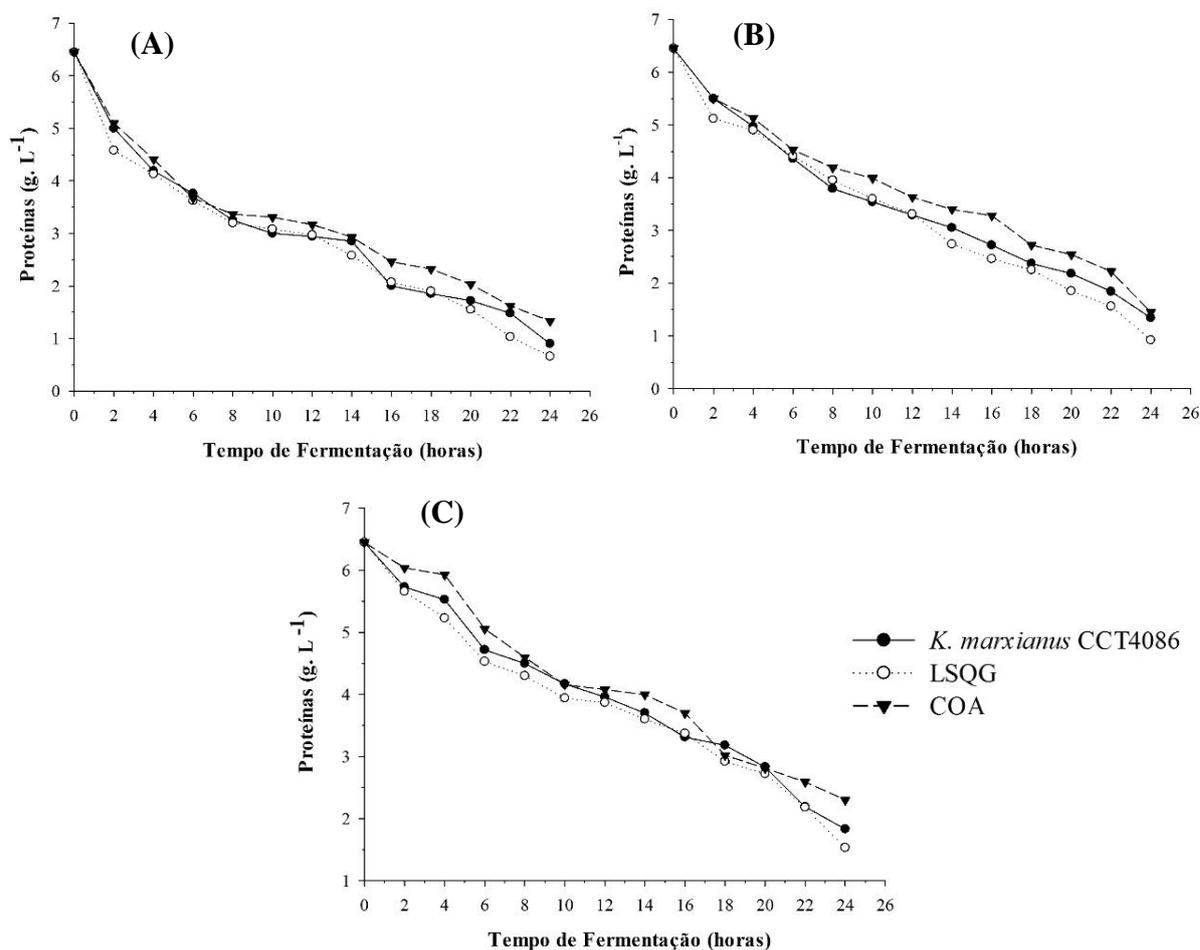
O que se observa em relação ao consumo de lactose pelas leveduras testadas de maneira geral, foi que o metabolismo da levedura isolada do soro de queijo gorgonzola (LSQG) em meio contendo lactose, apresentou resultados mais satisfatórios que a levedura isolada da coalhada (LCOA), porém não superior da levedura padrão *K. marxianus* CCT 4086.

#### 5.3.1.1.2. Proteína

Durante a fermentação do soro de queijo *in natura*, também foi realizada ao longo do processo, a análise de consumo de proteínas pelas leveduras, sendo este um nutriente de extrema importância para as mesmas por auxiliar na sua manutenção, fisiologia, multiplicação e crescimento.

No soro de queijo, o teor inicial de proteínas era de 0,64%, o que representa uma concentração de 6,4 g.L<sup>-1</sup>. A Tabela 16 mostra o consumo de proteínas pelas leveduras no final da fermentação. E a Figura 13 mostra a curva deste consumo no decorrer das 24 horas de fermentação.

**Figura 13.** Consumo de proteínas do soro de queijo obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A) microaerobiose, (B) e anaerobiose (C).



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

**Tabela 16.** Teor final de proteínas do soro de queijo *in natura* obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA após 24 horas em diferentes condições de cultivo.

	Aerobiose (100 rpm)			Microaerobiose (50 rpm)			Anaerobiose		
	KM	LSQG	LCOA	KM	LSQG	LCOA	KM	LSQG	LCOA
<b>Proteína Final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	0,90 ± 0,12	0,66 ± 0,10	1,33 ± 0,11	1,34 ± 0,15	0,92 ± 0,09	1,45 ± 0,10	1,83 ± 0,15	1,53 ± 0,20	2,30 ± 0,15
<b>Consumo de Proteína (%)</b>	86,04	89,76	79,37	78,60	85,73	77,52	71,62	76,27	64,34

Legenda: KM: *Kluyveromyces marxianus* CCT4086; LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Em relação ao consumo de proteína pelas leveduras, os meios incubados em aerobiose foram os que apresentaram maior consumo pelas três linhagens.

No entanto, neste caso, diferente do consumo de lactose, a levedura que apresentou maior consumo deste nutriente foi a levedura LSQG, tanto em aerobiose, microaerobiose, como em anaerobiose (Figura 13 e Tabela 16).

De acordo com a Tabela 16, observa-se que, com 24 horas de fermentação em aerobiose, a levedura LSQG apresentou consumo final de proteína de 89,76%, a levedura *K. marxianus* CCT 4086 de 86,04% e a levedura LCOA de 79,37%, havendo diferença significativa entre a LCOA e as outras leveduras em relação ao teor final de proteínas ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ).

Trabalho similar realizado por Meneses (2009), com a levedura do gênero *Kluyveromyces marxianus*, obteve em aerobiose com 70 horas de fermentação do soro de queijo, consumo de proteínas de 86% partindo de um teor de proteína inicial de 0,69%. Já Souza Jr. (2004), obteve consumo de proteínas por *K. marxianus* de 93,30%. No presente estudo, as leveduras estudadas levaram menor tempo para realizar o consumo de quase que a totalidade do teor de proteínas.

Em microaerobiose, a levedura LSQG apresentou consumo de proteína de 85,73%, a *K. marxianus* CCT 4086 de 78,60% e a LCOA 77,52%. Neste caso não houve diferença significativa de consumo ( $\text{g.L}^{-1}$ ), apenas entre *K. marxianus* CCT 4086 e LCOA ( $p > 0,05$ ).

Em anaerobiose, a levedura LSQG apresentou consumo de proteína de 76,27%, seguida da *K. marxianus* CCT 4086 com 71,62% e a LCOA com 64,34%, havendo diferença significativa entre as três leveduras ( $p < 0,05$ ).

Assim como a lactose, o maior consumo de proteína também foi em aerobiose, pelo fato de que nestas condições a levedura visa seu crescimento, havendo, portanto, necessidade de maior fonte de energia (lactose) para tal atividade e proteína para sua manutenção e fonte de nitrogênio para as células.

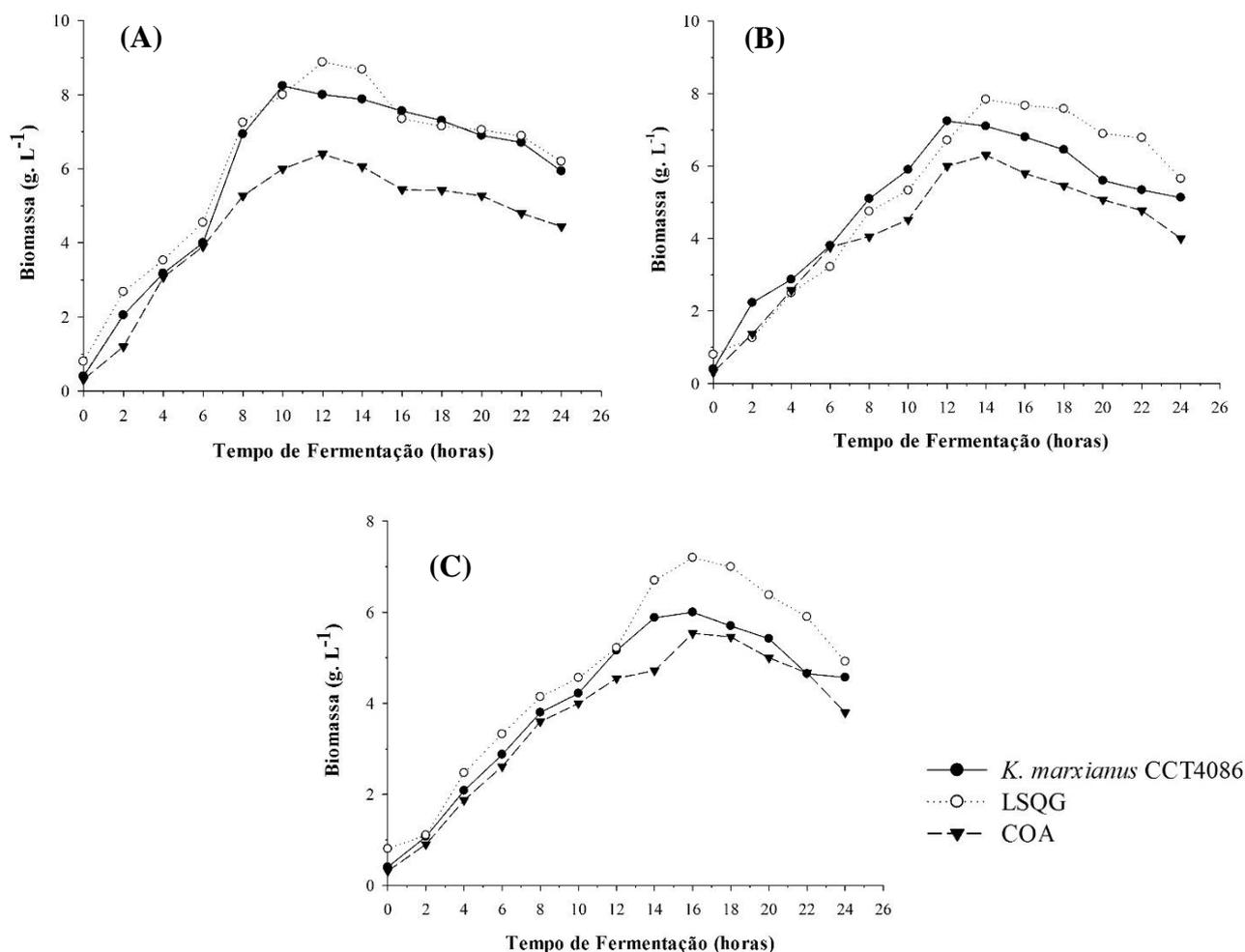
Em condições aeróbias, há um maior saldo energético, ou seja, de uma molécula de lactose no processo de respiração, resulta em 32 ATP e em processo fermentativo apenas 2 ATP. Com maior saldo energético, esta cresce mais rápido em agitação, consumindo com maior velocidade os açúcares e proteínas, os quais serão fonte de energia e também farão parte das moléculas estruturais da célula (GALLO; BASSO, 2012).

### 5.3.1.2. Produção de biomassa e etanol

#### 5.3.1.2.1. Biomassa

As Figuras 14 (A), (B) e (C), ilustram o resultado do perfil de produção de biomassa celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo do tempo de fermentação pelas leveduras estudadas. A Tabela 15 apresenta os principais resultados da cinética obtidos destas fermentações.

**Figura 14.** Produção de biomassa a partir do soro de queijo obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

**Tabela 17.** Parâmetros cinéticos avaliados em relação à produção de biomassa, após a fermentação do soro de queijo pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.

Tempo (hs)	<i>K. marxianus</i>				LSQG				LCOA			
AEROBIOSE												
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,40±0,21	0,00	0,00	0,00	0,80 ±0,20	0,00	0,00	0,00	0,00±0,29	0,00	0,00	0,00
2	2,05±0,14	0,25	1,14	0,83	2,68 ±0,21	0,14	1,01	0,94	1,20±0,32	0,15	0,66	0,45
4	3,18±0,12	0,25	1,23	0,70	3,53 ±0,18	0,18	1,18	0,68	3,07±0,13	0,22	1,35	0,69
6	4,00±0,08	0,21	2,90	0,60	4,55 ±0,15	0,16	1,33	0,63	3,90±0,32	0,17	1,29	0,60
8	6,94±0,06	0,30	2,04	0,82	7,25 ±0,15	0,21	1,98	0,81	5,27±0,18	0,19	1,61	0,62
10	8,24±0,25	0,29	2,27	0,78	8,00 ±0,18	0,23	2,14	0,72	6,00±0,12	0,18	1,81	0,57
12	8,00±0,22	0,22	2,17	0,63	8,88±0,15	0,24	2,32	0,67	6,40±0,11	0,19	1,86	0,51
14	7,88±0,21	0,19	2,08	0,53	8,78 ±0,22	0,21	2,04	0,56	6,06±0,19	0,15	1,63	0,41
16	7,56±0,06	0,18	1,61	0,45	8,30±0,24	0,19	1,71	0,41	5,44±0,20	0,13	1,29	0,32
18	7,30±0,11	0,15	1,5	0,38	8,20±0,16	0,17	1,63	0,36	5,42±0,21	0,12	1,24	0,28
20	6,90±0,23	0,14	1,37	0,33	8,00±0,21	0,15	1,47	0,32	5,27±0,19	0,11	1,12	0,25
22	6,71±0,16	0,13	1,27	0,29	7,89±0,21	0,15	1,31	0,27	4,80±0,45	0,10	0,93	0,2
24	5,94 ±0,12	0,11	1,00	0,23	7,20±0,12	0,13	1,11	0,23	4,44±0,32	0,09	0,81	0,17
MICROAEROBIOSE												
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,40±0,21	0,00	0,00	0,00	0,80±0,20	0,00	0,00	0,00	0,31±0,29	0,00	0,00	0,00
2	2,23±0,17	0,46	1,93	0,92	1,26±0,18	0,09	0,35	0,23	1,37±0,21	0,27	1,12	0,53
4	2,87±0,15	0,37	1,67	0,62	2,50±0,15	0,17	1,10	0,43	2,57±0,09	0,39	1,71	0,57
6	3,80±0,18	0,26	1,63	0,57	3,22±0,32	0,15	0,96	0,33	3,76±0,06	0,33	1,80	0,58
8	5,10±0,16	0,30	1,77	0,59	4,75±0,31	0,23	1,58	0,49	4,05±0,16	0,24	1,65	0,47
10	5,90±0,09	0,25	1,89	0,55	5,33±0,27	0,19	1,59	0,45	4,52±0,23	0,20	1,71	0,42
12	7,24±0,25	0,22	2,16	0,57	6,71±0,08	0,19	1,88	0,49	6,00±0,22	0,22	2,02	0,47
14	7,10±0,18	0,19	1,97	0,48	7,84±0,26	0,21	1,90	0,50	6,30±0,20	0,19	1,96	0,43
16	6,80±0,16	0,17	1,72	0,40	7,67±0,45	0,18	1,72	0,43	5,80±0,18	0,16	1,73	0,34
18	6,45±0,32	0,15	1,48	0,34	7,58±0,41	0,16	1,61	0,38	5,46±0,23	0,13	1,38	0,29
20	5,60±0,29	0,12	1,22	0,26	7,34±0,32	0,15	1,42	0,33	5,07±0,16	0,11	1,22	0,24
22	5,34±0,25	0,10	1,07	0,22	7,05±0,33	0,13	1,28	0,28	4,77±0,17	0,10	1,05	0,20
24	5,13±0,34	0,10	0,93	0,20	6,98±0,19	0,13	1,12	0,26	4,00±0,12	0,08	0,74	0,15

Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Y<sub>X/S</sub>: conversão de substrato em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Y<sub>X/P</sub>: conversão de proteína em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Q<sub>X</sub>: produtividade em biomassa.

**Cont. Tabela 17.** Parâmetros cinéticos avaliados em relação à produção de biomassa, após a fermentação do soro de queijo pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.

Tempo (hs)	<i>K. marxianus</i>				LSQG				LCOA			
ANAEROBIOSE												
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,40±0,21	0,00	0,00	0,00	0,80±0,20	0,00	0,00	0,00	0,31±0,29	0,00	0,00	0,00
2	1,07±0,12	0,35	0,93	0,34	1,10±0,32	0,09	0,38	0,15	0,90±0,21	0,27	1,44	0,30
4	2,08±0,16	0,40	1,83	0,42	2,47±0,27	0,33	1,37	0,42	1,87±0,32	0,34	3,00	0,39
6	2,87±0,07	0,26	1,43	0,41	3,32±0,41	0,23	1,31	0,42	2,61±0,20	0,28	1,65	0,38
8	3,80±0,09	0,27	1,74	0,43	4,14±0,34	0,25	1,55	0,42	3,60±0,36	0,28	1,78	0,41
10	4,22±0,4	0,19	1,68	0,38	4,56±0,45	0,18	1,50	0,38	4,00±0,35	0,22	1,61	0,37
12	5,16±0,12	0,19	1,91	0,40	5,22±0,41	0,17	1,71	0,37	4,55±0,41	0,19	1,79	0,35
14	5,88±0,19	0,18	1,99	0,39	6,70±0,12	0,18	2,07	0,42	4,72±0,51	0,15	1,80	0,32
16	6,00±0,15	0,17	1,78	0,35	7,20±0,10	0,19	2,08	0,40	5,54±0,15	0,17	1,90	0,33
18	5,70±0,13	0,14	1,62	0,29	7,00±0,45	0,16	1,76	0,34	5,46±0,12	0,14	1,50	0,29
20	5,42±0,17	0,12	1,39	0,25	6,88±0,12	0,14	1,63	0,30	5,00±0,16	0,12	1,29	0,23
22	4,65±0,18	0,09	1,00	0,19	6,72±0,18	0,13	1,39	0,27	4,67±0,17	0,10	1,13	0,20
24	4,57±0,12	0,08	0,76	0,15	6,59±0,16	0,13	1,18	0,24	3,80±0,17	0,08	0,87	0,15

Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Y<sub>X/S</sub>: conversão de substrato em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Y<sub>X/P</sub>: conversão de proteína em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Q<sub>X</sub>: produtividade em biomassa.

Em relação à produção de biomassa, o que se observa na Tabela 17 e Figura 14, foi que, esta ocorreu em maior concentração em aerobiose. Esta produção foi maior pela levedura LSQG, obtendo produção máxima de biomassa de  $8,88 \text{ g.L}^{-1}$  em 12 horas de fermentação. Neste tempo, também, a levedura apresentou maior conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e conversão de proteína em célula ( $Y_{X/P}$ ) com valores de  $0,24 \text{ g.g}^{-1}$  e  $2,32 \text{ g.g}^{-1}$  respectivamente. A maior produtividade ( $Q_X$ ) foi em 2 horas de fermentação com valor de  $0,94 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

A levedura *K. marxianus* CCT 4086 apresentou resultados semelhantes ao obtido pela LSQG, com produção máxima de biomassa de  $8,24 \text{ g.L}^{-1}$  em 10 horas de fermentação, e a maior conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e proteína em célula ( $Y_{X/P}$ ) foram de  $0,30 \text{ g.g}^{-1}$  e  $2,90 \text{ g.g}^{-1}$  respectivamente, porém em menor tempo de fermentação que a LSQG, ou seja, em 8 e 6 horas de fermentação respectivamente. Neste caso, a maior produtividade ( $Q_X$ ) em biomassa também foi em 2 horas de fermentação com valor de  $0,83 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

A levedura LCOA apresentou produção máxima de biomassa de  $6,40 \text{ g.L}^{-1}$  e conversão de proteína em célula ( $Y_{X/P}$ ) de  $1,86 \text{ g.g}^{-1}$  em 12 horas de fermentação. A sua maior conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e produtividade ( $Q_X$ ) ocorreu em 4 horas de fermentação com valores de  $0,22 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0,69 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  respectivamente. Em termos de produção de biomassa, a LCOA apresentou resultado de 28% e 22,33% menores que o obtido pelas leveduras LSQG e *K. marxianus* CCT 4086, respectivamente. E em termos de produtividade esta diferença foi de 26,6% e 17%, respectivamente.

Analisando a Figura 14 (A), observa-se na curva que em 2 horas de fermentação as leveduras LSQG e *K. marxianus* CCT 4086 apresentaram crescimento acentuado, o que pode explicar a maior produtividade neste período, quando comparado com os demais tempos. Também pode ser observado que a LCOA teve produtividade maior em 4 horas de fermentação.

Em microaerobiose a levedura LSQG foi a que apresentou maior produção de biomassa de  $7,84 \text{ g.L}^{-1}$ , com ( $Y_{X/P}$ ) de  $1,90 \text{ g.g}^{-1}$ , e ( $Q_X$ ) de  $0,50 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , sendo estes resultados de maior relevância por tal linhagem ocorrerem em 14 horas de fermentação, somente ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,23 \text{ g.g}^{-1}$ , foi em 8 horas de fermentação.

A levedura *K. marxianus* CCT 4086 apresentou maior produção de biomassa de  $7,24 \text{ g.L}^{-1}$  e ( $Y_{X/P}$ ) de  $2,16 \text{ g.g}^{-1}$  em 12 horas de fermentação, já no que se refere a ( $Y_{X/S}$ ), esta apresentou resultado de  $0,46 \text{ g.g}^{-1}$  em 2 horas de fermentação, e maior ( $Q_X$ ) de  $0,92 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 2 horas de fermentação. O que se observa neste caso, embora não tenha ocorrido uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à produção máxima de biomassa entre a LSQG e a *K. marxianus* CCT 4086 em microaerobiose, esta última levedura apresentou conversão de

proteína em biomassa ( $Y_{X/P}$ ) e produtividade ( $Q_X$ ) de 12% e 45,65% maior respectivamente do que a LSQG.

A levedura LCOA apresentou produção de biomassa de  $6,30 \text{ g.L}^{-1}$  em 14 horas de fermentação (Figura 14 (B)), com maior ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,39 \text{ g.g}^{-1}$  em 4 horas. Já sua maior ( $Y_{X/P}$ ) foi de  $2,02 \text{ g.g}^{-1}$  em 12 horas, com maior ( $Q_X$ ) de  $0,58 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 6 horas de fermentação. Quando comparado com a linhagem *K. marxianus* CCT 4086, a levedura LCOA em termos de ( $Y_{X/S}$ ), ( $Y_{X/P}$ ) não apresentou diferença numérica em seus resultados. Já quando comparado com a levedura isolada LSQG, a levedura LCOA apresentou ( $Y_{X/S}$ ) de 41,02% maior. Quanto à produtividade e ( $Y_{X/P}$ ), os resultados obtidos entre elas foram próximos.

Em anaerobiose, por se tratar de um processo mais lento, foi onde houve menor produção de biomassa pelas leveduras, sendo que dentre as leveduras testadas, a LSQG também foi a que teve maior produção, com valor de  $7,20 \text{ g.L}^{-1}$  e ( $Y_{X/P}$ ) de  $2,08 \text{ g.g}^{-1}$  em 16 horas de fermentação, a maior ( $Y_{X/S}$ ) foi de  $0,33 \text{ g.g}^{-1}$  a partir de 4 horas de fermentação, com maior ( $Q_X$ ) de  $0,42 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 4 horas.

Enquanto que a *K. marxianus* CCT 4086, apresentou produção máxima de biomassa de  $6 \text{ g.L}^{-1}$  em 16 horas, com ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,40 \text{ g.g}^{-1}$  em 4 horas de fermentação, maior ( $Y_{X/P}$ ) de  $1,99 \text{ g.g}^{-1}$  em 14 horas e ( $Q_X$ ) de  $0,43 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 8 horas. Valores de ( $Q_X$ ) e ( $Y_{X/S}$ ) próximos ao obtido pela LSQG.

Nestas condições, a LCOA foi a que apresentou resultados mais semelhantes com a LSQG, exceto pela produção de biomassa que foi de  $5,54 \text{ g.L}^{-1}$  em 16 horas, isto representa cerca de 23,05% menor que a produção obtida pela LSQG ( $p < 0,05$ ). Já em termos de ( $Y_{X/S}$ ) a LCOA apresentou resultado de  $0,34 \text{ g.g}^{-1}$  em 4 horas, ( $Y_{X/P}$ ) de  $3 \text{ g.g}^{-1}$  em 4 horas e uma ( $Q_X$ ) de  $0,41 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 8 horas de fermentação. Assim, portanto, havendo diferença significativa na produção de biomassa entre as 3 leveduras ( $p < 0,05$ ).

O cultivo em aerobiose proporcionou maior concentração de biomassa, onde verificou-se também a maior depleção do substrato e proteínas disponível (Figura 12 e 13 (A)), pois nestas condições o metabolismo da levedura se direciona para a respiração, permitindo maior crescimento, maior produção de biomassa, maior consumo de substrato e síntese de materiais de reserva, como esteróis e ácidos graxos, o que explica o maior pico de produção de biomassa em menor tempo de fermentação (MENDES et al., 2013).

Em microaerobiose, observou maior consumo de substrato (Figura 12 (B)), proteína (Figura 13 (B)) e produção de biomassa (Figura 14 (B)) quando comprado com o cultivo em anaerobiose (Figuras 11, 12 e 13 (C)), com resultados maiores e em menores tempos de fermentação para atingir o pico máximo de produção, pois a maioria das leveduras não cresce

otimamente em anaerobiose, posto que o oxigênio além de ser acceptor final na respiração durante o crescimento em aerobiose, o mesmo também é requerido para a manutenção do crescimento.

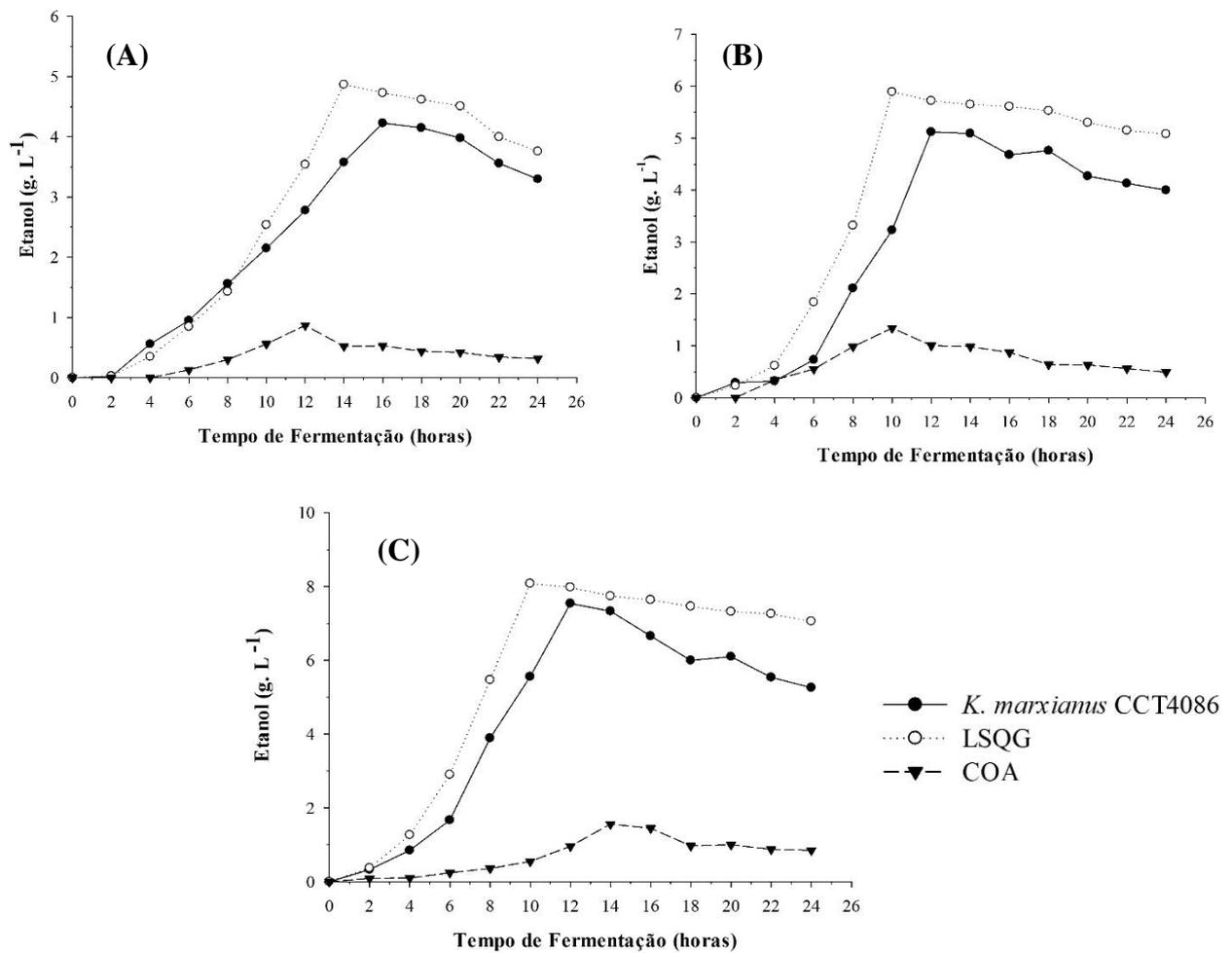
Estudos recentes realizados por Vincenzi et al. (2014), utilizando a levedura *K. marxianus* com crescimento em soro de queijo, obtiveram produção máxima de biomassa de 5 g.L<sup>-1</sup> em 15 horas de fermentação, com conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) de 0,37 g.g<sup>-1</sup>. Yadav et al. (2014), também com *K. marxianus* obtiveram conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) de 0,26 g.g<sup>-1</sup> produtividade ( $Q_X$ ) de 0,45 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Já Hadiyanto et al. (2014), em seus estudos apresentaram produção máxima de biomassa de 9 g.L<sup>-1</sup> em 20 horas de fermentação, com conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) de 0,32 g.g<sup>-1</sup> e produtividade ( $Q_X$ ) de 0,21 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. O presente estudo apresentou resultados semelhantes ao encontrado na literatura, porém com maior vantagem, pois levou menor tempo para atingir a produção máxima de biomassa durante a fermentação.

De acordo com os resultados obtidos nesta etapa, pode-se observar que as 3 linhagens são capazes de realizar seu crescimento tanto na condição de presença de oxigênio (aerobiose), quanto em baixa concentração de oxigênio (microaerobiose) ou ausência (anaerobiose). No entanto, a levedura LSQG foi a que apresentou resultados mais satisfatórios em um todo quando comparado com a *K. marxianus* CCT 4086 e a LCOA

### 5.3.1.2.2. Etanol

As Figuras 15 (A), (B) e (C) ilustram o perfil da produção de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo do tempo de fermentação pelas leveduras estudadas. A Tabela 18 apresenta os principais resultados quanto à cinética de produção de etanol.

**Figura 15.** Produção de etanol a partir do soro de queijo obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

**Tabela 18.** Parâmetros cinéticos obtidos em relação à produção de etanol, após a fermentação do soro de queijo pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.

Tempo (hs)	<i>K. marxianus</i>				LSQG				LCOA			
AEROBIOSE												
	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)
0	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,02±0,02	0,00	0,01	1,00	0,03±0,05	0,02	0,16	4,24	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,56±0,03	0,00	0,14	9,41	0,35±0,03	0,02	0,09	4,12	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,95±0,06	0,07	0,16	10,54	0,85±0,12	0,04	0,14	6,88	0,13±0,12	0,01	0,02	1,74
8	1,56±0,03	0,06	0,20	13,15	1,43±0,03	0,05	0,18	8,87	0,30±0,03	0,01	0,04	2,14
10	2,15±0,05	0,08	0,22	14,89	2,54±0,21	0,07	0,25	14,95	0,56±0,05	0,02	0,06	3,35
12	2,78±0,12	0,10	0,23	15,20	3,54±0,23	0,11	0,30	19,60	0,87±0,20	0,03	0,07	5,00
14	3,58±0,11	0,03	0,26	17,28	4,89±0,20	0,13	0,35	24,22	0,52±0,15	0,01	0,04	2,61
16	4,23±0,15	0,04	0,26	19,70	4,73±0,06	0,12	0,3	22,26	0,53±0,06	0,013	0,03	2,60
18	4,15±0,16	0,04	0,23	17,14	4,62±0,13	0,11	0,26	19,91	0,44±0,21	0,010	0,02	1,95
20	3,98±0,15	0,04	0,20	15,78	4,51±0,15	0,09	0,22	17,96	0,42±0,03	0,009	0,02	1,73
22	3,56±0,19	0,03	0,16	13,40	4,00±0,07	0,08	0,18	15,26	0,34±0,32	0,006	0,01	1,64
24	3,30±0,08	0,04	0,14	12,20	3,76±0,12	0,08	0,16	14,10	0,32±0,12	0,006	0,01	1,26
MICROAEROBIOSE												
	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)
0	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,29±0,12	0,07	0,15	7,27	0,23±0,09	0,04	0,12	8,21	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,32±0,23	0,05	0,08	8,88	0,62±0,15	0,06	0,15	11,43	0,34±0,09	0,06	0,09	10,82
6	0,73±0,15	0,06	0,12	10,52	1,84±0,10	0,14	0,31	26,00	0,55±0,10	0,05	0,09	9,66
8	2,11±0,08	0,13	0,26	24,82	3,32±0,10	0,19	0,42	35,34	0,98±0,11	0,06	0,12	11,75
10	3,23±0,09	0,14	0,32	26,90	5,89±0,10	0,24	0,59	45,20	1,34±0,15	0,06	0,13	7,14
12	5,12±0,10	0,17	0,43	31,00	5,72±0,11	0,18	0,48	34,00	1,00±0,10	0,04	0,08	7,14
14	5,09±0,12	0,15	0,36	27,17	5,65±0,09	0,17	0,40	31,00	0,98±0,23	0,03	0,07	5,76
16	4,68±0,21	0,13	0,29	23,35	5,61±0,07	0,15	0,35	27,20	0,87±0,09	0,02	0,05	4,63
18	4,76±0,22	0,12	0,26	21,50	5,53±0,15	0,13	0,31	24,59	0,64±0,34	0,02	0,04	3,00
20	4,27±0,32	0,09	0,21	17,70	5,30±0,09	0,12	0,27	22,00	0,63±0,15	0,01	0,03	2,65
22	4,13±0,22	0,09	0,19	16,00	5,15±0,06	0,11	0,23	20,53	0,56±0,09	0,01	0,03	2,30
24	4,00±0,09	0,08	0,17	15,34	5,08±0,14	0,11	0,21	19,83	0,49±0,21	0,01	0,02	1,96

Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Y<sub>P/S</sub>: conversão de substrato a etanol (g g<sup>-1</sup>), Q<sub>P</sub>: produtividade em etanol (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), η: rendimento etanólico (%)

**Cont. Tabela 18.** Parâmetros cinéticos obtidos em relação à produção de etanol, após a fermentação do soro de queijo pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.

Tempo (hs)	<i>K. marxianus</i>				LSQG				LCOA			
ANAEROBIOSE												
	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)
<b>0</b>	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,000	0,00	0,00
<b>2</b>	0,33±0,21	0,16	0,17	32,36	0,37±0,09	0,11	0,19	20,43	0,09±0,18	0,040	0,05	7,62
<b>4</b>	0,85±0,17	0,20	0,21	37,90	1,27±0,14	0,25	0,32	47,38	0,10±0,16	0,02	0,03	4,06
<b>6</b>	1,67±0,14	0,17	0,28	32,23	2,90±0,21	0,27	0,48	49,65	0,24±0,22	0,03	0,04	5,50
<b>8</b>	3,89±0,11	0,31	0,49	57,71	5,47±0,07	0,40	0,68	76,00	0,36±0,14	0,03	0,05	5,74
<b>10</b>	5,56±0,37	0,27	0,56	50,30	8,08±0,23	0,39	0,81	73,00	0,55±0,21	0,03	0,06	6,12
<b>12</b>	7,54±0,44	0,30	0,63	56,65	7,98±0,17	0,31	0,67	58,40	0,96±0,17	0,04	0,08	7,89
<b>14</b>	7,33±0,21	0,24	0,52	43,90	7,74±0,04	0,24	0,55	44,64	1,56±0,22	0,05	0,11	9,82
<b>16</b>	6,66±0,32	0,21	0,43	37,90	7,64±0,32	0,23	0,48	41,93	1,45±0,09	0,05	0,09	8,56
<b>18</b>	6,00±0,21	0,16	0,33	28,90	7,46±0,14	0,19	0,41	36,00	0,97±0,09	0,03	0,05	5,02
<b>20</b>	6,10±0,31	0,14	0,31	26,34	7,32±0,21	0,17	0,37	32,10	1,00±0,10	0,02	0,05	4,63
<b>22</b>	5,54±0,12	0,12	0,25	23,00	7,26±0,27	0,16	0,33	30,52	0,88±0,17	0,02	0,04	3,82
<b>24</b>	5,26±0,15	0,11	0,22	21,20	7,06±0,18	0,17	0,16	28,65	0,85±0,19	0,02	0,04	3,50

Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Y<sub>P/S</sub>: conversão de substrato a etanol (g g<sup>-1</sup>), Q<sub>P</sub>: produtividade em etanol (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), η: rendimento etanólico (%)

No que se refere à produção de etanol (bioproduto de interesse do presente estudo) a maior produção foi em anaerobiose pela levedura LSQG (a fermentação é um processo anaeróbio onde a presença de oxigênio no meio pode levar ao efeito “Pasteur” e inibir as vias fermentativas) (Figura 15 (C) e Tabela 18). Com produção máxima de 8,08 g.L<sup>-1</sup> e produtividade de etanol (Q<sub>P</sub>) de 0,81 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> em 10 horas de fermentação, já a conversão de substrato em etanol (Y<sub>P/S</sub>) foi de 0,40 g.g<sup>-1</sup> e o maior rendimento etanólico (η) foi de 76%, e ocorreram em 8 horas de fermentação.

A produção de etanol em anaerobiose pela *K. marxianus* CCT 4086 foi semelhante ao obtido pela LSQG (Figura 15 (C)), apresentando produção máxima de etanol de 7,54 g.L<sup>-1</sup> e produtividade (Q<sub>P</sub>) de 0,63 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> em 12 horas de fermentação, com conversão de substrato em etanol (Y<sub>P/S</sub>) de 0,31 g.g<sup>-1</sup> e rendimento etanólico (η) de 57,71% também em 8 horas de fermentação. Embora a produção de etanol pela LSQG e a *K. marxianus* CCT 4086 não tenha apresentado diferença significativa ( $p > 0,05$ ), o rendimento etanólico (η) final avaliado durante a fermentação foi de 26% menor para a *K. marxianus* CCT 4086. Além disso, a LSQG mostrou ser mais rápida que a linhagem controle na obtenção dos seguintes parâmetros: produção de etanol, fator de conversão do substrato em etanol e produtividade etanólica, fato que resultaria na economia em um processo industrial.

A levedura LCOA apresentou os menores resultados, sendo que sua produção máxima de etanol foi de 1,56 g.L<sup>-1</sup>, com rendimento etanólico (η) final de apenas 9,82% e conversão de substrato em etanol (Y<sub>P/S</sub>) de 0,05 g.g<sup>-1</sup> em 14 horas de fermentação, já sua maior produtividade (Q<sub>P</sub>) foi de 0,11 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> em 14 horas. Seu rendimento máximo (η) foi em torno de 87,07 % e 83% menor que o obtido pelas leveduras LSQG e *K. marxianus* CCT 4086 respectivamente, havendo diferença significativa em todos os parâmetros estudados para produção de etanol ( $p < 0,05$ ).

A segunda melhor condição para produção de etanol pela levedura LSQG e a *K. marxianus* CCT 4086 foi em microaerobiose (Figura 15 (B)) e Tabela 18), sendo que a LSQG apresentou resultados mais satisfatórios com produção de 5,89 g.L<sup>-1</sup>, (Y<sub>P/S</sub>) de 0,24 g.g<sup>-1</sup>, (Q<sub>P</sub>) de 0,59 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e (η) de 45,20% em 10 horas de fermentação. A *K. marxianus* CCT 4086 nestas condições apresentou produção máxima de etanol de 5,12 g.L<sup>-1</sup>, com (Y<sub>P/S</sub>) de 0,17 g.g<sup>-1</sup>, (Q<sub>P</sub>) de 0,43 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e maior (η) de 31%, em 12 horas de fermentação. Neste caso, em termos de produção, houve diferença significativa de acordo com os valores obtidos pela LSQG ( $p < 0,05$ ). Quanto ao rendimento etanólico a *K. marxianus* CCT 4086 também apresentou resultado menor que a LSQG, com diferença de 31,40%.

Em microaerobiose, a levedura LCOA apresentou produção máxima de etanol de  $1,34 \text{ g.L}^{-1}$  e ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,06 \text{ g.g}^{-1}$  em 10 horas de fermentação. Quanto a ( $Q_P$ ) esta foi de  $0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 10 horas de fermentação e o maior ( $\eta$ ) foi de 11,75% em 8 horas. Embora os resultados obtidos pela LCOA tenham sido menores que os obtidos pela LSQG e *K. marxianus* CCT 4086 com rendimento ( $\eta$ ) de 74,50% e 62,10% menores respectivamente, quando comparados com seus próprios resultados em anaerobiose, os resultados em microaerobiose foram relativamente melhores, sendo que em termos de rendimento a LCOA teve um aumento de 16,42% do que em anaerobiose.

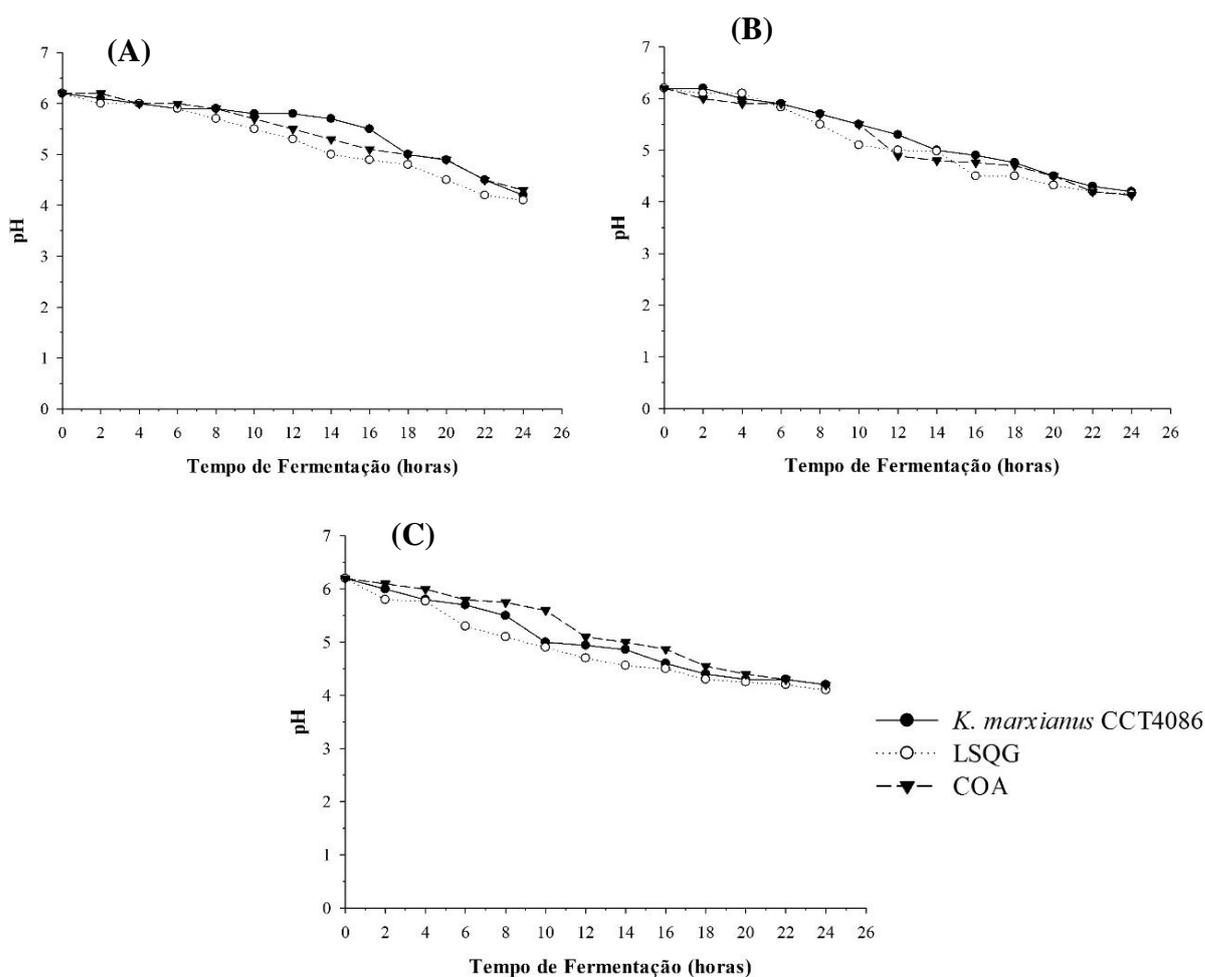
Em aerobiose (Figura 15 (A)) e Tabela 18), a produção de etanol pelas leveduras foram menores. A LSQG apresentou produção máxima de  $4,89 \text{ g.L}^{-1}$ , ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,13 \text{ g.g}^{-1}$ , ( $Q_P$ ) de  $0,35 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e maior ( $\eta$ ) de 24,22% em 14 horas de fermentação. Já a *K. marxianus* CCT 4086 obteve produção de  $4,23 \text{ g.L}^{-1}$ , ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,11 \text{ g.g}^{-1}$ , ( $Q_P$ ) de  $0,26 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e ( $\eta$ ) de 19,70% em 16 horas de fermentação, não havendo diferença significativa na produção de etanol pela LSQG e a *Kluyveromyces* ( $p > 0,05$ ).

Em relação ao rendimento, a *K. marxianus* CCT 4086 apresentou valor de 18,66% menor que a LSQG. Já a LCOA apresentou os menores resultados em aerobiose, com produção de  $0,87 \text{ g.L}^{-1}$ , ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,03 \text{ g.g}^{-1}$ , ( $Q_P$ ) de  $0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e ( $\eta$ ) de 5% em 12 horas de fermentação, sendo que nessas condições o rendimento foi em torno de 79,35% e 74,6% menor em relação a LSQG e a *K. marxianus* CCT 4086 respectivamente.

Trabalho realizado por Zoppellari e Bardi (2013), ao utilizarem o soro de queijo *in natura* com concentração inicial de lactose de  $44 \text{ g.L}^{-1}$ , para produção de etanol em aerobiose e anaerobiose com a *K. marxianus*, obtiveram rendimento etanólico final ( $\eta$ ) de 27% e 71% respectivamente, levando em torno de 20 a 38 horas de fermentação. Vincenzi et al. (2014), com concentração inicial de lactose de  $44,7 \text{ g.L}^{-1}$ , obtiveram produção máxima de etanol de  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , utilizando diferentes linhagens de *Kluyveromyces*, com rendimento ( $\eta$ ) de etanol máximo de 69% e conversão de substrato em etanol ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,40 \text{ g.g}^{-1}$ , em 20 horas de fermentação. Já Dragone et al. (2011), também utilizando *K. marxianus* em soro de queijo, com concentração inicial de lactose de  $50 \text{ g.L}^{-1}$ , obtiveram ( $Y_{P/S}$ ) em seus experimentos de  $0,36 \text{ g.g}^{-1}$  e ( $\eta$ ) de 69,4%. Kargi et al. (2006), também nas mesmas condições utilizando soro de queijo *in natura* por *Kluyveromyces*, obtiveram produção máxima de etanol de  $1,30 \text{ g.L}^{-1}$ , com ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,36 \text{ g.g}^{-1}$  e produtividade de etanol ( $Q_X$ ) de  $0,18 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Gonzáles e Fernádes (2006), partindo de uma concentração de lactose de  $45 \text{ g.L}^{-1}$ , obtiveram ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,42 \text{ g.g}^{-1}$ , ( $Q_X$ ) de  $0,54 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e ( $\eta$ ) de 79, 11%.

Com relação aos valores de pH acompanhados durante a fermentação, observou-se que houve uma pequena variação pelas três leveduras, embora limitada, sendo a esperada, visto que em trabalhos similares de processos fermentativos também encontraram valores relativamente próximos ao encontrado no presente estudo. Valores semelhantes também foram constatados por Florentino (2006) e Florêncio (2008), nos quais iniciaram a fermentação do soro de queijo com um pH de 5,92 e terminou a fermentação após 42 horas com pH de 4,18. Neste estudo, o pH inicial do soro de queijo era de 6 e ao final da fermentação pelas leveduras ficou em torno de 4,10 e 4,20 nas condições aeróbias, microaeróbias e anaeróbias, conforme demonstrado na Figura 16 (A), (B) e (C); estando dentro da faixa de pH ótimo encontrado na literatura, com pouca variação.

**Figura 16.** Acompanhamento do pH dos meios fermentados a partir do soro de queijo obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada

De maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os encontrados pela literatura. Vale ressaltar que as condições de cultivos dos autores citados anteriormente eram diferentes da realizada deste trabalho, além da linhagem utilizada em cada estudo que também influencia o resultado final, pois mesmo se tratando de leveduras do mesmo gênero, o metabolismo de cada espécie é diferente em relação ao substrato utilizado.

### 5.3.1.2.3. Demanda química de oxigênio

Durante a fermentação do soro também foi realizada a análise de DQO (demanda química de oxigênio) para avaliar o comportamento de cada levedura quanto à eficiência da carga orgânica do soro de queijo (Tabela 19).

**Tabela 19.** Eficiência na redução de DQO do soro de queijo após 24 horas de fermentação, obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.

	Aerobiose (100 rpm)			Microaerobiose (50 rpm)		Anaerobiose	
	0	24		24		24	
	DQO Inicial (mg.L <sup>-1</sup> )	DQO Final (mg.L <sup>-1</sup> )	Redução (%)	DQO Final (mg.L <sup>-1</sup> )	Redução (%)	DQO Final (mg.L <sup>-1</sup> )	Redução (%)
<b>K.M</b>	45.000	9.800	78,22	12.400	72,44	14.100	68,67
<b>LSQG</b>	45.000	6.300	86,00	9.000	80,00	11.400	74,66
<b>LCOA</b>	45.000	15.500	65,56	18.300	59,33	20.300	54,89

Legenda: KM: *Kluyveromyces marxianus* CCT4086; LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

A maior redução da DQO do soro de queijo ocorreu em aerobiose, pela levedura LSQG, chegando a eficiência na redução de 86%, seguida pela levedura *K. marxianus* CCT 4086 com redução de 78,22% e a LCOA com 65,56%. Sendo que a LSQG apresentou ser 9,04% e 23,65% mais eficaz que a *K. marxianus* CCT 4086 e a LCOA respectivamente.

Vale ressaltar que em aerobiose o processo de catabolismo é mais eficiente em quebrar moléculas orgânicas em inorgânicas para obtenção de energia e ao mesmo tempo no emprego destas partículas com potencial poluidor na síntese de biomassa microbiana durante reações catabólicas (GALLO; BASSO, 2012).

Já em anaerobiose foi onde houve menor redução de DQO (como também foi onde apresentou menor consumo de lactose (Figura 12 (C)) e proteínas (Figura 13 (C)), sendo estes os principais compostos orgânicos presentes no soro de queijo), mesmo assim a LSQG foi a que apresentou maior redução nestas condições, com 74,66%, seguida da *K. marxianus* CCT 4086 com 68,67%. A LCOA obteve redução de DQO de 54,89%, neste caso a LSQG

apresentou ser 8,02 % e 25,45% mais eficiente na redução de DQO, quando comparada com a *K. marxianus* CCT 4086 e a LCOA respectivamente.

Trabalho realizado por Assunção (2014), ao fermentar o soro de queijo *in natura* visando principalmente a produção de biomassa, obteve eficiência na redução de DQO de 83%. Já Flores (2008), também fermentando o soro de queijo com *K. marxianus*, obteve eficiência na redução de DQO de 89,33%. E Burlani (2014), obteve redução de DQO do soro de queijo de 53%. Tais resultados estão próximos aos obtidos no presente estudo, mostrando que além de levar a produção de um produto de interesse industrial (etanol e biomassa), a fermentação do soro também é uma forma de reduzir seu potencial poluidor.

### 5.3.2. Fermentação do permeado de soro de queijo

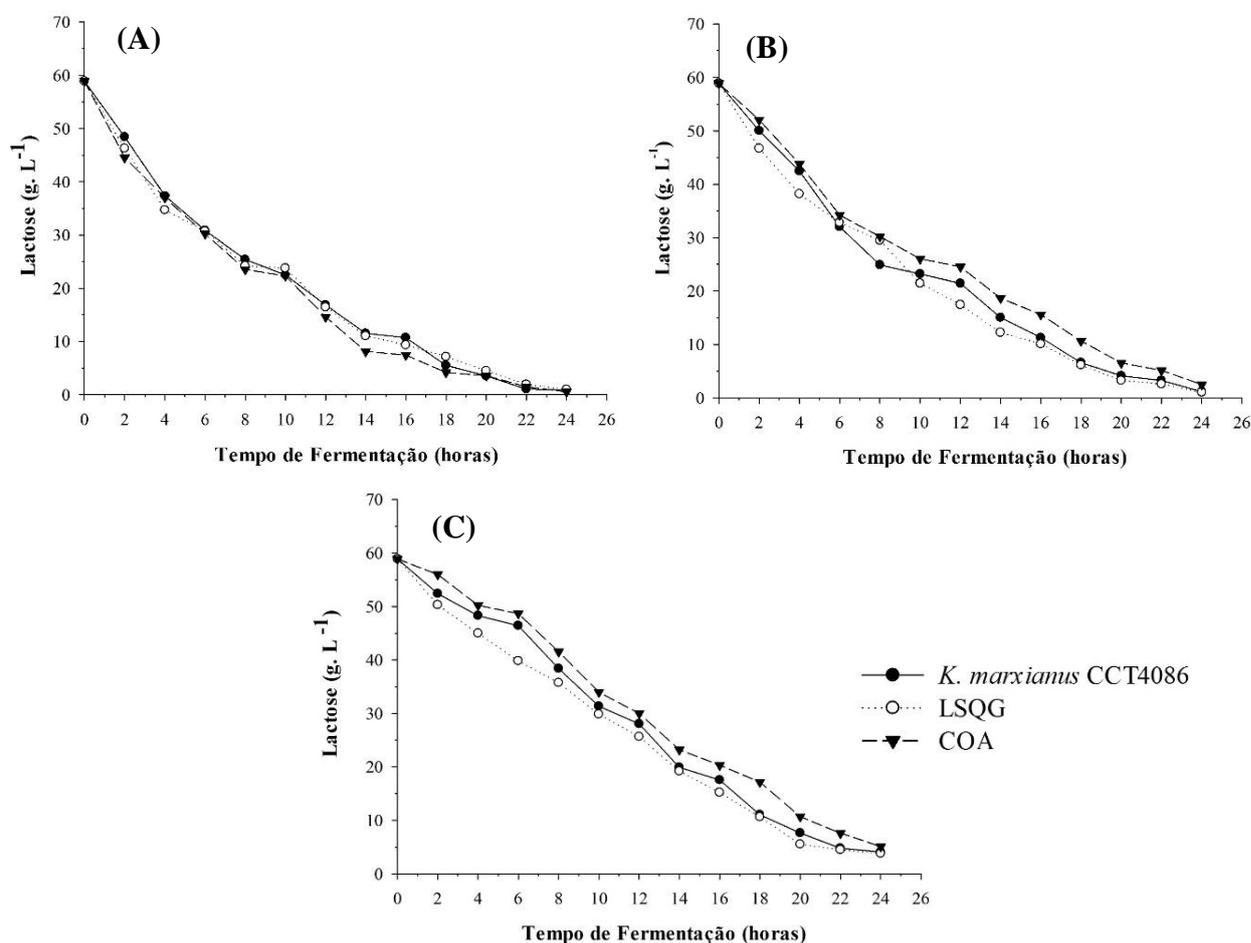
No presente estudo, o permeado foi obtido após o tratamento térmico ácido (item 4.2.2), assim como o soro de queijo *in natura*, o mesmo foi fermentado pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em 24 horas. Os resultados dos parâmetros analisados no decorrer das fermentações encontram-se nos itens seguintes:

#### 5.3.2.1. Consumo de lactose e proteína

##### 5.3.2.1.1. Lactose

O teor de lactose no permeado de soro era de 5,89% o que representa um teor de lactose de 58,9 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 14), sendo esta concentração cerca de 14,10% maior que no soro de queijo *in natura*, possivelmente devido à evaporação da água durante o aquecimento para a remoção de proteínas, conforme descrito no item 5.2. A Figura 17 mostra o gráfico de consumo de lactose no decorrer das 24 horas de fermentação pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em permeado de soro e a Tabela 20 mostra o consumo final de lactose em 24 horas de fermentação.

**Figura 17.** Consumo de lactose do permeado de soro obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

**Tabela 20.** Teor final de lactose do permeado de soro obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA após 24 horas de fermentação em diferentes condições de cultivo.

	Aerobiose (100 rpm)			Microaerobiose (50 rpm)			Anaerobiose		
	KM	LSQG	LCOA	KM	LSQG	LCOA	KM	LSQG	LCOA
<b>Lactose Final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	0,91±	0,53±	1,00±	1,18±	1,06±	2,50±	4,10±	3,80±	5,10±
<b>Consumo de Lactose (%)</b>	0,10	0,10	0,10	0,12	0,10	0,13	0,76	0,10	0,10
	98,45	99,08	98,30	97,80	98,20	94,00	93,03	93,54	91,34

Legenda: KM: *Kluyveromyces marxianus* CCT4086; LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Em relação ao consumo final de lactose do permeado, em 24 horas de fermentação (Figura 17 e Tabela 20), assim como no soro de queijo *in natura*, o maior consumo ocorreu em aerobiose (Figura 12 (A)), pela levedura LSQG com 99,08% de consumo, seguida da *K. marxianus* CCT 4086 com 98,45% e a LCOA 98,30%, sendo que nessas condições não houve diferença significativa no teor de lactose final ( $\text{g.L}^{-1}$ ) pelas leveduras *K. marxianus* e LCOA ( $p > 0,05$ ).

Neste substrato em aerobiose, como pode ser observado, houve maior consumo de lactose pela LSQG e LCOA quando comparado estas duas linhagens na fermentação do soro de queijo *in natura* (Tabela 15). Resultado semelhante foi encontrado por Kouski et al. (2012), que com 72 horas de fermentação do permeado de soro utilizando *Kluyveromyces marxianus*, apresentou consumo de lactose em aerobiose de 96,20%, porém no presente estudo o tempo de fermentação foi menor.

Em microaerobiose (Figura 17 (B)), as leveduras LSQG e a *K. marxianus* CCT 4086 apresentaram consumo de lactose bem próximos de 98,20% e 97,80% respectivamente ( $p > 0,05$ ). Já a LCOA nessas condições apresentou consumo de 94%.

No entanto, nessas condições (microaerobiose), no meio composto por permeado de soro, as três leveduras apresentaram maior consumo de lactose quando comparado com o soro de queijo *in natura*, como pode ser observado na Tabela 15.

Em anaerobiose, foi onde houve menor consumo de lactose (Figura 17 (C)), sendo que as leveduras LSQG e a *K. marxianus* CCT 4086, também apresentaram resultados bem similares com 93,54% e 93,03% respectivamente. E a LCOA apresentou um consumo de 91,34%. Neste substrato e nessas condições (anaerobiose), também houve maior consumo de lactose quando comparado com o soro de queijo *in natura* (Tabela 15).

Trabalho desenvolvido por Zoppellari e Bardi (2013), ao fermentarem o permeado de soro por levedura do gênero *Kluyveromyces* em anaerobiose, obtiveram consumo de lactose apenas de 52,60%, resultado este bem menor ao encontrado no presente estudo pelas linhagens testadas.

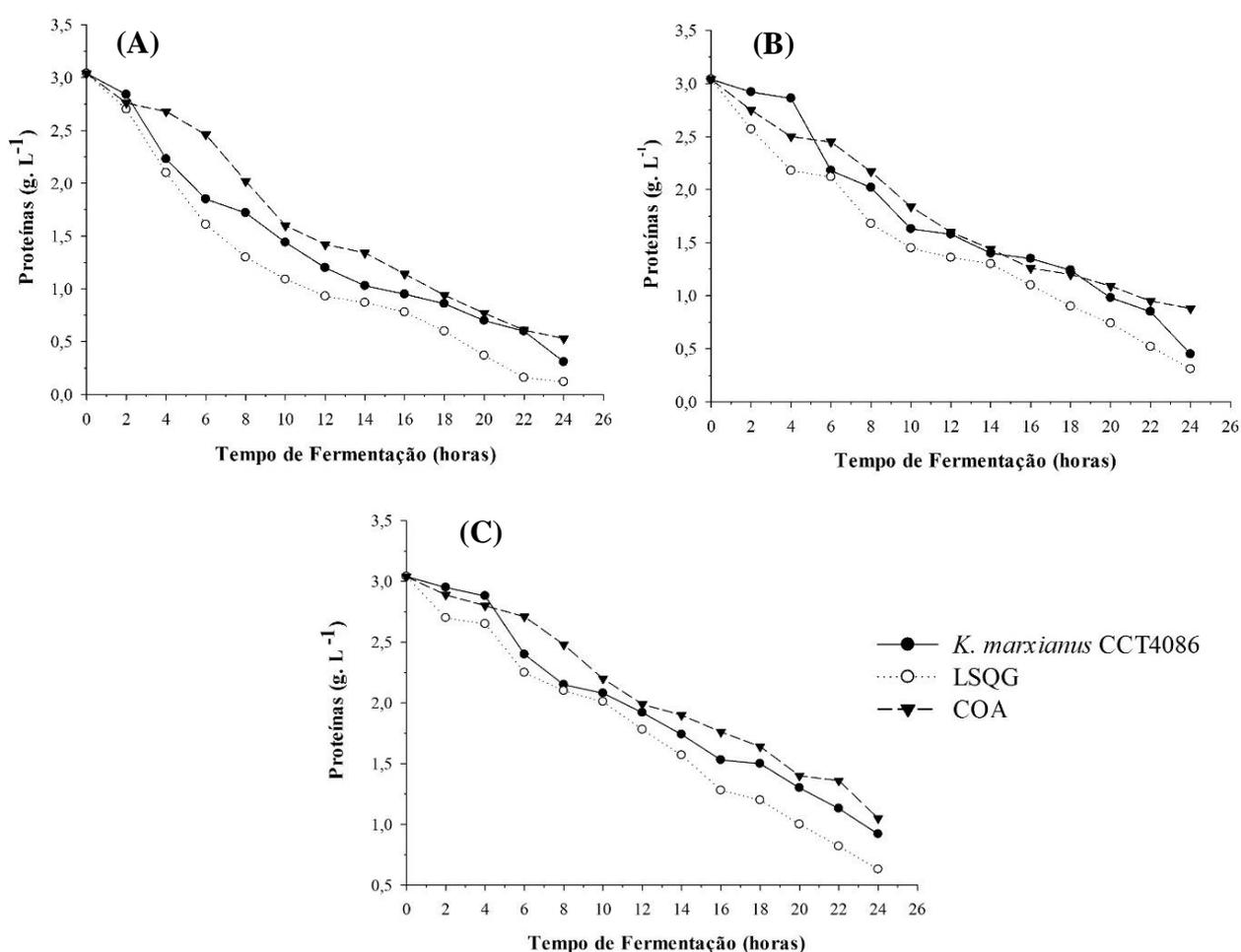
Já Silveira (2004), obteve consumo de lactose de 98,48% em condições aeróbias, consumo de 82% em microaerobiose e consumo de 100% de lactose em anaerobiose com 72 horas de fermentação, diferente dos resultados obtidos no presente trabalho que em aerobiose, as leveduras utilizadas conseguiram assimilar melhor a lactose presente do que nos meios anaeróbios, e em menor tempo de fermentação.

### 5.3.2.1.2. Proteína

Quanto ao teor de proteína no meio de permeado de soro, esta foi de 0,30% ou 3,0 g.L<sup>-1</sup> após a precipitação das proteínas do soro de queijo *in natura*, representando uma redução de 53,12% da mesma durante o processo de obtenção do substrato.

A Figura 18 apresenta o perfil de consumo de proteínas pelas leveduras durante as 24 horas de fermentação. A Tabela 21 apresenta o consumo de proteína final pelas leveduras em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.

**Figura 18.** Consumo de proteína do permeado de soro obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

**Tabela 21.** Teor final de proteínas do permeado de soro obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA após 24 horas de fermentação em diferentes condições de cultivo.

	Aerobiose (100 rpm)			Microaerobiose (50 rpm)			Anaerobiose		
	KM	LSQG	LCOA	KM	LSQG	LCOA	KM	LSQG	LCOA
<b>Proteína Final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	0,31± 0,15	0,22± 0,11	0,53± 0,10	0,45± 0,06	0,31± 0,08	0,88± 0,12	0,92± 0,12	0,63± 0,16	1,05± 0,08
<b>Consumo de Proteína (%)</b>	89,66	92,76	82,33	85,00	89,66	70,66	69,33	79,00	65,00

Legenda: KM: *Kluyveromyces marxianus* CCT4086; LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Quanto ao consumo de proteína do permeado de soro, o que se observa é que houve maior consumo pelas leveduras neste substrato, quando comparado com os resultados obtidos no soro de queijo *in natura* (Tabela 16 e Figura 13).

A levedura LSQG em aerobiose, apresentou consumo de proteínas de 92,76%, cerca de 3,23% maior do que a mesma consumiu no soro de queijo *in natura*. A *K. marxianus* CCT 4086 apresentou consumo de proteínas no permeado de soro de 89,66%, com diferença no consumo de 4,04% maior quando comparado com o resultado obtido no substrato de soro de queijo. Já a LCOA obteve consumo de proteínas de 82,33% no permeado de soro, sendo esse consumo cerca de 3,6% maior para o permeado, quando comparado com o soro de queijo *in natura*.

Em microaerobiose, quando comparado os resultados com os obtidos no soro de queijo *in natura*, a levedura LSQG apresentou consumo de proteínas de 89,66%, o que corresponde um consumo de 4,38% maior que a do soro de queijo. A levedura *K. marxianus* CCT 4086 obteve consumo de 85%, correspondendo uma diferença de 7,53% com o soro de queijo. Já a LCOA teve consumo de 70,66%, sendo que em soro de queijo esse consumo foi 8,85% menor. Nessas condições (microaerobiose), a diferença de consumo de proteínas da levedura LSQG e a *K. marxianus* CCT 4086 foi de 5,20%, e da LSQG para a LCOA foi de 21,20%, havendo diferença significativa no teor de proteínas final entre as três linhagens ( $p < 0,05$ ).

Em anaerobiose, no permeado de soro, a levedura LSQG obteve consumo final de proteínas de 79%, o que representou consumo de 3,45% maior que a obtida no soro de queijo. A *K. marxianus* CCT 4086 nestas condições apresentou maior consumo de proteínas neste substrato (permeado), pois seu consumo de proteínas foi de 69,33%, sendo este valor 3,20% menor que a obtida no soro de queijo. Já a LCOA foi a que obteve menor diferença com o

consumo de proteínas do permeado em comparação com o soro de queijo. No permeado seu consumo foi de 65%, uma diferença de 1,01% maior que o obtido no soro de queijo. Ao comparar os resultados obtidos entre as leveduras nessa condição, observa-se que houve diferença significativa no teor final de proteína ( $\text{g.L}^{-1}$ ) entre as leveduras ( $p < 0,05$ ).

Trabalho realizado por Bitello et al. (2013), utilizando permeado de soro como substrato para fermentação por *K. marxianus*, obtiveram redução de proteína de 23% em aproximadamente 38 horas de fermentação, resultado este abaixo do encontrado no presente estudo. Já Yadav et al. (2014), utilizando processo contínuo de fermentação do soro de queijo em 30 horas de fermentação, obtiveram consumo de lactose de 42% pela levedura *K. marxianus* e *Candida krusei*, atuando em consórcio.

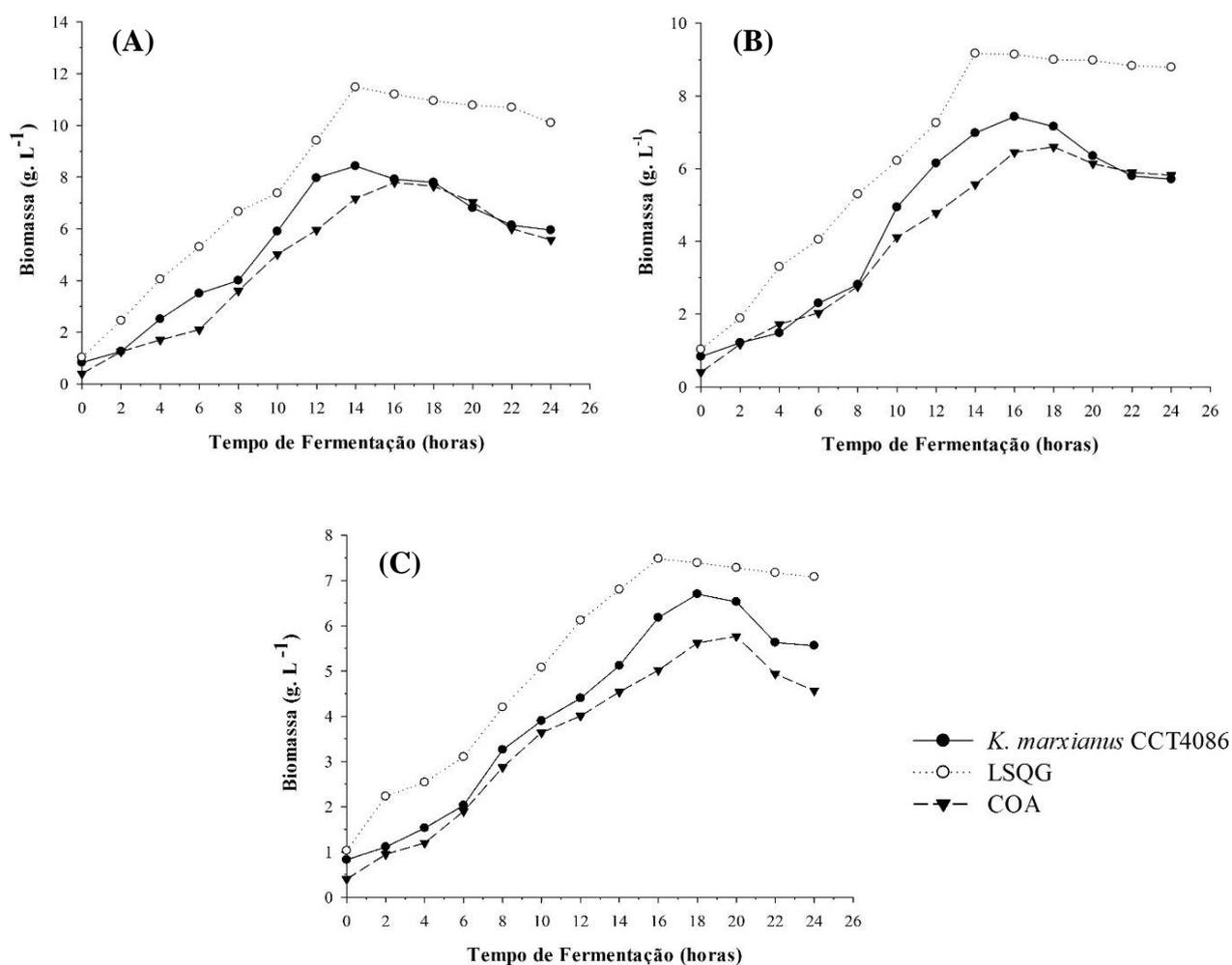
De maneira geral, houve maior consumo de proteínas pelas leveduras no permeado de soro do que no soro de queijo *in natura*, isto pode ser pelo fato que o teor de proteínas inicial do permeado de soro partiu de uma menor concentração ( $3 \text{ g.L}^{-1}$ ), sendo, portanto, de mais fácil assimilação pelas leveduras, por estar menos concentrado do que no soro de queijo *in natura*, levando a menor estresse osmótico causado pelo substrato e a de menor concentração sólidos no meio.

### 5.3.2.2. Produção de biomassa e etanol

#### 5.3.2.2.1. Biomassa

As Figuras 19 (A), (B) e (C) ilustram os resultados das curvas de produção de biomassa celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ao longo do tempo de fermentação pelas leveduras estudadas em permeado de soro. A Tabela 22 mostra os resultados da cinética obtida em relação à biomassa pelas leveduras em 24 horas de fermentação.

**Figura 19.** Produção de biomassa a partir do permeado de soro obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

**Tabela 22.** Parâmetros cinéticos avaliados em relação à produção de biomassa, após a fermentação do permeado de soro pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.

Tempo (hs)	<i>K. marxianus</i>				LSQG				LCOA			
Aerobiose												
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,83±0,23	0,00	0,00	0,00	1,03±0,19	0,00	0,00	0,00	0,40±0,09	0,00	0,00	0,00
2	1,26±0,17	0,04	2,15	0,22	2,45±0,08	0,10	4,18	0,71	1,25±0,12	0,07	3,04	0,43
4	2,51±0,21	0,08	2,07	0,42	4,05±0,17	0,14	3,21	0,76	1,70±0,10	0,05	3,61	0,33
6	3,50±0,34	0,10	2,24	0,45	5,30±0,21	0,15	2,99	0,71	2,10±0,45	0,06	2,93	0,28
8	4,00±0,22	0,09	2,40	0,40	6,67±0,13	0,16	3,24	0,71	3,60±0,21	0,09	3,14	0,40
10	5,90±0,17	0,14	3,17	0,51	7,38±0,17	0,17	3,26	0,64	5,01±0,17	0,13	3,20	0,46
12	7,97±0,11	0,17	3,88	0,60	9,42±0,21	0,19	3,98	0,70	5,95±0,13	0,13	3,44	0,46
14	8,43±0,22	0,16	3,78	0,54	11,48±0,13	0,21	4,82	0,75	7,17±0,12	0,14	3,98	0,48
16	7,92±0,12	0,15	3,39	0,44	11,20±0,16	0,20	4,50	0,64	7,80±0,14	0,15	3,89	0,46
18	7,80,110±	0,13	3,20	0,39	10,95±0,21	0,18	4,07	0,55	7,65±0,34	0,14	3,45	0,40
20	6,81±0,13	0,11	2,56	0,30	10,78±0,17	0,18	3,65	0,49	7,04±0,21	0,12	2,93	0,33
22	6,14±0,21	0,09	2,18	0,24	10,70±0,13	0,17	3,36	0,44	6,00±0,13	0,10	2,30	0,25
24	5,95±0,09	0,09	1,88	0,21	10,10±0,10	0,16	3,11	0,38	5,57±0,23	0,09	2,06	0,22
Microaerobiose												
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,83±0,23	0,00	0,00	0,00	1,03±0,19	0,00	0,00	0,00	0,40±0,09	0,00	0,00	0,00
2	1,21±0,17	0,04	3,17	0,19	1,89±0,11	0,07	1,83	0,43	1,17±0,08	0,11	2,66	0,35
4	1,48±0,18	0,04	3,61	0,16	3,30±0,36	0,11	2,64	0,57	1,72±0,12	0,09	2,44	0,33
6	2,30±0,11	0,05	1,71	0,25	4,05±0,09	0,12	3,28	0,50	2,03±0,11	0,07	2,76	0,27
8	2,81±0,34	0,06	1,94	0,25	5,30±0,51	0,15	3,14	0,53	2,76±0,15	0,08	2,71	0,30
10	4,94±0,11	0,12	2,91	0,41	6,22±0,11	0,14	3,26	0,52	4,11±0,18	0,11	3,09	0,37
12	6,15±0,11	0,14	3,64	0,44	7,26±0,32	0,15	3,71	0,52	4,78±0,32	0,13	3,04	0,37
14	6,98±0,16	0,14	3,75	0,44	9,17±0,32	0,17	4,68	0,58	5,57±0,11	0,13	3,23	0,37
16	7,43±0,23	0,14	3,91	0,41	9,14±0,30	0,17	4,18	0,51	6,45±0,36	0,14	3,40	0,38
18	7,16±0,21	0,12	3,52	0,35	9,00±0,11	0,15	3,72	0,44	6,60±0,41	0,13	3,37	0,34
20	6,35±0,15	0,10	2,68	0,28	8,98±0,18	0,14	3,46	0,40	6,14±0,21	0,11	2,94	0,29
22	5,80±0,15	0,09	2,27	0,23	8,83±0,23	0,14	3,10	0,35	5,90±0,14	0,10	2,63	0,25
24	5,71±0,12	0,08	1,88	0,20	8,79±0,41	0,13	2,84	0,32	5,82±0,12	0,10	2,51	0,23

Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Y<sub>X/S</sub>: conversão de substrato em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Y<sub>X/P</sub>: conversão de proteína em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Q<sub>X</sub>: produtividade em biomassa.

**Cont. Tabela 22.** Parâmetros cinéticos avaliados em relação à produção de biomassa, após fermentação do permeado de soro pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.

Tempo (hs)	<i>K. marxianus</i>				LSQG				LCOA			
	Anaerobiose											
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,83±0,23	0,00	0,00	0,00	1,03±0,19	0,00	0,00	0,00	0,40±0,09	0,00	0,00	0,00
2	1,11±0,12	0,04	3,11	0,14	2,23±0,10	0,14	3,53	0,39	0,95±0,05	0,19	3,67	0,28
4	1,53±0,21	0,07	4,38	0,18	2,54±0,43	0,11	3,87	0,38	1,20±0,21	0,09	3,33	0,20
6	2,03±0,08	0,10	1,88	0,20	3,10±0,17	0,11	2,62	0,35	1,90±0,19	0,15	4,55	0,25
8	3,26±0,11	0,12	2,73	0,30	4,20±0,12	0,14	3,37	0,40	2,87±0,23	0,14	4,41	0,31
10	3,90±0,12	0,11	3,20	0,31	5,08±0,15	0,14	3,93	0,41	3,64±0,10	0,13	3,86	0,32
12	4,40±0,15	0,12	3,19	0,30	6,12±0,15	0,15	4,04	0,42	4,01±0,21	0,12	3,44	0,30
14	5,12±0,42	0,11	3,30	0,31	6,80±0,19	0,15	3,93	0,41	4,54±0,12	0,12	3,63	0,30
16	6,18±0,24	0,13	3,54	0,33	7,48±0,18	0,15	3,66	0,40	5,02±0,12	0,12	3,61	0,29
18	6,70±0,31	0,12	3,81	0,33	7,39±0,12	0,13	3,46	0,35	5,62±0,10	0,13	3,73	0,29
20	6,53±0,41	0,11	3,28	0,29	7,28±0,24	0,12	3,06	0,31	5,77±0,21	0,11	3,27	0,27
22	5,63±0,44	0,09	2,51	0,22	7,17±0,21	0,11	2,77	0,28	4,94±0,10	0,09	2,70	0,21
24	5,56±0,21	0,09	2,23	0,20	7,08±0,08	0,11	2,51	0,25	4,57±0,16	0,08	2,10	0,17

Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Y<sub>X/S</sub>: conversão de substrato em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Y<sub>X/P</sub>: conversão de proteína em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Q<sub>X</sub>: produtividade em biomassa

De acordo com a Figura 19 e a Tabela 22, observa-se que em aerobiose, a levedura que obteve maior produção de biomassa foi a LSQG, chegando a produzir  $11,48 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa, com conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,21 \text{ g.g}^{-1}$ , conversão de proteína em célula ( $Y_{X/P}$ ) de  $4,82 \text{ g.g}^{-1}$  e produtividade ( $Q_X$ )  $0,76 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 4 horas de fermentação. A levedura *K. marxianus* CCT 4086 apresentou produção máxima de biomassa de  $8,43 \text{ g.L}^{-1}$  em 14 horas de fermentação, ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,17 \text{ g.g}^{-1}$ , ( $Y_{X/P}$ ) de  $3,88 \text{ g.g}^{-1}$  e ( $Q_X$ )  $0,60 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 12 horas. Já a levedura LCOA apresentou produção máxima de biomassa de  $7,80 \text{ g.L}^{-1}$  e ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,15 \text{ g.g}^{-1}$  em 16 horas de fermentação, com ( $Y_{X/P}$ ) de  $3,98 \text{ g.g}^{-1}$  e ( $Q_X$ ) de  $0,48 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 14 horas.

A LSQG apresentou produção de biomassa de 26,56% maior que a *K. marxianus* CCT 4086 e 32,05% maior que a LCOA, havendo dessa maneira diferença significativa na produção de biomassa e na produtividade entre as leveduras ( $p < 0,05$ ). Já em relação a ( $Y_{X/S}$ ) e ( $Y_{X/P}$ ) os resultados foram próximos para *K. marxianus* CCT 4086 e a LCOA.

Em microaerobiose (Figura 19 (B)), assim como observado na produção de biomassa a partir do soro de queijo *in natura*, a produção foi intermediária, onde a LSQG apresentou pico máximo de produção de biomassa de  $9,17 \text{ g.L}^{-1}$ , com ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,17 \text{ g.g}^{-1}$ , ( $Y_{X/P}$ ) de  $4,68 \text{ g.g}^{-1}$  e ( $Q_X$ )  $0,58 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  também em 14 horas de fermentação, nestas condições, embora o tempo de obtenção dos resultados mais satisfatórios tenha ocorrido similarmente, o metabolismo da levedura foi mais reduzido quando comparado com os resultados obtidos em aerobiose.

A levedura *K. marxianus* CCT 4086 apresentou produção máxima de biomassa de  $7,43 \text{ g.L}^{-1}$ , ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,14 \text{ g.g}^{-1}$ , ( $Y_{X/P}$ ) de  $3,91 \text{ g.g}^{-1}$  em 16 horas de fermentação, porém, a ( $Q_X$ ) mais satisfatória foi de  $0,44 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  entre 12 e 14 horas de fermentação. E a levedura LCOA apresentou produção máxima de biomassa de  $6,60 \text{ g.L}^{-1}$  em 18 horas de fermentação, ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,14 \text{ g.g}^{-1}$ , ( $Y_{X/P}$ ) de  $3,40 \text{ g.g}^{-1}$  e ( $Q_X$ )  $0,38 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  também em 16 horas.

Comparando os resultados das três leveduras nestas condições, a levedura LSQG em relação a *K. marxianus* CCT 4086 e a LCOA, apresentou produção de biomassa de 18,70% e 28,02% maior respectivamente ( $p < 0,05$ ), entretanto, essa diferença foi menor do que em aerobiose. Em relação a ( $Y_{X/S}$ ), não houve diferença numérica entre os resultados obtidos pelas três leveduras, e quanto ( $Y_{X/P}$ ) e produtividade, os valores foram próximos entre a *K. marxianus* CCT 4086 e a LCO.

Em anaerobiose (Figura 19 (C)), a LSQG também apresentou maior produção de  $7,48 \text{ g.L}^{-1}$  e  $(Y_{X/S})$  de  $0,15 \text{ g.g}^{-1}$  em 16 horas de fermentação, além de  $(Y_{X/P})$  de  $4,04 \text{ g.g}^{-1}$  e  $(Q_X)$   $0,42 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  também em 12 horas. A *K. marxianus* CCT 4086 teve produção máxima de biomassa de  $6,70 \text{ g.L}^{-1}$  em 18 horas de fermentação, com  $(Y_{X/S})$  de  $0,13 \text{ g.g}^{-1}$  e  $(Q_X)$  de  $0,33 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 16 horas de fermentação, enquanto que a maior  $(Y_{X/P})$  foi de  $4,38 \text{ g.g}^{-1}$  em 4 horas. A levedura LCOA apresentou produção máxima de biomassa de  $5,77 \text{ g.L}^{-1}$  em 20 horas,  $(Y_{X/S})$  de  $0,19 \text{ g.g}^{-1}$  em 2 horas, uma  $(Y_{X/P})$  de  $4,55 \text{ g.g}^{-1}$  em 6 horas e maior  $(Q_X)$  de  $0,32 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 10 horas de fermentação.

Nestas condições, embora a LSQG tenha apresentado maior produção de biomassa, a diferença para a produção obtida pela *K. marxianus* CCT 4086 foi de 10,42%, sendo essa diferença menor, do que a obtida em aerobiose e microaerobiose. Já para a LCOA, a diferença de produção de biomassa foi 22,86% menor que a LSQG ( $p < 0,05$ ). Em relação à  $(Y_{X/S})$  e  $(Y_{X/P})$ , as leveduras LSQG e a *K. marxianus* CCT 4086 apresentaram resultados próximos.

De maneira geral, assim como no crescimento em soro de queijo *in natura*, as leveduras estudadas apresentaram certo padrão de produção de biomassa, onde em aerobiose levaram menor tempo para atingirem seu pico máximo de produção e em maior quantidade, havendo um decréscimo na produção de biomassa e aumento no tempo quando em microaerobiose e anaerobiose. Neste substrato, a levedura LCOA, embora tenha apresentado menores resultados, esses não foram muito diferentes dos resultados obtidos pelas outras duas leveduras, como ocorrido no soro de queijo *in natura*, podendo dizer que para essa linhagem LCOA de certa forma, a redução de proteína e o aumento de lactose no meio favoreceu seu crescimento.

Silveira et al. (2005), ao realizarem a fermentação do permeado de soro em condições aeróbias, microaeróbias e anaeróbia, obtiveram os seguintes resultados quanto a produção e  $(Y_{X/P})$  respectivamente de  $8,11 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,17 \text{ g.g}^{-1}$  em aerobiose,  $4 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,061 \text{ g.g}^{-1}$  em microaerobiose e  $2,16 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,05 \text{ g.g}^{-1}$  em anaerobiose. Assim, como no presente estudo, a produção em biomassa foi reduzindo quando em microaerobiose e anaerobiose. Assunção (2014), obteve produção máxima de biomassa utilizando permeado de soro de  $5,30 \text{ g.L}^{-1}$ , produtividade de  $0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e  $(Y_{X/P})$  de  $0,42 \text{ g.g}^{-1}$ . E Pais et al. (2015), obtiveram produção de biomassa de  $6,79 \text{ g.L}^{-1}$  com produtividade  $(Q_X)$  de  $0,67 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e com  $(Y_{X/P})$  de  $0,66 \text{ g.g}^{-1}$ . Mostrando que os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com o encontrado na literatura.

A Tabela 23 mostra a comparação na produção máxima de biomassa pelas leveduras em soro de queijo *in natura* e permeado de soro e seus respectivos tempos de obtenção.

**Tabela 23.** Comparação da produção máxima de biomassa obtida pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em soro de queijo e permeado de soro, em diferentes condições de cultivo.

Soro de Queijo						
	KM		LSQG		LCOA	
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Tempo (horas)	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Tempo (horas)	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Tempo (horas)
<b>Aerobiose</b>	8,24	10	8,88	12	6,40	12
<b>Microaerobiose</b>	7,24	12	7,84	14	6,30	14
<b>Anaerobiose</b>	6,00	16	7,20	16	5,54	16
Permeado de Soro						
	KM		LSQG		LCOA	
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Tempo (horas)	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Tempo (horas)	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Tempo (horas)
<b>Aerobiose</b>	8,43	14	11,48	14	7,80	16
<b>Microaerobiose</b>	7,43	16	9,17	14	6,60	18
<b>Anaerobiose</b>	6,70	18	7,48	16	5,77	20

Legenda: KM: *Kluyveromyces marxianus* CCT4086; LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Conforme observado na Tabela 23, a levedura *K. marxianus* CCT 4086, não apresentou diferença na produção de biomassa quando em soro de queijo *in natura* e permeado de soro, em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose. A diferença na fermentação desta levedura em relação aos dois substratos testados foi o tempo de obtenção do pico máximo de produção, onde no soro de queijo este pico foi em menor tempo nas três condições testadas quando comparado com o permeado.

Quanto a LSQG, esta levedura apresentou diferença de produção em aerobiose, com produção maior de 22,64% no permeado de soro, e em microaerobiose com uma produção maior também no permeado de soro de 14,50%, já em anaerobiose, a produção de biomassa foi próxima nos dois substratos. Quanto ao tempo este foi semelhante em aerobiose e microaerobiose.

A levedura LCOA também não apresentou diferença na produção máxima de biomassa em soro de queijo e permeado de soro, o único meio que houve uma pequena diferença em produção foi em aerobiose no permeado, que apresentou 18% maior que o soro de queijo.

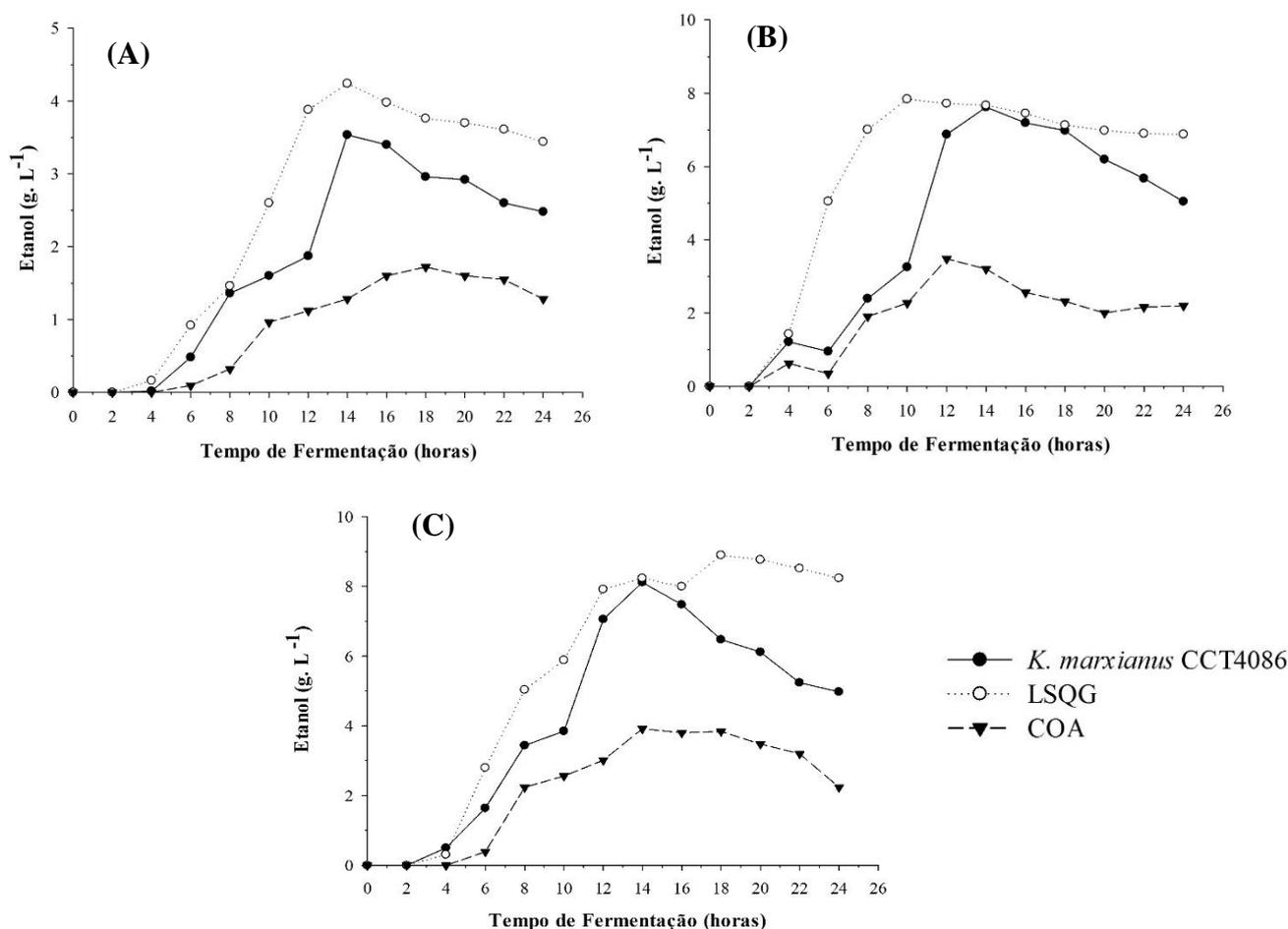
Quanto ao tempo para atingir este pico máximo de produção, nos meios compostos por soro de queijo foi em menor tempo do que o em permeado de soro.

Assim, observa-se que a redução do teor de proteína do meio e consequente aumento no teor de lactose não apresentou diferença quanto à produção de biomassa pelas três leveduras estudadas, exceto pelo tempo, em que no soro de queijo foi mais satisfatório pelas leveduras, o que pode estar associado à concentração de substrato no meio, onde quanto maior a concentração do substrato, no caso a lactose, maior o tempo de assimilação do mesmo, que pode levar os micro-organismos ao estresse osmótico.

#### 5.3.2.2.2. Produção de Etanol

A Figura 20 (A), (B) e (C) mostra o perfil de produção de etanol ao longo da fermentação em permeado de soro. A Tabela 24 apresenta os resultados dos parâmetros cinéticos obtidos pelas leveduras no decorrer da fermentação.

**Figura 20.** Produção de etanol a partir do permeado de soro obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

**Tabela 24.** Parâmetros cinéticos avaliados em relação à produção de etanol, após a fermentação do permeado de soro pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, leveduras LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.

Tempo (hs)	<i>K. marxianus</i>				LSQG				LCOA			
	AEROBIOSE											
	Etanol g.L <sup>-1</sup>	$Y_{P/S}$ g.g <sup>-1</sup>	$Q_P$ g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	$\eta$ (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	$Y_{P/S}$ g.g <sup>-1</sup>	$Q_P$ g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	$\eta$ (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	$Y_{P/S}$ g.g <sup>-1</sup>	$Q_P$ g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	$\eta$ (%)
0	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,02±0,04	0,00	0,00	0,00	0,16±0,12	0,01	0,04	1,23	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,48±0,08	0,02	0,08	3,19	0,92±0,10	0,03	0,15	6,09	0,09±0,02	0,00	0,015	0,61
8	1,36±0,10	0,04	0,17	7,56	1,46±0,11	0,04	0,18	7,82	0,32±0,07	0,009	0,040	1,72
10	1,60±0,14	0,04	0,16	8,19	2,60±0,08	0,07	0,26	12,70	0,96±0,04	0,027	0,096	5,09
12	1,87±0,18	0,04	0,16	8,30	3,88±0,21	0,09	0,32	17,02	1,12±0,10	0,026	0,093	4,91
14	3,54±0,19	0,07	0,25	13,91	4,24±0,23	0,09	0,30	16,51	1,28±0,11	0,027	0,091	4,98
16	3,40±0,21	0,07	0,21	13,15	3,98±0,31	0,06	0,20	14,96	1,60±0,43	0,032	0,100	6,01
18	2,96±0,08	0,06	0,16	10,33	3,76±0,12	0,08	0,17	13,54	1,72±0,56	0,033	0,096	6,19
20	2,92±0,07	0,05	0,15	9,83	3,70±0,17	0,07	0,15	12,67	1,60±0,08	0,029	0,080	5,48
22	2,60±0,18	0,04	0,12	8,37	3,61±0,10	0,07	0,13	11,80	1,55±0,23	0,027	0,070	5,06
24	2,48±0,20	0,04	0,10	7,97	3,44±0,31	0,04	0,09	11,07	1,28±0,21	0,022	0,053	4,12
	MICROAEROBIOSE											
	Etanol g.L <sup>-1</sup>	$Y_{P/S}$ g.g <sup>-1</sup>	$Q_P$ g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	$\eta$ (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	$Y_{P/S}$ g.g <sup>-1</sup>	$Q_P$ g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	$\eta$ (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	$Y_{P/S}$ g.g <sup>-1</sup>	$Q_P$ g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	$\eta$ (%)
0	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
4	1,21±0,18	0,07	0,30	13,77	1,43±0,16	0,07	0,36	12,65	0,62±0,07	0,04	0,16	7,70
6	0,95±0,08	0,04	0,16	6,61	5,05±0,14	0,19	0,84	36,10	0,35±0,11	0,01	0,06	2,63
8	2,39±0,43	0,07	0,30	13,12	7,01±0,11	0,24	0,88	44,38	1,90±0,13	0,07	0,24	12,36
10	3,25±0,23	0,09	0,33	16,97	7,84±0,10	0,21	0,78	38,98	2,27±0,10	0,07	0,23	12,88
12	6,88±0,32	0,18	0,57	34,21	7,72±0,09	0,19	0,64	34,70	3,48±0,21	0,10	0,29	18,86
14	7,62±0,21	0,17	0,54	28,13	7,67±0,14	0,16	0,55	30,62	3,20±0,35	0,08	0,23	14,82
16	7,19±0,30	0,15	0,45	28,00	7,45±0,21	0,15	0,47	28,44	2,56±0,30	0,06	0,16	11,01
18	6,98±0,09	0,13	0,39	24,86	7,13±0,10	0,14	0,40	25,18	2,32±0,21	0,05	0,13	8,96
20	6,19±0,07	0,09	0,26	17,67	6,98±0,10	0,13	0,35	23,37	2,00±0,20	0,04	0,10	7,12
22	5,67±0,23	0,05	0,12	8,96	6,90±0,21	0,12	0,31	22,83	2,16±0,10	0,04	0,10	7,49
24	5,05±0,21	0,04	0,09	6,60	6,88±0,21	0,12	0,29	22,16	2,20±0,07	0,04	0,09	7,27

Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

$Y_{P/S}$ : conversão de substrato a etanol (g g<sup>-1</sup>),  $Q_P$ : produtividade em etanol (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>),  $\eta$ : rendimento etanólico (%).

**Cont. Tabela 24.** Parâmetros cinéticos avaliados em relação à produção de etanol, após a fermentação do permeado de soro pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, leveduras LSQG e LCOA em diferentes condições de cultivo.

Tempo (hs)	<i>K. marxianus</i>				LSQG				LCOA			
	ANAEROBIOSE											
	Etanol g.L <sup>-1</sup>	<i>Y<sub>PS</sub></i> g.g <sup>-1</sup>	<i>Q<sub>P</sub></i> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	$\eta$ (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	<i>Y<sub>PS</sub></i> g.g <sup>-1</sup>	<i>Q<sub>P</sub></i> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	$\eta$ (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	<i>Y<sub>PS</sub></i> g.g <sup>-1</sup>	<i>Q<sub>P</sub></i> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	$\eta$ (%)
0	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,50±0,10	0,05	0,13	8,86	0,31±0,04	0,02	0,08	4,10	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
6	1,64±0,12	0,13	0,27	24,48	2,80±0,12	0,15	0,47	27,38	0,39±0,09	0,04	0,07	7,16
8	3,44±0,11	0,17	0,43	31,26	5,04±0,11	0,22	0,63	40,56	2,24±0,05	0,13	0,28	24,03
10	3,85±0,21	0,14	0,38	26,03	5,89±0,10	0,20	0,59	37,76	2,56±0,12	0,10	0,26	19,15
12	7,06±0,30	0,23	0,59	42,62	7,92±0,41	0,24	0,66	44,37	3,02±0,13	0,10	0,25	19,44
14	8,12±0,33	0,21	0,58	38,79	8,24±0,23	0,21	0,59	38,67	3,92±0,18	0,11	0,28	20,45
16	7,48±0,21	0,18	0,47	33,71	8,00±0,32	0,18	0,50	34,10	3,80±0,21	0,10	0,24	18,34
18	6,50±0,16	0,11	0,30	21,34	8,90±0,49	0,18	0,49	34,36	3,84±0,09	0,09	0,21	17,13
20	6,12±0,15	0,12	0,31	22,24	8,77±0,21	0,16	0,44	30,61	3,48±0,24	0,07	0,17	13,45
22	5,24±0,15	0,10	0,24	18,04	8,52±0,24	0,15	0,38	29,18	3,20±0,09	0,06	0,15	11,62
24	4,98±0,20	0,06	0,15	11,83	8,24±0,21	0,15	0,34	27,86	2,24±0,10	0,04	0,09	7,75

Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

*Y<sub>PS</sub>*: conversão de substrato a etanol (g g<sup>-1</sup>), *Q<sub>P</sub>*: produtividade em etanol (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>),  $\eta$ : rendimento etanólico (%)

Em relação à produção de etanol e rendimento etanólico no permeado de soro, esta foi menor quando comparado com os resultados obtidos na fermentação do soro de queijo *in natura*. Entretanto, assim como no outro substrato, os resultados mais satisfatórios ocorreram em anaerobiose, mantendo o mesmo perfil fermentativo, onde com a LSQG obteve produção máxima de etanol de 8,90 g.L<sup>-1</sup> em 18 horas de fermentação, com conversão do substrato em etanol ( $Y_{P/S}$ ) de 0,24 g.g<sup>-1</sup>, produtividade de ( $Q_P$ ) de 0,66 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e rendimento etanólico de ( $\eta$ ) de 44,37% em 12 horas. Já com a *K. marxianus* CCT 4086 obteve produção máxima de 8,12 g.L<sup>-1</sup> em 14 horas de fermentação, com ( $Y_{P/S}$ ) de 0,23 g.g<sup>-1</sup>, ( $Q_P$ ) de 0,59 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) de 42,62% em 12 horas. E a LCOA nessas condições apresentou produção de etanol de 3,92 g L<sup>-1</sup> em 14 horas de fermentação, com ( $Y_{P/S}$ ) de 0,13 g.g<sup>-1</sup>, ( $Q_P$ ) de 0,28 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) de 24,03%, entretanto, esses resultados foram obtidos em 8 horas de fermentação, tempo este menor que os das outras linhagens estudadas.

Embora a LCOA tenha de certa forma aumentado sua produção e rendimento etanólico quando comparado com os resultados em aerobiose e em anaerobiose (Tabela 24), ainda assim, esses foram 45,58% e 43,61% menor que os obtidos pela LSQG e *K. marxianus* CCT 4086 respectivamente.

A segunda condição de melhor produção e rendimento foi em microaerobiose, onde a LSQG apresentou produção máxima de etanol de 7,84 g.L<sup>-1</sup>, porém, em menor tempo, nesta condição, seu tempo de produção máxima foi de 10 horas de fermentação, apresentando ( $Y_{P/S}$ ) de 0,24 g.g<sup>-1</sup>, ( $Q_P$ ) de 0,88 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) de 44,38% em apenas 8 horas de fermentação. A *K. marxianus* CCT 4086 obteve produção de etanol de 7,62 g.L<sup>-1</sup> em 14 horas de fermentação, com ( $Y_{P/S}$ ) 0,18 g.g<sup>-1</sup>, ( $Q_P$ ) de 0,57 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) de 34,21 % em 12 horas de fermentação. E a levedura LCOA apresentou produção máxima de etanol de 3,48 g.L<sup>-1</sup>, com ( $Y_{P/S}$ ) de 0,10 g.g<sup>-1</sup>, ( $Q_P$ ) de 0,29 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) de 18,86% em 12 horas de fermentação, sendo que seu rendimento também se manteve abaixo do encontrado pela LSQG e *K. marxianus* CCT 4086 em torno de 57,50% e 44,86% menor respectivamente, havendo diferença significativa entre a produção de etanol obtido pelas leveduras *K. marxianus* e LSQG, quando comparada com a LCOA ( $p < 0,05$ ).

Em aerobiose, condição na qual as leveduras apresentaram resultados menos satisfatórios para etanol, com a levedura LSQG obteve-se produção máxima de etanol de 4,24 g.L<sup>-1</sup> em 14 horas de fermentação, ( $Y_{P/S}$ ) de 0,09 g.g<sup>-1</sup>, ( $Q_P$ ) de 0,32 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) de 17,02 % em 12 horas de fermentação. A maior produção de etanol pela *K. marxianus* CCT 4086 foi de 3,54 g.L<sup>-1</sup>, com ( $Y_{P/S}$ ) de 0,07 g.g<sup>-1</sup>, ( $Q_P$ ) de 0,25 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) de 13,91% em 14 horas de

fermentação, havendo diferença significativa entre o rendimento final de etanol entre as duas leveduras ( $p < 0,05$ ), sendo que a LSQG apresentou maior rendimento e em menor tempo. Já a LCOA, no permeado de soro também foi a que apresentou menores resultados para produção de etanol, chegando a produzir máximo de etanol de  $1,72 \text{ g.L}^{-1}$ , com ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,033 \text{ g.g}^{-1}$  e ( $\eta$ ) de  $6,19\%$  em 18 horas de fermentação e ( $Q_P$ ) de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 16 horas. Em termo de rendimento etanólico, a LCOA foi  $62,07\%$  e  $55,50\%$  menor que as leveduras LSQG e *K. marxianus* CCT 4086 respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos na fermentação do permeado de soro, observa-se que para a levedura LSQG neste substrato, embora a maior produção de etanol tenha ocorrido em anaerobiose, o rendimento etanólico desta levedura quando comparado com os resultados obtidos em microaerobiose, foram bem próximos. Entretanto, analisando tais resultados, seria mais vantajoso neste caso a fermentação em microaerobiose, pois nesta condição a levedura chegou em seu platô máximo de rendimento, produtividade e conversão de substrato em etanol em apenas 8 horas de fermentação, isto é, 4 horas a menos que em anaerobiose.

Outro ponto observado na fermentação do permeado de soro foi que mesmo que a produção de etanol entre a levedura *Kluyveromyces* e a levedura LSQG tenha sido bem próximas nas três condições testadas, o que faz com que a LSQG apresente-se mais eficaz é o rendimento etanólico final, que foi melhor e o tempo de fermentação, que foi menor para essa última levedura, o que é levado em conta em processos industriais, pois além de visar o rendimento final, isto é, o quanto de etanol se está obtendo com o substrato, o tempo em que isso acontece é de grande importância.

A Tabela 25 apresenta a comparação da produção de etanol e rendimento etanólico máximo obtido pelas leveduras na fermentação do soro de queijo *in natura* e o permeado de soro, e suas respectivas horas de obtenção.

**Tabela 25.** Comparação do rendimento etanólico máximo obtidos pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em soro de queijo e permeado de soro em diferentes condições de cultivo.

	KM				LSQG				LCOA			
	Etanol g.L <sup>-1</sup>	T*	η (%)	T*	Etanol g.L <sup>-1</sup>	T*	η (%)	T*	Etanol g.L <sup>-1</sup>	T*	η (%)	T*
<b>Soro de Queijo</b>												
<b>Aerobiose</b>	4,23	16	19,70	16	4,87	14	24,22	14	0,87	12	5,00	12
<b>Microaerobiose</b>	5,12	12	31,00	12	5,89	10	45,20	10	1,34	10	11,75	8
<b>Anaerobiose</b>	7,54	12	57,71	8	8,08	10	76,00	8	1,56	14	9,82	14
<b>Permeado de Soro</b>												
<b>Aerobiose</b>	3,54	14	13,91	14	4,24	14	16,32	12	1,72	18	6,19	18
<b>Microaerobiose</b>	7,62	14	34,21	12	7,84	10	44,38	8	3,48	12	18,86	12
<b>Anaerobiose</b>	8,12	14	42,62	12	8,90	18	44,37	12	3,92	14	24,03	8

Legenda: KM: *Kluyveromyces marxianus* CCT4086; LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

\*Tempo em horas onde houve maior produção de etanol e rendimento etanólico.

Analisando a Tabela 25, observa-se que embora em alguns casos a maior produção de etanol pelas leveduras tenha ocorrido no permeado de soro, foi no meio composto de soro de queijo *in natura* que se obteve maior rendimento etanólico, sendo que este rendimento se refere ao etanol produzido pelo teor de substrato (no caso lactose consumida) em um determinado tempo, em relação ao fator de conversão da lactose em etanol, sendo que para cada 1g.L<sup>-1</sup> de lactose são gerados em média aproximadamente 0,5 g.L<sup>-1</sup> de etanol, conforme discutido por Silveira (2006), dependendo da linhagem utilizada e das condições de fermentação.

Além disso foi usada maior concentração de lactose no permeado de soro, sendo até esperado maior concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>), mas em relação aos outros parâmetros analisados, o permeado mostrou desvantagem até mesmo para a LSQG.

A levedura *K. marxianus* CCT 4086, em aerobiose apresentou rendimento etanólico de 29,40% maior em soro de queijo quando comparado com o permeado de soro e em maior tempo. Já em microaerobiose essa diferença entre os substratos foi de apenas 9,38% maior no permeado de soro com o mesmo tempo de fermentação. E em anaerobiose, a diferença de rendimento foi de 24,80% maior para o soro de queijo e em menor tempo de fermentação.

A levedura isolada LSQG que neste estudo vem apresentando resultados mais satisfatórios, em aerobiose, apresentou rendimento maior de 31,60% em soro de queijo. Em microaerobiose praticamente não houve diferença no rendimento entre os dois substratos, sendo que no soro de queijo foi apenas 1,80% maior em rendimento etanólico quando comparado com o permeado. A única diferença foi o tempo de fermentação, que foi menor em permeado de

soro. Já em anaerobiose, os resultados foram bem diferentes e o mais importante para seguir com as próximas análises, pois nestas condições a LSQG apresentou rendimento de 41,62% maior em soro de queijo, quando comparado com o permeado de soro e em apenas 8 horas de fermentação.

Quanto a LCOA é evidente que no permeado de soro seu rendimento e produção foram mais satisfatórios, onde em aerobiose o rendimento foi 19,22% maior que o soro de queijo. Em microaerobiose e em anaerobiose, essa diferença foi de 37,70% e 59,14% respectivamente maior no permeado de soro, quando comparado com o soro de queijo. A diferença entre as fermentações está no tempo, onde em aerobiose e microaerobiose quando em soro de queijo, o rendimento máximo obtido foi em menor tempo de fermentação que no permeado. Já quanto em anaerobiose o menor tempo de obtenção máxima do rendimento etanólico foi no permeado de soro.

Trabalho realizado por Gabardo et al. (2014), ao fermentar o soro de queijo e o permeado de soro para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para metabolizar a lactose diretamente, obtiveram em soro de queijo rendimento etanólico ( $\eta$ ) de 81,10% e conversão do substrato em etanol ( $Y_{P/S}$ ) de 0,41 g.g<sup>-1</sup>, já ao utilizar o permeado de soro, estes autores obtiveram rendimento ( $\eta$ ) de 75,4% e conversão de substrato em etanol ( $Y_{P/S}$ ) de 0,38 g.g<sup>-1</sup>, fato parecido com o ocorrido no presente estudo em que o rendimento etanólico em soro de queijo foi maior que em permeado de soro.

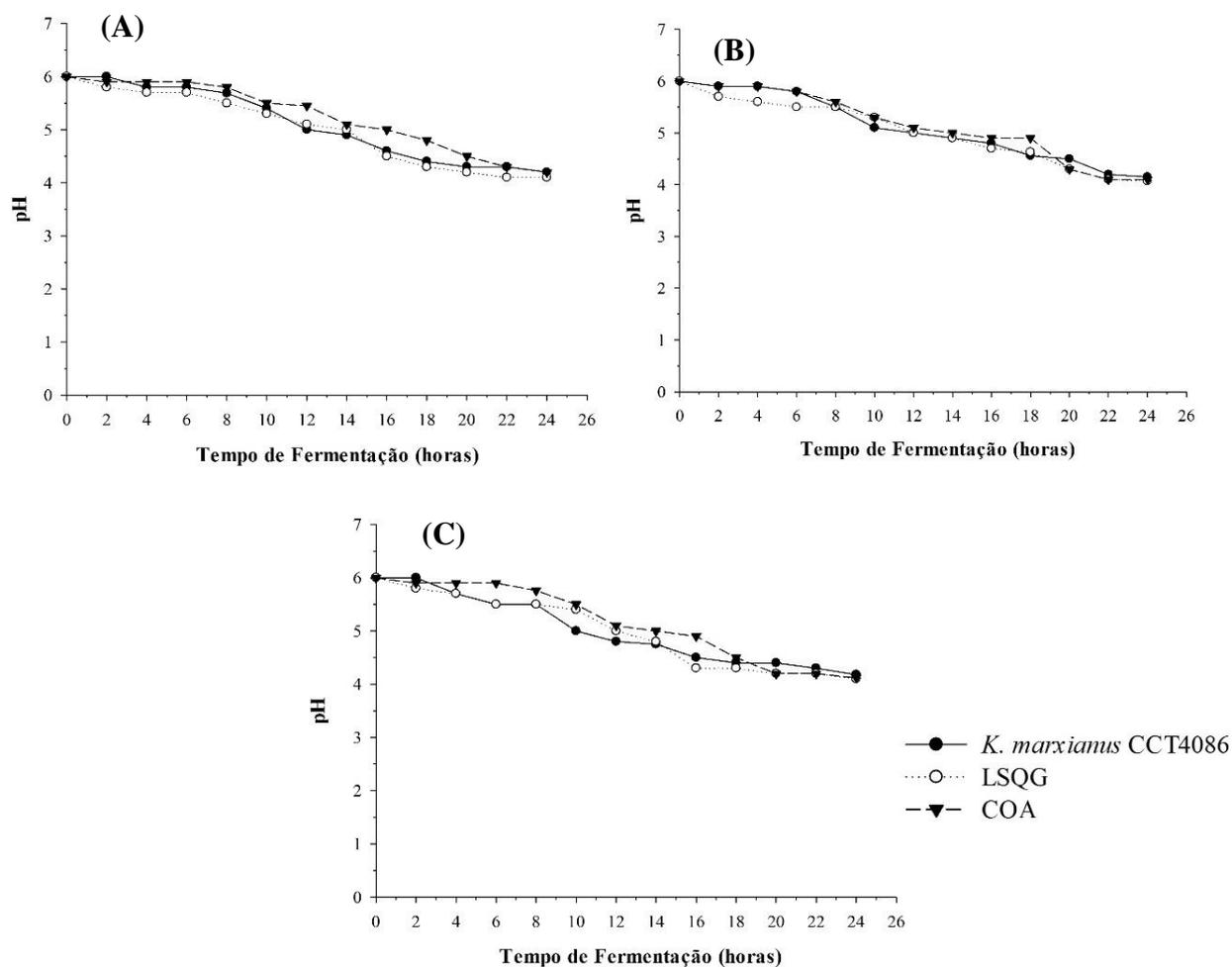
Zoppellari e Bardi (2013), utilizaram o permeado de soro para produção de etanol, sendo que em aerobiose obtiveram produção máxima de etanol de 1,68 g.L<sup>-1</sup> com conversão de substrato em etanol ( $Y_{P/S}$ ) de 0,04 g.g<sup>-1</sup> e um rendimento etanólico ( $\eta$ ) de 9,30%, já em anaerobiose a produção máxima de etanol foi de 9,70 g.L<sup>-1</sup>, com uma ( $Y_{P/S}$ ) de 0,54 g.g<sup>-1</sup> e um rendimento etanólico ( $\eta$ ) de 98%, assim, como no presente estudo em condições de cultivo sem agitação, os resultados foram mais eficazes que com agitação. Neste contexto, Silva et al. (2010), também utilizando permeado de soro por *S. cerevisiae* geneticamente modificada obtiveram produtividade de etanol de 0,74 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, com ( $Y_{P/S}$ ) de 0,48 g.g<sup>-1</sup> e ( $\eta$ ) de 76%. Estes resultados são bem próximos aos obtidos pela levedura LSQG em anaerobiose do presente estudo.

Esta diferença de rendimento etanólico e produção de etanol, que se observa entre os trabalhos citados, pode ser em virtude de que na maioria das vezes o permeado de soro é obtido por meio de ultrafiltração, processo esse em que não há perda significativa de nutrientes do permeado, no entanto, ao utilizar o processo ácido/térmico para obtenção do permeado pode

haver perda de alguns nutrientes essenciais, pois estes podem ficar retidos no precipitado de proteínas durante a coagulação, conforme observado também por Araújo (2013). Sendo que em muitos casos a perda de nutrientes pode interferir no processo fermentativo, podendo influenciar na multiplicação, crescimento celular e eficiência de transformação do açúcar em álcool.

Quanto ao pH (Figura 21), esse apresentou o mesmo perfil encontrado no soro de queijo *in natura* (Figura 16), com pequena variação no decorrer da fermentação pelas três leveduras estudadas, conforme o esperado, pois pode ser decorrente da formação de alguns ácidos orgânicos gerados durante a fermentação. Resultados semelhantes foram encontrados por Burlani (2014) e Zoppellari (2013), onde os mesmos autores observaram redução do pH do permeado de soro no decorrer da fermentação.

**Figura 21.** Acompanhamento do pH dos meios fermentados a partir do permeado de soro obtido pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em aerobiose (A), microaerobiose (B) e anaerobiose (C).



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada

### 5.3.2.2.3. Demanda química de oxigênio

No permeado do soro também foi realizado a medição de DQO no decorrer da fermentação. Os resultados iniciais e finais desta análise se encontram na Tabela 26.

**Tabela 26.** Eficiência na redução de DQO do permeado de soro após 24 horas de fermentação pelas leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA em condições de cultivo.

	Aerobiose (100 rpm)			Microaerobiose (50 rpm)		Anaerobiose	
	0	24		24		24	
	DQO Inicial mg.L <sup>-1</sup>	DQO Final mg.L <sup>-1</sup>	Redução (%)	DQO Final mg.L <sup>-1</sup>	Redução (%)	DQO Final mg.L <sup>-1</sup>	Redução (%)
<b>KM</b>	56.000	14.000	75,00	19.876	64,51	21.343	61,89
<b>LSQG</b>	56.000	12.000	78,57	18.567	66,84	20.653	63,12
<b>LCOA</b>	56.000.	18.500	66,96	20.239	63,86	23.983	57,17

Legenda: KM: *Kluyveromyces marxianus* CCT4086; LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Assim como ocorrido no soro de queijo *in natura*, no permeado de soro, a levedura LSQG em aerobiose apresentou maior eficiência na redução final de DQO, com valor de 78,57%, seguida da *K. marxianus* CCT 4086 com redução de 75%. Já a LCOA obteve redução de DQO de 66,96%, sendo este valor 14,81% e 10,72% menor que o da LSQG e *K. marxianus* CCT 4086 respectivamente.

A condição com menor eficiência na redução de DQO foi em anaerobiose, onde a LSQG apresentou redução de carga orgânica de 63,12% seguida da *K. marxianus* CCT 4086 com 61,89%. Enquanto que a LCOA apresentou redução de DQO de 57,17%, sendo esse valor 9,42% e 7,62% menor que o da LSQG e *K. marxianus* CCT 4086 respectivamente.

Observa-se que, mesmo que a levedura LCOA tenha apresentado menor resultado de redução de DQO quando comparado com as leveduras LSQG e *K. marxianus* CCT 4086, no substrato de permeado de soro foi onde a LCOA apresentou resultados mais satisfatórios quando comparado com ela mesma em soro de queijo, conforme pode ser observado na Tabela 19. Já as leveduras LSQG e *K. marxianus* CCT 4086 apresentaram maior redução de DQO no soro de queijo *in natura* do que no permeado de soro, isso também pode ser observado na Tabela 19.

A DQO inicial do permeado de soro encontra-se em maior concentração do que a apresentada no soro de queijo *in natura*, isto pode estar relacionada com o teor de lactose inicial deste substrato (Tabela 14), sendo que a redução da DQO dos meios em permeado de soro pode estar relacionada com a fermentação da lactose que é o principal precursor da DQO elevada nos

resíduos lácteos. Assim esta diferença entre a redução da DQO do soro de queijo e do permeado de soro pode ser pelo fato de que esse último já partiu de uma concentração maior de carga orgânica.

Trabalho realizado por Burlani (2014) obteve redução de DQO do permeado de soro de 63% no final da fermentação, partindo de uma concentração inicial de 133,8 g.L<sup>-1</sup> de DQO. Esse mesmo autor quando analisou a redução de DQO do soro de queijo, obteve redução de 53% (conforme demonstrado anteriormente no item 5.3.2.2) diferente do presente estudo, em que a maior redução ocorreu em soro de queijo. Schultz et al. (2006), fermentando permeado de soro para produção de “single-cell protein”, obtiveram redução de 83,14% de DQO ao longo de 80 horas de fermentação por *Kluyveromyces*, partindo de uma concentração inicial de 193.000 mg.L<sup>-1</sup>, chegando a um valor final de 32.533 mg.L<sup>-1</sup>.

Assim, em termos de redução de carga orgânica, como pode ser observado, as três leveduras estudadas apresentaram resultados satisfatórios quando comparadas com o encontrado na literatura, sendo que a levedura LSQG foi a que atingiu melhores resultados.

### 5.3.3. Comparação entre os resultados

Mesmo que em menor concentração, houve pequena produção de etanol em aerobiose pelas leveduras nos dois substratos utilizados, isso pode ser explicado em decorrência da concentração substrato fermentativo no meio, que pode inibir a respiração, mesmo em ambientes com agitação (aeróbios), uma vez que há a saturação da capacidade respiratória dos micro-organismos. Este fenômeno é conhecido na fisiologia das leveduras como efeito Crabtree. Podendo ser Crabtree *short-term*, que é caracterizado pela fermentação alcoólica durante um curto período em aerobiose devido a um impulso de açúcar após a célula ser cultivada por várias gerações com restrição de carboidrato. E Crabtree *long-term*, que é caracterizado pela fermentação alcoólica em aerobiose devido a altas concentrações de carboidrato no meio ou devido a cultivos em altas taxas de crescimento (DINIZ, 2009; SILVEIRA, 2004).

Entretanto, de acordo com os resultados obtidos na fermentação do soro de queijo *in natura* e no permeado de soro, indicou que o processo que conduziu a maior produção de etanol e se apresentou mais favorável foi em anaerobiose pelas linhagens estudadas. Em termos de tempo e rendimento é essencial definir com precisão o momento em que a fermentação deve ser interrompida quando atingir seu rendimento máximo, pois o que se observa nas Figuras 14 (A), (B) e (C) e nas Figuras 19 (A), (B) e (C), é que há um acréscimo na produção de etanol até

determinado tempo de fermentação, após as leveduras atingirem seu pico máximo de produção de etanol começam a ter uma redução deste bioproduto produzido, provavelmente induzido pelo metabolismo da levedura, fato este também observado por Zoppellari e Bardi (2013) e Cangussu (2003). Isto pode ocorrer, pois o etanol que a levedura está produzindo está sendo tóxico a ela mesma, e após certo tempo de fermentação ela passa a tirar esse excesso de álcool do meio através da ação da enzima álcool desidrogenase, que catalisa reversivelmente a redução de acetaldeído em etanol, e convertendo em outras moléculas menos tóxicas como ácidos orgânicos.

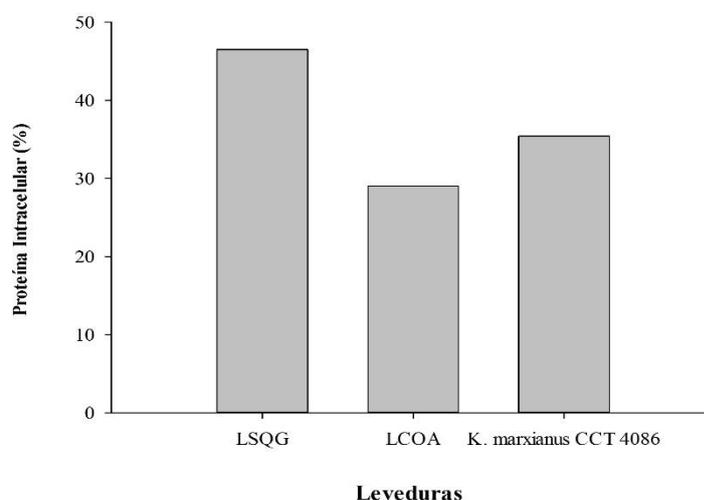
Outra hipótese, poderia ser a presença de glicerol no meio, sendo que este é um metabólito produzido que serve como indicador de estresse da levedura. Os níveis deste composto pode ser um indicador da tolerância a situações de estresse provocado por fatores adversos, além de que o glicerol atua como osmorregulador que inibe ou limita a fermentação alcoólica. Quando se tem acúmulo de glicerol no meio ocorre um decréscimo lento e linear da produtividade de etanol, relacionada ao acréscimo de glicerol, seguido por uma queda da produtividade a partir de um limiar de concentração (SALVATO, 2010), como pode ser observado nas Figuras 15 e 20.

#### *5.3.4. Proteína intracelular da biomassa de leveduras*

Também foi realizada a análise de proteína da biomassa produzida pelas três leveduras após as 24 horas de fermentação. Sabe-se que a biomassa produzida por leveduras é constituída principalmente por proteína, a qual pode ser utilizada posteriormente ao processo, e empregada em diversas áreas da indústria alimentícia, química e farmacêutica, além de poder ser utilizada como meio de enriquecimento na própria fermentação (como extrato de levedura), reduzindo o custo com suplementação, sendo considerado um concentrado natural que contém proteínas completas, com todos os aminoácidos essenciais.

A Figura 22 mostra a porcentagem de proteína produzida para cada levedura no final da fermentação.

**Figura 22.** Proteína intracelular bruta obtida da biomassa das leveduras *K. marxianus* CCT 4086, LSQG e LCOA.



Legenda: LSQG: Levedura isolada do soro de queijo gorgonzola; LCOA: Levedura isolada da coalhada.

Como pode-se observar, a levedura LSQG apresentou maior teor de proteína em sua biomassa produzida, chegando a um valor de 46,50% de proteína total, obtida após o rompimento da célula com tratamento térmico-ácido. Esta levedura também foi a que apresentou maior produção em biomassa no soro de queijo e permeado de soro (Tabela 17 e 24), assim como o maior consumo eficaz de proteínas em tais meios (Figuras 13 e 18), confirmando que a biomassa produzida por leveduras é composta, sobretudo por proteínas.

A levedura *K. marxianus* CCT 4086 apresentou teor de proteína intracelular de 35,40% e a LCOA com teor menor de proteína intracelular de 29%, coincidindo com os resultados de produção de biomassa (Tabela 17 e 24) e consumo de proteínas (Figura 13 e 18 e Tabelas 16 e 21) em ambos substratos.

Lemes et al. (2012), ao estudar a proteína intracelular da levedura do gênero *Kluyveromyces marxianus* utilizando técnica de extração com ultrassom, obtiveram teor final de proteína da biomassa de 43%. Resultado semelhante ao encontrado por Paez et al. (2008), que obtiveram teor de proteína intracelular da levedura *K. marxianus* de 42,20%. E Silva e Castro-Gomez (1995), utilizando a levedura *Kluyveromyces lactis* em seus estudos, obtiveram teor de proteína da biomassa de levedura de 39,63%. Estes resultados mostram que a levedura LSQG e a *K. marxianus* CCT 4086 apresentam-se de acordo com os resultados encontrados pela literatura em termos de teor de proteína presente na biomassa celular.

Cazetta et al. (2005), ao utilizar a levedura padrão *Saccharomyces* sp, crescida em melação de cana, obtiveram teor de proteína intracelular de 50,35%, resultado próximo ao

encontrado por Caballero-Córdoba et al. (1997), que utilizando a mesma espécie, obtiveram produção de proteína intracelular de 48,51%. Comparando com a levedura padrão *Saccharomyces* sp, a levedura isolada LSQG apresentou resultados satisfatórios, por se tratar de uma linhagem nova e isolada de um resíduo industrial, a mesma apresenta uma capacidade promissora também na área de produção de proteína que pode ser aplicada nas indústrias.

O valor proteico da biomassa de levedura depende de uma série de fatores, destacando-se o substrato utilizado, o tratamento da massa fluida, as concentrações de sais e o meio de cultura de onde provém a levedura, fazendo com que sua composição química tenha alguma variação. E como pode ser observado de acordo com os resultados obtidos, o meio, à base de soro de queijo, mesmo *in natura*, apresentou uma biomassa rica em proteína pela levedura LSQG e até mesmo pela *K. marxianus* CCT 4086, as quais podem ser uma fonte não convencional alternativa de suplementos, podendo substituir proteínas convencionais de alto custo, sendo o que meio de crescimento pela levedura não apresentaria custo algum para a indústria, uma vez que o mesmo é descartado pelos laticínios.

Como a levedura LSQG foi a que apresentou resultados mais satisfatórios, quando comparado com a levedura também isolada LCOA e até mesmo com a *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 utilizada como padrão nas fermentações, a LSQG foi identificada e incorporada ao acervo da Coleção de Culturas – Micoteca URM do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (o documento de identificação encontra em anexo)

Portanto, a partir das próximas fases do presente estudo, a levedura LSQG será denominada como *Kluyveromyces marxianus* URM 7404 conforme sua identificação.

## 5.4. Parte 4- SUPLEMENTAÇÃO DO SORO DE QUEIJO

### 5.4.1. Fermentação do soro de queijo suplementado

A terceira fase do estudo consistiu em avaliar o perfil fermentativo e os parâmetros etanólicos em diferentes tipos de suplementações do meio (Tabela 10 do item 4.2.4), a partir da levedura, substrato e condição de cultivo que apresentaram no geral resultados mais satisfatórios quanto à produção de etanol. Sendo, portanto, utilizada, a partir desta fase, a levedura isolada *K. marxianus* URM 7404 (LSQG) no substrato de soro de queijo em anaerobiose. A Tabela 27 apresenta a composição média inicial dos meios de cultivos.

**Tabela 27.** Composição média dos meios de cultivo suplementados antes da fermentação pela levedura *K.marxianus* URM 7404.

Meios de Cultivo	pH inicial	Lactose (g.L <sup>-1</sup> )	Proteína (g.L <sup>-1</sup> )	DQO (mg.L <sup>-1</sup> )
M1 <sup>a</sup>	6,00 ± 0,12	50,40 ± 0,55	6,54 ± 0,27	45.000 ± 0,45
M2 <sup>b</sup>	6,20 ± 0,10	52,22 ± 0,40	6,30 ± 0,25	50.300 ± 0,58
M3 <sup>c</sup>	4,70 ± 0,15	53,22 ± 0,36	4,70 ± 0,30	38.800 ± 0,76
M4 <sup>d</sup>	5,30 ± 0,14	51,45 ± 0,67	5,50 ± 0,25	48.170 ± 0,61

<sup>a</sup> Soro de queijo *in natura*

<sup>b</sup> Soro de queijo *in natura* + Extrato de levedura

<sup>c</sup> Soro de queijo *in natura* + Nutrientes (sais (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; MgSO<sub>4</sub>; ZnSO<sub>4</sub>)

<sup>d</sup> Soro de queijo *in natura* + Extrato de levedura + Nutrientes (sais (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; MgSO<sub>4</sub>; ZnSO<sub>4</sub>)

De acordo com a Tabela 27, observa-se que quanto à concentração inicial de lactose dos meios utilizados, houve diferença significativa entre os meios M1 (controle sem suplementação) e M3, e entre o M3 e M4 ( $p < 0,05$ ). Há uma pequena variação de lactose entre eles, que pode ser pelo fato, dos meios terem sido preparados separadamente, havendo, portanto, variação analítica durante seu preparo.

Quanto ao teor inicial de proteína nos meios M1, M2 e M4, não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 27). Já no M3 apresentou diferença em relação aos outros meios estudados ( $p > 0,05$ ). Observou-se durante seu preparo que houve precipitação das proteínas no momento da adição dos sais, o que pode ter ocorrido reduzindo o pH do meio até atingir o ponto isoelétrico das proteínas do leite, levando à precipitação das mesmas, reduzindo assim o teor de proteínas do meio. O mesmo ocorreu no meio M4, entretanto, como neste havia a presença de extrato de levedura, a precipitação foi menor que o meio M3.

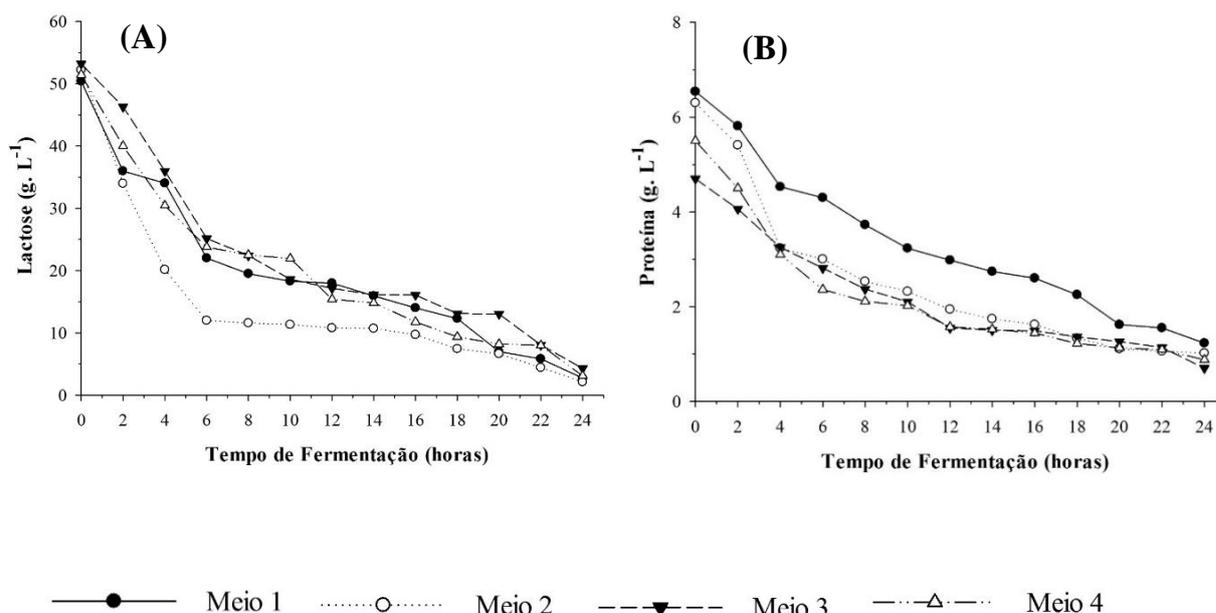
Isso também pode ser observado no teor de DQO inicial em que o meio M3 foi o que apresentou menor concentração da mesma ( $p > 0,05$ ), e o meio M4 apresentou menor concentração de DQO, quando comparado com o meio M2 ( $p > 0,05$ ), que também continha extrato de levedura.

#### 5.4.2. Consumo de lactose e proteína

Em relação ao consumo de lactose (Figura 23 (A)) com 24 horas de fermentação, o meio de cultivo M2 apresentou concentração de lactose final de  $3,73 \text{ g.L}^{-1}$ , seguido do meio M1 com  $4,00 \text{ g.L}^{-1}$ , M4 com  $4,11 \text{ g.L}^{-1}$  e do meio M3 com  $5,30 \text{ g.L}^{-1}$ , representando, portanto, consumo final total de lactose nestes meios de 92,86%, 92,06%, 92,02% e 90,04% respectivamente. Não foi observada diferença significativa no consumo final de substrato ( $p > 0,05$ ) entre os meios testados neste experimento pela levedura *K. marxianus* URM 7404.

Observa-se nesta fermentação que no meio M1 (composto somente por soro *in natura*), a levedura apresentou consumo de 1,44% a mais de lactose que o obtido na primeira fermentação (Figura 12 e Tabela 15), estando, portanto, de acordo com o esperado por esta linhagem.

**Figura 23.** Consumo de lactose (A) e proteína (B) do soro de queijo e dos meios suplementados, obtido pela levedura isolada *K. marxianus* URM 7404 em anaerobiose.



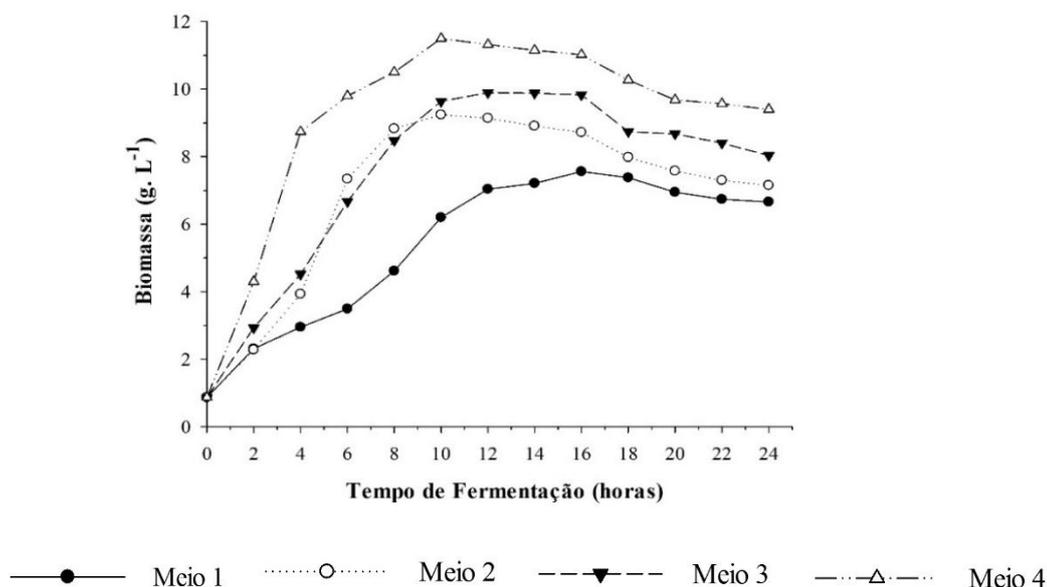
Quanto ao consumo de proteína (Figura 23 (B)), este foi maior no meio M4 com resultado final de  $0,70 \text{ g.L}^{-1}$ , seguido do meio M3 com  $0,88 \text{ g.L}^{-1}$ , M2 com  $1,02 \text{ g.L}^{-1}$  e M1 com  $1,23 \text{ g.L}^{-1}$ , representando consumo total de proteínas pela levedura nestes meios de 85,11%, 84%, 83,81% e 81,19% respectivamente. É importante lembrar que os meios M3 e M4 que apresentaram maiores consumo de proteínas, foram também os que partiram de uma concentração inicial de proteína menor, devido à precipitação das mesmas na presença destes nutrientes (sais) adicionados, conforme descrito na Tabela 27 e explicado no item 5.4.1.

### 5.4.3. Produção de biomassa e etanol

#### 5.4.3.1. Biomassa

Quanto à produção de biomassa obtida pela levedura *K.marxianus* URM 7404 nos diferentes meios testados, os resultados encontram-se descritos na Tabela 28 e o perfil fermentativo encontra-se na Figura 24.

**Figura 24.** Perfil de produção de biomassa obtido pela levedura isolada *K. marxianus* URM 7404 em anaerobiose no soro queijo *in natura* e nos meios suplementados.



**Tabela 28.** Parâmetros cinéticos obtidos em relação a produção de biomassa pela levedura *K.marxianus* URM 7404, a partir da fermentação do soro de queijo em diferentes suplementações.

Tempo (hs)	Meio 1				Meio 2			
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,87±0,43	0,00	0,00	0,00	0,87±0,43	0,00	0,00	0,00
2	2,31±0,21	0,10	1,97	0,72	2,28±0,31	0,08	1,58	0,71
4	2,95±0,27	0,13	1,03	0,52	3,93±0,30	0,10	1,00	0,77
6	3,49±0,30	0,09	1,74	0,44	7,34±0,25	0,16	1,96	1,08
8	4,61±0,09	0,12	1,33	0,47	8,83±0,21	0,20	2,11	1,00
10	6,20±0,07	0,17	1,61	0,53	9,24±0,51	0,20	2,10	0,84
12	7,04±0,12	0,19	1,73	0,51	9,14±0,18	0,20	1,90	0,69
14	7,21±0,19	0,18	1,67	0,45	8,91±0,16	0,19	1,76	0,57
16	7,56±0,21	0,18	1,70	0,42	8,72±0,18	0,18	1,68	0,49
18	7,38±0,27	0,17	1,52	0,36	7,98±0,32	0,16	1,43	0,40
20	6,95±0,15	0,14	1,24	0,30	7,58±0,30	0,15	1,29	0,34
22	6,74±0,10	0,13	1,18	0,27	7,30±0,29	0,13	1,23	0,29
24	6,66±0,11	0,12	1,09	0,24	7,15±0,21	0,13	1,19	0,26
Tempo (hs)	Meio 3				Meio 4			
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,87±0,43	0,00	0,00	0,00	0,87±0,43	0,00	0,00	0,00
2	2,93±0,40	0,30	3,22	1,03	4,30±0,18	0,30	3,43	1,72
4	4,52±0,32	0,21	2,52	0,91	8,74±0,24	0,56	3,28	1,97
6	6,67±0,33	0,21	3,07	0,97	9,80±0,23	0,32	2,84	1,49
8	8,48±0,16	0,25	3,27	0,95	10,50±0,19	0,33	2,84	1,20
10	9,64±0,53	0,25	3,37	0,88	11,50±0,15	0,36	3,05	1,06
12	9,90±0,60	0,25	2,87	0,75	11,32±0,16	0,30	2,66	0,87
14	9,88±0,45	0,24	2,82	0,64	11,15±0,09	0,28	2,58	0,73
16	9,83±0,21	0,24	2,79	0,56	11,02±0,05	0,26	2,50	0,63
18	8,74±0,34	0,20	2,36	0,44	10,27±0,17	0,22	2,20	0,52
20	8,68±0,30	0,19	2,27	0,39	9,68±0,21	0,20	2,02	0,44
22	8,40±0,26	0,17	2,12	0,34	9,57±0,23	0,20	1,97	0,40
24	8,04±0,32	0,15	1,79	0,30	9,40±0,20	0,18	1,85	0,36

Y<sub>X/S</sub>: conversão de substrato em biomassa (g g<sup>-1</sup>), Y<sub>X/P</sub>: conversão de proteína em biomassa (g g<sup>-1</sup>), Q<sub>X</sub>: produtividade em biomassa.

De acordo com a Tabela 28 e a Figura 24, o meio que apresentou maior produção de biomassa celular foi o M4 (composto de soro de queijo + extrato de leveduras + nutrientes), chegando a produção de 11,50 g.L<sup>-1</sup> em 10 horas de fermentação. Seguido do M3 (somente nutrientes) com produção de 9,90 g.L<sup>-1</sup> em 12 horas de fermentação, indicando que a adição de sais no meio favoreceu a produção de biomassa por esta levedura.

O meio M2 (somente extrato de levedura) apresentou produção máxima de biomassa de 9,24 g.L<sup>-1</sup> em 10 horas de fermentação. E o meio M1 (*in natura*- sem suplementação) neste caso, foi o que teve menor produção com valor de 7,56 g.L<sup>-1</sup> em 16 horas de fermentação. Não

havendo diferença significativa apenas entre os meios M2 e M3 quanto à produção de biomassa ( $p > 0,05$ ). O meio M1 apresentou produção de biomassa de 34,26% menor quando comparado com o M4; e de 23,50% e 18,20 % menor que o M3 e M2 respectivamente.

Quanto a produtividade celular ( $Q_X$ ), a conversão de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e a conversão de proteína em biomassa ( $Y_{X/P}$ ), estas também foram maiores no meio M4 com valores respectivos de  $1,97 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ,  $0,56 \text{ g.g}^{-1}$  e  $3,43 \text{ g.g}^{-1}$ . Seguidos do meio M3 com maior ( $Q_X$ ) de  $1,03 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,30 \text{ g.g}^{-1}$  e ( $Y_{X/P}$ ) de  $3,37 \text{ g.g}^{-1}$ . Já o meio M2 apresentou resultados similares ao M3 com maior ( $Q_X$ ) de  $1,08 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,20 \text{ g.g}^{-1}$  e ( $Y_{X/P}$ ) de  $2,11 \text{ g.g}^{-1}$ . E o meio M1 cujos seus valores mais satisfatórios de ( $Q_X$ ) foi de  $0,72 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,19 \text{ g.g}^{-1}$  e ( $Y_{X/P}$ ) de  $1,97 \text{ g.g}^{-1}$ .

Os meios M1 e M3 apresentaram suas maiores produtividades em biomassa com 2 horas de fermentação, já o meio M4 e M2 a maior produtividade em biomassa ocorreu com 4 e 6 horas de fermentação respectivamente, sendo possível observar uma queda significativa de lactose nestes tempos, conforme a Figura 24 (A).

Observa-se que o meio padrão M1 (sem suplemento) foi o que apresentou a menor produção de biomassa pela levedura, quando comparado com os meios suplementados (M2, M3 e M4), este acontecimento pode ser em virtude que os sais e o extrato de levedura serviram como uma mistura complexa de nutriente, composta de fontes de nitrogênio, vitaminas, entre outros, contendo constituintes celulares necessário para o crescimento da levedura (PARRONDO; GARCÍA; DÍAZ, 1996). Observando ainda que os meios que apresentaram maior consumo de proteínas foram os que apresentaram maior produção de biomassa, a qual é constituída principalmente por proteínas. Assim, no que se refere à produção de biomassa a partir do soro de queijo, a suplementação do meio é importante para induzir ao melhor crescimento da levedura.

Desse comportamento de cessar a produção de biomassa sem ter a escassez de fonte de carbono, acredita-se que ocorra em função da escassez dos demais nutrientes, ou a relação inadequada entre carbono e nitrogênio que impossibilitem a continuidade na síntese celular, ou ainda a ocorrência da produção de outros metabólitos, como o etanol (produto de interesse do presente estudo) e outros ácidos orgânicos, sendo que em elevadas concentrações de fonte de carbono e limitação da oxigenação do meio favorecem o metabolismo de produção de etanol.

Barbosa et al. (2010), utilizando soro de queijo suplementado com sais, obtiveram  $8,4 \text{ g.L}^{-1}$  de produção de biomassa com 12 h de fermentação, valor menor ao obtido no meio M4 e M2 do presente estudo, e com maior tempo de fermentação. Zafar et al. (2005) também ao suplementar o soro de queijo com diferentes sais, obtiveram em 26 horas de fermentação

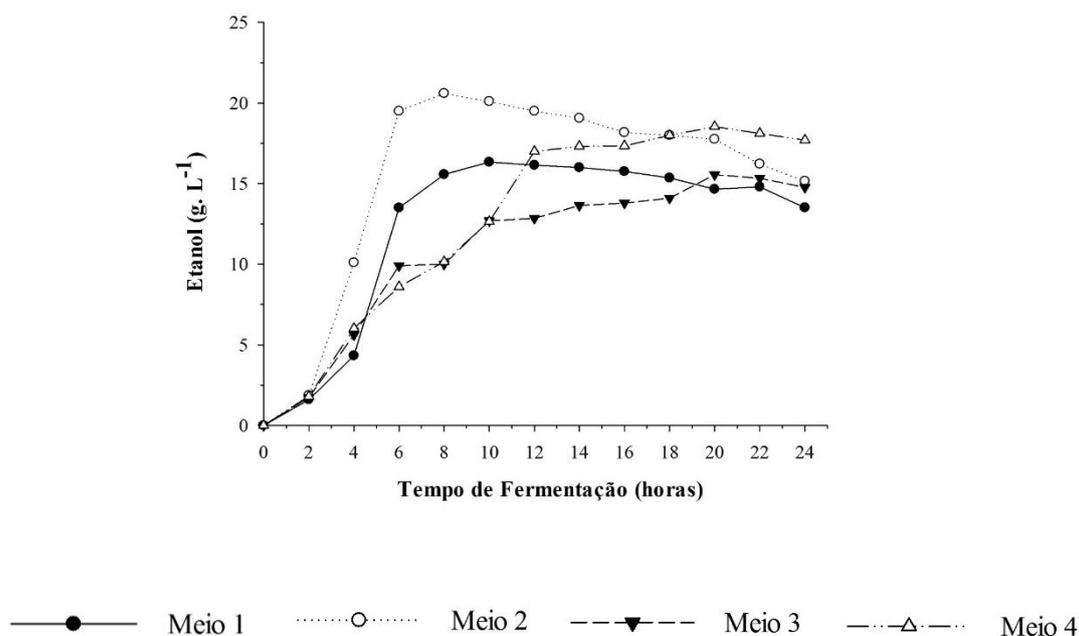
produção máxima de biomassa de  $10,34 \text{ g L}^{-1}$  com conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,22 \text{ g.g}^{-1}$ , o mesmo autor fermentando o soro de queijo *in natura* (sem suplementação) obteve produção de biomassa de  $9,53 \text{ g.L}^{-1}$ , diferença de 7,9% a menos que o obtido no soro suplementado.

Já Grba et al. (2002), ao suplementar o meio composto de soro de queijo com extrato de levedura e diferentes sais, obtiveram produção máxima de biomassa de aproximadamente  $6 \text{ g.L}^{-1}$  em 16 horas de fermentação com produtividade em biomassa ( $Q_X$ ) de  $1,90 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , resultado semelhante ao encontrado no meio M4 do presente estudo, sendo que a diferença neste caso também foi o tempo, e que a levedura utilizada levou menos tempo para atingir seus resultados mais satisfatórios.

#### 5.4.3.2. Etanol

A Figura 25 apresenta o perfil de produção de etanol pela levedura *K. marxianus* URM 7404 em soro de queijo *in natura* e meios com soro de queijo suplementado. Enquanto a Tabela 29 apresenta os resultados da cinética de produção de etanol, produtividade, conversão de substrato em etanol e rendimento etanólico pela levedura.

**Figura 25.** Perfil de produção de etanol obtido pela levedura isolada *K. marxianus* URM 7404 em anaerobiose no soro queijo *in natura* e nos meios suplementados.



**Tabela 29.** Parâmetros cinéticos obtidos em relação a produção de etanol pela levedura *K.marxianus* URM 7404, a partir fermentação do soro de queijo em diferentes suplementações.

Tempo (hs)	Meio 1				Meio 2			
	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)
0	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
2	1,60±0,32	0,11	0,80	20,70	1,85±0,12	0,10	0,93	18,90
4	4,33±0,43	0,26	1,08	49,30	10,10±0,32	0,31	2,53	58,70
6	13,50±0,33	0,48	2,25	88,60	19,50±0,3	0,48	3,25	90,30
8	15,57±0,45	0,50	1,94	93,87	20,60±0,44	0,51	2,58	95,70
10	16,34±0,51	0,51	1,63	94,80	20,10±0,61	0,49	2,01	92,20
12	16,15±0,29	0,50	1,35	92,90	19,50±0,32	0,47	1,63	87,70
14	16,00±0,32	0,46	1,14	86,50	19,06±0,21	0,46	1,36	85,50
16	15,76±0,23	0,43	0,99	80,70	18,17±0,20	0,43	1,14	79,60
18	15,36±0,21	0,40	0,85	75,10	18,00±0,17	0,40	1,00	74,90
20	14,66±0,50	0,34	0,73	62,90	17,76±0,17	0,39	0,89	72,60
22	14,80±0,43	0,33	0,67	61,90	16,22±0,23	0,34	0,74	63,20
24	13,51±0,34	0,29	0,56	54,30	15,15±0,20	0,31	0,63	58,20
Tempo (hs)	Meio 3				Meio 4			
	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)	Etanol g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>P/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>P</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	η (%)
0	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
2	1,74±0,23	0,25	0,23	46,80	1,80±0,12	0,16	0,15	29,30
4	5,61±0,67	0,33	1,40	60,70	6,02±0,27	0,28	1,50	53,36
6	9,90±0,54	0,35	1,65	65,70	8,60±0,18	0,31	1,43	57,90
8	10,00±0,32	0,32	1,25	60,50	10,15±0,23	0,35	1,27	65,30
10	12,70±0,21	0,37	1,27	68,30	12,65±0,37	0,43	1,27	79,90
12	12,85±0,56	0,36	1,07	66,30	17,00±0,24	0,44	1,41	87,85
14	13,65±0,45	0,37	0,98	68,50	17,32±0,21	0,47	1,42	88,10
16	13,80±0,83	0,37	0,86	69,20	17,35±0,20	0,44	1,08	81,40
18	14,10±0,32	0,35	0,78	65,50	18,00±0,17	0,43	1,00	79,60
20	15,56±0,10	0,39	0,78	72,10	18,54±0,18	0,43	0,93	79,90
22	15,34±0,12	0,34	0,70	63,30	18,12±0,18	0,42	0,82	77,69
24	14,77±0,14	0,31	0,62	54,70	17,70±0,10	0,38	0,74	69,65

Y<sub>P/S</sub>: conversão de substrato a etanol (g.g<sup>-1</sup>), Q<sub>P</sub>: produtividade em etanol (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), η: rendimento etanólico (%).

De acordo com a Figura 25 e a Tabela 29, observa-se que em termos de produção de etanol o meio que apresentou maior produção foi o meio M2, com pico máximo de etanol de 20,60 g.L<sup>-1</sup> em 8 horas de fermentação, seguido do meio M4 com produção máxima de 18,54 g.L<sup>-1</sup> em 20 horas de fermentação, M1 com produção de 16,34 g.L<sup>-1</sup> em 10 horas de fermentação, e o M3 com 15,56 g.L<sup>-1</sup> em 20 horas de fermentação. Havendo diferença significativa quanto à produção de etanol pela levedura nos diferentes meios testados ( $p < 0,05$ ).

Embora alguns meios tenham produzido uma concentração alta de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ), o que foi levado em consideração neste processo fermentativo conforme discutido anteriormente, foi o rendimento etanólico ( $\eta$ ) final e os demais parâmetros cinéticos, além do tempo de ocorrência destes.

Neste caso, o meio M2 apresentou maior rendimento etanólico ( $\eta$ ) de 95,70% em 8 horas de fermentação, seguido do meio M1 com rendimento ( $\eta$ ) de 94,80% em 10 horas de fermentação. Observando que no período de até 6 horas de fermentação houve um acentuado consumo de lactose (Figura 25 (A)) e com maior conversão de substrato em etanol ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,51 \text{ g.g}^{-1}$  pela levedura no meio M2. Já no meio M1 entre 6 e 10 horas de fermentação observa-se um alto consumo de lactose com conversão de substrato em etanol ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,52 \text{ g.g}^{-1}$ , ressaltando que esse meio continha somente soro de queijo, sem suplementação, sendo assim o meio M1 apresentou praticamente o mesmo rendimento em etanol do meio suplementado com extrato de levedura (M2) e com poucas horas de diferença. A maior produtividade ( $Q_P$ ) etanólica destes meios foram em 6 horas de fermentação, sendo de  $3,25 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $2,25 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para o meio M2 e M1 respectivamente. Observando assim, proximidade nos resultados obtidos em tais meios.

O meio M4 que de acordo com a Tabela 29, apresentou a segunda maior produção de etanol, foi o terceiro meio com maior rendimento etanólico de 88,10% e ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,47 \text{ g.g}^{-1}$  em 14 horas de fermentação, seguido do meio M3 com rendimento de 72,10% e ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,39 \text{ g.g}^{-1}$  em 20 horas de fermentação. Quanto a produtividade ( $Q_P$ ) esta foi de  $1,50 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para o meio M4 e de  $1,65 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para o meio M3 em 4 e 6 horas de fermentação respectivamente.

Observa-se também, que os meios que apresentaram maior produção de biomassa M4 e M3, (Figura 24) foram os que apresentaram menor produção de etanol e em maior tempo (Figura 25), sendo que após a levedura atingir seu pico máximo de produção celular nestes meios, ela ainda continuou a fermentação para produção de etanol, mantendo-se constante após a obtenção deste produto.

Ao contrário do ocorrido nos meios M2 e M1, onde mesmo ao atingir o seu máximo de produção de etanol em 6 e 10 horas respectivamente (Figura 25), esta linhagem isolada ainda apresentou crescimento durante um tempo de fermentação até atingir a máxima de produção celular em 10 horas para o meio M2 e 16 horas para o meio M1 (Figura 24).

Este acontecimento pode ter ocorrido pelo fato da levedura começar a tirar o excesso de álcool do meio que poderia estar sendo tóxico a ela, produzindo outras moléculas menos tóxicas como ácidos orgânicos (conforme explicado no item 5.3.3), conseguindo desta

maneira continuar seu crescimento, pois ainda há lactose no meio, conforme mostra a Figura 23 (A). Esse perfil fermentativo também foi observado por Vincenzi et al. (2014), ao fermentar soro de queijo com *Kluyveromyces* sp.

No entanto, como o foco do presente estudo é o etanol, levou-se em conta o melhor tempo em que a levedura *K. marxianus* URM 7404 apresentou melhor produção, rendimento etanólico e os outros parâmetros cinéticos analisados, em relação ao substrato utilizado, no caso a lactose. Sendo assim, o meio de soro de queijo suplementado com extrato de levedura (M2) foi o que apresentou resultados mais satisfatórios de acordo com o estudo.

Vale ressaltar, que o meio de soro de queijo *in natura* sem suplementação (M1) é tão eficaz quanto os meios suplementados, uma vez que seus resultados foram próximos aos obtidos nos demais meios testados, e em alguns casos até superior e sem a necessidade de adicionar um suplemento, que de certa forma acaba sendo dispendioso.

Garbado et al. (2014), ao utilizar soro de queijo em biorreator de leite fluidizado com células de levedura do gênero *Kluyveromyces* imobilizadas, obtiveram rendimento etanólico máximo de 89,20%, com produtividade de 2,53 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e conversão de substrato em etanol de 0,47 g.g<sup>-1</sup>. Já Koutinas et al. (2007), utilizando leveduras isoladas de grânulos de Kefir na fermentação do soro de queijo suplementado, obtiveram produtividade etanólica de 2,07 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, com conversão de substrato em etanol de 0,40 g.g<sup>-1</sup> e rendimento de 97,6%, sendo estes resultados bem similares ao obtido no presente estudo, mostrando que a levedura isolada também apresenta grande potencial para bioconversão da lactose em etanol.

Nesta segunda fermentação do soro de queijo realizada pela levedura isolada (*K. marxianus* URM 7404), foi possível observar, que quando comparada com os resultados da produção de etanol e rendimento etanólico obtido nas primeiras fermentações (Figura 15 (C) e Tabela 18), este processo apresentou resultados mais eficazes e satisfatórios, isto pode ser em decorrência do metabolismo da levedura estar se adaptando melhor a fonte de carbono fornecida, no caso a lactose, assim metabolizando de maneira melhor e maior o substrato, levando a maior conversão da lactose em etanol.

### 5.4.3.3. Demanda química de oxigênio

Quanto à análise de DQO realizada no final da fermentação, a Tabela 30 apresenta os resultados finais obtidos.

**Tabela 30.** Comparação da eficiência na redução de DQO do soro de queijo em diferentes suplementações, pela levedura *K. marxianus* URM 7404 em 24 horas de fermentação.

	0	24 horas	
	DQO Inicial (mg.L <sup>-1</sup> )	DQO Final (mg.L <sup>-1</sup> )	Redução (%)
<b>M1</b>	45.000	7.850	82,55
<b>M2</b>	50.300	7.450	85,20
<b>M3</b>	38.800	8.970	76,88
<b>M4</b>	48.170	10.570	78,05

Mesmo partindo de uma concentração maior de DQO de 50.300 mg.L<sup>-1</sup>, o meio M2 foi o que apresentou maior eficiência na redução de matéria orgânica com redução de 85,20%, seguido do meio M1 com 82,55% e do meio M4 com 78,05%.

Mesmo cada meio testado tendo partido de uma concentração inicial de DQO diferente (fato explicado no item 5.4), a eficiência final na redução de carga orgânica foi satisfatória para todos. Vale lembrar que esses meios citados também foram os que apresentaram maior consumo de lactose pela levedura, e também nessa mesma ordem (M2, M1 e M4), coincidindo com tais resultados obtidos em 24 horas de fermentação (Figura 23 (A)).

Observa-se também nesta segunda fermentação realizada, que a levedura *K. marxianus* URM 7404 apresentou maior eficiência na redução de carga orgânica do soro de queijo *in natura*, quando comparada com a primeira fermentação realizada em anaerobiose, com um aumento na eficiência da redução de carga orgânica 9,55%. Isso também pode ser devido à adaptação da levedura com o substrato e melhoramento do metabolismo em lactose, conforme discutido anteriormente.

### 5.5. Parte 5- MELHORAMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

Vale ressaltar primeiramente que nas primeiras etapas de fermentação do soro de queijo pela levedura isolada, os experimentos foram conduzidos em tempo de fermentação de até 24 horas, pois até então não tinha conhecimento do perfil fermentativo da levedura. A partir das primeiras etapas da tese, que consistiram na fermentação em soro de queijo e permeado de soro e posteriormente na fermentação do soro em diferentes tipos de suplementações, foi possível observar os tempos nos quais a levedura apresentara seus melhores e mais satisfatórios resultados, por este motivo, a partir desta etapa em diante a fermentação passou a ser realizada em menor tempo de cultivo, a fim de tornar o processo para produção de etanol mais eficaz quanto ao tempo.

#### 5.5.1. Melhoria das condições de cultivo para fermentação do soro de queijo pela levedura *K. marxianus* URM 7404

Após a etapa de análise sobre a melhor suplementação do soro de queijo para levedura estudada *K. marxianus* URM 7404 (item 5.4), seguiu-se para etapa de melhoria das condições de cultivo para essa levedura. Sendo assim, os meios para realizar o melhoramento do cultivo foram suplementados com extrato de levedura, conforme os resultados analisados e estudados no item anterior.

A Tabela 31 apresenta os valores de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ), rendimento (%) e produtividade em etanol ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) sobre a variação de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH, e concentração de lactose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) através do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)  $2^3$ .

Após a realização do DCCR pode ser verificado que a variação observada nos experimentos foi de  $12,64 \text{ g.L}^{-1}$  (ensaio 8) a  $29,78 \text{ g.L}^{-1}$  (ensaio 16) para produção em etanol, com variação em rendimento de 55% (ensaio 7) a 98% (ensaio 15 e 17) e obtendo uma variação em produtividade em etanol de  $1,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 6) a  $2,48 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 15). Em geral, observa-se que para produção de etanol, rendimento e produtividade, os melhores resultados estão no ponto central.

Nesse estudo de condições de melhoria das condições de cultivo para a produção de etanol a partir do soro de queijo, conseguiu-se aumentar em 30,82% a produção de etanol e 3,06 % em rendimento, quando comparando as condições iniciais de estudo com suplementação do meio com extrato de levedura (item 5.4.3.2).

**Tabela 31:** Delineamento composto central 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para maximização da condição de produção de etanol pela *Kluyveromyces marxianus*.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>
1	34,7 (+1)	5,6 (+1)	66,0 (+1)	28,3	94	2,36
2	34,7 (+1)	5,6 (+1)	54,0 (-1)	20,8	84	1,73
3	34,7 (+1)	4,4 (-1)	66,0 (+1)	18,53	67	1,54
4	34,7 (+1)	4,4 (-1)	54,0 (-1)	14,88	73	1,24
5	31,3 (-1)	5,6 (+1)	66,0 (+1)	15,56	56	1,30
6	31,3 (-1)	5,6 (+1)	54,0 (-1)	14,45	67	1,20
7	31,3 (-1)	4,4 (-1)	66,0 (+1)	15,90	55	1,33
8	31,3 (-1)	4,4 (-1)	54,0 (-1)	12,64	58	1,05
9	36,0 (+1,68)	5,0 (0)	60,0 (0)	24,93	94	2,08
10	30,0 (-1,68)	5,0 (0)	60,0 (0)	19,78	77	1,64
11	33,0 (0)	6,0 (+1,68)	60,0 (0)	19,70	75	1,65
12	33,0 (0)	4,0 (-1,68)	60,0 (0)	14,50	56	1,21
13	33,0 (0)	5,0 (0)	70,0 (+1,68)	27,08	84	2,26
14	33,0 (0)	5,0 (0)	50,0 (-1,68)	20,60	87	1,72
15	33,0 (0)	5,0 (0)	60,0 (0)	29,78	98	2,48
16	33,0 (0)	5,0 (0)	60,0 (0)	29,40	97	2,45
17	33,0 (0)	5,0 (0)	60,0 (0)	28,80	98	2,40

X<sub>1</sub> = Temperatura (°C); X<sub>2</sub> = pH inicial; X<sub>3</sub> = Lactose (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>1</sub> = Etanol (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub> = Rendimento; Y<sub>3</sub> = Produtividade em etanol (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

### 5.5.2. Verificação dos modelos para as respostas produção em etanol, rendimento e produtividade pela levedura *Kluyveromyces marxianus*

A Tabela 32 apresenta os efeitos das variáveis independentes estudadas (temperatura, pH inicial e concentração de lactose) sobre produção de etanol, rendimento e produtividade. Como pode ser observado para a produção de etanol, todos os parâmetros foram significativos ( $p < 0,05$ ), somente a interação pH inicial x concentração de lactose não foi significativo ( $p > 0,05$ ), mas apresentou um efeito positivo.

Para o rendimento, verifica-se que todos os parâmetros foram significativos ( $p < 0,05$ ), além disso, as interações exerceram efeito positivo quando aumentado seu nível de (-1) para o nível superior (+1).

A produtividade em etanol apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), para as variáveis, temperatura, pH inicial e concentração de lactose. Somente as interações não foram significativas ( $p > 0,05$ ), mas exerceram efeito positivos.

**Tabela 32:** Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta etanol, rendimento e produtividade em etanol.

	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )					Rendimento (%)			
	CR	EP	t (2)	p		CR	EP	t (2)	p
Média*	29,52	0,28	103,71	<0,01	Média*	98,23	0,33	295,30	<0,01
X <sub>1</sub> (L)*	2,39	0,13	17,86	<0,01	X <sub>1</sub> (L)*	8,10	0,15	51,84	<0,01
X <sub>1</sub> (Q)*	- 3,12	0,15	-21,23	<0,01	X <sub>1</sub> (Q)*	- 6,18	0,17	51,84	<0,01
X <sub>2</sub> (L)*	1,90	0,13	14,19	<0,01	X <sub>2</sub> (L)*	5, 86	0,15	-35,92	<0,01
X <sub>2</sub> (Q)*	- 5,00	0,15	-33,86	<0,01	X <sub>2</sub> (Q)*	- 13,27	0,17	-77,07	0,02
X <sub>3</sub> (L)*	1,94	0,13	14,47	<0,01	X <sub>3</sub> (L)*	- 1,10	0,16	-7,05	<0,01
X <sub>3</sub> (Q)*	- 2,60	0,15	-17,66	<0,01	X <sub>3</sub> (Q)*	- 6,18	0,17	-35,92	<0,01
X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> *	1,78	0,17	10,17	0,01	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> *	3,50	0,20	17,15	<0,01
X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub> *	0,85	0,17	4,85	0,03	X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub> *	2,25	0,20	11,02	<0,01
X <sub>2</sub> xX <sub>3</sub>	0,21	0,17	1,22	0,35	X <sub>2</sub> xX <sub>3</sub> *	1,00	0,20	4,90	0,04

	Produtividade em Etanol (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )			
	CR	EP	t (7)	p
Média*	2,46	0,12	21,15	<0,01
X <sub>1</sub> (L)*	0,2	0,05	3,66	<0,01
X <sub>1</sub> (Q)*	- 0,26	0,06	- 4,35	<0,01
X <sub>2</sub> (L)*	0,16	0,05	2,90	0,02
X <sub>2</sub> (Q)*	- 0,41	0,06	- 6,88	<0,01
X <sub>3</sub> (L)*	0,16	0,05	2,97	0,02
X <sub>3</sub> (Q)*	- 0,22	0,06	- 3,58	<0,01
X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub>	0,15	0,07	2,08	0,075
X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub>	0,07	0,07	0,96	0,37
X <sub>2</sub> xX <sub>3</sub>	0,02	0,07	0,26	0,80

\* ( $p < 0,05$ ); X<sub>1</sub>: Temperatura (°C); X<sub>2</sub>: pH; X<sub>3</sub>: Lactose (g.L<sup>-1</sup>).

Através da Tabela 32, pode-se estimar a produção de etanol, rendimento e produtividade em etanol, em termos de um modelo quadrático apresentados na equação 12, 13 e 14. Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância (ANOVA), como mostra a Tabela 33.

**Tabela 33:** Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2<sup>3</sup>.

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	Etanol	Rend.	Etanol	Rend.	Etanol	Rend.	Etanol	Rend.
Regressão	530,78	3611,06	9	9	58,98	401,23	10,1	7,26
Resíduo	40,87	386,82	7	7	5,84	55,26		
Total	571,65	3997,88						

Produtividade em Etanol (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )								
Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	Regressão	3,69		9		0,41		10,25
Resíduo	0,28		7		0,04			
Total	3,97		16					

Rend. = Rendimento etanólico; Etanol (R: 0,96, F<sub>9;7; 0,95</sub> = 3,68); Rend. (R: 0,95, F<sub>9;7; 0,95</sub> = 3,68); Produtividade em etanol (R: 0,96, F<sub>9; 7; 0,95</sub> = 3,68).

A Tabela 33 apresenta o valor de F<sub>calculado</sub> de 10,1; 7,26 e 10,25 para as respostas etanol, rendimento e produtividade, respectivamente, apresentando um coeficiente de correção (R<sup>2</sup>) de aproximadamente 0,95 a 0,96 para três respostas. Com isso, o F<sub>calculado</sub> foi de 2,75 vezes maior que o F<sub>tabelado</sub> para etanol. Para o rendimento o F<sub>calculado</sub> foi de 1,97 vezes maior que o F<sub>tabelado</sub> e para a produtividade em etanol o F<sub>calculado</sub> foi de 2,79.

Com os valores de R<sup>2</sup> acima de 80% e coerência no F teste é possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam as respostas em função das variáveis temperatura, pH inicial e lactose nas faixas estudadas, mostradas nas Equações 12, 13 e 14.

$$\text{Etanol (g.L}^{-1}\text{): } 29,52 + 2,39.\text{Temp} - 3,12.\text{Temp}^2 + 1,90.\text{pH} - 5,00.\text{pH}^2 + 1,93.\text{Lact} - 2,60.\text{Lact}^2 + 1,78.\text{Tem.pH} + 0,85.\text{Tem.Lact} \quad (12)$$

$$\text{Rendimento: } 98,23 + 8,10.\text{Temp} - 6,18.\text{Temp}^2 + 5,86.\text{pH} - 13,27.\text{pH}^2 - 1,10.\text{Lact} - 6,18.\text{Lact}^2 + 3,50.\text{Tem.pH} + 2,25.\text{Tem.Lact} + 1.\text{pH.Lact} \quad (13)$$

$$\text{Produtividade em etanol (g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{): } 2,46 + 0,20.\text{Temp} - 0,26.\text{Temp}^2 + 0,16.\text{pH} - 0,41.\text{pH}^2 + 0,16.\text{Lact} - 0,22.\text{Lact}^2 + 0,15.\text{Tem.pH} + 0,07.\text{Tem.Lact} \quad (14)$$

Onde: Temp: Temperatura; Lact: Lactose.

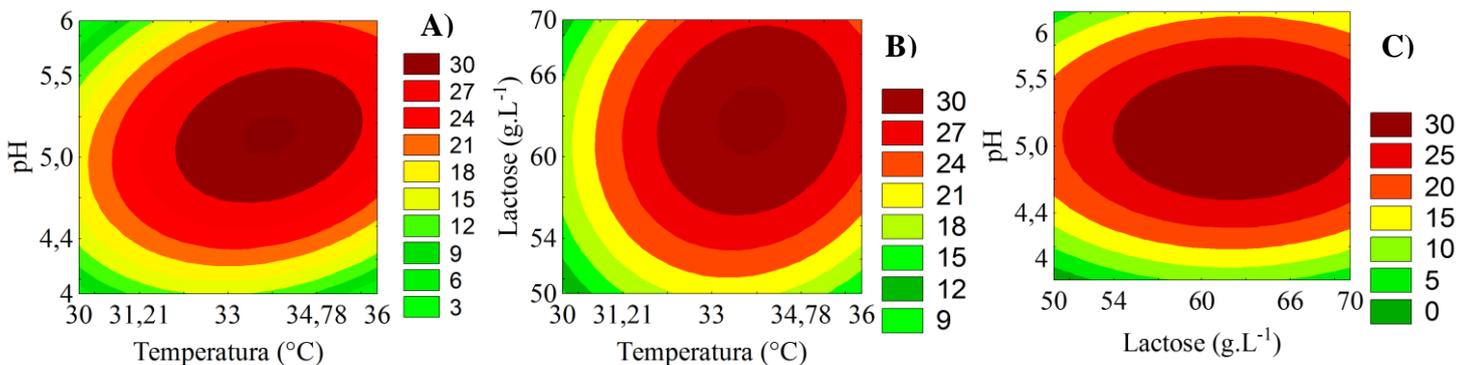
Os resultados do desvio relativo entre os resultados experimentais e preditos pelo modelo, apresentados na Tabela 31, foram inferiores a 20% (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Dessa forma, as Equações 12, 13 e 14 preveem bem o comportamento da produção de etanol, rendimento e produtividade em etanol, frente às variáveis estudadas.

As Figuras 26, 27 e 28 permitem acompanhar o comportamento das variáveis significativas na produção de etanol, rendimento e produtividade em etanol.

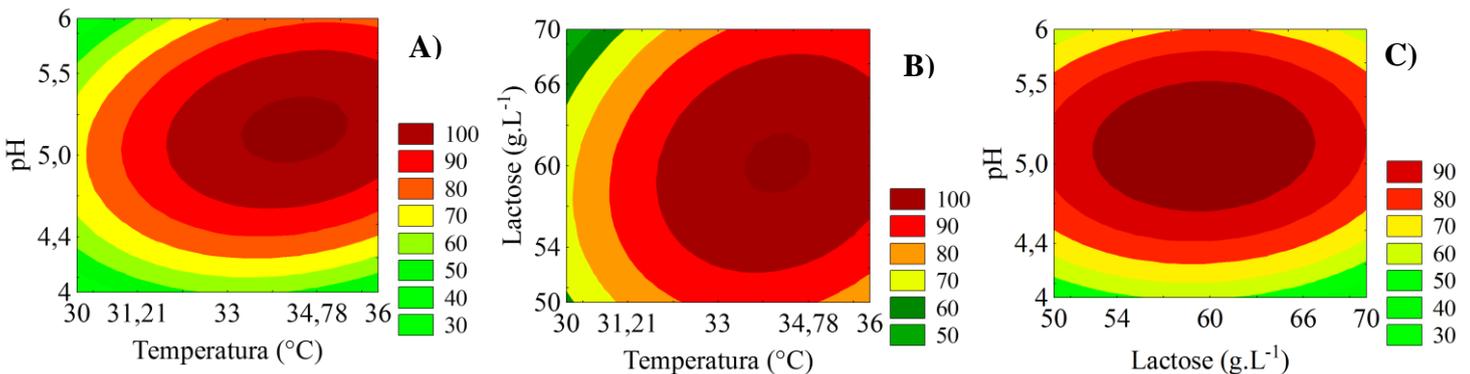
Conforme observado na Figura 26, para obter elevada produção em etanol deve estar o pH inicial na faixa 4,75 a 5,4 e temperatura entre 32,1 a 35,5 °C. Quando trabalhando com a concentração de lactose deve ser 57 a 69,2 g.L<sup>-1</sup> e temperatura na faixa de 32,11 a 35,30 °C. Ou quando trabalhando com pH inicial 4,5 a 5,6 sendo a concentração de lactose de 54 a 70 g.L<sup>-1</sup>. Para as demais respostas como rendimento e produtividade observa-se faixas semelhantes.

Portanto, para a obtenção dos máximos para todas as respostas são necessários pH inicial 4,6 a 5,6, concentração de lactose entre 54 a 66 g.L<sup>-1</sup> e Temperatura entre 32,11 a 35,30 °C.

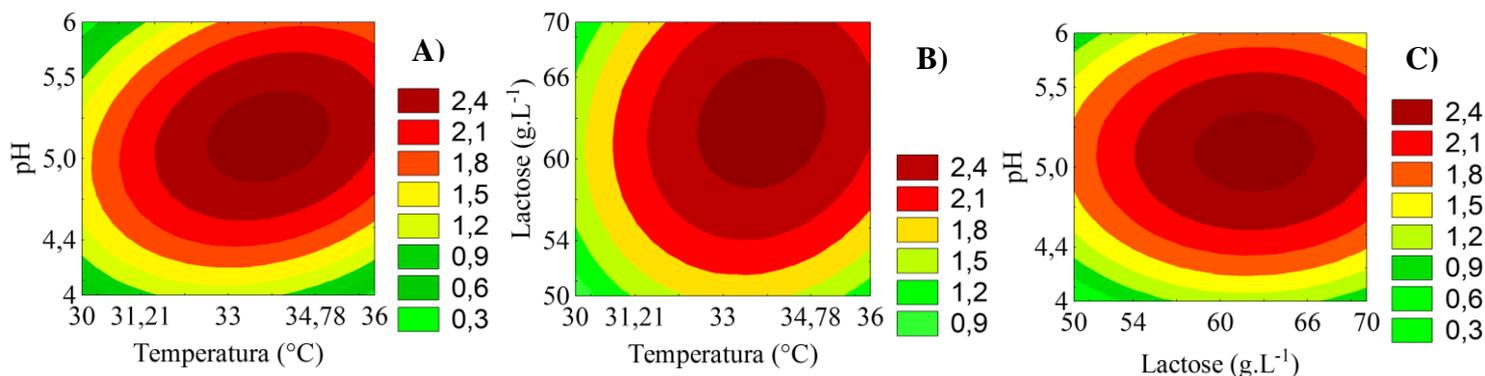
**Figura 26:** Curva de contorno para a resposta produção de etanol.



**Figura 27:** Curva de contorno para a resposta rendimento.



**Figuras 28:** Curva de contorno para a resposta produtividade em etanol.

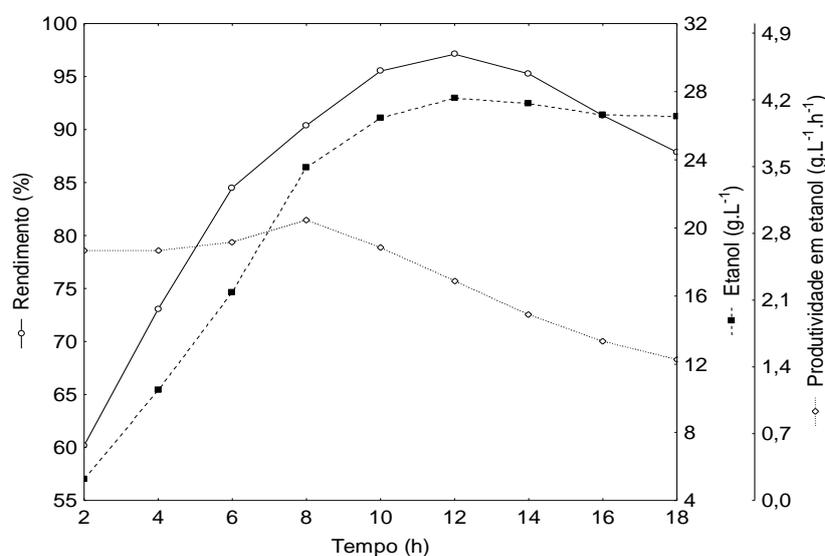


### 5.5.3. Validação do modelo para a produção de etanol com soro de queijo

Para a validação do modelo selecionou-se o meio de cultivo onde as variáveis se encontram nos níveis para máxima produção em etanol, de forma a aproveitar o máximo das condições de processo e de cultivo: pH inicial 5 e temperatura de 33°C e 60 g.L<sup>-1</sup> de lactose. A produção foi realizada de acordo com item 4.2.4. A Figura 29 mostra os resultados médio da cinética, dos ensaios realizados em triplicata, para a produção em etanol, rendimento e produtividade em etanol.

Na Figura 29 percebe-se um aumento da produção de etanol até o tempo de 12 horas obtendo 27,61 g.L<sup>-1</sup>, além disso, o rendimento máximo (97,11%) também ocorreu nesse mesmo tempo. Após esse período ocorre um decréscimo na produção. Esse decréscimo observado é típico para a levedura *Kluyveromyces marxianus* devido ao produto ser extremado pela célula, até uma certa concentração, tornado tóxico para a levedura e inibindo a sua produção. Para a produtividade, a máxima ocorrida foi no tempo de 8 horas obtendo 2,94 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

**Figura 29.** Valores médios de etanol, rendimento e produtividade etanólica no acompanhamento dos ensaios para validação do modelo matemático.



A Tabela 34 mostra os resultados da validação para as respostas etanol, rendimento e produtividade em etanol.

**Tabela 34:** Respostas da validação do modelo matemático.

	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento	Prod. em etanol (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>Resposta prevista</b>	29,52	97,11	2,94
<b>Resposta experimental</b>	27,61	98,23	2,46
<b>Desvio do modelo</b>	-6,92	1,14	16,33

\*Resultados são médias dos ensaios em triplicatas

Percebe-se que as respostas etanol e rendimento no ensaio da validação do modelo foram bem próximos ao previsto, apresentam um desvio inferior a 20%. Obtendo 27,61 g.L<sup>-1</sup> em etanol e com rendimento de 98%. A diferença observada na resposta pode ser atribuída a alguma mudança no metabolismo da levedura por exemplo, ou na sua ativação para o cultivo.

De maneira geral, comparando os resultados obtidos nos experimentos que visavam a validação, percebe-se que conduzir a fermentação alcoólica na condição da máxima produção foi mais vantajosa em termos de respostas analisadas, pois foi possível obter além de melhor produção de etanol, melhor rendimento e produtividade.

Os resultados aqui obtidos podem ser comparados favoravelmente com outros relatados na literatura, como por exemplo, Ghanadzadeh e Ghorbanpour (2012), otimizando as condições de cultivo para *K. marxianus* em soro de queijo para produção de etanol, obtiveram resultados eficazes para essa variável ao utilizar as concentrações de lactose, pH e temperatura nos valores medianos estudados, obtendo rendimento etanólico de 89,28% e produção de etanol

de aproximadamente  $25 \text{ g.L}^{-1}$  com quase que a totalidade do consumo de lactose, esses autores utilizaram as melhores condições de otimização que foram pH 5,3, temperatura de  $30,8^\circ\text{C}$  e lactose de  $42 \text{ g.L}^{-1}$ .

Dragone et al. (2011), em sua otimização do soro de queijo por *K. fragilis*, apresentaram resultados mais eficazes para suas variáveis estudadas a partir do aumento da concentração de lactose do meio, assim como na temperatura. Sendo assim, esses autores obtiveram produção máxima de etanol de  $55,9 \text{ g.L}^{-1}$ , rendimento de 69,04%, produtividade  $1,27 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e conversão  $0,37 \text{ g.g}^{-1}$ , a partir de condições de cultivo de  $150 \text{ g.L}^{-1}$  de lactose e temperatura de  $30^\circ\text{C}$ .

Assim como Sansonetti et al. (2010), que em condições de otimização semelhantes à do presente estudo para produção de etanol por *K. marxianus* em soro de ricotta, obtiveram rendimento etanólico de 84 % e produção de  $21,29 \text{ g.L}^{-1}$ , utilizando temperatura de  $32,35^\circ\text{C}$ , pH 5,41 e lactose de aproximadamente  $47 \text{ g.L}^{-1}$ .

Estes autores observaram, assim como no presente estudo, que concentrações mais altas de lactose e temperatura levam a uma drástica diminuição na formação do produto e na utilização do substrato. Em altas temperaturas, o efeito deletério no rendimento de etanol pode ser atribuído à desnaturação de ribossomos, enzimas e problemas associados à fluidez da membrana, e altas concentrações de lactose. Pode levar ao estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa, levando às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática, conforme discutido anteriormente (GHANADZADEH E GHORBANPOUR, 2012; DRAGONE, et al 2011).

## 5.6. AMPLIAÇÃO DA ESCALA DE FERMENTAÇÃO

### 5.6.1. Ampliação da escala fermentativa do soro de queijo pela levedura *K. marxianus* URM 7404

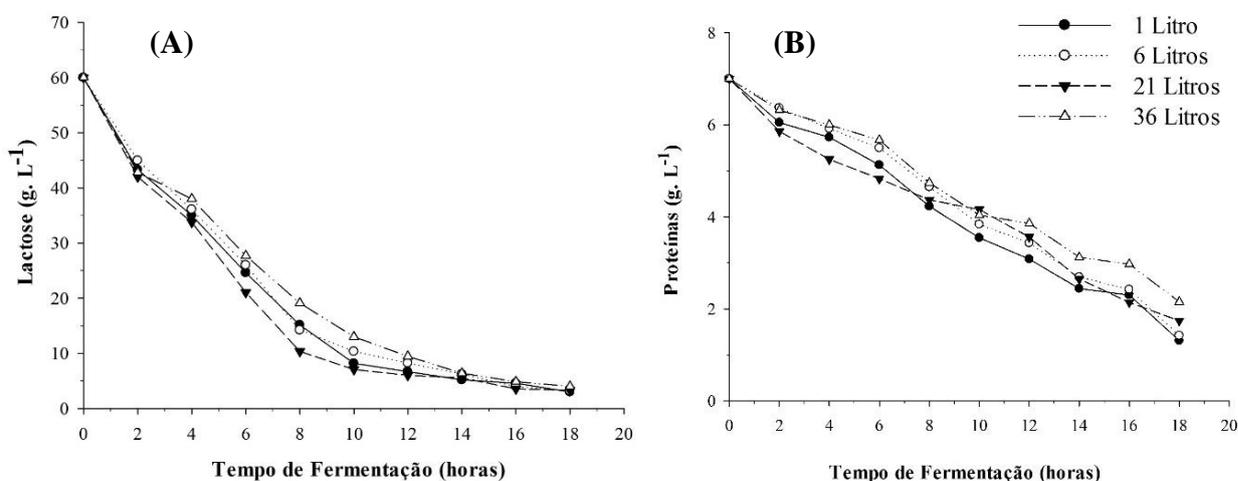
Após a etapa de melhoramento das condições experimentais estabelecidas em bancada, o processo fermentativo foi redimensionado, para verificação do comportamento fermentativo, do consumo de substrato, a evolução da produção de etanol, do rendimento e de outros fatores de conversão.

### 5.6.2. Consumo de lactose e proteína

Quanto ao consumo de lactose, após 18 horas de fermentação, esta foi reduzida para 3 g.L<sup>-1</sup>, 3,15 g.L<sup>-1</sup>, 3,29 g.L<sup>-1</sup> e 4 g.L<sup>-1</sup> para o cultivo em 1 L, 6 L, 21 L e 36 L respectivamente (Figura 30 (A)), o que representou consumo de 95%, 94,75%, 94,52% e 93,34% respectivamente, não havendo diferença no teor final de lactose entre os meios com 1 L e 6 L e entre os meios com 6 L e 21 L ( $p > 0,05$ ).

Assim, observa-se que a partir de 36 L de meio para fermentação, o consumo de lactose pela levedura começa a ficar mais lento e menor, o que pode ser explicado em decorrência do volume a ser fermentado.

**Figura 30.** Consumo de lactose (A) e proteína (B) obtido pela levedura *K. marxianus* em ampliação de escala fermentativa.



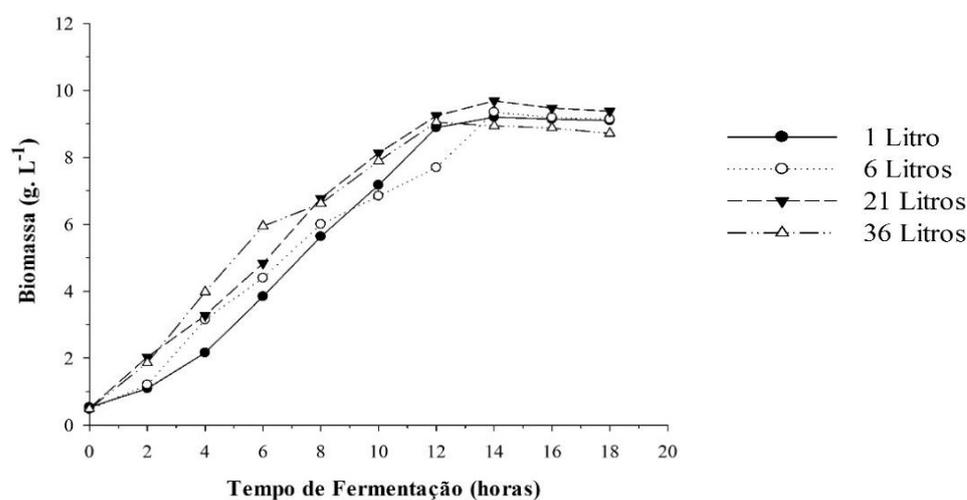
Em relação ao consumo de proteínas, o mesmo foi observado, onde o teor final de proteína solúvel foi de  $1,31 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $1,42 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $1,74 \text{ g.L}^{-1}$  e  $2,15 \text{ g.L}^{-1}$  para o cultivo em 1L, 6 L, 21 L e 36 L respectivamente (Figura 30 (B)), o que representou um consumo de 81,29%, 79,71%, 75,14% e 69,29% respectivamente. No entanto, neste caso, observa-se diferença no teor de proteínas final entre o meio de 36 L com os demais meios estudados.

### 5.6.3. Produção de biomassa e etanol

#### 5.6.3.1. Biomassa

Quanto a produção de biomassa, observa-se de acordo com a Figura 31, que o perfil de crescimento pela levedura foi um pouco diferente, quando comparado com os demais resultados apresentados anteriormente, pois com esta ampliação, o perfil de crescimento, apresentou-se mais padronizado, isto é, pode-se observar que a levedura está mais e melhor adaptada ao substrato soro de queijo, não apresentando variações no decorrer da fermentação.

**Figura 31.** Produção de biomassa obtida pela levedura *K. marxianus* em ampliação de escala fermentativa.



De acordo com a Tabela 35 apresentada a seguir, quanto aos valores máximos de produção de biomassa, é possível observar que, independente da variação de volume estudado na ampliação de escala, a produção celular em si foi próxima para os quatro volumes fermentativos da escala piloto estudada.

**Tabela 35.** Produção de biomassa e parâmetros cinéticos avaliados após a fermentação do soro de queijo pela levedura *K. marxianus* em ampliação de escala fermentativa.

Tempo (hs)	1 Litro				6 Litros			
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,53±0,21	0,00	0,00	0,00	0,47±0,18	0,00	0,00	0,00
2	1,09±0,20	0,03	0,59	0,28	1,20±0,09	0,05	1,16	0,37
4	2,16±0,41	0,07	1,28	0,41	3,15±0,10	0,11	2,48	0,67
6	3,84±0,34	0,09	3,60	0,55	4,39±0,17	0,10	4,51	0,65
8	5,63±0,15	0,11	1,84	0,64	6,00±0,10	0,12	2,35	0,70
10	7,17±0,10	0,13	1,92	0,66	6,85±0,15	0,13	2,02	0,64
12	8,89±0,12	0,16	2,13	0,70	7,69±0,20	0,14	2,02	0,60
14	9,20±0,45	0,16	1,90	0,62	9,35±0,21	0,17	2,06	0,63
16	9,14±0,32	0,16	1,83	0,54	9,19±0,30	0,16	1,90	0,55
18	9,10±0,13	0,15	1,67	0,48	9,14±0,31	0,15	1,73	0,48

Tempo (hs)	21 Litros				36 Litros			
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>X/S</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>X/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>X</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,50±0,20	0,00	0,00	0,00	0,48±0,20	0,00	0,00	0,00
2	2,03±0,10	0,09	1,34	0,77	1,86±0,07	0,08	2,02	0,69
4	3,28±0,10	0,11	1,59	0,69	3,98±0,16	0,16	3,50	0,87
6	4,83±0,34	0,11	4,20	0,72	5,95±0,11	0,17	4,11	0,91
8	6,78±0,17	0,13	2,39	0,78	6,62±0,09	0,15	2,72	0,77
10	8,13±0,07	0,14	2,69	0,76	7,89±0,14	0,16	2,50	0,74
12	9,24±0,09	0,16	2,54	0,73	9,05±0,04	0,17	2,73	0,71
14	9,69±0,16	0,17	2,11	0,66	8,94±0,13	0,16	2,18	0,60
16	9,47±0,20	0,16	1,85	0,56	8,88±0,10	0,15	2,08	0,52
18	9,38±0,22	0,16	1,80	0,49	8,72±0,23	0,15	1,74	0,46

Y<sub>X/S</sub>: conversão de substrato em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Y<sub>X/P</sub>: conversão de proteína em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Q<sub>X</sub>: produtividade em biomassa.

A fermentação em 21 L de meio apresentou produção máxima de biomassa de 9,69 g L<sup>-1</sup> em 14 horas de fermentação, sendo esta a maior produção quando comparado com os quatro volumes estudados. Seguido de um valor de 9,35 g.L<sup>-1</sup> e 9,20 g.L<sup>-1</sup> dos meios com 6 L e 1 L respectivamente, ambos também em 14 horas de fermentação. Somente o meio de 36 L apresentou menor produção de biomassa quando comparado com os demais ( $p < 0,05$ ), com uma produção máxima de 9,05 g.L<sup>-1</sup>, em 12 horas de fermentação.

Em relação a produtividade celular (Q<sub>X</sub>), esta foi maior no cultivo em 36 L, chegando a 0,91 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (6 horas de fermentação), seguido do cultivo em 21 L com 0,78 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e os cultivos em 1 L e 6 L, ambos com (Q<sub>X</sub>) de 0,70 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

A conversão de substrato em biomassa (Y<sub>X/S</sub>) foi semelhante para os cultivos em 6 L, 21 L e 36 L, todos apresentaram conversão de 0,17 g.g<sup>-1</sup>, em 14 e 12 horas de fermentação

respectivamente. O cultivo em 1 L apresentou ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,16 \text{ g.g}^{-1}$  em 12 horas, não observando dessa maneira, diferença entre os resultados apresentados.

Já a conversão de proteínas em substrato ( $Y_{X/P}$ ) foi próxima para os cultivos em 6 L, 21 L e 36 L, apresentando valores de  $4,51 \text{ g.g}^{-1}$ ,  $4,20 \text{ g.g}^{-1}$  e  $4,11 \text{ g.g}^{-1}$ , todos em 6 horas de fermentação. O cultivo em 1 L foi o que apresentou menor ( $Y_{X/P}$ ), com resultado de  $2,13 \text{ g.g}^{-1}$  em 12 horas de fermentação.

Trabalho realizado por Barba et al. (2001), ao fermentar a lactose em diferentes volumes de cultivo (10 L, 100 L e 1000 L), por *Kluyveromyces lactis* para produção de biomassa em temperatura de  $30^\circ\text{C}$  e pH 4, observaram aumento na produção a partir de 100 L de cultivo, mantendo praticamente o mesmo valor em 1000 L, com valor de aproximadamente  $17 \text{ g.L}^{-1}$  em 8 a 10 horas de fermentação, sendo que no volume de 10 L os autores obtiveram produção de aproximadamente  $11 \text{ g.L}^{-1}$  em 12 horas de fermentação.

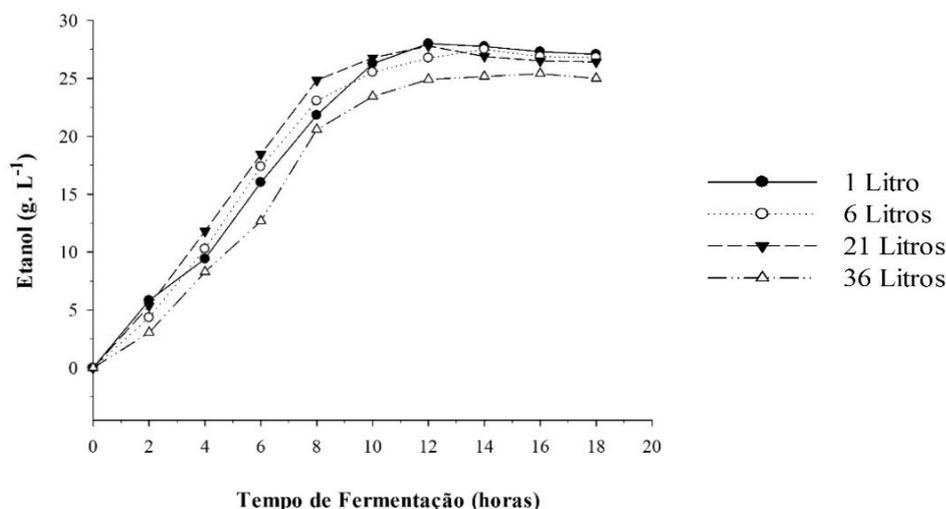
Já Iconomopoulou et al. (2001), usando leveduras isoladas do Kefir na fermentação do soro de queijo, conseguiram aumentar a produção de biomassa em 70% no aumento da escala de fermentação de 100 L para 3000 L. E Lustrato et al. (2013), utilizando a levedura *K. marxianus* para produção de ácido acético a partir do soro de queijo, também obtiveram maior produção de biomassa com a ampliação de escala fermentativa, sendo que com 20 L a produção foi de  $9,50 \text{ g.L}^{-1}$  e com 200L esse valor foi para  $85,8 \text{ g.L}^{-1}$ .

No geral, a ampliação de escala pela levedura *K. marxianus*, no que se refere a produção de biomassa, só começou a ter uma pequena diminuição na produção a partir da fermentação com volume de 36 L, tendo uma redução de apenas 1,52% quando comparado com o cultivo em 1 L, porém, mesmo assim manteve os resultados próximos ao obtido no meio suplementado com extrato de levedura (Meio 2) em fermentação em bancada (100 mL), conforme analisado na etapa 5.5 de suplementação do meio fermentativo (Tabela 28).

#### 5.6.3.2. Etanol

Assim como na produção de biomassa, observa-se de acordo com a Figura 32 e Tabela 36, que a produção de etanol começou a ter redução em seus parâmetros a partir da fermentação em 36 L.

**Figura 32.** Produção de etanol obtida pela levedura *K. marxianus* em ampliação de escala fermentativa.



**Tabela 36.** Produção de etanol e parâmetros cinéticos avaliados após a fermentação do soro de queijo pela levedura *K. marxianus* em ampliação de escala fermentativa.

Tempo (hs)	1 Litro				6 Litros			
	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	η (%)	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	η (%)
2	5,83±0,15	0,35	2,91	65,06	4,35±0,09	0,29	2,17	53,91
4	9,41±0,10	0,38	2,35	70,18	10,28±0,06	0,43	2,57	80,07
6	16,02±0,23	0,45	2,67	84,33	17,38±0,23	0,43	2,90	80,51
8	21,83±0,20	0,49	2,73	90,66	23,06±0,20	0,50	2,88	93,79
10	26,27±0,18	0,51	2,63	94,48	25,53±0,18	0,51	2,55	95,74
12	28,00±0,20	0,53	2,33	97,84	26,77±0,18	0,52	2,23	96,70
14	27,75±0,11	0,51	1,98	94,33	27,51±0,23	0,51	1,96	93,56
16	27,31±0,10	0,49	1,71	91,79	26,89±0,14	0,48	1,68	89,35
18	27,07±0,23	0,47	1,50	88,47	26,80±0,21	0,47	1,49	87,79
Tempo (hs)	21 Litros				36 Litros			
	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	η (%)	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Q <sub>P</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	η (%)
2	5,36±0,14	0,30	2,68	55,45	3,05±0,32	0,18	1,52	33,03
4	11,82±0,13	0,45	2,96	83,88	8,28±0,21	0,38	2,07	70,14
6	18,45±0,10	0,47	3,08	88,17	12,69±0,24	0,39	2,12	73,13
8	24,84±0,11	0,50	3,11	93,14	20,59±0,09	0,50	2,57	95,80
10	26,78±0,21	0,51	2,68	94,22	23,43±0,10	0,50	2,34	93,84
12	27,80±0,10	0,51	2,32	96,30	24,91±0,15	0,49	2,08	91,78
14	26,90±0,16	0,49	1,92	92,77	25,16±0,09	0,47	1,80	87,40
16	26,52±0,11	0,47	1,66	87,49	25,81±0,32	0,46	1,59	85,81
18	26,42±0,13	0,47	1,47	86,76	25,40±0,34	0,45	1,39	83,14

Y<sub>P/S</sub>: conversão de substrato a etanol (g.g<sup>-1</sup>), Q<sub>P</sub>: produtividade em etanol (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), η: rendimento etanólico (%).

Como pode ser observado, a produção de etanol entre os volumes de 1 L, 6 L e 21 L praticamente manteve-se a mesma, com valores de 28 g.L<sup>-1</sup>, 27,51 g.L<sup>-1</sup> e 27,80 g.L<sup>-1</sup> respectivamente, não havendo diferença significativa entre os mesmos ( $p > 0,05$ ), onde nos volumes de 1L e 6 L essa produção máxima ocorreu em 12 horas de fermentação, já em 21 L, foi em 14 horas.

Nos experimentos fermentando 36 L de meio a base de soro de queijo, foi onde a produção de etanol caiu 9,25%, quando comparado com a fermentação em 1 L, pois em 36 L a produção máxima de etanol foi de 25,41 g.L<sup>-1</sup> em 16 horas. Este tempo levado para atingir o pico máximo de produção pode ser por se tratar de um volume maior a ser fermentado, conduzindo a uma fermentação mais lenta para a levedura estudada.

Já quanto a produtividade de etanol ( $Q_P$ ), foi bem próxima os meios com volume de 1L 6 L e 36 L ( $p > 0,05$ ), apresentando produtividade máxima de 2,73 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>; 2,90 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 2,57 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> respectivamente. Já o cultivo em 21 L, a produtividade foi cerca de 12,21% maior quando comparada com o meio de 1 L, pois em 21 L chegou a ( $Q_P$ ) de 3,11 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> em 8 horas de fermentação, isto pode ser observado na Figura 31, em que nesse tempo há uma acentuada produção de etanol, o que conseqüentemente conduziu a maior produtividade.

Para o parâmetro cinético de conversão de substrato em etanol ( $Y_{P/S}$ ), os quatro volumes apresentaram valores máximos bem próximos, conforme apresentado na Tabela 35, sendo eles 0,53 g.g<sup>-1</sup>; 0,52 g.g<sup>-1</sup>; 0,51 g.g<sup>-1</sup> e 0,50 g.g<sup>-1</sup> para 1 L, 6 L, 21 L e 36 L respectivamente. Nos tempos de 12 horas para os cultivos em 1 L e 6 L, e de 10 e 8 horas para os cultivos de 21 L e 36 L respectivamente.

Quanto ao rendimento etanólico ( $\eta$ ) é interessante observar que o mesmo foi caindo gradativamente conforme foi aumentado a escala de fermentação, no entanto, mesmo assim, o rendimento final no meio de maior volume (36 L) foi satisfatório, chegando a 95,80% em apenas 8 horas de fermentação, mostrando potencial para aplicação industrial. Já os cultivos em volume de 1 L e 6 L apresentaram resultados próximos, com ( $\eta$ ) máximo de 97,84% e 96,7%, ambos em 12 horas de fermentação, enquanto que, o meio com 21 L apresentou ( $\eta$ ) de 96,30% também em 12 horas.

Trabalho realizado Koutinas et al. (2007), utilizando cultura de Kefir para o tratamento do soro de queijo e produção de etanol em pH 5,5 e temperatura de 30°C, obtiveram redução na produção alcóolica durante a ampliação de escala, sendo que no cultivo de 100 L foi obtido 25 g.L<sup>-1</sup> de etanol, com produtividade de 2,54 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> conversão de 0,52 g.g<sup>-1</sup> e

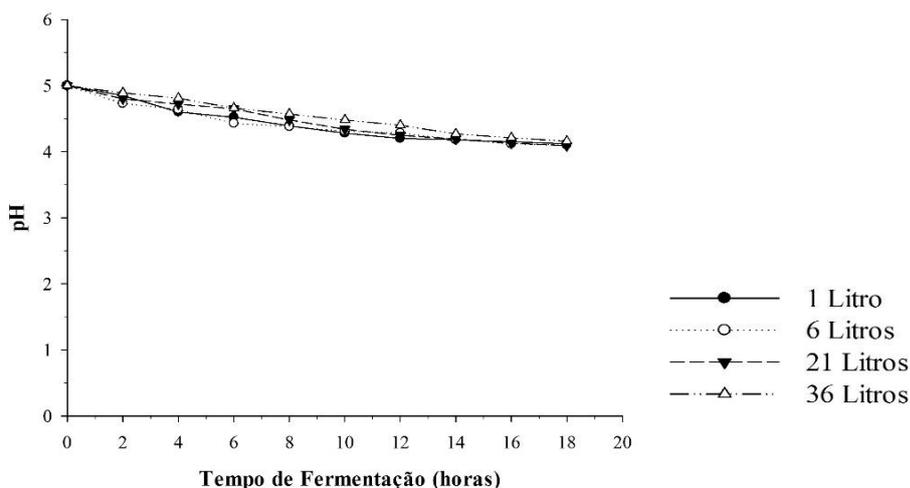
rendimento de 94,40 % em 10 horas de fermentação. Já ao fermentar em 300 L, a produção foi de 21 g.L<sup>-1</sup>, produtividade de 0,75 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, conversão de 0,40 g g<sup>-1</sup> e rendimento de 80,80% em 22 horas, e com 1000 L a produção manteve-se em 20 g L em 14 horas, assim como os demais rendimentos.

Iconomopoulou et al. (2001), como citado anteriormente, usando leveduras isoladas do Kefir na fermentação do soro de queijo para produção de etanol, também observaram redução na produção durante o aumento de escala. Ao utilizar 100 L de meio de cultivo com teor de lactose inicial de 51 g.L<sup>-1</sup>, obtiveram produção de etanol de 10 g.L<sup>-1</sup>, já ao cultivar em um volume de 3000 L, com lactose inicial de 49 g.L<sup>-1</sup>, a produção de etanol caiu para 7 g.L<sup>-1</sup>, apresentando redução de 30%.

E Lustrato et al. (2013), utilizando a levedura *K. marxianus* em soro de queijo para produção de ácido acético, ampliando a escala, conforme citado no item sobre biomassa, obtiveram em 20 L produção de etanol de 11,92 g.L<sup>-1</sup> com produtividade de 0,50 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Em 200 L a produção foi para 12,57 g.L<sup>-1</sup> e produtividade de 0,52 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, já em 2000 L a produção foi de 13,4 g.L<sup>-1</sup> e a produtividade de 0,56 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Neste caso houve aumento de 11,04% na produção etanólica com a ampliação de 20 para 2000 L.

De maneira geral, a ampliação apresentou resultados esperados e semelhantes ao encontrado em escala de bancada, obtido após o melhoramento das condições de cultivo para produção de etanol, conforme descrito no item 5.6. E como ocorrido na produção de biomassa, observa-se na Figura 33 que o perfil fermentativo da levedura apresentou-se mais adaptado ao substrato e às condições de cultivo utilizadas. O mesmo ocorreu com o pH do meio analisado durante as horas de fermentação (Figura 33), em que o mesmo apresentou uma pequena redução nos quatro volumes estudados, como era o esperado, pois durante a fermentação ocorre a produção de alguns ácidos orgânicos pela levedura, que torna o meio apropriado para seu crescimento e metabolismo.

**Figura 33.** Acompanhamento do pH dos meios em ampliação de escala fermentativa.



#### 5.6.4. Demanda química de oxigênio

Quanto a redução do teor de matéria orgânica, observa-se de acordo com a Tabela 37 que a maior eficiência foi entre os meios cultivado em volumes de 1 L e 6 L, com eficiência de 85 e 86,54%, apresentando resultados bem próximos para ambos meios.

A partir de 21 L, a eficiência na redução da DQO começou a cair um pouco, quando comparado com os meios de menor volume, chegando a 80,90% no cultivo em 21 L e 78,94% em 36 L, no entanto, mesmo com essa diminuição da redução de compostos orgânicos de 7,21%, quando comparado com o cultivo em 6 L (onde houve maior redução de DQO), pode-se dizer que para a ampliação de escala, a *K. marxianus* utilizada foi eficaz no tratamento do soro de queijo em grandes volumes desse efluente.

**Tabela 37.** Comparação da eficiência na redução de DQO da levedura *K. marxianus* URM 7404 em ampliação de escala fermentativa.

	0	18 horas	Redução (%)
	DQO Inicial (mg.L <sup>-1</sup> )	DQO Final (mg.L <sup>-1</sup> )	
<b>1 Litro</b>	51.300	7.600	85,18
<b>6 Litros</b>	51.300	6.900	86,54
<b>21 Litros</b>	51.300	9.800	80,90
<b>36 Litros</b>	51.300	10.800	78,94

Trabalho realizado por Koutinas et al. (2004), utilizando soro de queijo para produção de proteína microbiana (SCP), a partir de Kefir, aumentando a escala de fermentação, obtiveram em 100 L de meio uma redução de DQO de 70,86 %, partindo de uma DQO inicial de 46.235 mg.L<sup>-1</sup>. Já quando aumentou o volume de cultivo para 300 L, com DQO inicial de 48.300 mg.L<sup>-1</sup>, a redução da carga orgânica foi de 62,10% em 16 horas de fermentação. O mesmo foi observado por Iconomopoulou et al. (2001), que numa escala de 1000 L a DQO foi reduzida em 62,50 % partindo de valor inicial de 52.266 mg.L<sup>-1</sup>, e ao ampliar a escala para 3000 L a redução foi de 59,43%, com DQO inicial de 50.400 mg.L<sup>-1</sup>.

Nestes casos citados, assim como no neste estudo, o aumento da escala conduziu a uma queda na eficiência da redução final de DQO, mas mesmo assim o resultado foi satisfatório, considerando o volume de soro utilizado.

Assim, pode-se dizer que a eficiência na redução de matéria orgânica permaneceu tão satisfatória na ampliação de escala, quanto nos experimentos conduzidos em bancada, realizados antes do melhoramento das condições de cultivo.

Esses experimentos forneceram dados importantes e relevantes que confirmam a viabilidade de transferir o procedimento para plantas em escala real onde há a possibilidade de avaliar grandes quantidades de efluente diário. Combinando com fermentações, a diferença entre os valores iniciais e finais da DQO total é provável devido a conversão da lactose em etanol, diminuindo seu teor no meio e favorecendo a redução de DQO.

## 5.7. Parte 7- PRODUÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA

### 5.7.1. Fermentação do soro de queijo suplementado com extrato de levedura comercial e extrato produzido

A partir do resultado obtido no item 5.3.4, onde a levedura *K. marxianus* URM 7404 (LSQG) mostrou maior concentração de proteína intracelular, foi realizada a produção de extrato de levedura com a mesma, conforme descrito no item 4.2.7.

Como os resultados com o soro de queijo suplementado com extrato de levedura mostrou-se mais eficiente na produção de etanol, conforme discutido no item 5.4, foi realizado a produção de um extrato da própria levedura utilizada no processo, obtida ao final da fermentação, com o objetivo de tornar o processo menos dispendioso, além de levar a geração de um outro bioproduto a partir de uma única fermentação, que pode ser utilizado como suplemento.

Para avaliar se o extrato produzido é tão eficaz quanto o extrato comercial foram fermentados meios com os dois extratos simultaneamente, a partir das condições fermentativas obtidas após o melhoramento das condições de cultivo (item 5.5).

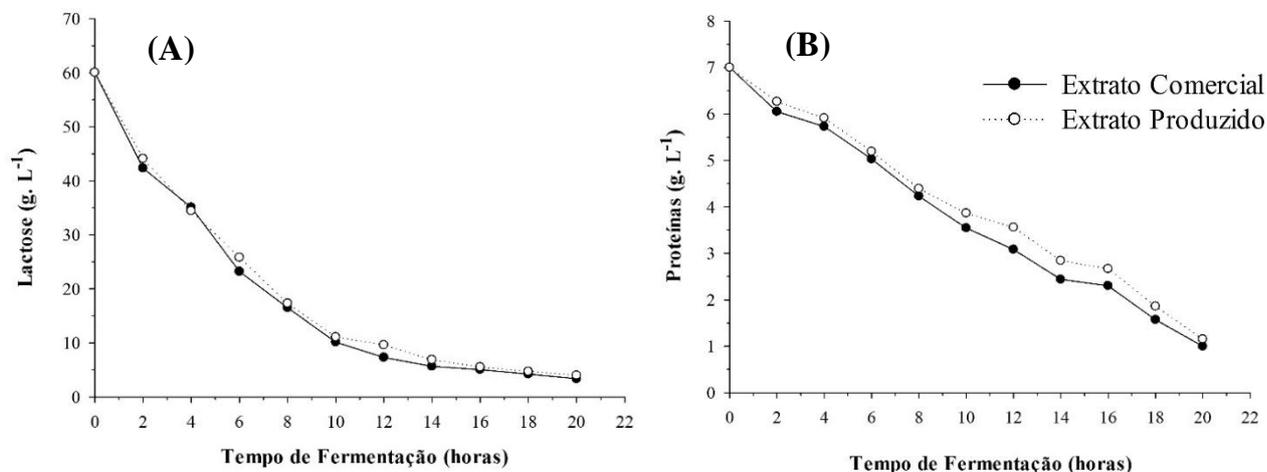
Sendo assim, o soro de queijo foi suplementado com 1% do extrato comercial e do extrato produzido separadamente. O meio de soro de queijo que continha 60 g.L<sup>-1</sup> de carboidrato (lactose) e pH 5, foi incubado à 33°C em estufa tipo DBO por 20 horas.

### 5.7.2. Consumo de lactose e proteínas

O teor de lactose inicial dos meios tanto com extrato comercial como com extrato produzido foi de 60,05 g.L<sup>-1</sup> (Figura 34 (A)).

Após 20 horas de fermentação, o meio com extrato comercial apresentou teor final de lactose de 3,36 g.L<sup>-1</sup>, o que representou um consumo total de 94,40% de lactose do meio. O meio suplementado com o extrato produzido pela biomassa da própria levedura *K. marxianus* URM 7404 apresentou teor final de lactose de 4 g.L<sup>-1</sup> (Figura 34 (A)), o que representou consumo total de 93,34%, apresentando consumo final de lactose semelhante entre os dois meios testados.

**Figura 34.** Consumo de lactose (A) e proteína (B) obtido pela levedura *K. marxianus*, utilizando o extrato comercial e extrato produzido.



Assim como a lactose, o teor de proteína total também foi quantificado, sendo que para ambos meios a concentração inicial da mesma era de  $7 \text{ g.L}^{-1}$ . Ao final da fermentação, o meio com extrato comercial apresentou teor de proteínas de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , representando um consumo de 85,71%. Enquanto que no meio com extrato produzido, a concentração final foi de  $1,15 \text{ g.L}^{-1}$  (Figura 34 (B)), que representou um consumo final de 83,57%. Neste caso, também não observou-se diferença entre os resultados de consumo final de proteína pela levedura em ambos meios estudados.

Assim, pode-se dizer que a levedura *K. marxianus* URM 7404 apresentou perfil fermentativo semelhante quanto ao consumo de lactose e proteína, nos dois meios testados.

### 5.7.3. Produção de biomassa e etanol

#### 5.7.3.1. Biomassa

Os parâmetros cinéticos avaliados quanto a produção de biomassa pela levedura nos dois meios de cultivos encontra-se na Tabela 38 e Figura 35 (A).

**Tabela 38.** Produção de biomassa e parâmetros cinéticos avaliados após a fermentação do soro de queijo pela levedura *K. marxianus* URM 7404, utilizando o extrato produzido e o extrato comercial como suplemento do meio fermentativo.

Tempo	<i>Extrato Comercial</i>				<i>Extrato Produzido</i>			
	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>x/s</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>x/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>x</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Biomassa g.L <sup>-1</sup>	Y <sub>x/s</sub> g.g <sup>-1</sup>	Y <sub>x/P</sub> g.g <sup>-1</sup>	Q <sub>x</sub> g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
0	0,89±0,40	0,00	0,00	0,00	0,89±0,40	0,00	0,00	0,00
2	2,27±0,32	0,10	1,45	0,69	1,87±0,32	0,06	1,33	0,49
4	3,39±0,12	0,10	1,97	0,62	3,73±0,13	0,11	2,61	0,71
6	5,10±0,14	0,12	4,13	0,70	4,66±0,16	0,11	3,51	0,63
8	7,51±0,31	0,17	2,39	0,83	6,45±0,41	0,13	2,13	0,69
10	8,74±0,10	0,19	2,27	0,78	7,38±0,32	0,13	2,07	0,65
12	9,92±0,45	0,19	2,30	0,75	9,05±0,10	0,16	2,37	0,68
14	9,83±0,11	0,18	1,96	0,64	9,36±0,50	0,16	2,04	0,60
16	9,65±0,40	0,16	1,86	0,55	9,19±0,15	0,15	1,91	0,52
18	9,56±0,35	0,15	1,69	0,48	9,00±0,13	0,15	1,65	0,45
20	9,50±0,21	0,15	2,02	0,43	8,94±0,43	0,14	1,81	0,40

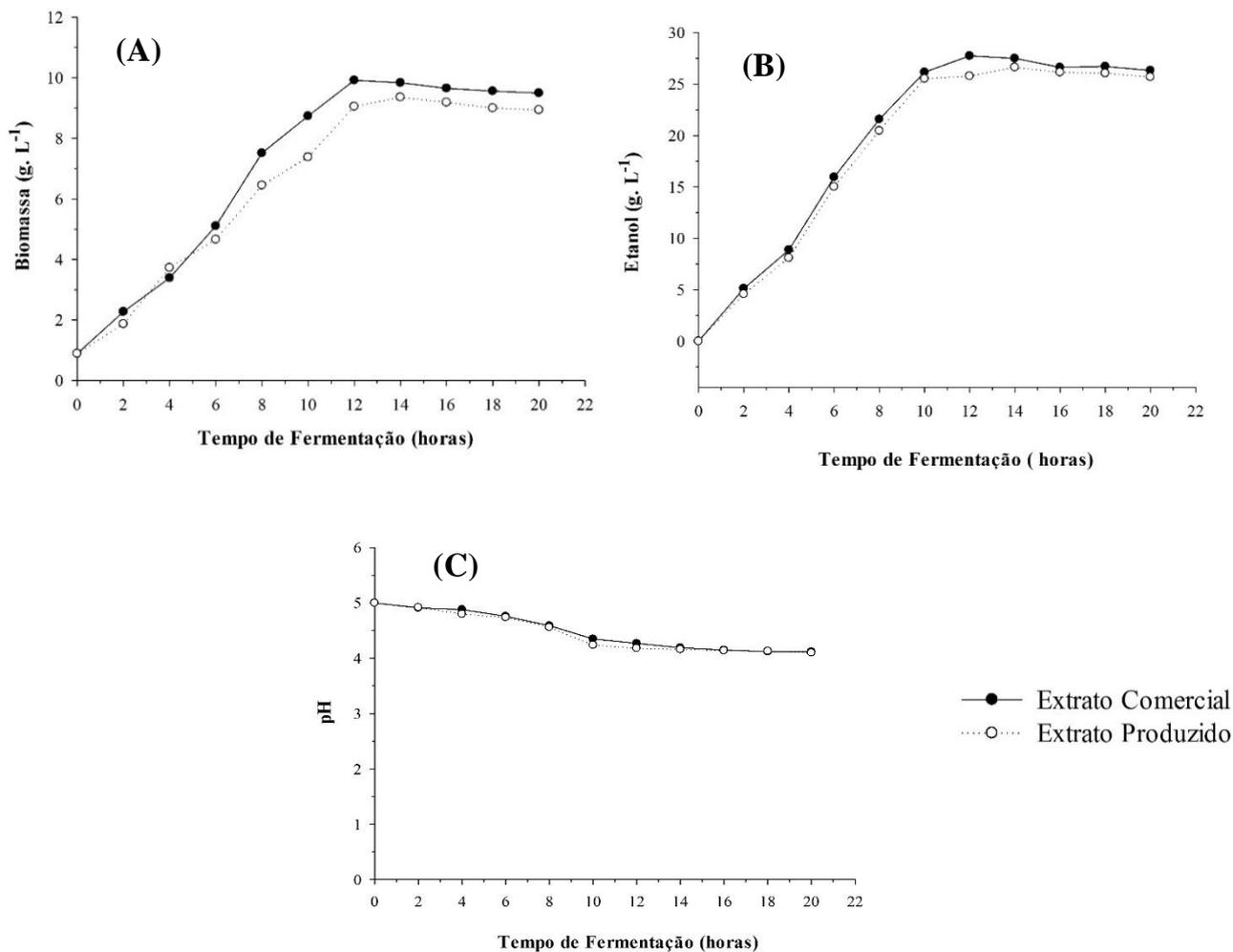
Y<sub>x/s</sub>: conversão de substrato em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Y<sub>x/P</sub>: conversão de proteína em biomassa (g.g<sup>-1</sup>), Q<sub>x</sub>: produtividade em biomassa (g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

Quanto à produção de biomassa, observa-se que essa foi maior no meio contendo extrato de levedura comercial, chegando a produzir 9,92 g.L<sup>-1</sup> em 12 horas de fermentação. Já no meio com extrato produzido, a produção máxima de biomassa foi de 9,36 g.L<sup>-1</sup> em 14 horas de fermentação, com uma diferença de 5,64 % ( $p > 0.05$ ).

A maior produtividade celular (Q<sub>x</sub>) foi obtida no meio com extrato comercial com 0,83 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> em 8 horas de fermentação, no entanto, no meio com o extrato produzido essa foi de 0,71 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, porém com a metade do tempo em 4 horas de fermentação.

Em relação a conversão de substrato em células (Y<sub>x/s</sub>) e conversão de proteínas em células (Y<sub>x/P</sub>), estas foram maiores também no meio com extrato comercial, com valores de 0,19 g.g<sup>-1</sup> e 4,13 g.g<sup>-1</sup> em 10 e 6 horas de fermentação respectivamente. Observa-se que este meio foi o que apresentou maior produção de biomassa (Figura 35 (A)). Para o meio com extrato produzido, os maiores (Y<sub>x/s</sub>) e (Y<sub>x/P</sub>) foram 0,16 g.g<sup>-1</sup> e 3,51 g.g<sup>-1</sup> em 12 e 6 horas respectivamente.

**Figura 35.** Produção de biomassa (A), etanol (B) e acompanhamento do pH (C) obtida pela levedura *K. marxianus*, utilizando o extrato produzido e o extrato comercial como suplemento do meio fermentativo de soro de queijo.



### 5.7.3.2. Etanol

Quanto a produção de etanol, observa-se que esta foi um pouco maior no meio com extrato comercial, chegando a produção máxima de  $27,75 \text{ g.L}^{-1}$  em 12 horas de fermentação (Tabela 39 e Figura 35 (B)). O meio suplementado com o extrato produzido chegou a produção máxima de etanol de  $26,64 \text{ g.L}^{-1}$  em 14 horas de fermentação, isto é, apenas 4 % a menos que o obtido pelo extrato comercial e em menor tempo de fermentação, não observando diferença numérica entre a produção de etanol nestes meios.

A produtividade em etanol ( $Q_P$ ) foi próxima para os dois meios testados, sendo que para o extrato comercial foi de  $2,70 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e para o extrato produzido de  $2,56 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  ambos em 8 horas de fermentação. Já a conversão de substrato em biomassa foi praticamente igual

para os meios  $0,53 \text{ g.g}^{-1}$  e  $0,52 \text{ g.g}^{-1}$  em 12 e 10 horas para o extrato comercial e produzido respectivamente ( $p > 0,05$ ) (Tabela 39).

**Tabela 39.** Produção de etanol e parâmetros cinéticos avaliados após a fermentação do soro de queijo pela levedura *K. marxianus* URM 7404, utilizando o extrato produzido e o extrato comercial como suplemento do meio fermentativo.

Tempo	<i>Extrato Comercial</i>				<i>Extrato Produzido</i>			
	Etanol $\text{g.L}^{-1}$	$Y_{P/S}$ $\text{g.g}^{-1}$	$Q_P$ $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	$\eta$ (%)	Etanol $\text{g.L}^{-1}$	$Y_{P/S}$ $\text{g.g}^{-1}$	$Q_P$ $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	$\eta$ (%)
2	5,12±0,36	0,29	2,56	53,86	4,59±0,43	0,29	2,30	53,64
4	8,87±0,30	0,36	2,22	66,23	8,10±0,23	0,32	2,03	58,94
6	15,95±0,33	0,43	2,66	80,63	15,03±0,55	0,44	2,51	81,80
8	21,58±0,25	0,50	2,70	92,31	20,47±0,65	0,48	2,56	89,22
10	26,76±0,35	0,52	2,62	97,64	25,53±0,54	0,52	2,55	97,12
12	27,75±0,41	0,53	2,31	98,02	25,78±0,70	0,51	2,15	95,23
14	27,50±0,40	0,51	1,96	94,19	26,64±0,72	0,50	1,90	93,32
16	26,64±0,32	0,48	1,67	90,23	26,15±0,64	0,48	1,63	89,35
18	26,71±0,24	0,48	1,48	89,12	26,06±0,35	0,47	1,45	87,74
20	26,32±0,15	0,46	1,32	86,49	25,69±0,27	0,46	1,28	85,38

$Y_{P/S}$ : conversão de substrato a etanol ( $\text{g.g}^{-1}$ ),  $Q_P$ : produtividade em etanol ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ),  $\eta$ : rendimento etanólico (%).

O rendimento etanólico ( $\eta$ ) também foi maior no meio com extrato comercial, com 98,02 % em 12 horas, porém, o meio com extrato produzido obteve rendimento de 97,12 % em 10 horas de fermentação, isto é, mesmo com um rendimento ( $\eta$ ) de apenas 0,92% menor, quando comparado com o extrato comercial, o extrato produzido apresentou seu maior rendimento em menor tempo de fermentação.

Quanto ao pH, este manteve-se semelhante para os dois meios estudados, conforme pode ser observado na Figura 35 (C), sendo o mesmo reduzido ao longo da fermentação, como é o esperado, uma vez que durante a fermentação ocorre a formação de ácidos orgânicos, fazendo que o pH seja reduzido, como discutido anteriormente.

#### 5.7.4. Demanda química de oxigênio

Também foi realizada a análise da DQO dos meios ao final do tempo de fermentação, conforme demonstrado na Tabela 40.

**Tabela 40.** Comparação da eficiência na redução de DQO, nos meios suplementados com extrato comercial e produzido pela levedura *K. marxianus* URM 7404.

	<b>0</b>	<b>20 horas</b>	
	<b>DQO Inicial (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>DQO Final (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Redução (%)</b>
<b>Extrato Comercial</b>	50.650	7.800	84,60
<b>Extrato Produzido</b>	50.200	8.700	82,66

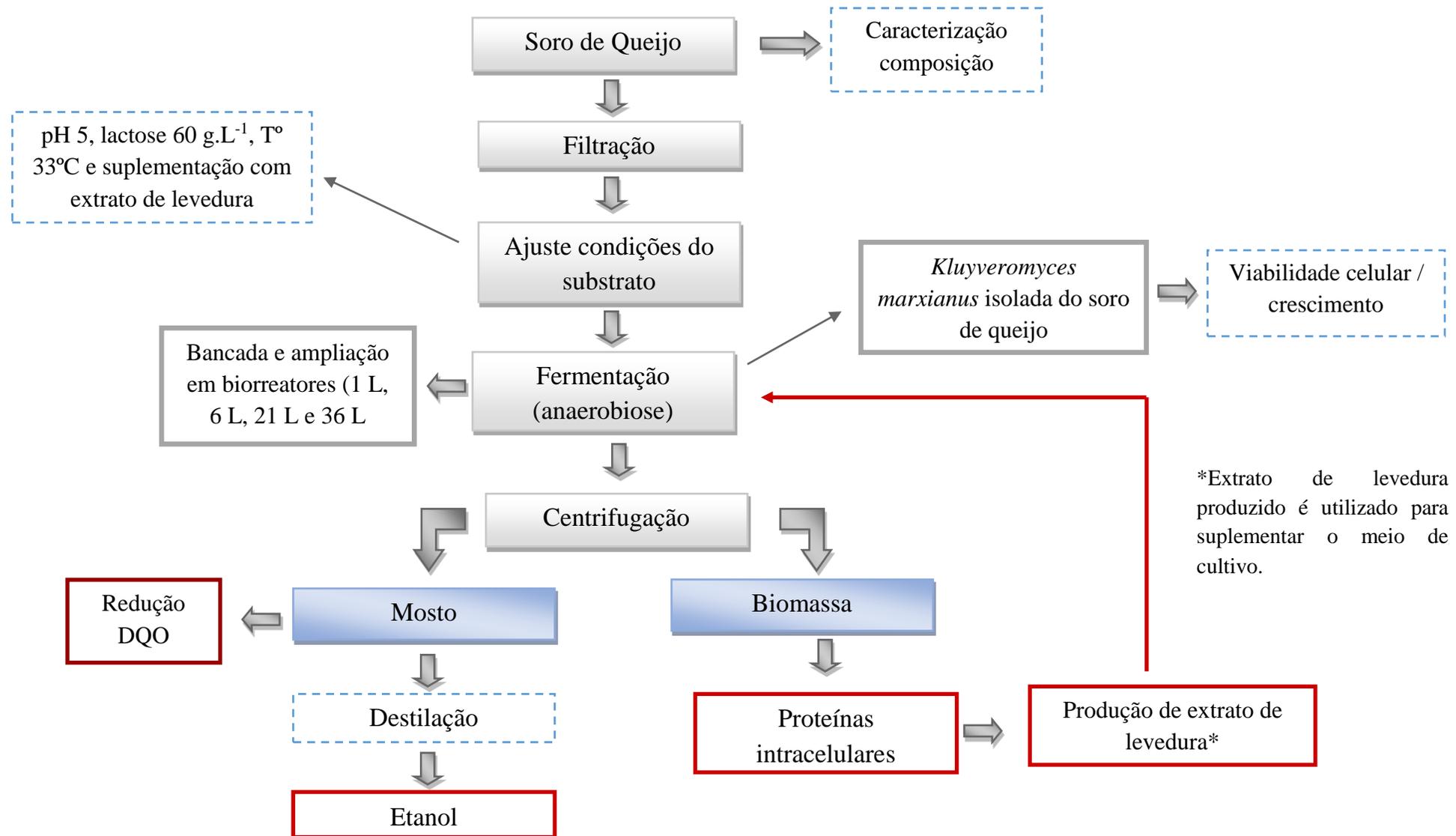
Como observa-se, ambos meios apresentaram eficiência na redução de DQO do soro de queijo após 20 horas de fermentação, com diferença de apenas 2,30 % entre o meio cultivado com extrato comercial e o meio com extrato produzido (Tabela 40).

Em suma, o soro de queijo suplementado com o extrato produzido pela biomassa da própria levedura apresentou resultados tão eficazes quanto o extrato industrial que normalmente é utilizado pelas indústrias e em pesquisas que necessitam de fonte de suplemento para os meios fermentativos, podendo desta maneira substituí-lo tanto para estes fins como para outros, como por exemplo, em indústrias de alimentos como enaltecedores de sabor.

Além disso, representa uma maneira próspera de aproveitar a biomassa que é gerada no final do processo fermentativo, e que em muitos casos acaba sendo descartada, representando também uma fonte poluidora ao meio ambiente, sendo, portanto, uma matéria-prima de custo extremamente baixa para a produção de extratos, pois costuma ser entregue gratuitamente para a produção de ração animal, não gerando qualquer rendimento econômico (REVILLION et al. 2000).

A Figura 36, representa a valorização e o aproveitamento do soro do queijo realizado no presente estudo, onde de uma forma geral buscou-se aproveitar este coproduto como um todo, desde a geração de etanol como o produto principal, até o aproveitamento da biomassa gerada no final do processo como suplemento fermentativo, além do tratamento final do efluente com a redução da carga orgânica.

**Figura 36.** Valorização e aproveitamento do soro de queijo por bioprocesso realizado no presente estudo.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi realizado com o objetivo de aperfeiçoar o processo de produção de etanol a partir de um importante coproduto da indústria de laticínios, o de soro de queijo, permitindo o aproveitamento alternativo do mesmo e contribuindo para a geração de uma fonte de energia renovável e menos poluente que as convencionais. Assim, uma série de etapas foram desenvolvidas neste trabalho, abrangendo desde o isolamento de leveduras presente no próprio soro de queijo, com capacidade de fermentação e produção de etanol a partir deste coproduto; comparação de produção de etanol em diferentes condições de cultivo (aeróbio, microaeróbio e anaeróbio) e substrato (soro e permeado de soro); testes com diferentes tipos de suplementação do soro para melhorias do processo; melhoramento das condições de cultivo para levedura que apresentou resultados mais satisfatórios; aumento da escala de fermentação (scale up) pelo micro-organismo e aproveitamento da própria biomassa gerada no final da fermentação. Cada etapa foi de grande importância para que o resultado final da pesquisa fosse alcançado, sobretudo, em termos de melhorias na eficiência do processo e dos parâmetros cinéticos fermentativos analisados.

Primeiramente esta pesquisa buscou aprimorar o processo de produção de etanol a partir do soro de queijo, para tanto, foi realizado o isolamento de linhagens de leveduras aptas para tais finalidades, sendo elas denominadas como LSQG (levedura isolada soro de queijo) e LCOA (levedura isolada da coalhada) em comparação com uma cepa padrão já utilizada em trabalhos anteriores (*K. marxianus* CCT 4086), assim como o melhor substrato lácteo para produção de etanol e condição de cultivo. Com este conjunto de experimentos foi possível definir a levedura que apresentou melhor capacidade de bioconversão no bioprocessamento (LSQG que por apresentar resultados mais eficazes foi identificada - *K. marxianus* URM 7404).

Após estabelecida a melhor linhagem, substrato e condição de cultivo, a terceira etapa buscou avaliar a influência dos diferentes tipos de suplementação no meio de cultivo para levedura. A partir destes resultados, na quarta etapa, foi realizado o melhoramento das condições de cultivo, a partir das condições estabelecidas anteriormente (levedura, condição fermentativa, substrato e suplemento), onde melhorias foram alcançadas através desta etapa, analisando a concentração de lactose, temperatura e pH inicial do meio, tendo como variáveis a produção de etanol, rendimento etanólico e produtividade.

Assim, a etapa posterior foi realizar a ampliação de escala fermentativa (ampliação em 1L, 6 L, 21 L e 36 L) para avaliar se os parâmetros cinéticos analisados permaneceriam tão eficientes em larga escala quanto foi em escala de bancada. Seguindo as condições de

melhoramento em *scale up*, os resultados cinéticos foram da mesma forma eficazes, só a partir de 36 L de meio que esses parâmetros analisados começaram a reduzir, no entanto, a redução não foi tão significativa quando comparada com os demais volumes testados.

Como o meio de soro suplementado com extrato de levedura foi mais satisfatório (realizado na terceira etapa), buscou-se obter uma maneira menos onerosa de suplementar o soro, sendo assim, a última etapa foi utilizar a biomassa gerada no final do processo como fonte de suplemento para enriquecer o meio de soro, para tanto, esta biomassa foi transformada em extrato de levedura. Os resultados obtidos para produção de etanol e seus parâmetros cinéticos, assim como produção de biomassa e redução de carga orgânica (DQO) com extrato produzido foram tão eficazes quanto os obtidos com extrato comercial, sendo, portanto, mais uma alternativa de aproveitamento de um resíduo gerado no final da fermentação que pode ser utilizado como benefício econômico para o processo.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são bastante promissores, visto que o emprego do soro de queijo para a produção de etanol mostrou ser satisfatório igualmente tanto em condições de meio não suplementado com extrato obtido pela biomassa da própria levedura, como o extrato comercial.

Isto significa que esse coproduto industrial apresenta possibilidade de aproveitamento diretamente de suas fontes, sem quaisquer maiores investimentos em fontes nutrientes. Assim, este estudo mostrou que a linhagem *K. marxianus* URM 7404, isolada do próprio soro de queijo, consiste em uma potencial candidata para o emprego em plantas industriais de geração de etanol a partir de soro e permeado de soro de queijo.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir de maneira geral que:

Do soro de queijo obtido da produção do queijo gorgonzola, foi possível obter uma linhagem de levedura apta a crescer neste coproduto e gerar não somente etanol, mas biomassa microbiana que pode ser reutilizada no processo, como extrato de levedura;

O soro de queijo, assim como o permeado de soro apresentam alto potencial de aproveitamento, servindo como fontes alternativas de carbono e de baixo custo para a produção de etanol e biomassa microbiana, sendo eficazes para ser utilizados em bioprocessos;

A condição de cultivo em anaerobiose favoreceu mais a produção de etanol, assim como a aeróbia foi para o crescimento da levedura;

A suplementação do soro de queijo apenas com extrato de levedura, apresentou aumento na produção de etanol e crescimento celular, em menor tempo de fermentação, além de maior eficiência na redução de DQO.

O melhoramento das condições de cultivo (DCCR) favoreceu o aumento da produção de etanol, além do rendimento e produtividade etanólica pela levedura e melhorou também o tempo de produção máxima de geração destes bioprodutos;

A ampliação de escala fermentativa (*scale up*) mostrou-se satisfatória, mantendo a produção de etanol, produtividade e rendimento etanólico, tão eficazes quanto em fermentação em bancada.

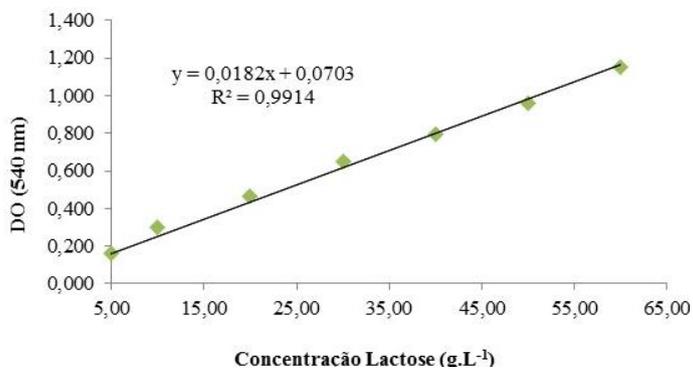
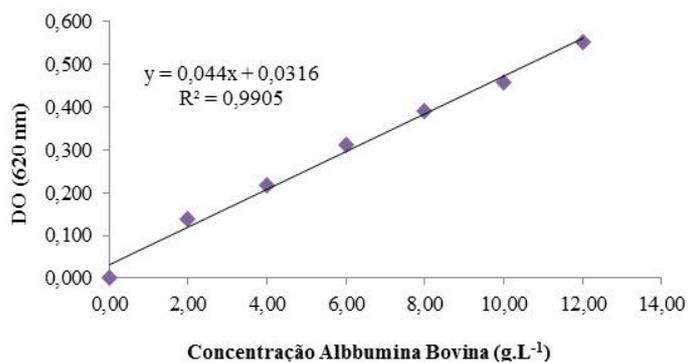
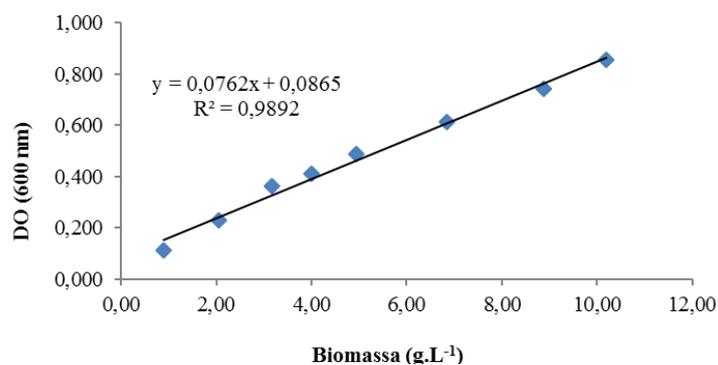
Foi possível obter extrato de levedura proveniente da própria levedura isolada, que apresentou ser tão eficaz como suplemento para os meios fermentativos, assim como o extrato comercial comumente utilizado.

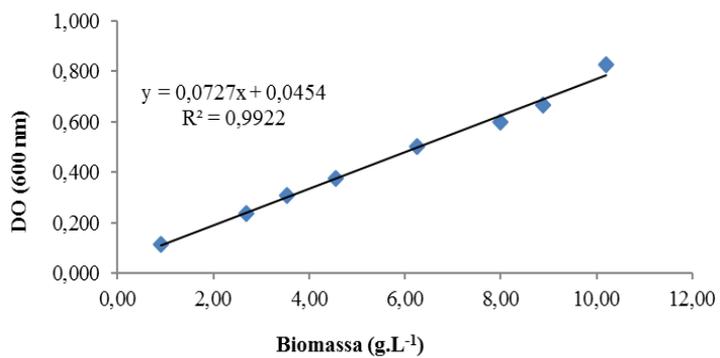
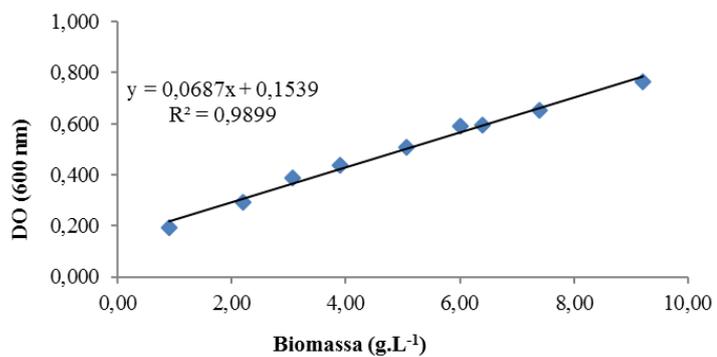
Com o processo utilizado foi possível reduzir expressivamente a carga orgânica do soro de queijo (DQO), em todas etapas estudadas.

## 8. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Fermentação em processo contínuo, reduzindo o tempo de fermentação,
- Fermentação em escala industrial,
- Produção de extrato de levedura com processo e equipamentos menos onerosos,
- Análise da composição centesimal do extrato produzido,
- Verificar a produção de outros componentes gerados durante a fermentação do soro por *Kluyveromyces*, como por exemplo,  $\beta$ - galactosidase, ácidos orgânicos e glicerol e suas aplicações,

## APÊNDICE I

**Figura 37.** Curva padrão da lactose.**Figura 38.** Curva padrão da proteína.**Figura 39.** Curva padrão biomassa x D.O. da levedura *K. marxianus* CCT 4086.

**Figura 40.** Curva padrão biomassa x D.O. da levedura LSQG.**Figura 41.** Curva padrão biomassa x D.O. da levedura LCOA.

## ANEXO I

Comprovante de identificação da levedura LSQG (amostra 1), e sua incorporação no acervo da coleção de culturas – Micoteca URM.

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA COLEÇÃO DE CULTURAS - MICOTECA URM	ADM-REG-017-01  Micoteca URM UFPE
---	--	---

## COMUNICADO DE INCORPORAÇÃO DE AMOSTRA(S)

Recife, 16 de junho de 2016

Comunicamos que a(s) amostra(s) abaixo foi(ram) incorporada(s) ao acervo da Coleção de Culturas – Micoteca URM do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, conforme pedido registrado sob número 45/16.

N.º	Código da Amostra	Nome da espécie	Código da Amostra concedido pela URM	Método e meio de preservação	Data de incorporação
1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (E.C. Hansen) Van der Walt	7404	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
2	2	<i>Rhodotorula lactosa</i> T. Haseg.	7405	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
3	3	<i>Rhodotorula glutinis</i> (Fresen.) F.C. Harrison	7406	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
4	4	<i>Rhodotorula graminis</i> Di Menna	7407	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
5	5	<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (Saito) Lodder	7408	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
6	6	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (A. Jörg.) F.C. Harrison	7409	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
7					
8					
9					
10					

Atenciosamente,



Prof. Cristina Maria de Souza Motta  
Curadora da Micoteca URM

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, R. M. S. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis à base de resíduos de frutas e hortaliças**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 2013.
- ANDRADE, E. T.; CARVALHO, S. R. G.; SOUZA, L. F. Programa do proálcool e o etanol no Brasil. **Engevista**, v.11, n. 2, p.127-136, 2009.
- ANDRADE, A. C. **Estudo da fermentação simultânea a hidrólise de soro de queijo, utilizando lactase *Saccharomyces cerevisiae***. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia -MG, 2005.
- AOAC. Association of Official Agricultural Chemists. **Official methods of analysis of the AOC International**. Washington. 2005.
- ARAÚJO, M. S. **Produção de Etanol neutro a partir do soro de queijo coalho por destilação convencional**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) - Centro de ciências e tecnologia agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, 2013.
- ASSUNÇÃO, G. M. **Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de queijo**. 130. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de engenharias e ciências exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2014.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p. 381-386, 2011.
- BARBA, D.; BEOLCHINI, F.; DEL RE, G.; GIACOMO.; VEGLIÓ, F. Kinetic analysis of *Kluyeromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. **Process Biochemistry**, n. 36, p. 531-536, 2001
- BARBOSA, A.S; FLORENTINO, E. R.; FLORÊNCIO, I. M.; ARAÚJO, A. S. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde**, v. 5, n. 1, p. 7-25, 2010.
- BITELLO, A. R.; VINCENZI, A.; FACCIN, C.; GRAFF, C. A.; SCHLABITZ, C.; BURLANI, E. L.; WILDNER, G. R.; MACHADO, L. A. P.; RODRIGUES, M.; MACIEL, M. J.; RAFAEL, R. S.; FUNKE, L.; SOUZA, C. F. V. Aproveitamento do soro de ricota para produção de

diferentes biomoléculas utilizando a *Kluyveromyces marxianus*. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 5, n. 4, 2013.

BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Utilização do soro de mandioca como substrato fermentativo para a biosíntese de goma xantana: viscosidade aparente e produção. **Polímeros** (São Carlos. Impresso), v. 20, p. 175-180, 2010.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. v. 2, 2001.

BURLANI, E. L. **Avaliação do potencial da levedura *Kluyveromyces* spp. para biotransformação da lactose do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro Universitário Univates, Lajeado, 2014.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Composição química de biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 102-106, 1997.

CANGUSSU, A. S. R. **Cinética de crescimento e metabolismo de levedura potencialmente probiótica**. 55 f. Tese (Doutorado Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

CARDOSO, M. G. Análises físico-químicas de aguardentes. In: Produção de Aguardente de Cana de Açúcar. 2ª Edição, Lavras, UFLA, 2006.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J.L.; CAROA, G.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 84, n.1, p. 96-102, 2011.

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**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 13-21, 1999.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COUTINHO, P.; BOMTEMPO, J. V. Roadmap tecnológico em matérias-primas renováveis: uma base para a construção de políticas e estratégias no Brasil. **Química Nova** [online]. v. 34, n. 5, 2011.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para agropecuária**, Safra 2014/2015. Brasília, v. 2, p. 84-104, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 13 de Maio de 2015;

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra Brasileira**, Safra 2011/2012. Brasília, p. 5-10, 2012. <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 26 de Junho de 2015;

CUSHION, E.; WHITEMAN, A.; DIETERLE, G. Bioenergy Development: Issues and impacts for poverty and natural resource management. Washington D. C: **The World Bank**. p.272, 2010.

DAREIOTI, M.A.; DOKIANAKIS, S. N.; STAMATELATOU, K.; ZAFIRI, C.; KORNAROS, M. Biogas production from anaerobic co-digestion of agroindustrial wastewaters under mesophilic conditions in a two-stage process. **Desalination**, Amsterdam, v. 248, n. 1-3, p. 891-906, 2009.

DARTORA, D.F.; HENDGES, D.H.; SANGALETTO, N.; CADORIN, T.L.; ALENCAR, S.M.; ONOFRE, S.B. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipases a partir do soro de queijo. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações. **Anais...**, Florianópolis - SC, v. 1. p. 1-1, 2003.

DE WIT, J. N. Lecturer's handbook on whey and whey products. **European Whey Products Association**, Bélgica, p. 89, 2001.

DINIZ, R. H. S. **Metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Kluyveromyces lactis* JA6**. 62 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2009.

DOMINGUES, L. M. R. **Estirpes floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para a utilização da lactose: construção e aplicação biotecnológica**. 345 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de engenharia, Universidade do Minho, Braga, 2001.

DRAGONE, G.; MUSSATTO S. I.; SILVA, J. B. A.; TEIXEIRA J. A. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1977–82, 2011.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A. Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 929-935, 2009.

DZIEZAK, J. Yeasts and yeast derivatives: applications. **Food Technology**, Chicago, v. 41, n. 2, p.122-125, 1987.

ERNEST & YOUNG TERCO. **Brasil sustentável: perspectivas dos mercados de petróleo, etanol e gás natural**. Ernest & Young Terco Brasil. Fundação Getúlio Vargas, 2011.

ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YANEZ, E.; CASTILLO, E. F. Biofuels: environment, technology and food security. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 13, p. 1275-1287, 2009.

FARIA, E. F.; RODRIGUES, I. C.; BORGES, R.V. **Estudo do impacto ambiental gerado nos corpos d'água pelo efluente da indústria de laticínio em Minas Gerais**. 82 f. Monografia (Especialização em Engenharia Sanitária e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

FARRELL, A. E.; PLEVIN, R. J.; TURNER, B. T.; JONES, A. D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science** v. 27, n. 311, p. 506-508, 2006.

FIESP- Federação das Indústrias do Estado de São Paulo - São Paulo. Leite e derivados. **Agronegócio Brasileiro**, 2008.

FLORÊNCIO, I. M.; **Estudo do aproveitamento do lactosoro de coagulação enzimática para fermentação e produção de aguardente**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Centro de tecnologia e recursos naturais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2008.

FLORENTINO, E. R. **Aproveitamento do soro de queijo de coagulação enzimática**. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

FLORES, A. P.; BAUTISTA, M. C.; EGUSQUIZA, R. C.; TORRE, M. Desarrollo de bioprocesos para la reducción de los niveles de DBO y DQO de efluentes de la industria alimentaria. **Revista Peruana de Química e Ingeniería Química**, v. 11, n. 1, p. 310, 2008.

FORTUNATO, M. R. C. **Utilização do simulador superpro designer® para avaliação do aproveitamento de soro de Queijo para a produção de etanol**. 216 f. Dissertação (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

FRIEDRICHS, J. Global energy crunch: How different parts of the world would react to a peak oil scenario. **Energy Policy**, v. 38, p. 1-8, 2010.

GANZLE, M.G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685-694, 2008.

GABARDO, S. **Otimização da bioconversão de lactose do soro de queijo em etanol em sistema de biorreatores imobilizados**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia em Alimentos) - Instituto de ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011;

GABARDO, S.; PEREIRA, G. F.; KLEIN, M.P.; HERTZ, P.F.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Aproveitamento biotecnológico de soro e permeado de soro de queijo para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Anais...**, XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), Florianópolis, SC, 2014.

GALLO, L. A.; BASSO, L.C. Fundamentos de bioquímica para ciências biológicas, ciências dos alimentos, agrônômicas e florestais. **Material Didático**. Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Esalq USP, 2012. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/>> Acesso em: 24 de Novembro de 2016.

GHANADZADEH, H.; GHORBANPOUR, M. Optimization of ethanol production from cheese whey fermentation in a batch-airlift bioreactor. **Bioengineering & Biomedical Science**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2012.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro do leite e as alternativas para seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, p. 43-46, 2001.

GONZÁLES, C. P.; FERNÁNDEZ, M. D. Efecto de la concentración del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces fragilis*. **Revista Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 26, p. 35-41, 2006.

GRANGEIRO, M. G. A. et al. Inclusão da levedura de cana de açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) em dietas para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Ceará, p. 766-773, 2001

GRBA, S.; STEHLINK-TOMAS, V.; STANZER, D.; VAHČIĆ, N.; ŠKRLIN, A. Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. **Chemical Biochemical Engineering Quarterly**, v. 16, n. 1, p. 13-16, 2002.

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;

HARTRE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HADIYANTO, H.; ARIYANTI, D.; AINI, A. P.; PINUNDI, D. S. Optimization of ethanol production from whey through fed-batch fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. **Energy Procedia**, v. 47, p. 108-112, 2014.

HERMES, E.; ROCHA, D. C.; ORSSATTO, F.; LUCAS, J. F. R.; GOMES, S. D.; SENE, L. Isolation of microorganisms of cheese whey with lipolytic activity for removal of COD. **Engenharia. Agrícola**. [online]. v. 33, n. 2, p. 379-387, 2013.

ICONOMOPOULOU, M.; BECATOROU, A.; KANELLAKI, M.; ATHANASIADIS, I.; KIOSEOGLU, V.; BLEKAS, G.; KOUTINAS, A. A.; PARASKEVOPOULOU, A. SCP production using kefir yeast from whey liquid effluent of dairy industry, **Anais...**, 7th International Conference on Environmental Science and Technology Ermoupolis, Syros island, Greece, p. 350-355, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. 1. ed. digital, São Paulo, 2008.

KARGI F.; OZMIHCI S. Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 711-718, 2006.

KOSIKOWSKI, F.V. Greater utilization of whey powder for human consumption and nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 8, p. 1343-1348, 1967.

KOTARSKA, K.; CZUPRYNSKI, B.; KLOSOWSKI, G. Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 965-971, 2005.

KOUSHKI, M.; JAFARI, M.; AZIZI, M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two strains. **Journal Food Science Technology**, v. 49, n. 5, p. 614-619, 2012.

KOUTINAS, A. A.; ATHANASIADIS, I.; BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KANELLARI, M.; AGOURIDIS, N.; BLEKAS, G. Kefir-yeast technology: Industrial scale-up of alcoholic fermentation of whey, promoted by raisin extracts, using kefir-yeast granular biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 576-582, 2007.

LANE, M. M.; MORRISEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17-26, 2010.

LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. O etanol combustível no Brasil: Biocombustíveis no Brasil: realidades e perspectivas. Brasília/DF: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa**, p. 15, 2012.

LEMAN, J.; KINSELLA, J.E.; Surface activity, film formation and emulsifying properties of milk proteins. **Critical Review in food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, n. 2, p. 115-138, 1989.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extraction of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 7-13, 2012.

LIU, J.; SONG, H.; LIU, Y.; LI, P.; YAO, J.; XIONG, J. Discovery of kokumi peptide from yeast extract by LC-Q-TOF-MS/MS and sensomics approach. **Journal Science Food and Agriculture**, v. 95, n. 15, p. 3183-3194, 2015.

LISTRATO, G.; SALIMEI, E.; ALFANO, G.; BELLI, C.; FANTUZ, F.; GRAZIA, L.; RANALLI, G. Cheese whey recycling in traditional dairy food chain: effects of vinegar from whey in dairy cow nutrition. **Acetic Acid Bacteria**, v. 2, n. 8, p. 47-53, 2013.

MACEDO, A. **Fracionamento de lactosoro de ovelha por tecnologias de membranas e estudos das possíveis utilizações dos concentrados obtidos**. 450 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agro-Industrial) - Instituto superior de agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

MACÊDO, J. A. B. As Indústrias Farmacêuticas e o Sistema de Gestão Ambiental (SGA). **Revista Fármacos & Medicamentos**. Editorial Racine, 46-50, 2000.

MACHADO, R. M. G.; FREIRE, V. H.; SILVA, P. H. Controle ambiental em indústrias de laticínios. **Brasil Alimentos**, 2001.

MAGENIS, R.B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R.D.M.; CERQUEIRA JÚNIOR, N. G.; OLIVEIRA, R. V.B.; SOLDI, V.; BENEDE, H. D. Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. **International Journal of Food Science and Technology**, Amsterdamm, v. 41, n. 5, p. 560-568, 2006.

MAIA, G. B. S.; PINTO, A. R.; MARQUES, C. Y. T.; ROITMAN, F. B.; LYRA, D. D. Produção Leiteira no Brasil. **Revista Agropecuária**, BNDES Setorial, v. 37, p. 371-398, 2014.

MATOS, A. T. Tratamento de resíduos agroindustriais. Viçosa: **AEAGRI**, p.128, 2005.

MAZZER, C.; CAVALCANTI, O.A. Introdução à gestão ambiental de resíduos. **Infarma**, Curitiba, v. 16, n. 11-12, p. 67-77, 2004.

MENDES, T. A. O.; PINTO, L. M.; MENDES, D. S. O.; MALTA, H. L. OLIVEIRA, E. S. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 16, n. 2, p. 81-89, 2013.

MENESES, A. D. S. **Processo biotecnológico para aproveitamento de soro obtido na produção de queijo de coalho**. 88 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química) - Centro ciências exatas e tecnologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

MENEZES, J. D. S.; DRUZIAN, J. I.; PADILHA, F. F.; SOUZA, R. R. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 8, n. 8, p. 1761-1776, 2012.

METSÄMUURONEN S, MÄNTTÄRI M, NYSTRÖM M. Comparison of analysis methods for protein concentration and its use in UF fractionation of whey. **Desalination** v. 283, n. 1, 156-164. 2011.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426- 429, 1959.

MOCKAITIS, G.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. **Journal of Environmental Management**, v. 79, n. 2, p. 198-206, 2006.

MORAES, D. C. **Seleção de micro-organismos fermentadores de xilose em etanol a partir de diferentes variedades da casca de uvas (*Vitis* spp)**. 83 f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de biociências, letras e ciências exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.

MURARI, C.S.; MORAES, D.C.; BUENO, G.F.; DEL BIANCHI, V.L. Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 393, p. 42-50, 2013.

NAGODAWITHANA, T.W. Savory flavors. **Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients**. Wiley, New York, p. 135-168, 1994.

NASCIMENTO, I. A.; CABANELAS, I. T. D.; MARQUES, S. S. I.; PEREIRA, S. A.; VICH, D. V.; DOS SANTOS, J. N.; GUERRIERI, Y. Microalgas como matéria-prima para biocombustíveis: uma opção eco-compatível para o aumento de eficiência na indústria sucroalcooleira. **Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y Acuicultura**. v. 3, p. 47-65, 2011.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 81-85, 2004.

OLIVEIRA, A.M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J.H. Otimização da extração de proteínas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 521-534, 2005.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 602-606, 2007.

PAIS, J.; SERAFIM, L.S.; FREITAS, F.; REIS, M.A.M. Conversion of cheese whey into poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. **New Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 224-230, 2015.

PÁEZ, G.; JIMÉNEZ, E.; MÁRMOL, Z.; FERRER, J.; SULBARÁN, B.; OJEDA, G.; ARAUJO, K.; RINCÓN, M. Perfil de aminoácidos de la proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. **Interciência**. v. 33, n. 4, p. 297-300, 2008.

PARRONDO, J.; GARCÍA, L.A.; DÍAZ, M. Nutrients balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose added whey. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 3, p. 1-11, 1996.

PELEGRINE, D. H.; GASPARETTO, C. A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 5, n. 1, p. 57-65, 2003.

PINHEIRO, R. I. C. **Estudo do Efeito da Pressão na Fisiologia de Leveduras**. 292 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica), Universidade do Minho, Braga - Portugal, 2004.

PINTO, L. C. **Aproveitamento de produtos derivados de levedura (*Saccharomyces spp.*) para o enriquecimento nutricional de alimentos à base de mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ)**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

RAMJEAWON, T. **Journal of Cleaner Production**, v. 8, p. 503-510, 2000.

RAPACCI, M. **Estudo comparativo das características física e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctea e acidificação direta**. 142 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 1997.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. Distiller's yeasts. In: REED, G. (Ed.). **Yeast Technology**. 2. ed. New York: AVI Book, 1991.

Relatório executivo. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável/ organização BNDES e CGEE, Rio de Janeiro: BNDES, 2008. **Biblioteca Digital do BNDES**. Disponível em: <<https://web.bndes.gov.br>> Acesso: 23 de outubro de 2014.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo: perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente **Revista Food Ingredients**, n. 17, p. 20-24, 2002.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2.ed., p. 325, 2009.

ROHLFES, A. L. B.; BACCAR, N. M.; OLIVEIRA, M. S. R.; MARQUARDT, L.; RICHARDS, N. S. P. S. Indústrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental. **Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2011.

RUSSEL, I. Will a recombinant DNA yeast be able to solve whey disposal problem? **Trends in Biotechnology**. v. 4, n. 5, p. 107-108, 1986.

SANSONETTI S.; CURCIO S.; CALABRÒ V.; IORIO G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 12, p. 1687-1692, 2009.

SANTINI, G. A.; PEDRA, D.F.B.M.; PIGATTO, G. Internacionalização do setor lácteo: A busca pela consolidação. In: Congresso Desenvolvimento rural e sistemas agroalimentares: os agronegócios no contexto de integração das nações. Porto Alegre. **Anais...**, Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, p. 1-21, 2009.

SANTOS. A. M. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Unidade acadêmica centro de tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

SANTOS, F. A.; BOREM, A; CALDAS, C.S. **Cana de açúcar: Bioenergia, açúcar e álcool - tecnologias e perspectivas**. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Editora Suprema. v. 1. p. 577, 2009.

SCHULTZ, N.; CHANG, L.F.; HAUCK, A.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 69, n. 5, p. 515-520, 2006.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SGARBIERI. C.V. Produção piloto de derivados de levedura (*saccharomyces sp*) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, p. 119-125, 1999.

SILVA, L. A. F. **Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IG-AR/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada.** 91 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de química, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

SILVA, A.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 37, n. 9, p. 973-982, 2010.

SILVA, P. H. F.; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade térmica do leite. **Atrius**. Artigos para Download p.1-8, 2004.

SILVA, M. O. S. A. Análise físico-química para controle de estações de tratamento de esgotos. 1ª Edição. São Paulo: **CETESB**, p. 226, 1997.

SILVA, C. A.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Estudo de um processo fermentativo utilizando soro de leite e a levedura *Kluyveromyces fragilis*. **Semina Ciências Agrárias**, v. 16, n. 1, p. 17-20, 1995.

SILVEIRA W. B.; PASSOS, F. J. V.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. **Enzyme Microbial Technology**, v. 36, n. 7, p. 930-936, 2005.

SILVEIRA, R. F. **Produção de etanol por leveduras em biorreatores com células livres e imobilizadas utilizando soro de queijo.** 69 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006;

SILVEIRA, W.B. **Produção de Etanol em permeado de soro por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p.111-119,2004.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v.57, n. 1, p 1-11, 1996.

SMITH, K. **Dried dairy ingredients**. Madison, p.60, 2008.

SOCCOL, C. R.; ROJAN, P. J.; PATEL, A. K.; WOICIECHOWSKI, A. L., VANDENBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A . Glucoamylase. In: **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatec Publishers, p. 221-230, 2005.

SOUZA, R. R., BERGAMASCO, R., COSTA, S.C., FENG, X., FARIA, S.H.B., GIMENES, M.L. Recovery and purification of lactose from whey. **Chemical Engineering and Processing**, v. 49, n. 11, p. 1137-143, 2010.

SOUZA, K. M.; ANDRADE, A. C.; ARAÚJO, E. H. Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Anais..**, VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Unicamp 2005.

SOUZA JR, C. G. **Aplicação de células recombinantes da levedura *Kluyveromyces marxianus* em soro de queijo**. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de ciências biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

SOVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobre expressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicado) - Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

STAM, H.; HOOGLAND, M., LANE, C. Food flavours yeast. In: B.J Wood (ed). **Microbiology of fermented foods**, v.2, 2ed, Blackie London, p. 505-542, 1998.

TANGÜLER, H.; ERTEN, H. The effect of different temperatures on autolysis of baker's yeast for the production of yeast extract. **Turkish journal of agriculture and forestry**, v. 33, n. 2, p. 149-154, 2009

TEIXEIRA, P, J. D. **Isolation, screening and characterization of microorganisms with potential for biofuels production**. 66 f. Dissertação (Microbiologia Aplicada) - Faculdade de ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VINCENZI, A.; MACIEL, M. J.; BURLANI, E. L.; OLIVEIRA, E. C.; VOLPATO, G.; LEHN, D.; SOUZA, C. F. V. Ethanol bio-production from ricota cheese whey by several strains of the yeasts *Kluyveromyces*. **American Journal of Food Technology**, v. 9, n. 6, p. 281-291, 2014.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. London: Wiley & Sons, 1998.

WALSTRA, P. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Madrid, Espanha. Ed acribia, 2001.

WEUSTHUIS, R. A.; VISSER, W.; PRONK, J. T.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. **Microbiology**, v. 140, n. 4, p. 703-715, 1994.

YADAV, J. S.S.; BEZAWADA, J.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R.Y. Permeabilization of *Kluyveromyces marxianus* with mild detergent for whey lactose hydrolysis and augmentation of mixed culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 3207-3222, 2014.

YUAN J. S.; TILLER K. H.; AL-AHMAD H.; STEWART N. R.; STEWART JR, C. N. Plants to power: bioenergy to fuel the future Trends in Plant. **Science**, v. 13, n. 8, p. 421-429, 2008.

ZAFAR S.; OWAIS M.; SALEEMUDDIN M.; HUSAI S. Batch kinetics and modelling of ethanolic fermentation of whey. **International Journal of food and Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 597-604, 2005.

ZAFAR S.; OWAIS M. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 295-298, 2005.

ZARCACHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; SPADOTI, L. M.; GALLINA, D. A.; TRENTO, F. K. H. S.; ALVES, A. T. S. e. Permeado de soro: aplicações que agregam valor aos coprodutos do leite. **Anuário Leite & Derivados**, n. 131, p. 48-55, 2012.

ZHANG, J.; LYND, L. R. Ethanol production from paper sludge by simultaneous saccharification and co-fermentation using recombinant xylose-fermenting microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 235-244, 2010.

ZIMMER, T. R. **Influência da carga orgânica e do tempo de enchimento sobre o desempenho do reator anaeróbio em batelada sequencial com biomassa granulada tratando soro de queijo**. 160 f. Dissertação (Mestrado Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2006.

ZOPPELLARI, F. **Produzione di bioetanolo da effluenti del settore lattiero-caseario con *Kluyveromyces marxianus***. 124 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular, Molecular e Industrial), Università di Bologna, Bologna - Italia, 2013.

ZOPPELLARI, F.; BARDI, L. Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 607-613, 2013.