



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

**CLEIDIANE SAMARA MURARI**

**ESTUDO DA BIOCONVERSÃO DA LACTOSE DO SORO DE  
LEITE EM BIOETANOL PELA LEVEDURA *KLUYVEROMYCES*  
*MARXIANUS 229***

São José do Rio Preto - SP  
2013



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

**CLEIDIANE SAMARA MURARI**

**ESTUDO DA BIOCONVERSÃO DA LACTOSE DO SORO DE  
LEITE EM BIOETANOL PELA LEVEDURA *KLUYVEROMYCES  
MARXIANUS 229***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de tecnologia e ciência de alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

**Orientador:**

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

São José do Rio Preto – SP  
2013

Murari, Cleidiane Samara.

Estudo da bioconversão da lactose do soro de leite em bioetanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229/ Cleidiane Samara Murari. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2013.

100 f. ; 30 cm.

Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Microbiologia. 3. Bioprocessos. 4. Fermentação de resíduos industriais. 5. Bioetanol. I. Del Bianchi, Vanildo Luiz. . II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 620.91

**CLEIDIANE SAMARA MURARI**

**ESTUDO DA BIOCONVERSÃO DA LACTOSE DO SORO DE  
LEITE EM BIOETANOL PELA LEVEDURA *KLUYVEROMYCES*  
*MARXIANUS 229***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de tecnologia e ciência de alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Dorta  
FATEC – Marília

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto – SP

27/Fevereiro /2013

*Aos meus amados pais*

*Maria Aparecida Dias Murari e Dirceu Murari*

*Dedico*

*“A vida é de fato escuridão, exceto lá onde houver impulso,  
E todo impulso é cego, exceto onde houver sabedoria,  
E toda sabedoria é vã, exceto onde há trabalho,  
E todo trabalho é vazio, exceto onde há amor,  
E quando você trabalha com amor,  
Você se liga com você mesmo,  
E com o outro e com Deus”*

(Khalil Gibran)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de ter conseguido realizar mais uma etapa importante em minha vida, pela saúde, disposição para os estudos e por me iluminar nos momentos difíceis.

Aos meus pais pelo apoio, carinho, paciência e dedicação imprescindível durante toda minha vida e por não medirem esforços para que eu pudesse seguir sempre em frente.

Ao professor Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi por dedicar seu tempo e sua experiência para que minha formação fosse, também, um aprendizado de vida, pela paciência, por todo o conhecimento que me repassou e por acreditar no meu potencial.

A minha amiga Débora Cristina Moraes por sempre ter me ajudado e me apoiado desde o início desta jornada, muito obrigada.

A professora Dra. Claudia Dorta pelos conselhos, pelos ensinamentos e pelas sugestões de grande importância para a execução deste trabalho, além de sua amizade.

Ao professor Dr. Mauricio Boscolo por ter cedido o equipamento para realização das análises de etanol, que foram de grande importância, e a Janaina Pires por ter ajudado durante a execução da mesma.

Ao pessoal do laboratório de Leite e Derivados, por terem concedido o soro de leite utilizado durante as pesquisas.

Aos meus companheiros de laboratório “pois na construção de uma peça teatral a presença de todos é imprescindível. Não existirá um cenário, se não houver quem o ilumine...” Gisele Ferreira Bueno, Pedro Aquino Mota, Adilson J. Chaves, Ederson Ribeiro, Noelia Ribeiro, Mariana Quintero, Lady R. P.Garcia, que sempre estavam prontos para me ajudar e ouvir, por serem dedicados, e principalmente, por serem amigos e companheiros.

Ao técnico do laboratório Newton, pela ajuda concedida em algumas análises realizadas.

As minhas amigas Natália Righetti Rocha Trinca, Juliana Soares, Bruna Lima da Silva e Letícia Yuri Nagai, pela amizade e companheirismo e por sempre me ouvir nos momentos difíceis, e pelos momentos divertidos que passamos juntas.

Aos professores do departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos.

Agradeço em fim a todos que de certa forma contribuíram e fizeram parte desta etapa importante de minha vida. Meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

O soro de leite é um subproduto de elevado valor nutricional, composto principalmente por lactose e proteínas. Representa uma fonte rica de nutrientes, podendo ser utilizado em diversos processos fermentativos, porém quando descartado de maneira incorreta pode gerar sérios problemas ao meio ambiente devido a sua elevada carga orgânica. Desta maneira, o objetivo do trabalho foi avaliar a produção de etanol e redução da matéria orgânica por *Kluyveromyces marxianus* 229 em meios compostos por soro de leite. Os meios foram fermentados por 48 horas em condições aeróbias e anaeróbias em diferentes concentrações de soro de leite (100%, 80%, 50% e 25%) e inoculo inicial (5%,10%,15% e 20%). Em intervalos de 6 horas alíquotas dos meios fermentativos foram retiradas para realizar análise de etanol, carboidratos, proteínas, e demanda química de oxigênio (DQO). A maior produção de etanol ocorreu nos meios compostos por maiores concentração de nutrientes (MSL1), e com 10% de inoculo inicial, chegando a produzir 18,70 g/L de etanol em 10 horas de fermentação e 17,20 g/L de etanol em 18 horas de fermentação em condições aeróbias e anaeróbias respectivamente. Porém, em termos de rendimento etanólico teórico, os meios que apresentaram 50% de soro de leite (MSL3), foram os que obtiveram melhores resultados, chegando a um rendimento de 71,80% em aerobiose e 68,11% em anaerobiose . Em relação à produção e produtividade celular, os meios MSL1 com 15% de inoculo foram os que obtiveram resultados mais satisfatório, com 6,45 g/L e 0,53 g/L.h respectivamente em aerobiose e 5,44 g/L e 0,22 g/L.h respectivamente em anaerobiose. A levedura *K. marxianus* 229 apresentou melhores resultados quanto a redução da DQO nos meios de menor concentração de nutrientes (MSL4), chegando a reduzir até 94,26% e 83,28% após 48 horas de fermentação aeróbia e anaeróbia respectivamente. Assim, pelo fato de reduzir o teor de matéria orgânica do soro de leite, reduzindo também seu impacto causado ao meio ambiente, além de gerar bioprodutos de alto valor comercial, verificou-se que a utilização da *Kluyveromyces* em soro de leite é uma alternativa promissora para se obter uma fonte renovável de biocombustível.

Palavras chave: Soro de Leite, etanol, bioprocessos, redução DQO, leveduras

## ABSTRACT

Whey, a by-product with high nutritional value, mainly composed by lactose and proteins, represents a rich source of nutrients that can be used in different fermentation processes. However, when it's incorrectly disposed, can cause, however when it's incorrectly disposed it can cause serious problems to the environment due its high organic load. Thus, the aim of this study was to evaluate the ethanol production and the organic matter reduction by *Kluyveromyces marxianus* 229 in a media composed of whey. The media was fermented for 48 hours under aerobic and anaerobic conditions at different concentrations of whey (100%, 80%, 50% and 25%) and initial inoculums (5%, 10%, 15% and 20%). Aliquots of fermentation media were taken every 6 hours to perform analysis of ethanol, carbohydrates, proteins and chemical oxygen demand (COD). Ethanol production was higher in media containing higher nutrients concentration (MSL1) and 10% of initial inoculums, reaching 18.70g/L of ethanol after 10 hours and 17.20g/L after 18 hours of fermentation under aerobic and anaerobic conditions, respectively; though in terms of theoretical ethanol yield, the media containing 50% of whey (MSL3) obtained better results, reaching a yield of 71.80% under aerobic condition and 68.11% under anaerobic condition. Regarding the cellular production and productivity, the media MSL1 containing 15% of inoculum obtained more satisfactory results, presenting 6.45g/L and 0.53 g/L.h respectively under aerobic condition and 5.44g/L and 0.22 g/L.h respectively under anaerobic condition. The yeast *K. marxianus* 229 showed better results for the COD reduction in the media with lower nutrients concentration (MSL4), reducing to 94.26% and 83.28% after 48 hours of aerobic and anaerobic fermentation respectively. These results showed that the yeast is able to reduce the content of whey organic matter, reduce the impact of the whey on the environment and generate bio-products with high commercial value, becoming a promising alternative to obtain a renewable source of biofuel.

Keywords: whey, ethanol, bio-processes, COD reduction, yeast.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Representação da molécula de lactose.....	<b>32</b>
<b>Figura 2</b>	Rota metabólica da fermentação da lactose em etanol.....	<b>36</b>
<b>Figura 3</b>	Curva de crescimento médio da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	<b>53</b>
<b>Figura 4</b>	Curva de crescimento médio da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	<b>53</b>
<b>Figura 5</b>	Curva de crescimento médio da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 15% de inoculo inicial, condições aeróbias e anaeróbias.....	<b>54</b>
<b>Figura 6</b>	Curva de crescimento médio da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inoculo inicial, sob condições anaeróbias.....	<b>55</b>
<b>Figura 7</b>	Produção média de massa celular pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inoculo inicial, sob condições aeróbias anaeróbias.....	<b>58</b>
<b>Figura 8</b>	Produção média de massa celular pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	<b>58</b>
<b>Figura 9</b>	Produção média de massa celular pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2,	

	MSL3 e MSL4, com 15% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	59
<b>Figura 10</b>	Produção média de massa celular pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	59
<b>Figura 11</b>	Consumo médio da lactose pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	64
<b>Figura 12</b>	Consumo médio da lactose pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	64
<b>Figura 13</b>	Consumo médio da lactose pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 15% de inoculo inicial, sob condições condições aeróbias e anaeróbias.....	65
<b>Figura 14</b>	Consumo médio da lactose pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inoculo inicial, sob condições anaeróbias.....	65
<b>Figura 15</b>	Consumo médio de proteína pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	69
<b>Figura 16</b>	Consumo médio de proteína pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	69
<b>Figura 17</b>	Consumo médio de proteína pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4,	

	com 15% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	70
<b>Figura 18</b>	Consumo médio de proteína pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inoculo inicial, sob condições anaeróbias.....	70
<b>Figura 19</b>	Produção de etanol pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	73
<b>Figura 20</b>	Produção média de etanol pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	73
<b>Figura 21</b>	Produção média de etanol pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 15% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	74
<b>Figura 22</b>	Produção média de etanol pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	74
<b>Figura 23</b>	Redução da DQO do soro de leite pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	83
<b>Figura 24</b>	Redução da DQO do soro de leite pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inoculo inicial, sob condições anaeróbias.....	83
<b>Figura 25</b>	Redução da DQO do soro de leite pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e	

	MSL4, com 15% de inoculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.....	<b>84</b>
<b>Figura 26</b>	Redução da DQO do soro de leite pela <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inoculo inicial, sob condições anaeróbias.....	<b>84</b>
<b>Figura 27</b>	Curva padrão da lactose.....	<b>100</b>
<b>Figura 28</b>	Curva padrão proteína.....	<b>100</b>
<b>Figura 29</b>	Curva padrão etanol.....	<b>100</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Composição média do soro de leite doce e ácido.....	<b>29</b>
<b>Tabela 2</b>	Algumas formas de aplicações para o uso de soro de leite.....	<b>31</b>
<b>Tabela 3</b>	Classificação taxonômica da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	<b>38</b>
<b>Tabela 4</b>	Composição do meio de cultivo para crescimento de <i>K. marxianus</i> 229.....	<b>42</b>
<b>Tabela 5</b>	Composição dos meios fermentativos.....	<b>43</b>
<b>Tabela 6</b>	Designação dos meios fermentativos de soro de leite, de acordo com suas concentrações .....	<b>43</b>
<b>Tabela 7</b>	Caracterização da composição média dos meios fermentativos à base de soro de leite em diferentes concentrações antes da fermentação.....	<b>51</b>
<b>Tabela 8</b>	Densidade óptica dos inóculos iniciais testados na fermentação do soro de leite .....	<b>52</b>
<b>Tabela 9</b>	Comparação do tempo estimado pela levedura <i>K. marxianus</i> 229 para atingir seu pico máximo de crescimento e seus respectivos valores de D.O. nos meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais, em condições aeróbias e anaeróbias.....	<b>56</b>
<b>Tabela 10</b>	Resultados obtidos quanto à produção celular, produtividade celular e conversão substrato a célula, pela levedura <i>K. marxianus</i> 229, em relação ao pico máximo de crescimento na fermentação dos meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais.....	<b>60</b>
<b>Tabela 11</b>	Comparação do consumo de lactose pela levedura <i>K. marxianus</i> 229, após 48 horas de fermentação em meios com diferentes concentrações	

	de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais.....	<b>66</b>
<b>Tabela 12</b>	Comparação da velocidade de consumo de substrato, pela levedura <i>K. marxianus</i> 229 , em relação ao pico máximo de crescimento na fermentação dos meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais.....	<b>68</b>
<b>Tabela 13</b>	Comparação do consumo de proteína pela levedura <i>K. marxianus</i> 229 , após 48 horas de fermentação em meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais .....	<b>71</b>
<b>Tabela 14</b>	Variáveis analisadas e melhores parâmetros cinéticos obtido pela fermentação aeróbia e anaeróbia da levedura <i>K.marxianus</i> 229, em meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais .....	<b>75</b>
<b>Tabela 15</b>	Comparação do tempo levado pela levedura <i>K.marxianus</i> 229 para atingir a produção máxima de etanol, nos meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais, em condições aeróbias e anaeróbias.....	<b>81</b>
<b>Tabela 16</b>	Comparação da redução de DQO dos meios fermentativos de soro de leite em diferentes concentrações de lactose e inóculo, após 48 horas de fermentação em condições aeróbias e anaeróbias pela levedura <i>K. marxianus</i> 229.....	<b>85</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxigênio
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar
<b>DO</b>	Densidade Óptica
<b>nm</b>	nanômetros
<b>rpm</b>	Rotação por Minuto
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>DNS</b>	Ácido Dinitrosalicílico
<b>GRAS</b>	<i>Generally Recognized as Safe</i>
<b>MSL1</b>	Meio de cultivo 100% soro de leite
<b>MSL2</b>	Meio de cultivo 80% soro de leite
<b>MSL3</b>	Meio de cultivo 50% soro de leite
<b>MSL4</b>	Meio de cultivo 25% soro de leite
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>g/L</b>	Gramas por litro
<b>g/L.h</b>	Gramas por litro/ hora
<b>g/g</b>	Rendimento grama por grama
<b>P<sub>x</sub></b>	Produtividade em Biomassa
<b>P<sub>s</sub></b>	Velocidade de consumo do substrato
<b>Y<sub>E/S</sub></b>	Conversão substrato a etanol
<b>Y<sub>P/E</sub></b>	Produtividade etanol
<b>η</b>	Rendimento etanol

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2.1.	Geral.....	23
2.2.	Específicos.....	23
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>24</b>
3.1.	Produção de etanol por fontes renováveis.....	24
3.2.	Resíduos gerados pelos laticínios e danos ambientais.....	26
3.3.	Soro de leite.....	28
3.4.	Lactose.....	32
3.5.	Soro de leite como meio fermentativo.....	33
3.6.	Levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> e metabolismo.....	37
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1.	Meio de Cultura e Manutenção dos Micro-organismos.....	41
4.1.1.	Micro-organismo.....	41
4.1.2.	Soro de leite.....	41
4.1.3.	Manutenção da cultura estoque.....	41
4.2.	Meio de fermentação.....	41
4.2.1.	Padronização do inóculo.....	41
4.2.2.	Preparo do soro de leite para fermentação.....	42
4.2.3.	Fermentação do soro de leite.....	43
4.3.	Curva de crescimento.....	44
4.3.1.	Quantificação do crescimento por densidade óptica.....	44
4.3.2.	Crescimento em aerobiose.....	44
4.3.3.	Crescimento em anaerobiose.....	45
4.3.4.	Cálculos relacionados ao crescimento celular.....	45
4.3.4.1.	Produtividade em massa celular.....	45
4.3.4.2.	Conversão substrato a massa celular.....	45
4.4.	Métodos analíticos.....	46
4.4.1.	Determinação de carboidratos.....	46

4.4.1.1.	Cálculo do consumo de carboidratos (%).....	46
4.4.1.2.	Cálculo da velocidade de consumo do substrato (g/L.h).....	46
4.4.2.	Determinação de proteínas.....	47
4.4.2.1.	Cálculo do consumo de proteínas (%).....	47
4.4.3.	Determinação de etanol.....	48
4.4.3.1.	Cálculos relacionados à produção etanólica.....	48
4.4.3.1.1.	Fator de conversão substrato a etanol (g/g).....	48
4.4.3.1.2.	Produtividade em etanol (g/L.h).....	48
4.4.3.1.3.	Rendimento (%).....	49
4.4.4.	Determinação da demanda química de oxigênio.....	49
4.4.4.1.	Cálculo de eficiência na redução de DQO.....	49
4.4.5.	Determinação de massa celular seca (MSC).....	50
4.4.5.1.	Cálculo para determinação da massa seca.....	50
4.5.	Análise dos resultados.....	50
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
5.1.	Parâmetros físico-químicos dos meios de cultivo antes da fermentação.....	51
5.2.	Padronização do inoculo inicial.....	52
5.3.	Processo fermentativo aeróbio e anaeróbio.....	52
5.3.1.	Curva de crescimento microbiano.....	52
5.3.2.	Massa celular.....	58
5.3.2.1.	Massa celular 5% de inóculo.....	61
5.3.2.2.	Massa celular 10% de inóculo.....	61
5.3.2.3.	Massa celular 15% de inóculo.....	61
5.3.2.4.	Massa celular 20% de inóculo.....	62
5.3.3.	Avaliação do consumo de lactose e proteínas.....	64
5.3.3.1.	Consumo de lactose.....	64
5.3.3.2.	Consumo de proteína.....	69
5.3.4.	Bioconversão da lactose em etanol em condições aeróbias e anaeróbias pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> 229.....	73
5.3.4.1.	Produção etanol 5% de inóculo.....	76

5.3.4.2.	Produção etanol 10% de inóculo.....	76
5.3.4.3.	Produção etanol 15% de inóculo.....	77
5.3.4.4.	Produção etanol 20% de inóculo.....	78
5.3.4.5.	Avaliação geral dos resultados obtidos na fermentação do soro de leite para produção de etanol.....	78
5.3.5.	Redução do potencial poluidor em condições aeróbias e anaeróbias.....	83
5.3.5.1.	Redução DQO 5% de inóculo.....	86
5.3.5.2.	Redução DQO 10% de inóculo.....	86
5.3.5.3.	Redução DQO 15% de inóculo.....	86
5.3.5.4.	Redução DQO 20% de inóculo.....	86
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>90</b>
<b>8.</b>	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse por subprodutos agroindustriais vem aumentando cada vez mais, sobretudo devido à capacidade dos mesmos em serem utilizados como substrato por diferentes micro-organismos capazes de produzir metabólitos de alto valor, a partir dos quais podem ser aplicados em diversos setores industriais, além de reduzir o impacto ao meio ambiente que os mesmos podem vir a ocasionar caso não sejam descartados de maneira correta. Dentre os diversos subprodutos descartados pelas indústrias, um de grande importância é o soro de queijo ou também chamado soro de leite.

O soro de leite é o subproduto da indústria de laticínios resultante da precipitação e remoção das caseínas do leite durante a produção de queijo, representando o principal e mais problemático subproduto deste tipo de indústria, em virtude de sua elevada carga orgânica que apresenta uma Demanda Química de Oxigênio em torno de 50.000 a 80.000 mg/L e também pela grande quantidade de volume gerado. O soro quando descartado de maneira incorreta e sem tratamento prévio pode gerar sérios problemas ao meio ambiente.

Nos últimos anos a legislação que cuida da qualidade do efluente das indústrias tornou-se mais rigorosa com relação ao destino dado ao soro de leite, com o intuito de preservar o meio ambiente. No entanto, grande parte do soro gerado pela maioria dos laticínios ainda é lançada na natureza como um produto residual sem muita utilidade. Porém, hoje em dia esta abordagem vem sendo abandonada ao passo que os estudos realizados mostram as excelentes propriedades biológicas, tecnológicas e funcionais do soro, fazendo com que o mesmo seja tratado cada vez mais como um subproduto de alto valor.

Do ponto de vista nutricional, o soro de leite é um subproduto rico em nutrientes, com quantidades significantes de lactose e proteínas, além de minerais, vitaminas e lipídios, é considerado um substrato em potencial para a realização de diversos processos biotecnológicos, tais como aqueles que remetem a conversão da lactose para produção de metabólitos de interesse, como o etanol e outros.

A utilização do soro como meio de cultura para a produção de produtos com maior valor agregado tem sido estudada há muito tempo, sobretudo devido à presença do alto teor de lactose, um açúcar fermentescível que torna o soro um substrato para fermentação por alguns micro-organismos que apresentem o potencial de metabolizar este dissacarídeo, porém são poucos os micro-organismos que apresentam tal capacidade.

Dentre os micro-organismos capazes de fermentar a lactose utilizando-a como fonte de carbono e energia, a levedura *Kluyveromyces marxianus* tem apresentado grande destaque em estudos nos últimos anos, pois além de sintetizar bioprodutos como enzimas hidrolíticas, produzir biomassa para indústria alimentícia, ribonucleotídeos e oligossacarídeos, também oferece vantagens no processo industrial quanto à velocidade de crescimento, alta atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase podendo ser explorada para a produção de etanol como um metabólito secundário a partir do soro de queijo. Por ser considerado um micro-organismo padrão – GRAS (*Generally Recognized as Safe*) trata-se de um micro-organismo seguro do ponto de vista da segurança alimentar e saúde pública.

Com a perspectiva de crescimento da demanda mundial de etanol e pela necessidade da geração de fontes alternativas de energia, as quais repercutem menores danos ambientais daquelas provindas de fontes fósseis como o petróleo e seus derivados, tecnologias capazes de melhorar o desempenho e a eficiência de processos fermentativos ganham importância fundamental no Brasil e no mundo.

A produção de etanol através da bioconversão da lactose do soro de leite 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 leite produzidas pela indústria reduzindo seu impacto ao meio ambiente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral a produção de etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 através do soro de leite visando à redução do seu potencial poluidor e a geração de um produto com maior valor agregado.

### 2.2. Específicos

Como objetivos específicos, o presente trabalho buscou avaliar:

- ✓ O efeito da concentração do soro de leite na produção de etanol e no crescimento microbiano;
- ✓ As diferentes concentrações de inóculos (5%, 10%, 15% e 20%);
- ✓ O desempenho da levedura em condições aeróbias e anaeróbias, em relação às variáveis massa celular, consumo de lactose, proteína, eficiência na redução de DQO e produção de etanol;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Produção de etanol por fontes renováveis

As mudanças climáticas aliadas às necessidades estratégicas de produção de energia têm motivado uma corrida sem precedentes à produção de combustíveis alternativos, preferencialmente de fontes renováveis de uma maneira ambientalmente sustentável (COSTA, 2011).

Os biocombustíveis que fazem parte da matriz energética brasileira são produzidos pela fermentação microbiana de açúcares derivados de matérias-primas agrícolas, principalmente de amido e de sacarose. Os Estados Unidos e o Brasil detêm cerca de 70,00% da produção mundial de etanol por meio de amido de milho e caldo da cana de açúcar, respectivamente (COSTA, 2011).

O etanol é um 'Combustível Universal', considerado renovável, ou seja, pode ser produzido sem risco de esgotar os recursos naturais do planeta (ao contrário do que ocorre com o petróleo), além da sua capacidade de reduzir as emissões de CO<sub>2</sub>. É um combustível politicamente correto, que tem sido tema de grande importância e discussão, pela sua repercussão mundial relacionada à escassez de fontes de energia e a busca por outras fontes alternativas para produção da mesma. Tem ganhado destaque na economia brasileira e mundial nos últimos tempos, além de apresentar uma posição estratégica no mercado tanto nacional quanto internacional (SANTANA et al., 2009). Isso porque ele é produzido a partir de biomassa que é uma matéria renovável e não contribui para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre, ou seja, o CO<sub>2</sub> liberado durante o uso da biomassa é absorvido novamente no processo de fotossíntese para a sua formação (COSTA, 2011).

O desenvolvimento de pesquisas relacionadas com a produção de biocombustíveis alternativos tem sido significativo nos últimos anos, sobretudo pela preocupação com a exaustão das reservas de combustíveis fósseis como o petróleo e seus derivados, que têm sido considerados como alguns dos principais responsáveis pelo aquecimento global. Portanto, os biocombustíveis tem uma grande chance de liderar o mercado dos combustíveis, já que é

previsto que, num futuro próximo, as reservas de petróleo disponíveis no mundo se tornem cada vez mais escassas (CIB, 2009).

A partir deste contexto a produção de bioetanol tem emergido como uma maneira mais viável no que se refere a fontes não convencionais de energia, uma vez que tal bioproduto tem inúmeras aplicações tanto na área farmacêutica, química ou alimentícia, além do desenvolvimento e avanços nas pesquisas e nos procedimentos tecnológicos do processo fermentativo (SILVEIRA, 2006; ZAFAR et al., 2005; MARQUES; SERRA, 2004).

O etanol passou a ser utilizado como combustível a partir da necessidade em reduzir a dependência do país à importação de petróleo (era importado cerca de 80% de petróleo para atender a demanda nacional), assim foi criado o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL) que visava o desenvolvimento das técnicas e aperfeiçoamento dos insumos para a produção de álcool (ANDRADE et al., 2009; SILVEIRA, 2006).

O programa governamental foi criado na década de 1970 devido à primeira crise do petróleo, sendo este o motivo principal para o uso em larga escala e o desenvolvimento de tecnologia para produção de etanol no país. A partir do Proálcool, o setor teve um grande desenvolvimento, com investimentos em equipamentos, serviços e novas tecnologias, tanto para a parte agrícola quanto para a industrial (CIB, 2009).

Simultaneamente ao desenvolvimento do PROALCOOL foram surgindo alternativas de produção de etanol, podendo citar como exemplo a utilização de subprodutos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, trigo, soja e milho, por micro-organismos para a bioconversão dos açúcares destes subprodutos em etanol (SILVEIRA, 2006).

Com a perspectiva de crescimento da demanda de álcool combustível como aditivo de função ambiental (pela redução de emissões de CO<sub>2</sub>) tecnologias capazes de melhorar o desempenho do processo ganharam importância fundamental no país (ANDRADE et al., 2009; SILVEIRA, 2006).

### **3.2. Resíduos gerados pelos laticínios e danos ambientais**

As atividades conduzidas pelos processos industriais levam à geração de resíduos durante sua produção, podendo ser estes líquidos, sólidos ou gasosos. Quando não há uma disposição correta de tais resíduos, os mesmos podem ocasionar sérios problemas de poluição no solo, em águas superficiais e em águas subterrâneas, sobretudo por apresentarem, em geral, grande concentração de material orgânico (carboidratos, proteínas, gorduras, entre outros), e inorgânico, onde o seu lançamento em corpos hídricos pode proporcionar grande decréscimo na concentração de oxigênio dissolvido nesse meio, cuja magnitude depende da concentração de carga orgânica e da quantidade lançada (TULLIO, 2007; MATOS, 2005).

O crescimento e desenvolvimento industrial nas últimas décadas têm levado a geração de efluentes potencialmente poluidores, sobretudo pelas suas características físicas e químicas, além da presença de compostos orgânicos ou inorgânicos que podem ser tóxicos à microbiota presente nos rios e lagos. Juntamente com tais características tem-se uma quantidade significativa de efluentes gerados diariamente pelos processos industriais dos mais diversos produtos que são considerados indispensáveis pela sociedade.

Os problemas ambientais associados às atividades industriais tem levado os órgãos ambientais das esferas federais, estaduais e municipais a se preocuparem e se conscientizarem, fazendo com que as indústrias cumpram leis de controle de emissão de poluentes e estas por sua vez vêm buscando alternativas para se adequarem às normas impostas pela legislação ambiental (TULLIO, 2007; ALMEIDA, 2004).

Os laticínios representam um importante setor da indústria alimentícia, tanto pelo ponto de vista econômico quanto social. Se considerar o grande número de empresas que descartam seus efluentes sem nenhum tipo de tratamento prévio nos cursos d'água, a contribuição dos laticínios em relação a poluição hídrica, sobretudo pela sua carga orgânica alta, é muito significativa (COSTA, 2008). Tal problema se torna mais grave quando se considera que 90% dos laticínios que estão em funcionamento são de pequeno porte, assim não dispõem de meios econômicos, tecnológicos e mão de obra qualificada

para lidar com as mudanças necessárias à implantação de tecnologias limpas para o aproveitamento do soro de leite (MURARI et al., 2011; COSTA, 2008; TULLIO, 2007; ALMEIDA, 2004).

Dentre os subprodutos da indústria de laticínios, o soro é até hoje o de maior importância, tanto pelo seu volume gerado, como pela sua carga poluidora, que quando lançado em corpos receptores pode causar sérios problemas ambientais, devido à sua elevada carga orgânica de difícil biodegradabilidade (ALMEIDA, 2004).

O soro possui uma DQO (demanda química de oxigênio) de 50.000-80.000 mg/L dependendo do processamento específico utilizado na fabricação de queijos e do conteúdo de lactose, este valor é cerca de 100 vezes maior que a carga orgânica do esgoto doméstico. Por isso que o seu descarte em corpos receptores d'água é preocupante (ALMEIDA, 2004), pois quando há o lançamento de grande quantidade de material orgânico oxidável no corpo hídrico, as bactérias aeróbias, para estabilizarem o material orgânico presente, passam a utilizar o oxigênio disponível no meio aquático, baixando sua concentração na água e podendo, provocar a morte de peixes e outros animais aquáticos aeróbios, por asfixia. Em caso de lançamento de grandes cargas orgânicas, além de proporcionar a morte de animais, pode provocar 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 et al., 2004). Sendo assim a sua disposição contínua pode ocasionar sérios problemas as estações de tratamento de esgotos e quando descartados em solos pode alterar a estrutura físico-química reduzindo 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 as águas pluviais captadas na respectiva indústria, se tornando um forte agravante ao meio ambiente. (SILVA, 1997).

### 3.3. Soro de leite

Na idade média o soro era utilizado em produtos farmacêuticos como componente de unguentos para queimadura, como bálsamo para pelo ou como neutralizante para cabelos, mas raramente era usado na alimentação (KOSIKOWSKI, 1979). O uso do soro passou a ter grande evidência em meados do século XIX, na Europa Ocidental, com a criação de mais de 400 “casas de soro”. Em meados de 1940, na Europa Central, foi usado no tratamento de dispepsia, uremia, gota, anemia, artrite, doenças hepáticas entre outras (COSTA, 2008 e HOLSINGER et al., 1974).

O soro de leite ou também chamado de soro de queijo é um subproduto gerado pelos laticínios, resultante da precipitação e remoção das caseínas do leite durante a produção de queijo podendo ser esta por via ácida ou enzimática (MURARI et al., 2011).

O soro de queijo retém cerca de 55% dos nutrientes do leite, contendo por volta de 4,5% de lactose, 0,6-0,8% de proteínas solúveis (albuminas e globulinas), 0,03-0,01% de gordura, 0,5-0,8% de minerais principalmente cloreto de sódio, além de fosfato e cálcio e 0,2-0,8% de ácido láctico (RÉVILLON et al., 2000). Existem também outros componentes como ácido cítrico, compostos nitrogenados na forma não protéica (como, por exemplo, a uréia e o ácido úrico), além de vitaminas tais como: tiamina, riboflavina, vitamina B6 e B12 e ácido pantotênico.

A lactose e as proteínas são os componentes presentes no soro de leite de maior importância. A lactose, além de se apresentar em maior quantidade no extrato seco total do soro, constitui de uma fonte em potencial de energia para os diversos processos biotecnológicos que possa ser aplicada.

A proteína do soro é considerada de alto valor nutricional por conter todos os aminoácidos essenciais facilmente digeríveis e considerados altamente completos, tanto fisiológica quanto nutricionalmente. As principais proteínas do soro são  $\beta$ -lactoglobulina (55-65%),  $\alpha$ -lactoalbumina (15-25%), protease-peptona (10-20%), imunoglobulinas (10-15%), albumina do soro bovino (5-6%), caseínas solúveis (1-2%) e proteínas em menores quantidades (<0,5%) como lactoferrina, lactolina, glicoproteína, entre outras. Algumas das

proteínas do soro apresentam importantes propriedades funcionais, como a  $\beta$ -lactoglobulina que possui excelentes propriedades gelatinizantes; a  $\alpha$ -lactoalbumina apresenta propriedade emulsificante e a lactoferrina e a lactoperoxidase que apresentam propriedades bacteriostáticas, isso torna o soro de leite um ingrediente de alto valor tecnológico nas indústrias alimentícias (SINHA et al., 2007).

O soro de leite pode ser ácido ou doce, dependendo da sua forma de obtenção. De acordo com Sgarbieri (2004), quando ocorre precipitação das proteínas do soro em pH em torno de 4,6, isto é, no pH isoeletrico (pI), resulta-se a caseína isoeletrica, que é transformada em caseinato, resultando no soro ácido que é obtido na produção dos queijos tipo cottage, “quark” e requeijão cremoso. Este tipo de soro menos utilizado quando comparado com o soro doce, devido ao seu alto grau de cinzas, elevadas concentrações de sais e baixo conteúdo protéico, o que lhe confere *flavour* ácido, que prejudica a sua aceitação nas indústrias alimentícias (SGARBIERI, 1996).

Já o soro doce é aquele que é separado da massa de queijo logo após o corte do coágulo e processado antes que a cultura láctea o acidifique em pH em torno de 5,9 a 6,3 como é o caso dos queijos minas frescal, mussarela, prato e outros (MOCKAITIS, 2003). A tabela 1 apresenta a diferença na composição de nutrientes dos soros de leite doce e ácido.

**Tabela 1.** Composição média do soro de leite doce e ácido

<b>Componentes</b>	<b>Soro Doce (%)</b>	<b>Soro Ácido (%)</b>
<b>Água</b>	93-94	94-95
<b>Sólidos Totais</b>	6-7	5-6
<b>Lactose</b>	4,5-5	3,8-4,2
<b>Proteína</b>	0,6-0,8	0,6-1
<b>Lipídeos</b>	0,3-0,5	0,3-0,6
<b>Nitrogênio Não-Protéico</b>	22	27
<b>Ácido Láctico</b>	0,1-0,2	0,7-0,8
<b>Cinzas</b>	0,5-0,7	0,7-0,8

Fonte: Costa (2008)

A indústria de derivados lácteos vem crescendo no cenário mundial, sendo que, dentre os produtos lácteos, o aumento na produção de queijo se destaca consideravelmente. A produção mundial de queijo nos últimos anos foi de aproximadamente 14.246 mil toneladas (ANUALPEC, 2007), o Brasil ocupa a terceira posição entre os maiores produtores de queijo do mundo. Tendo em vista que aproximadamente 90% do volume do leite destinado à fabricação de queijo se transforma em soro, a fabricação de 1 kg de queijo, que em média, necessita de 10L de leite, irá gerar cerca de 9L de soro (SOUZA et al., 2005). Considerando que a produção de queijos no Brasil está em torno de 450 mil toneladas por ano, tem-se equivalente a 4.050 mil toneladas de soro de queijo sendo produzidas no país (BARBOSA et al., 2010; GARCIA, 2009).

No Brasil as indústrias produtoras de queijo em sua maioria são de pequeno porte, não dispendo de meios econômicos e tecnológicos apropriados para o reaproveitamento do soro de leite, além da falta de recursos humanos qualificados nas unidades produtivas. Assim, o descarte deste subproduto no meio ambiente torna-se cada vez mais comum (MENDES et al., 2003).

Por muito tempo, o soro foi considerado um produto de baixo valor comercial residual, porém hoje em dia esta abordagem vem sendo abandonada, sobretudo pelo fato do mesmo apresentar excelentes propriedades biológicas, tecnológicas e funcionais, sendo tratado cada vez mais como um subproduto de alto valor agregado (TULLIO, 2007; MURARI et al., 2011). Para cada litro de soro são desperdiçados cerca de 50 g de lactose e 10 g de proteína que possuem elevado valor nutricional e funcional, criando condições para poder se pensar em um processo de valorização do soro com simultânea redução da carga poluente e melhor aproveitamento de seus nutrientes (DOMINGUES et al., 1999).

De acordo com os diversos processos tecnológicos empregados no soro de leite, este quando seco pode ser utilizado na alimentação animal, como aditivo alimentar ou até mesmo ser convertido em produtos químicos, além de combustíveis e outros produtos através da fermentação (CARMINATTI, 2001). Porém, o alto percentual de água presente na sua composição inviabiliza economicamente sua desidratação, e o fato de ser perecível agrava o

problema, impossibilitando seu armazenamento prolongado, direcionando as pesquisas para seu melhor aproveitamento em diversas áreas industriais (SERPA et al., 2009).

Os três principais destinos do soro de leite pelas indústrias podem ser: o primeiro é seu processamento em diversos produtos como soro em pó, bebida láctea, ricota, concentrado protéico, formulação de alimentos infantis, iogurtes, doces de leite, alimentos dietéticos, sopas, molhos, produtos de panificação, confeitarias, sorvetes e bebidas, entre outros (tabela 2). Já o segundo destino seria seu uso em alimentação animal podendo ser na forma líquida, condensada ou seca. O terceiro seria o seu tratamento adequado para posterior descarte no esgoto (MURARI et al.; 2011; CARMINATTI 2001).

**Tabela 2.** Algumas formas de aplicações para o uso de soro de leite

---

Bebidas carbonatadas e fermentadas
Bebidas energéticas
Precipitados de albuminas e globulinas como aditivos alimentares
Preparados cosméticos farmacêuticos
Produção de lactose
Produção de etanol
Produção de ácido láctico para indústrias farmacêuticas e alimentícias
Meio de fermentação para a produção de antibióticos, combustíveis (metano)
Biomassa para produção de alimentos
Concentrado protéico do soro (Whey protein concentrate – WPC)

---

Fonte: CARMINATTI (2001)

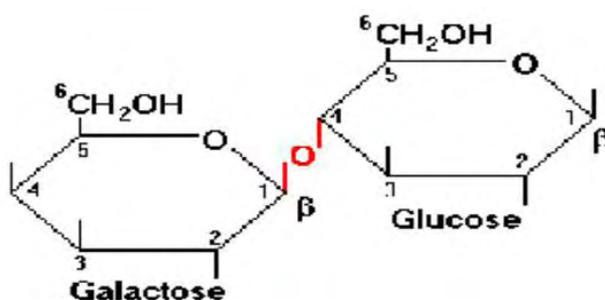
O soro de leite também pode ser aproveitado como fertilizante, pois contém elementos essenciais às culturas agrícolas como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, sódio e magnésio. Contudo, este uso somente pode ser realizado em locais com chuvas anuais adequadas e vegetação que absorva nitrogênio e fósforo. Se for aplicado de maneira correta pode enriquecer as pastagens e o solo, porém em excesso pode destruir a vegetação e atingir os lençóis freáticos (ABREU, 2005).

Mesmo com várias alternativas de uso estima-se que apenas 50% do total de soro produzido é aproveitado, retornando à alimentação humana e animal ou para produção de medicamentos e outros produtos (MIZUBUTI, 1994). Portanto cada vez mais vem se buscando soluções mais simples, com baixo custo e de melhor compatibilidade com a preservação do meio ambiente para o tratamento do soro descartado pelas indústrias (MURARI et al., 2011; COSTA, 2008).

### 3.4. Lactose

A lactose presente no soro de leite, chamada de “açúcar do leite”, é o carboidrato característico do leite de vaca, é responsável por 40% do total de sólidos. 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, 2011; CARMINATTI, 2001).

Quimicamente trata-se de um açúcar redutor constituído por um radical D-glicose e outro D-galactose, unidos por uma ligação  $\beta$ -1 $\rightarrow$ .4 glicosídica como mostra a figura 1 (SOUZA et al., 2005). Por possuir um grupo hidroxila livre, a lactose é um açúcar redutor e pode reagir com substâncias nitrogenadas, desencadeando a reação de Maillard.



**Figura 1.** Representação da molécula de lactose (SOUZA et al., 2004)

A lactose apresenta a mesma fórmula molecular da sacarose e difere-se desta pela configuração molecular, no poder edulcorante, na solubilidade e na reatividade química, além de não fermentar tão rapidamente.

Este açúcar é encontrado no leite de todos mamíferos, principalmente no soro, e em derivados como queijos, iogurtes, leite condensado, creme de leite, entre outros, em concentrações diferentes, sendo responsável por seu sabor levemente adocicado. Outras fontes de origem são raras, este é o único dos açúcares comuns não encontrado em plantas (CARMINATTI, 2001).

O teor de lactose no leite e no soro apresenta uma variação de acordo com a espécie e alimentação dos animais. O teor de lactose do leite bovino vai depender da raça, fator de individualidade e, sobretudo, da fase de lactação do animal (BALDASSO, 2011).

No organismo humano, a lactose age como uma promotora na absorção e retenção de cálcio no intestino e absorção de magnésio e manganês (CARMINATTI, 2001).

A lactose apresenta uma baixa solubilidade, o que condiciona a sua aplicação em alimentos, pois em altas concentrações apresenta a tendência de se cristalizar, desenvolvendo textura arenosa e/ou formação de depósitos (CUNHA, 2010).

Este dissacarídeo é utilizado na indústria alimentícia em diversos produtos como, por exemplo: molhos para salada, condimentos, embutidos, formulações infantis, sobremesas, produtos de confeitaria, bebidas instantâneas, sopas e molhos e derivados lácteos entre outros. Além disso, ele é amplamente utilizada na indústria farmacêutica como veículo ou excipientes de medicamento (YANG; SILVA, 1995), sem contar que a transformação da lactose tem sido frequentemente considerada como uma maneira de superar os problemas ocorridos pelo descarte do soro das indústrias de laticínios (CARMINATTI, 2001).

### **3.5. Soro de leite como meio fermentativo**

O soro de leite apresenta em sua composição um elevado teor de lactose, aproximadamente 4,5%, o que representa cerca de 70% dos sólidos totais presente em tal subproduto. Por esta importância, o aproveitamento deste açúcar fermentescível por excelência vem sendo cada vez mais explorado no âmbito acadêmico.

A utilização do soro lácteo como meio de cultura, justamente pela sua rica composição, faz do soro líquido ou concentrado um substrato de fermentação bem atrativo e interessante, acrescentando a estes fatores o fato que o soro pode ser disponível em grande quantidade a custo relativamente baixo (MENDES et al., 2003).

O soro de queijo utilizado como substrato para o crescimento de diferentes micro-organismos capazes de assimilar a lactose como fonte básica de carbono e energia, além de reduzir a sua carga poluente, gera produtos de elevado interesse comercial como é o caso do etanol (produto secundário) que pode ser utilizado na fabricação de bebidas alcoólicas e como combustível, além da biomassa que é recuperada após centrifugação, sendo esta utilizada na alimentação humana e animal (SILVEIRA, 2006).

Com a crescente demanda pelo etanol combustível o processo de tratamento do soro de leite pode se tornar cada vez mais viável, pois os custos com o tratamento acabariam se reduzindo devido ao retorno financeiro obtido com o uso ou comercialização do etanol. A produção de etanol a partir de soro já ocorre na Irlanda, Alemanha, Estados Unidos e principalmente na Nova Zelândia, onde 50% do soro são utilizados para produzir etanol (DINIZ, 2009).

De acordo com a FAO (2008) a produção mundial de soro de leite está estimada em torno de 160 milhões de toneladas por ano. Alguns autores estimaram que, ao longo dos últimos 50 anos, metade de todo o soro produzido não foi transformado em seus sub-produtos secundários, mas sim foram eliminados como resíduos em efluentes. A quantidade de lactose disponível para a produção de etanol pode ser elevada ficando em torno de 4 milhões de toneladas por ano. Se for considerada uma eficiência de conversão de 85%, poderia produzir cerca de 2,3 bilhões de litros de etanol, isto é aproximadamente 3,5% do total da produção mundial de etanol em 2008, que foi cerca de 65 bilhões de litros (GUIMARÃES et al., 2010).

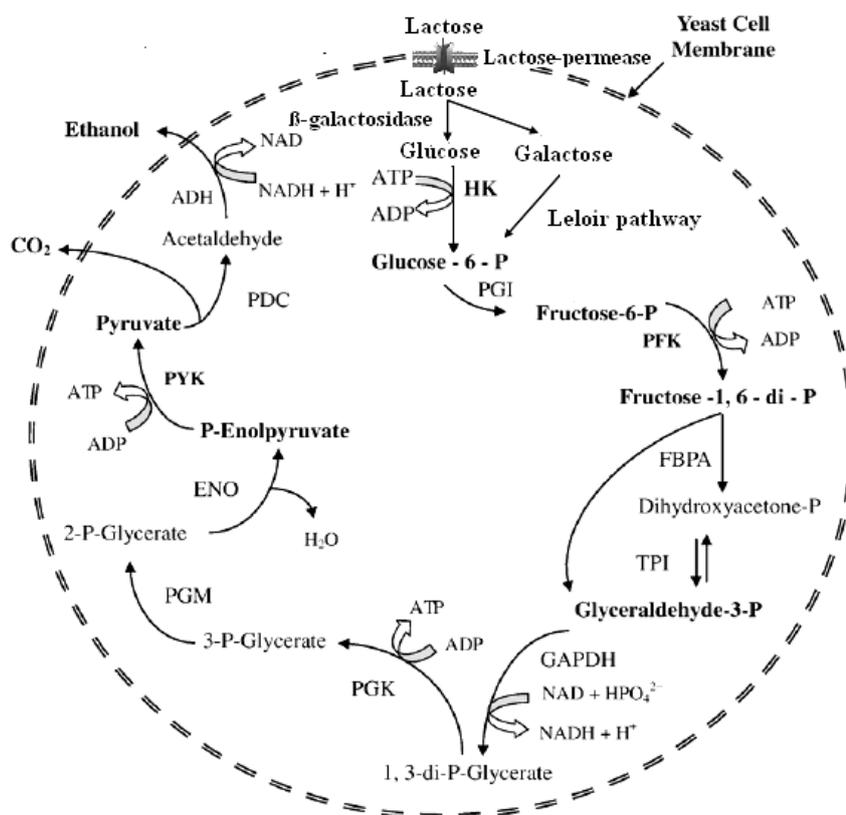
A concepção de um processo para a produção de etanol a partir de soro, além de ter o compromisso de maximizar a produtividade de etanol, tem o objetivo de minimizar a concentração de açúcar residual do efluente, uma vez

que a finalidade do processo também é o tratamento de resíduos (GUIMARÃES et al., 2010; BECERRA et al., 2001a).

A obtenção de etanol pela fermentação da lactose tem recebido bastante atenção nos últimos anos, e a procura de micro-organismos que tenham a capacidade de produzir álcool diretamente da lactose é bem ampla, sendo que a maioria das plantas comerciais tem como escolha a linhagem da levedura *Kluyveromyces* sp, uma vez que o número de micro-organismos produtores é limitado (GUIMARÃES, et al., 2010; SILVEIRA, 2006; SILVEIRA, 2004; RUSSEL, 1986).

Poucas linhagens de leveduras são capazes de metabolizar a lactose presente no soro de leite em etanol, dentre as que possuem tal capacidade pode-se citar a levedura *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Candida pseudotropicalis* (GABARDO, 2011; GUIMARÃES, et al, 2010; ZAFAR et al., 2005).

No metabolismo de dissacarídeos como a lactose, a hidrólise dos mesmos a monômeros é necessária. Dependendo da espécie de levedura e da natureza do açúcar esta hidrólise pode ocorrer extracelularmente, no espaço periplasmático ou no citoplasma após o transporte do dissacarídeo (DINIZ, 2009). A capacidade de fermentar a lactose presente no soro ocorre pela presença de 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 et al., 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 (galactoquinase, galactose-1-P uridiltransferase e UDP-galactose 4-epimerase) (GABARDO, 2011). A representação esquemática das rotas metabólicas envolvidas no processo da fermentação do soro de queijo em etanol encontra-se ilustrada na figura 2.



**Figura 2.** Rota metabólica da fermentação da lactose em etanol (GABARDO, 2011 *apud* RUBIO-TEIXEIRA, 2006).

Quando se fala em produção de etanol o micro-organismo mais comumente utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que é capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares. Porém, no caso do soro de leite, a mesma não é capaz de metabolizar a lactose, devido à ausência da enzima  $\beta$ -galactosidase e da lactose-permease. A partir disso, tem surgido, várias abordagens para a fermentação da lactose por outros micro-organismos. Uma delas é a técnica de DNA recombinante que, através da expressão de genes, codifica as enzimas de degradação da lactose ( $\beta$ -galactosidase e lactose permease) de *Kluyveromyces lactis* em outro micro-organismo como, por exemplo, a *S. cerevisiae* (DOMINGUES et al., 1999; RUSSEL, 1986).

Estudos realizados por Ponsano (1995), ao utilizar a levedura *Kluyveromyces fragilis* na fermentação alcoólica de soro de queijo para reduzir a demanda química de oxigênio e produção de etanol, obteve cerca de  $14 \text{ g.L}^{-1}$

do produto após sua separação por destilação e uma redução de 72% da DQO inicial. Já Silva e Castro-Gomez (1975) em um estudo sobre o processo fermentativo do soro de leite também utilizando a levedura *Kluyveromyces fragilis* obtiveram 25,46 g.L de etanol após 17 horas de fermentação sob agitação.

As atuais políticas governamentais de proteção do meio ambiente, juntamente com os órgãos que controlam e fiscalizam a poluição ambiental, e com o reconhecimento do valor nutricional e comercial do soro de queijo, tem feito com que cada vez mais aumentasse o interesse em pesquisas nesta área, a fim de introduzir novas metodologias de disposição e aproveitamento do soro. Assim o soro de queijo que sempre foi considerado um subproduto indesejável passou a ser reconhecido como uma fonte potencial de nutrientes e que tem estimulado o desenvolvimento de processos viáveis de conversão do soro em bioprodutos de alto valor agregado (SILVEIRA, 2006).

A produção de álcool através da fermentação do soro de leite tem sido estimulada pela crescente necessidade mundial de energia. Neste contexto, estudos da aplicação de processos biológicos e químicos para tratar o soro de queijo lançado de maneira incorreta no meio ambiente vão de encontro com a necessidade de propostas para solucionar o problema da disposição incorreta de soro pelas indústrias queijeiras (ALMEIDA, 2004; KOSIKOWSKI, 1979).

### **3.6. Levedura *Kluyveromyces marxianus* e metabolismo**

As leveduras constituem um dos grupos de micro-organismos com ampla utilização, sendo aplicadas em um grande número de processos fermentativos e de produtos resultantes do mesmo (BOURGEOIS; LARPENT 1995). São seres aeróbios, mas também podem ser anaeróbios facultativos, pelo fato de conseguirem crescer na presença ou ausência de oxigênio. Os açúcares normalmente utilizados pelas leveduras como fonte de carbono incluem a sacarose, glicose e frutose, há ainda a galactose e a maltose como carboidratos passíveis de serem metabolizados (OLIVEIRA, 2006). Algumas leveduras podem usar uma série de fontes não convencionais de carbono,

como os biopolímeros, as pentoses, os alcóois, os polióis, os hidrocarbonetos, os ácidos graxos e os ácidos orgânicos (ROEPCKE, 2007).

Do ponto de vista tecnológico, as leveduras possuem vantagens em relação a outros micro-organismos, sobretudo pela sua capacidade de assimilar grande variedade de substratos e sua alta velocidade de crescimento (ROEPCKE, 2007).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é um micro-organismo unicelular, não possui motilidade, pode se reproduzir sexualmente (conjugação) ou assexualmente (fissão), apresenta forma oval, morfologicamente semelhante à *Saccharomyces cerevisiae* (OGRODOWSKI, 2006; SILVEIRA, 2006). Sua classificação encontra-se na tabela 3. Apesar de possuírem o mesmo ancestral comum os gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* possuem requerimentos nutricionais e redes metabólicas diferentes, provavelmente em virtude da diferença de nicho ecológico destes micro-organismos (DINIZ, 2009).

**Tabela 3.** Classificação taxonômica da levedura *Kluyveromyces marxianus*

<b>Reino</b>	<b>Fungi</b>
<b>Filo</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Subfilo</b>	<i>Saccharomycotina</i>
<b>Classe</b>	<i>Saccharomycetes</i>
<b>Ordem</b>	<i>Saccharomycetales</i>
<b>Família</b>	<i>Saccharomycetaceae</i>
<b>Gênero</b>	<i>Kluyveromyces</i>
<b>Espécie</b>	<i>K. marxianus</i>

Fonte: Fonseca et al., 2007

Ao contrário do gênero *Saccharomyces*, que não pode metabolizar a lactose e assim transformá-la em etanol, a *Kluyveromyces* é capaz de assimilar a lactose por um mecanismo fermentativo que é limitado à capacidade de transporte do açúcar, onde o nível de oxigênio presente é um controle crítico no fluxo metabólico (efeito Crabtree). A capacidade de assimilação de lactose de algumas espécies do gênero difere da *Saccharomyces* pela regulação do metabolismo do açúcar, especialmente no que se refere à repressão causada

pelo excesso de glicose no meio, ou seja, altas concentrações de substrato favorecem o fluxo metabólico com baixos níveis de oxigênio, fato que aumenta a produtividade do etanol (SILVEIRA, 2006). Outro aspecto relevante da *Kluyveromyces marxianus* é sua capacidade de crescer em lactose mesmo na ausência de respiração (efeito Kluver negativo).

De acordo com Pinheiros (2004), a levedura *Kluyveromyces marxianus* é considerada Crabtree-negativa, isto é, quando exposta a condições aeróbias, não fermenta o açúcar quando este se encontra em excesso. No entanto, por vezes podem ocorrer desregulações no metabolismo e este efeito já não ocorre. Por exemplo, em culturas de *Kluyveromyces marxianus* de alta densidade celular ocorre fermentação alcoólica em condições aeróbias, quando o açúcar se encontra em excesso, fato que mostra que tudo irá depender da linhagem e do metabolismo do micro-organismo que está sendo testado.

Bellaver (2004), ao estudar a baixa tendência de formação de etanol por células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 e sua relação com o efeito Crabtree negativo inerente a espécie, mostrou que a baixa produtividade na produção de etanol é uma consequência na capacidade de tal levedura manter o fluxo glicolítico constante, pela dispersão de carbono para biossíntese de carboidratos ou para rota metabólica da pentose fosfato.

A fisiologia da *Kluyveromyces marxianus* é influenciada por características como a concentração inicial de substrato no meio fermentativo, além do acúmulo final de etanol durante o processo, uma vez que a taxa de fermentação da lactose é reduzida em concentrações de açúcares acima de 2% e pelo acúmulo de mais de 5% de etanol (SILVEIRA, 2006). Dentre suas características fisiológicas importantes pode-se citar, como o exemplo, seu rápido crescimento (taxa de crescimento aproximadamente  $\mu = 0,89 \text{ h}^{-1}$ ); temperatura ótima em torno de 40°C e afinidade para vários açúcares, sendo capaz de metabolizar lactose, xilose, rafinose e sacarose (ROUWENHORST, 1987).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* apresenta grande aplicação industrial, pela sua capacidade de utilizar lactose como fonte de carbono e energia, além da mesma crescer em uma faixa ampla de temperatura, entre

30° a 45°C (SILVEIRA, 2006). Apresenta um grande potencial para ser empregada tanto na indústria farmacêutica como alimentícia. A mesma tem sido utilizada na produção em larga escala de proteína unicelular (SCP) a partir de soro de leite, além de ser reconhecida como um micro-organismo seguro para o consumo humano (GRAS – Generally Recognized as Safe) pelo FDA (MURARI, et al., 2011; SILVEIRA, 2006).

O gênero *Kluyveromyces* tem sido amplamente utilizado em indústrias pelas suas características fisiológicas e a síntese de bioprodutos como a produção de enzimas hidrolíticas, biomassa para indústria alimentícia, ribonucleotídeos, oligossacarídeos, oligopeptídeos e sua eficiência na produção de proteínas heterológicas, componentes aromáticos e etanol (SILVEIRA, 2006), além de oferecer inúmeras vantagens quando se refere a processos industriais, onde se pode destacar: a) alta velocidade de crescimento que é um fator importante para indústria alimentícia; b) aceitabilidade como micro-organismo seguro; c) alta atividade da enzima  $\beta$ -galactosidade; d) faixa de temperatura ótima de crescimento em torno de 40°C o que diminui os custos com resfriamento e risco de contaminação (BELÉM; LEE 1998; FURLAN et al., 1995). Outra possível aplicação desta levedura é na produção de leite fermentado *Kefir* contendo bifidobactérias, uma vez que a levedura *Kluyveromyces marxianus* prolonga a sobrevivência destas bactérias, que são benéficas à saúde (PINHEIROS, 2004).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Meio de Cultura e Manutenção dos Micro-organismos**

#### **4.1.1. Micro-organismo**

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 adquirida junto ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro (SP).

#### **4.1.2. Soro de leite**

O soro de leite utilizado foi obtido do laboratório de Tecnologia de Leites e Derivados do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, IBILCE/UNESP, após o preparo do queijo tipo Minas Frescal, cujo pH antes do processo fermentativo em questão era de 6,20, tratando-se portanto de um soro de leite classificado como doce.

#### **4.1.3. Manutenção da Cultura Estoque**

A levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 foi propagada em tubo de ensaio com tampão com o meio Potato Dextrose Agar (PDA), onde o crescimento ocorreu em temperatura de 37°C por 24 horas em BOD, e posteriormente os tubos foram mantidos em refrigerador a 5°C.

### **4.2. Meio de Fermentação**

#### **4.2.1. Padronização do Inóculo**

O inóculo inicial foi realizado em frascos de erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo, conforme descrito na Tabela 4, sendo inoculados a partir da cultura estoque (8 mL) com uma densidade óptica (D.O.) aproximada de 0,8 a 0,9 com leitura em espectrofotômetro a 600<sub>nm</sub>. Em seguida estes frascos foram incubado a 35°C com agitação de 100 rpm por 24 horas.

Após o período de incubação o meio foi centrifugado a 2 g por 20 minutos. O sedimento de células foi lavado duas vezes em água destilada esterilizada, antes de ser adicionado no meio de cultivo.

**Tabela 4.** Composição do meio de cultivo para crescimento de *K. marxianus* 229.

<b>Composto</b>	<b>Concentração (% p/v)</b>
Glicose	2,0
Extrato de Levedura	0,6
(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

#### **4.2.2. Preparo do Soro de Leite Para Fermentação**

O soro de leite foi filtrado, utilizando bomba a vácuo, onde posteriormente realizou-se as diluições nas concentrações desejadas para fermentação, e em seguida foi esterilizado com um pH de 3,0 em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Antes de seguir para a etapa de esterilização, o soro de leite foi suplementado (tabela 5) e diluído em diferentes concentrações a fim de avaliar se em concentrações diferentes de nutrientes a levedura utilizada teria melhor assimilação dos mesmos. Sendo assim os meios foram diluídos em uma proporção que representava 80%, 50% e 25% de soro de leite em 200 mL de meios fermentativos utilizado, além de ser testado o meio fermentativo com 100% de soro de leite.

**Tabela 5.** Composição dos Meios Fermentativos

<b>Composto</b>	<b>Concentração (% p/v)</b>
<b>Soro de leite</b>	100%, 80%,50% e 25%
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,2
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,2
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0,2

A redução do pH para 3,0 antes da esterilização foi necessária, pois de acordo com o trabalho realizado por Ogradowski (2006) e constatado por Murari et al. (2011) nesta faixa de pH evita-se problemas com reação de maillard, caramelização e precipitação das proteínas, o que poderia causar interferência no processo fermentativo subsequente. O soro de leite teve seu pH reduzido para 3,0 com Ácido Clorídrico (HCl) concentrado e após a esterilização o pH foi ajustado assepticamente para 4,5 com Hidróxido de Sódio (NaOH) concentrado.

#### **4.2.3. Fermentação do Soro de Leite**

Após a etapa de preparo e esterilização dos meios, a fermentação em si consistiu em testar 5%, 10%, 15% e 20% de inóculo (v/v), padronizado (item 4.2.1) nos meios fermentativos em 600 nm. Tais concentrações de inoculos foram testadas em todos os meios estudados, onde os mesmos foram designados conforme descrito na tabela 6.

**Tabela 6.** Designação dos meios fermentativos de soro de leite, de acordo com suas concentrações.

<b>Concentração Soro de Leite</b>	<b>Designação dos Meios</b>
100 % soro de leite	<b>MSL1</b>
80 % soro de leite	<b>MSL2</b>
50 % soro de leite	<b>MSL3</b>
25 % soro de leite	<b>MSL4</b>

Os meios foram incubados a 37°C por 48 horas sem agitação (cultivo anaeróbio) ou a 100 rpm (fermentação aeróbia). Em um intervalo de 6 horas eram retiradas alíquotas dos meios para realização das análises de carboidrato, proteínas, DQO, etanol, além do crescimento do micro-organismo.

### **4.3. Curva de Crescimento**

Foi realizada a curva de crescimento da levedura *Kluyvermyces marxianus* 229 nos diferentes meios fermentativos, para se obter o perfil fermentativo da mesma em condições aeróbias e anaeróbias e em distintas concentrações de nutrientes, onde uma curva com os valores da densidade óptica do meio medidos a 600<sub>nm</sub> e o tempo de fermentação foi realizado.

#### **4.3.1. Quantificação do crescimento por densidade óptica**

A curva do crescimento celular foi determinada pela medida da absorbância a 600 nm. A medida foi realizada em 10 pontos dentro das 48 horas de fermentação. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **4.3.2. Crescimento em Aerobiose**

Para realização da curva de crescimento aeróbia, os meios foram submetidos às mesmas condições de cultivo citadas no item 4.2.3 em erlenmeyers de 250 mL tampados com tampão, após a adição de das diferentes concentrações de inóculo padrão (v/v) testados nos meios, estes foram incubados em “shaker” (Tecnal - 420) a 37°C por 48 horas em uma agitação de 100 rpm, onde em um intervalo de 3 e de 6 horas foram retiradas alíquotas dos meios fermentativos para realizar a medida da densidade óptica a 600<sub>nm</sub> e em seguida estas alíquotas foram centrifugadas, onde o sobrenadante foi armazenado para realização dos métodos analíticos (item 4.4.) e a biomassa para a análise de massa seca (item 4.4.5).

### 4.3.3. Crescimento em Anaerobiose

Para a curva de crescimento em anaerobiose, os meios foram submetidos às mesmas condições de cultivo citadas no item 4.2.3 em erlenmeyers de 250 mL vedados com tampão e seguiram-se os mesmos procedimentos da curva de crescimento em aerobiose (item 4.3.1). A diferença foi que, neste caso, os meios foram incubados em BOD também a 37°C por 48 horas, porém, sem agitação.

### 4.3.4. Cálculos relacionados ao crescimento celular

#### 4.3.4.1. Produtividade em Biomassa

$$P_x = \frac{X_f - X_0}{t_f}$$

Onde:

$X_f$  = concentração biomassa final (g/L)

$X_0$  = concentração biomassa inicial (g/L)

$t_f$  = tempo total de fermentação (horas)

$P_x$  = produtividade em biomassa (g/L.h)

#### 4.3.4.2. Conversão substrato a Massa Celular

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_t - S_f}$$

Onde:

$X_f$  = concentração biomassa final (g/L)

$X_0$  = concentração biomassa inicial (g/L)

$S_f$  = concentração substrato final (g/L)

$S_t$  = concentração substrato total (g/L)

$Y_{x/s}$  = produtividade em biomassa (g/L.h)

## 4.4. Métodos Analíticos

### 4.4.1. Determinação de Carboidratos

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 esfriada e em seguida foram adicionados 4 mL de água destilada. Simultaneamente, foi feita uma curva de calibração com diferentes concentrações de lactose. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540<sub>nm</sub> (Apêndice A).

#### 4.4.1.1. Cálculo do consumo de lactose (%)

Para calcular a porcentagem no consumo da lactose pela levedura, foi utilizada a seguinte equação:

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

Onde:

S<sub>f</sub>= concentração substrato final (g/L)

S<sub>t</sub>= concentração substrato total (g/L)

#### 4.4.1.2. Cálculo da velocidade de consumo do substrato (g/L.h)

Para calcular a velocidade média do consumo de substrato (lactose) foi utilizada a seguinte equação:

$$P_s = \frac{S_t - S_f}{t_f}$$

Onde:

S<sub>f</sub>= concentração substrato final (g/L)

$S_t$ = concentração substrato total (g/L)

$t_f$ = total de fermentação (horas)

$P_s$ = velocidade média consumo de substrato (g/L.h)

#### 4.4.2. Determinação de Proteínas

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 diluída 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 (constituído 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 650nm, onde simultaneamente foi feita uma curva de calibração com diferentes concentrações de albumina bovina (Apêndice A).

##### 4.4.2.1. Cálculo do consumo de proteínas (%)

Para calcular a porcentagem no consumo de proteínas totais pela levedura a seguir:

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

Onde:

$P_f$ = concentração proteína final (g/L)

$P_t$ = concentração proteína total (g/L)

### 4.4.3. Determinação de Etanol

A determinação do etanol foi realizada através de cromatografia gasosa (cromatógrafo Hewlett Packard series II modelo 5890 equipado com coluna SPB-35 e detector de ionização de chama).

As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 230°C, a temperatura do forno foi programada inicialmente para 40°C, sendo aumentada em uma velocidade de 20°C/min até a temperatura final de 100°C. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio e uma taxa de split de 1:5. A amostra do “headspace” foi retirada por meio de uma seringa própria para gases. Simultaneamente, foi feita uma curva de calibração com diferentes concentrações de etanol (Apêndice A).

#### 4.4.3.1. Cálculos relacionados à produção etanólica

##### 4.4.3.1.1. Fator de conversão substrato a etanol (g/g)

Para calcular o fator de conversão do substrato a etanol foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Y_{E/S} = \frac{E_f - E_0}{S_t - S_f}$$

Onde:

$E_f$  = concentração produto final (g/L)

$E_0$  = concentração produto inicial (g/L)

$S_t$  = concentração substrato total (g/L)

$S_f$  = concentração substrato final (g/L)

$Y_{e/s}$  = fator de conversão substrato a produto (g/g)

##### 4.4.3.1.2. Produtividade em etanol (g/L.h)

$$Y_{P/E} = \frac{E_f - E_0}{t_f}$$

Onde:

$E_f$  = concentração produto final (g/L)

$E_0$  = concentração produto inicial (g/L)

$t_f$  = tempo total de fermentação (horas)

$Y_{P/E}$  = produtividade em etanol (g/L.h)

#### 4.4.3.1.3. *Rendimento (%)*

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

Onde:

$E_f$  = concentração produto final (g/L)

$E_0$  = concentração produto inicial (g/L)

$S_t$  = concentração substrato total (g/L)

$S_f$  = concentração substrato final (g/L)

0,5368 = estequiometria para conversão da lactose em etanol

#### 4.4.4. **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 nm, aparelho da Hach Co., segundo metodologia da APHA (1995).

##### 4.4.4.1. *Cálculo de eficiência na redução de DQO*

$$\% \text{ de redução} = \frac{(\text{DQO entrada} - \text{DQO ponto de coleta}) * 100}{\text{DQO entrada}}$$

#### 4.4.5. Determinação de Massa Celular Seca (MSC)

A metodologia empregada foi a descrita pela AOAC (*Association of Analytical Chemistry, Official methods of Analysis*), que consistiu em centrifugar alíquotas de 10 mL do meio fermentativo a 2 g por 30 minutos, sendo o sobrenadante descartado e a biomassa lavada com água destilada, seguida de secagem em estufa a 105°C até peso constante.

##### 4.4.5.1. Cálculo para Determinação da Massa Seca

$$\frac{X_e = M_e - M_s}{M_s}$$

Onde:

X<sub>e</sub> = Conteúdo de umidade, expresso na base seca, g/L

M<sub>e</sub> = Massa da amostra no equilíbrio, g

M<sub>s</sub> = Massa seca da amostra, g

#### 4.5. Análise dos Resultados

Os experimentos foram 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

### Soro de Leite

#### 5.1. Parâmetros Físico-Químicos dos Meios de Cultivo antes da Fermentação

Os meios de cultivos MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, cuja designação encontra-se explicada na Tabela 6, apresentaram a composição conforme descrita na Tabela 7, quanto ao pH, carboidrato, proteínas e DQO antes da fermentação pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229.

A importância de saber qual a composição média dos meios de cultivo antes da fermentação é para verificar a assimilação destes nutrientes pela levedura após o período fermentativo estudado, podendo então calcular seu rendimento e produtividade quanto aos metabólitos gerados e também avaliar se houve uma redução expressiva quanto a carga orgânica do soro de leite.

**Tabela 7.** Caracterização da composição média dos meios fermentativos à base de soro de leite em diferentes concentrações antes da fermentação.

Meios de Cultivo	pH	Carboidratos g/L	Proteínas g/L	DQO mg/L
<b>MSL1</b>	4,5 ± 0,10	57,60 ± 1,52	7,50 ± 0,20	66.200 ± 0,03
<b>MSL2</b>	4,5 ± 0,10	45,60 ± 1,52	6,20 ± 0,20	56.500 ± 0,05
<b>MSL3</b>	4,5 ± 0,10	32,50 ± 1,52	3,80 ± 0,30	38.880 ± 0,05
<b>MSL4</b>	4,5 ± 0,10	18,80 ± 1,52	2,70 ± 0,15	22.680 ± 0,06

\* MSL1 (100% soro de leite), MSL2 (80% soro de leite), MSL3 (50% soro de leite), MSL4 (25% soro de leite).

Os resultados obtidos no meio de cultivo MSL1 representam a composição original do soro de leite, uma vez que tal meio não foi diluído,

mostrando que os mesmos condizem com os valores teóricos expressos pela literatura de acordo com Révillon et al. (2000).

Os resultados dos meios de cultivo testados (MSL2, MSL3 e MSL4) foram obtidos com as diluições realizadas a partir do MSL1, utilizando as análises descritas no item 4.4.

## 5.2. Padronização do Inóculo Inicial

A tabela 8 mostra as concentrações de inóculos padronizados no início das fermentações aeróbias e anaeróbias. A padronização do inóculo é uma das etapas mais importantes em um processo fermentativo, uma vez que tanto a quantidade de células, bem como o estágio fisiológico das mesmas podem influenciar grandemente o desempenho do bioprocessamento (BARROSO, 2010), além da qual garante que em todos os meios esta sendo inoculada a mesma quantidade de células da levedura.

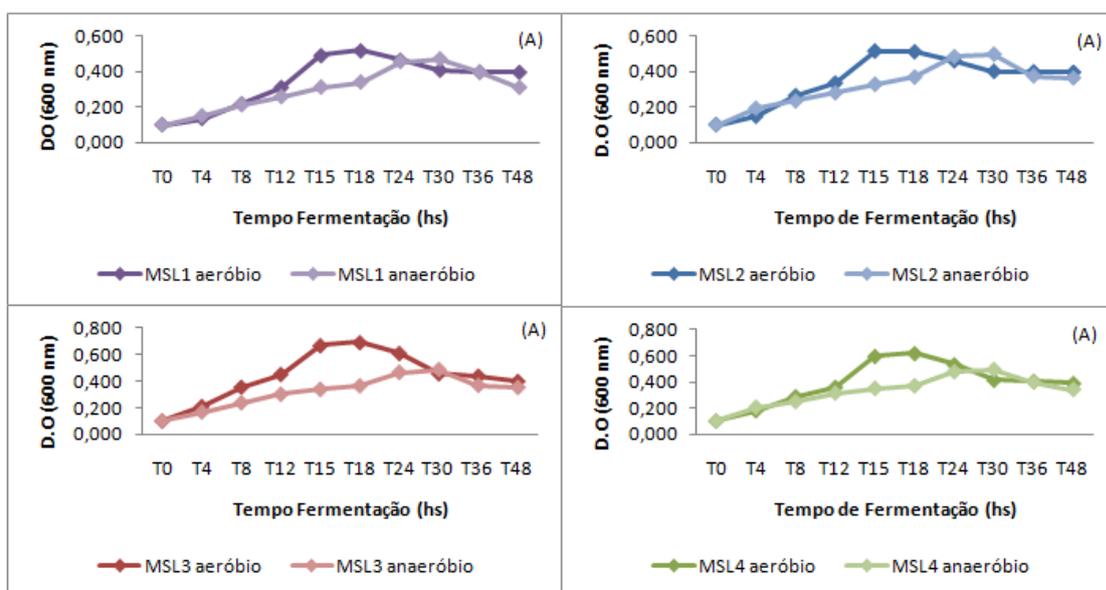
**Tabela 8.** Densidade óptica dos inóculos iniciais testados na fermentação do soro de leite.

Inóculo	DO. a 600 nm	Células Iniciais (g/L)
5%	0,100	0,15
10%	0,150	0,27
15%	0,230	0,40
20%	0,270	0,53

## 5.3. Processo Fermentativo Aeróbio e Anaeróbio

### 5.3.1. Curva de Crescimento Microbiano

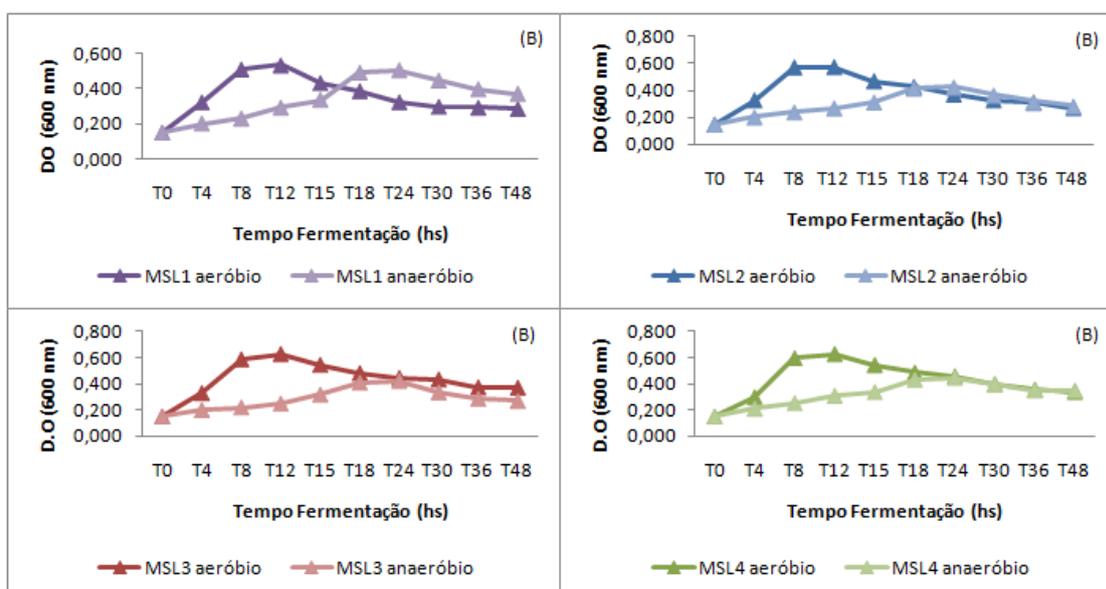
As figuras 3, 4, 5 e 6, mostram as curvas de crescimento aeróbio e anaeróbica da levedura *K. marxianus* 229, quando esta se encontra a 5%, 10%, 15% e 20% respectivamente de inóculo inicial nos meios MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4.



**Figura 3.** Curva de crescimento médio da levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.

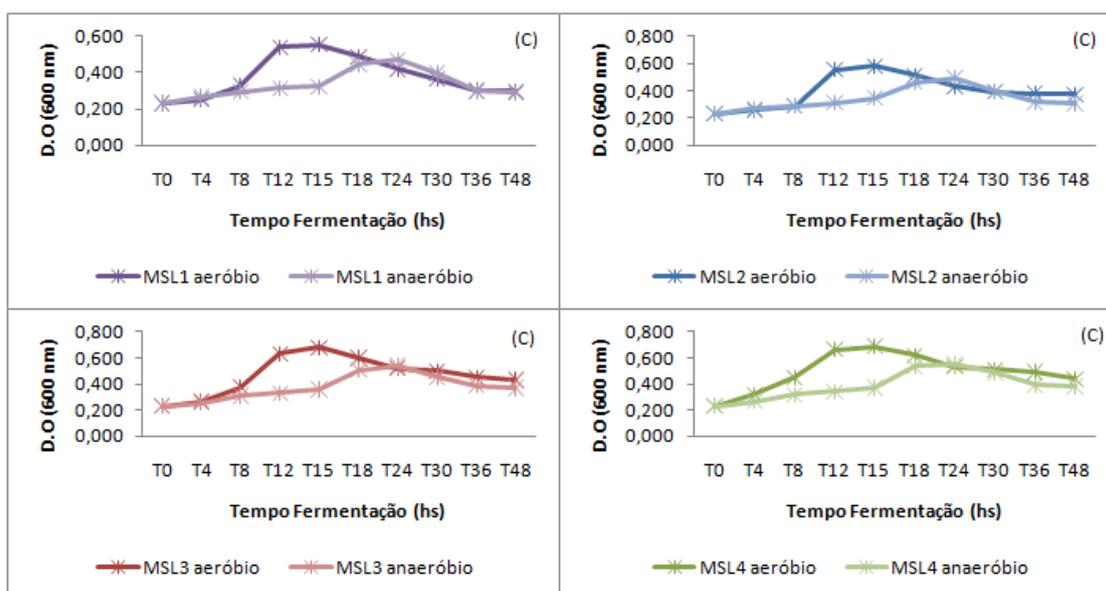
Ao analisar a figura 3, observa-se que todos os meios fermentativos (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4), com inóculo inicial de 5% submetidos a fermentação aeróbia, apresentaram um pico máximo de crescimento, com 18 horas de fermentação, havendo posterior estabilidade e declínio.

Já em condições anaeróbias, os meios fermentativos apresentaram seu pico máximo de crescimento com 30 horas de fermentação. Esse resultado mostra que o crescimento da levedura a 5% em aerobiose, foi maior e mais rápida, mostrando uma economia de tempo de 12 horas (figura 3 e tabela 9).



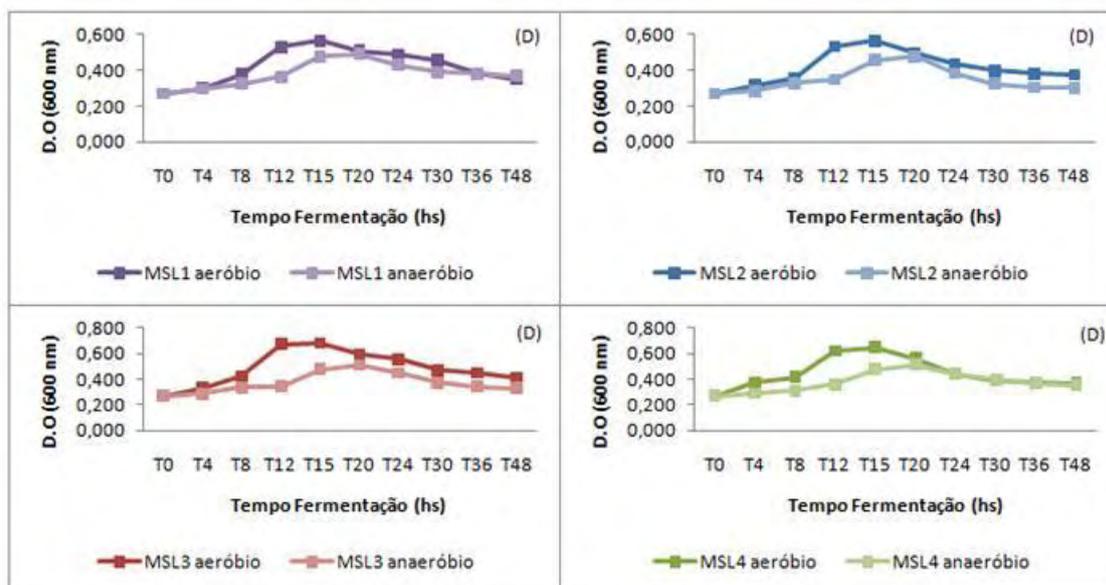
**Figura 4.** Curva de crescimento médio da levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inóculo inicial, sob condições anaeróbias e anaeróbias.

Os meios fermentativos (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4), contendo uma concentração de inóculo inicial de 10%, quando em condições aeróbias, apresentaram um pico máximo de crescimento, conforme a figura 4, com 12 horas de fermentação. Já em anaerobiose a levedura *Kluyveromyces marxianus* 229, com os mesmos meios, levou exatamente o dobro de tempo para atingir seu pico máximo de crescimento, isto é, com 24 horas de fermentação.



**Figura 5.** Curva de crescimento médio da levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 15% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.

Em condições aeróbias, os meios fermentativos (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4), que inicialmente tiveram uma adição de 15% de inoculo, levaram 15 horas para atingir seu pico máximo de crescimento (figura 5). Quando em anaerobiose, tal pico ocorreu com 24 horas de fermentação, igual ao ocorrido com os meios anaeróbios com 10% de inóculo inicial.



**Figura 6.** Curva de crescimento médio da levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.

Ao testar a concentração de 20% de inóculo inicial nos meios fermentativos (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4), observa-se que, em aerobiose, os mesmos levaram 15 horas para atingir seu pico máximo de crescimento, assim como também ocorreu com os meios com 15% de inóculo inicial. Em condições anaeróbias, o pico máximo de crescimento ocorreu com 20 horas de fermentação (figura 6), sendo estes os meios que menos se distinguiram dos meios aeróbios nas mesmas condições, ou seja, o pico máximo de crescimento pela levedura em anaerobiose ficou bem próximo do obtido em aerobiose.

O que se observa em relação à confecção da curva de crescimento pela *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de inóculo inicial, é que a mesma apresentou resultado mais satisfatório, quando em aerobiose, nos meios de cultivos testados com 10% de inóculo inicial (figura 4), pois neste, a levedura levou menos tempo para atingir seu pico máximo de crescimento, levando apenas 12 horas de fermentação. Já em condições anaeróbias os meios de cultivos com 20% de inóculo, foram os que apresentaram um pico máximo de crescimento em menor tempo, ou seja, estes levaram 20 horas de fermentação, ao contrário dos demais inoculos testados, que em sua maioria

levaram 24 horas e até mesmo 30 horas, conforme ocorrido nos meios com 5% de inóculo inicial (figura 3).

Os meios MSL1 e MSL2 não apresentaram diferença significativa entre si, quanto ao valor médio da D.O. a 600 nm, obtido durante o pico máximo de crescimento aeróbio para as diferentes concentrações de inóculos (tabela 9) (Tukey,  $p > 0,05$ ). Os meios MSL3 e MSL4, estes também não apresentaram diferença significativa entre si quanto ao valor médio da DO (Tukey,  $p > 0,05$ ), entretanto, apresentaram um valor de D.O. maior que os meios MSL1 e MSL2 em aerobiose (tabela 9).

**Tabela 9.** Comparação do tempo levado pela levedura *K.marxianus* 229 para atingir seu pico máximo de crescimento e seus respectivos valores de D.O, nos meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais, em condições aeróbias e anaeróbias.

Meios	Pico máximo crescimento (horas)		Valor D.O. 600 nm	
	Aeróbio	Anaeróbio	Aeróbio	Anaeróbio
<b>5% Inóculo</b>				
<b>MSL1</b>	18	30	0,520	0,470
<b>MSL2</b>	18	30	0,510	0,498
<b>MSL3</b>	18	30	0,693	0,485
<b>MSL4</b>	18	30	0,620	0,490
<b>10% Inóculo</b>				
<b>MSL1</b>	12	24	0,533	0,503
<b>MSL2</b>	12	24	0,572	0,426
<b>MSL3</b>	12	24	0,625	0,424
<b>MSL4</b>	12	24	0,629	0,447
<b>15% Inóculo</b>				
<b>MSL1</b>	15	24	0,553	0,470
<b>MSL2</b>	15	24	0,580	0,497
<b>MSL3</b>	15	24	0,680	0,538
<b>MSL4</b>	15	24	0,687	0,552
<b>20% Inóculo</b>				
<b>MSL1</b>	15	20	0,566	0,492
<b>MSL2</b>	15	20	0,564	0,476
<b>MSL3</b>	15	20	0,682	0,509
<b>MSL4</b>	15	20	0,648	0,513

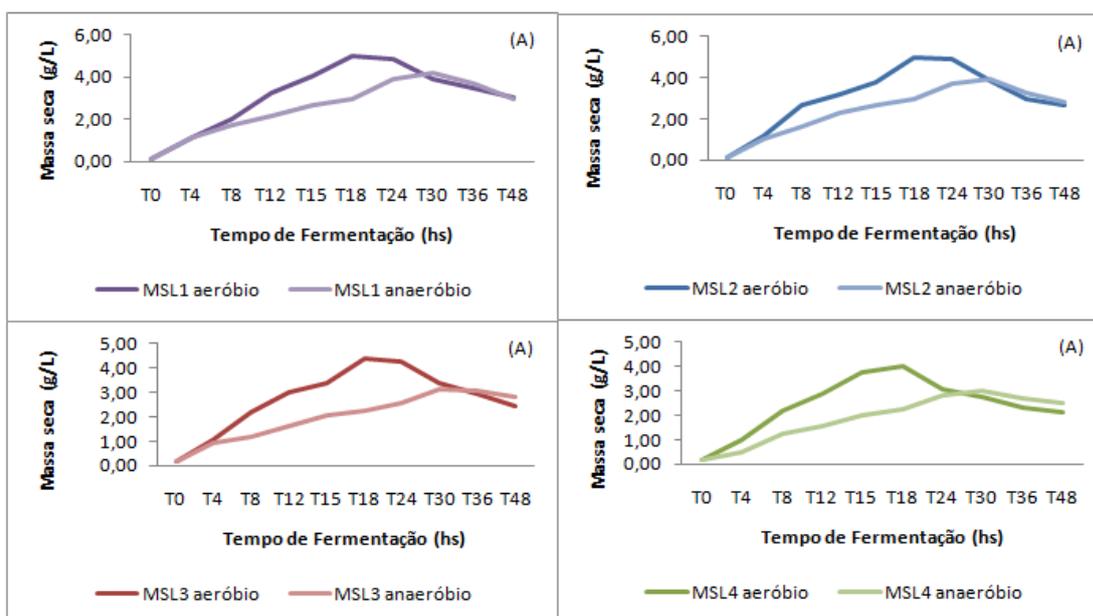
Tal diferença entre os resultados pode estar no fato de que os meios MSL3 e MSL4 foram os meios mais diluídos, ou seja, se encontravam com menor concentração de nutrientes, que poderiam estar causando inibição pelo substrato.

Independente da concentração de inóculo observa-se que os meios aeróbios são os que apresentaram um pico de crescimento celular maior e em menor tempo de fermentação (Tabela 9), quando comparados com os meios anaeróbios, o que é explicado devida a rápida oxidação do substrato pelo micro-organismo, para obter energia e levar a produção de massa celular.

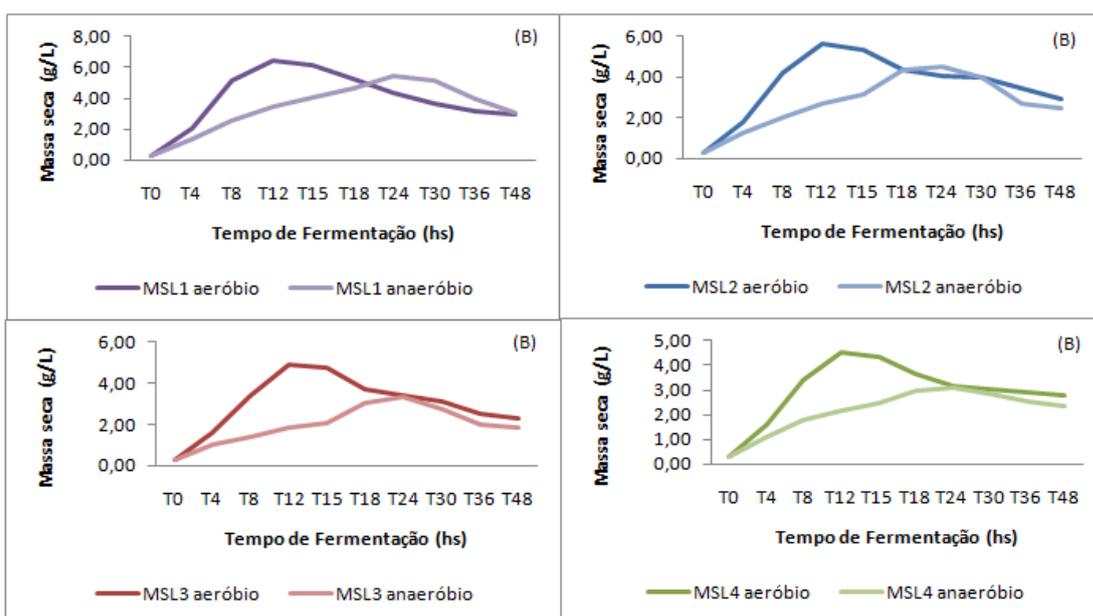
De acordo com Pelczar et al. (1980) no início da curva de crescimento dos micro-organismos ocorre a adaptação fisiológica das células ao meio de cultura no qual elas foram introduzidas. Nesta etapa, o metabolismo está ativo (sintetizando enzimas e coenzimas) de modo a criar as condições para que elas possam se dividir. Em seguida, o número de células aumenta exponencialmente com o tempo. Posteriormente o número de células viáveis se mantém constante, se tornando iguais ao número células que nascem e as que morrem. Por fim, ocorre o declínio, pois as condições do meio vão se tornando cada vez mais impróprias para as células sobreviverem; o que pode ser observados nas figuras 3, 4, 5 e 6.

### 5.3.2. Massa Celular

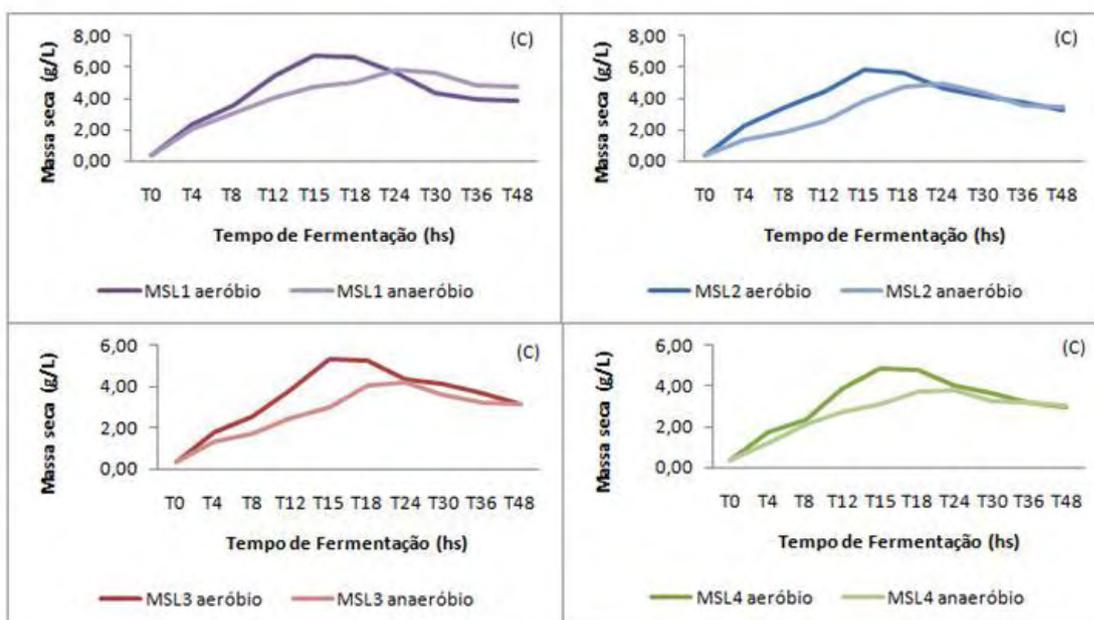
Para saber a quantidade de células que foram produzidas nas 48 horas de fermentação, e se a concentração inicial de inóculo nos meios fermentativos (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) acabariam influenciando na produção da mesma, foi feita análise da produção celular em g/L dos meios em condições aeróbias e anaeróbias, conforme resultados demonstrados nas figuras 7, 8, 9 e 10 e na Tabela 10.



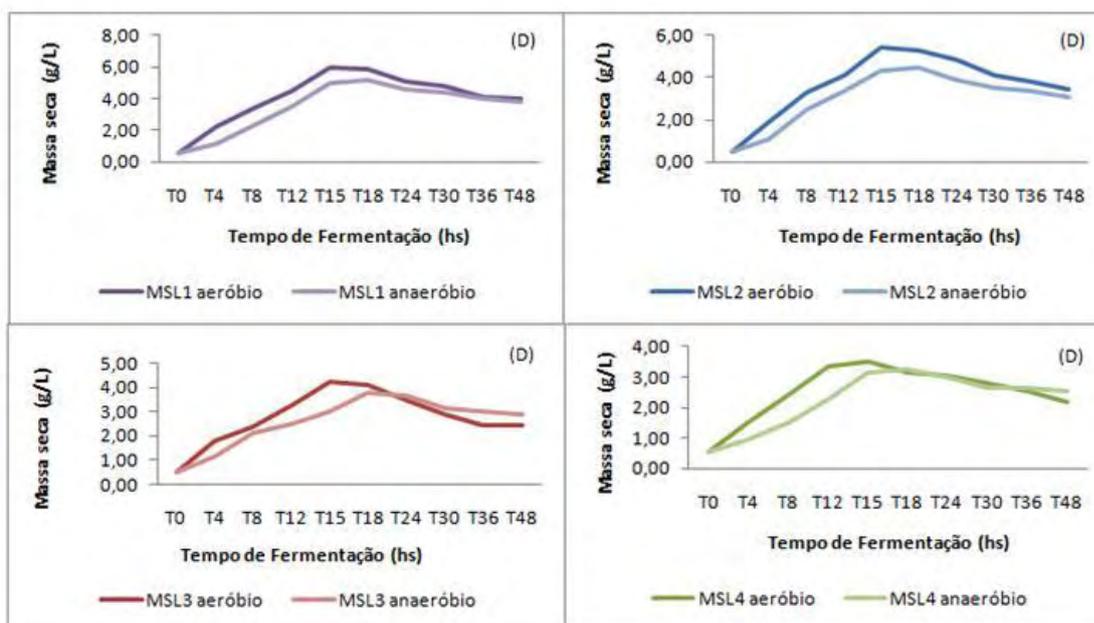
**Figura 7.** Produção média de massa celular pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 8.** Produção média de massa celular pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 9.** Produção média de massa celular pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 15% de inóculo inicial sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 10.** Produção média de massa celular pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 em diferentes concentrações de lactose MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.

As figuras 7, 8, 9 e 10 mostram resultados semelhantes aos apresentados pela DO. o que é esperado, já que são parâmetros relacionados.

O cultivo aeróbio favoreceu maior e mais rápida produção de biomassa pela *K. marxianus* 229. O emprego do inóculo inicial de 10% resultou no tempo

mais curto de obtenção de biomassa (12 horas) independente da concentração de substrato.

**Tabela 10.** Resultados obtidos quanto à produção celular, produtividade celular e conversão substrato a célula, pela levedura *K. marxianus* 229, em relação ao pico máximo de crescimento na fermentação dos meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais.

Meios	Massa Celular (g/L)		$P_x$ (g/L.h <sup>-1</sup> )		$Y_{x/s}$ (g/g <sup>-1</sup> )	
	<i>Aeróbio</i>	<i>Anaeróbio</i>	<i>Aeróbio</i>	<i>Anaeróbio</i>	<i>Aeróbio</i>	<i>Anaeróbio</i>
<b>5% Inóculo</b>						
<b>MSL1</b>	5,04	4,20	0,30	0,14	0,09	0,08
<b>MSL2</b>	5,00	3,90	0,27	0,13	0,12	0,10
<b>MSL3</b>	4,38	3,15	0,24	0,10	0,15	0,12
<b>MSL4</b>	3,15	2,98	0,22	0,09	0,18	0,17
<b>10% Inóculo</b>						
<b>MSL1</b>	6,45	5,44	0,53	0,22	0,12	0,11
<b>MSL2</b>	5,61	4,55	0,46	0,18	0,14	0,12
<b>MSL3</b>	4,94	3,34	0,41	0,14	0,20	0,14
<b>MSL4</b>	4,50	3,10	0,37	0,13	0,27	0,20
<b>15% Inóculo</b>						
<b>MSL1</b>	6,76	5,80	0,45	0,24	0,12	0,12
<b>MSL2</b>	5,85	4,90	0,39	0,20	0,13	0,13
<b>MSL3</b>	5,32	4,20	0,35	0,17	0,19	0,17
<b>MSL4</b>	4,87	3,80	0,32	0,15	0,29	0,25
<b>20% Inóculo</b>						
<b>MSL1</b>	6,00	5,20	0,40	0,28	0,11	0,12
<b>MSL2</b>	5,42	4,45	0,36	0,24	0,13	0,14
<b>MSL3</b>	4,23	3,75	0,28	0,20	0,14	0,16
<b>MSL4</b>	3,50	3,25	0,23	0,18	0,20	0,25

De acordo com a Tabela 10, é possível observar que em todas as diferentes concentrações de inóculo inicial (5%,10%,15% e 20%), os meios fermentativos que inicialmente tiveram uma concentração de substrato maior, isto é, MSL1 (57,6 g/L de lactose), seguido do MSL2 (45,65 g/L de lactose), foram os meios que apresentaram maior produção e produtividade ( $P_x$ ) em massa celular.

A produção celular nos meios MSL1 foi em média 35% maior do que nos meios MSL4 (Tukey,  $p < 0,05$ ), entretanto, tal diferença pode ser explicada pelas menores concentrações de substratos nos meios MSL4, portanto, menor fonte de carbono e nitrogênio para conversão de biomassa.

É importante observar que o rendimento de biomassa ( $Y_{X/S}$ ) para todos experimentos foi maior no MSL4, isso pode indicar que a menor concentração de substrato no meio exerceu menor pressão osmótica, e melhor eficiência de conversão do substrato em massa celular.

#### **5.3.2.1. Massa Celular 5% de Inóculo**

Ao comparar os meios aeróbios e anaeróbios, de maior produção celular entre si com 5% de inóculo, isto é, os MSL1, pode-se dizer de acordo com o teste de Tukey, não houve diferença significativa entre ambos (Tukey,  $p > 0,05$ ), havendo apenas uma diferença de 16,6% a mais de produção celular do aeróbio para o anaeróbio (5,04 g/L e 4,20 g/L e um consumo de lactose de 91,50% e 82,04% respectivamente). Já quanto à produtividade o aeróbio foi 53,3% maior que o anaeróbio (0,30 g/L.h<sup>-1</sup> e 0,14 g/L.h<sup>-1</sup> respectivamente), havendo uma diferença significativa entre os meios (Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### **5.3.2.2. Massa Celular 10% de Inóculo**

Neste caso, ao comparar os meios de maior produção celular (MSL1), observa-se que estes apresentaram uma diferença de 15,6% (Tukey,  $p > 0,05$ ) do aeróbio para o anaeróbio (6,45 g/L e 5,44 g/L respectivamente) com um consumo de lactose para produção celular de 90,60% e 87,70% respectivamente. Já em relação a ( $P_X$ ) esta diferença foi de 58,5% entre ambos, com 0,53 g/L.h<sup>-1</sup> e 0,22 g/L.h<sup>-1</sup> respectivamente (Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### **5.3.2.3. Massa Celular 15% de Inóculo**

O MSL1 aeróbio (meio de maior produção celular), teve uma produção de 14,20% a mais, quando comparado com o mesmo meio submetido em anaerobiose, representado uma produção e produtividade, respectiva de ambos de 6,76 g/L.h e ( $P_X$ ) 0,45 g/L.h<sup>-1</sup> para aeróbio e 5,80 g/L e 0,24 g/L.h<sup>-1</sup>

para anaeróbio, com um consumo de lactose respectivo de 93,15% e 89,45% . Quanto à produtividade, esta teve uma diferença de 46,6% a mais do aeróbio para o anaeróbio (Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### **5.3.2.4. Massa Celular 20% de Inóculo**

Com o inóculo de 20% o MSL1 aeróbio (também de maior produção celular), teve uma produção celular de apenas 13,3% a mais de que o MSL1 anaeróbio (6,00 g/L e 5,20 g/L respectivamente), não havendo uma diferença significativa entre ambos (Tukey,  $p > 0,05$ ), quanto ao consumo de lactose para tais finalidades, este foi de 89% e 83,30% para os meios aeróbios e anaeróbios respectivamente. Em relação à ( $P_x$ ), a diferença entre os meios foi de 30% a mais, do aeróbio para anaeróbio (0,40 g/L.h<sup>-1</sup> e 0,28 g/L.h<sup>-1</sup> respectivamente), com diferença significativa entre estes (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Outra característica observada na fermentação da *K. marxianus* 229 no soro de leite, em diferentes concentrações de substrato e de inóculo, esta no fato de que a maior produção celular nestes meios ocorreu na mesma hora (figuras 7, 8, 9 e 10), onde houve o pico máximo de crescimento pela levedura, conforme demonstrados nas figuras 3, 4, 5 e 6.

Também fica evidente, que os meios aeróbios foram os que tiveram resultados mais satisfatórios quando comparados com os meios anaeróbios. Isto é explicado por Pelczar et al. (1980), pois, nos processos aeróbios, os microrganismos são capazes de oxidar completamente alguns dos substratos a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, obtendo o máximo de energia para a conversão dos substratos remanescentes em nova massa celular. Já no metabolismo anaeróbio, as células são menos eficazes para converter os substratos orgânicos em material celular e usualmente excretam intermediários degradados parcialmente.

Estudo realizado por Silveira (2004) para produção de etanol a partir de permeado de soro pela levedura *Kluyvermyces marxianus* UFV 3 obteve após 96 horas de fermentação em condições aeróbias 5,16 g/L de massa celular. Já em anaerobiose este valor de massa celular foi de 2,27 g/L. Tais resultados comprovam também que em aerobiose a produção voltada para massa celular

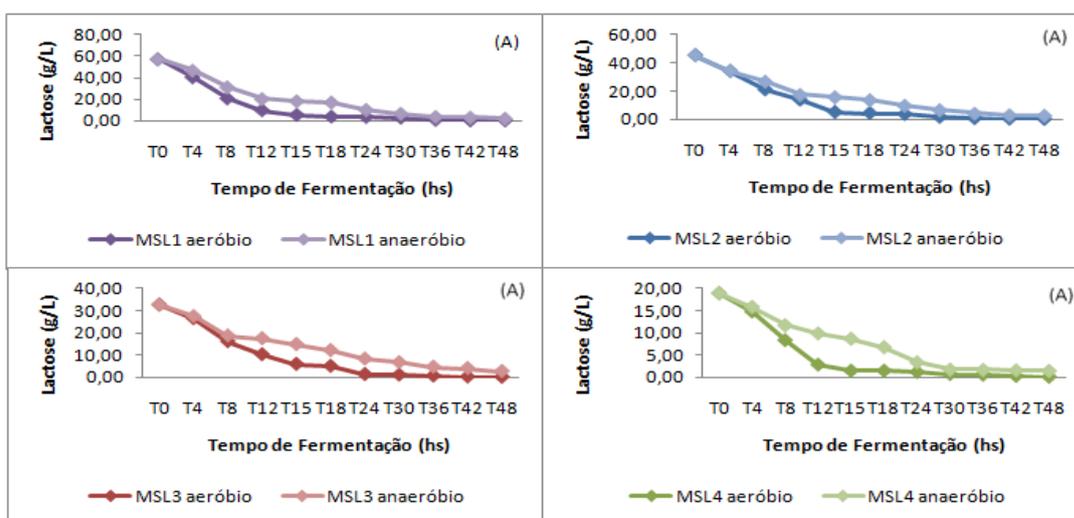
é maior quando comparado com anaerobiose, como os obtidos no presente trabalho.

De maneira geral, o que se observa é que dentre as diferentes concentrações de inóculo, os que apresentaram maior produção celular e rendimento, conseqüentemente maior consumo de lactose para tais finalidades foram os meios fermentados com 15% de inóculo inicial, tanto em condições aeróbias, quanto em anaeróbias, seguidos dos com 10%, 20% e 5% de inóculo. Já em relação à produtividade, os meios com 10% de inóculo foram os que apresentaram resultados mais satisfatórios, seguidos dos meios com 15%, 20% e 5% de inóculo. Esta diferença está, em relação ao tempo decorrido para a levedura atingir o ponto máximo de produção celular, onde em 10% de inóculo este tempo foi de 12 horas, enquanto que com 15% de inóculo este tempo foi com 15 horas de fermentação (figuras 4 e 5 e tabela 9).

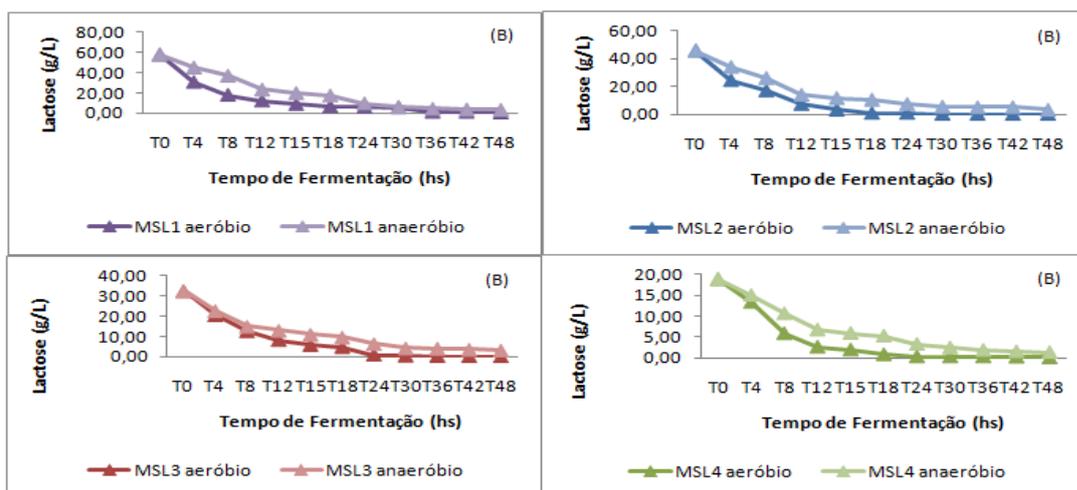
### 5.3.3. Avaliação do consumo de lactose e proteínas

#### 5.3.3.1. Consumo de Lactose

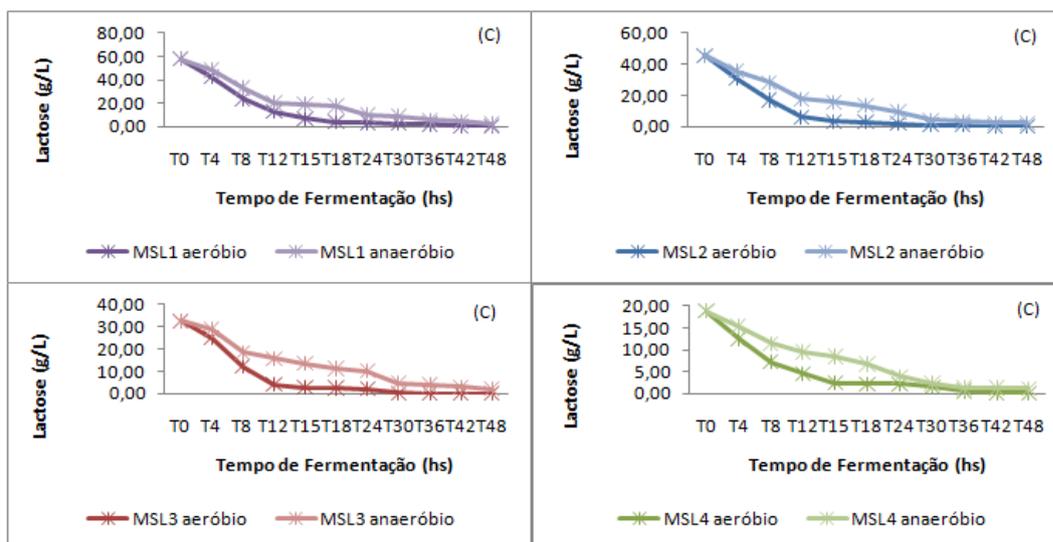
O consumo de lactose pela *Kluyveromyces marxianus* 229 pode ser observado nas figuras 11, 12, 13 e 14, após 48 horas de fermentação.



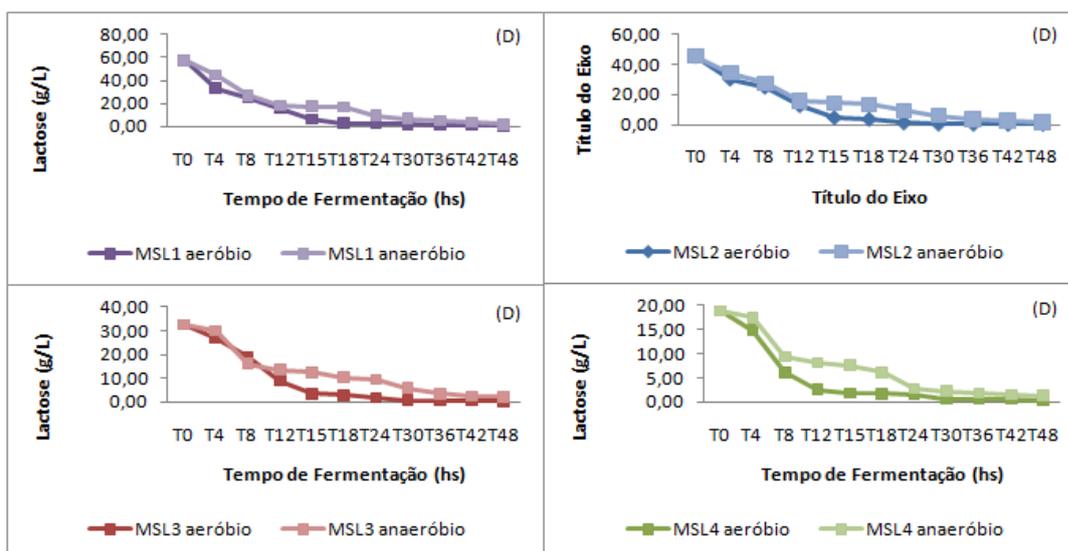
**Figura 11.** Consumo médio da lactose pela *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 12.** Consumo médio da lactose pela *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 13.** Consumo médio da lactose pela *Kluveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 15% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 14.** Consumo médio da lactose pela *Kluveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inóculo inicial, sob condições anaeróbias.

Ao observar as figuras 11, 12, 13 e 14, fica evidente que em aerobiose os quatro meios fermentativos (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4), nas diferentes concentrações de inóculo inicial (5%, 10%, 15% e 20%), foram os que tiveram maior e mais rápido consumo de lactose pela levedura *K. marxianus* 229, quando comparado com os mesmos meios fermentados em anaerobiose.

Na tabela 11, pode-se observar claramente a diferença no consumo de lactose pelos meios testados em suas respectivas condições de fermentação

aeróbias e anaeróbias e concentração de substrato inicial e inóculo, conforme explicado.

**Tabela 11.** Comparação do consumo de lactose pela levedura *K. marxianus* 229, após 48 horas de fermentação em meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais.

Meios	Carboidrato Inicial (g/L)	Carboidrato Final (g/L)		Consumo (%)	
		Aeróbio	Anaeróbio	Aeróbio*	Anaeróbio**
<b>5% Inóculo</b>					
MSL1	57,60	0,02	2,23	99,96	96,12
MSL2	45,65	0,01	2,90	99,97	93,64
MSL3	32,50	0,02	2,60	99,93	92,00
MSL4	18,80	0,07	1,50	99,62	92,02
<b>10% Inóculo</b>					
MSL1	57,60	0,02	2,04	99,96	96,45
MSL2	45,65	0,11	2,70	99,75	94,08
MSL3	32,50	0,07	2,20	99,78	93,23
MSL4	18,80	0,11	1,30	99,41	93,08
<b>15% Inóculo</b>					
MSL1	57,60	0,25	2,18	99,73	96,20
MSL2	45,65	0,11	2,24	99,75	95,10
MSL3	32,50	0,07	2,06	99,78	93,66
MSL4	18,80	0,16	1,20	99,14	93,60
<b>20% Inóculo</b>					
MSL1	57,60	0,30	2,46	99,48	95,72
MSL2	45,65	0,11	1,72	99,75	96,23
MSL3	32,50	0,30	2,20	99,07	93,23
MSL4	18,80	0,25	1,27	98,67	93,24

\* Média consumo substrato

5% = 99,87%  
 10% = 99,72%  
 15% = 99,60%  
 20% = 99,49%

\*\* Média consumo substrato

5% = 93,44%  
 10% = 94,21%  
 15% = 94,64%  
 20% = 94,60%

Ao comparar os meios fermentativos de cada concentração de inóculo testado (5%,10%,15% e 20%) entre si, ou seja, entre MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4 (figuras 11, 12, 13 e 14 e tabela 11), observa-se que dentre os mesmos,

quando em aerobiose, não apresentaram diferença significativa, em relação ao consumo de substrato (Tukey,  $p > 0,05$ ), ao final de 48 horas de fermentação.

Já entre os meios anaeróbios, os que apresentaram maior consumo de lactose foram os meios MSL1 em todos os inoculos testados (tabela 11), apresentando, portanto, uma diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ) entre os demais meios testados (MSL2, MSL3 e MSL4). Os meios anaeróbios apresentaram uma média de consumo de substrato de 93,44%, 94,21%, 94,64 e 94,60%, para os inóculos de 5%, 10%, 15% e 20% respectivamente.

O trabalho realizado por Silveira (2004) obteve um consumo de lactose de 98,48% após 48 horas de fermentação em condições aeróbias, e um consumo de 100% ao realizar a fermentação do permeado de soro em anaerobiose, ao contrário do ocorrido no presente trabalho que em aerobiose a levedura utilizada conseguiu assimilar mais a lactose presente do que em anaerobiose, produzindo maior massa celular. Já estudos realizados por Mendes et al. (2003) obtiveram um consumo de 96,3% de lactose após fermentação do soro de leite em diferentes concentrações de lactose para produção de etanol. Nos dois casos, as condições experimentais foram diferentes das do presente trabalho.

Os meios de cultivos fermentados em aerobiose também foram os que apresentaram maior velocidade específica de consumo do substrato quando comparados com os anaeróbios (Tukey,  $p < 0,05$ ), sendo que os com inóculo de 10% e 15% foram os que apresentaram maior velocidade específica de consumo (tabela 12), quando comparados com os demais meios aeróbios.

Observa-se que tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, conforme a redução da concentração de nutriente dos meios testados (MSL1, MSL2 MSL3 e MSL4), a velocidade específica de consumo do substrato ( $P_S$ ) também vai se reduzindo (tabela 12), podendo-se dizer que quanto mais concentrado se encontrava o meio de cultivo maior a velocidade de consumo pela levedura, pois apresentavam maior teor de nutriente para ser assimilado pelo micro-organismo, o que não inibiu significativamente o crescimento do mesmo (tabela 10).

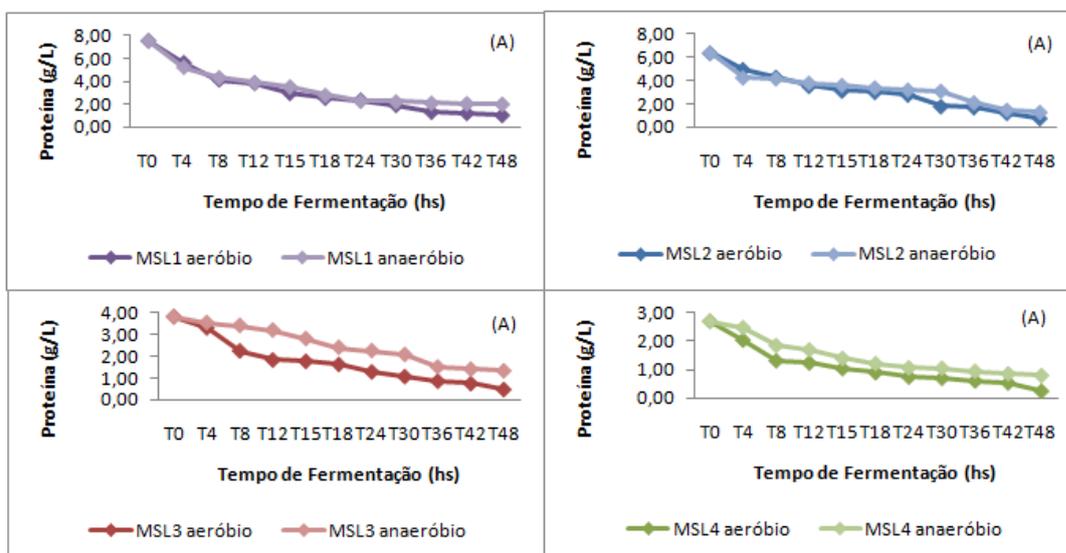
**Tabela 12.** Comparação da velocidade de consumo de substrato, pela levedura *K. marxianus* 229, em relação ao pico máximo de crescimento na fermentação dos meios com concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais.

Meios	$P_s$ (g/L.h <sup>-1</sup> )	
	Aeróbio	Anaeróbio
<b>5% Inóculo</b>		
<b>MSL1</b>	0,85	0,71
<b>MSL2</b>	0,75	0,58
<b>MSL3</b>	0,67	0,50
<b>MSL4</b>	0,40	0,28
<b>10% Inóculo</b>		
<b>MSL1</b>	0,94	0,75
<b>MSL2</b>	0,80	0,67
<b>MSL3</b>	0,67	0,61
<b>MSL4</b>	0,38	0,36
<b>15% Inóculo</b>		
<b>MSL1</b>	0,98	0,74
<b>MSL2</b>	0,81	0,65
<b>MSL3</b>	0,66	0,60
<b>MSL4</b>	0,37	0,30
<b>20% Inóculo</b>		
<b>MSL1</b>	0,86	0,69
<b>MSL2</b>	0,74	0,60
<b>MSL3</b>	0,65	0,53
<b>MSL4</b>	0,34	0,34

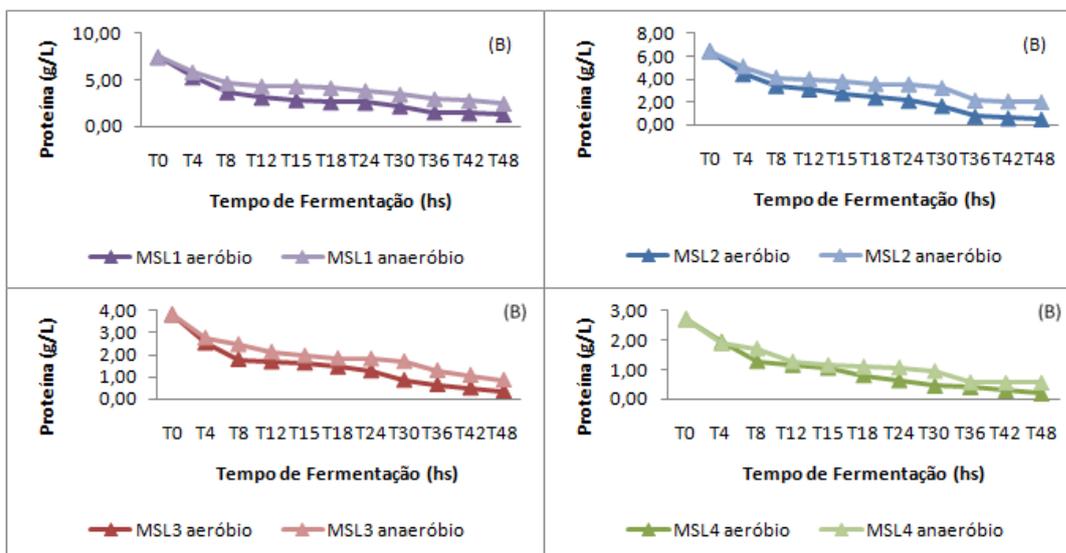
Vale ressaltar que dentre os meios aeróbios e anaeróbios, os que apresentaram maior consumo do substrato (mesmo sendo esta diferença baixa quando comparados com os demais meios testados) e maior velocidade de consumo do mesmo, foram os meios MSL1 com 10% e 15% de inóculo (tabela 10, 11 e 12), sendo que estes (MSL1), também foram os que obtiveram maior produção de massa celular, mostrando a relação do consumo de substrato e conversão celular.

### 5.3.3.2. Consumo de Proteína

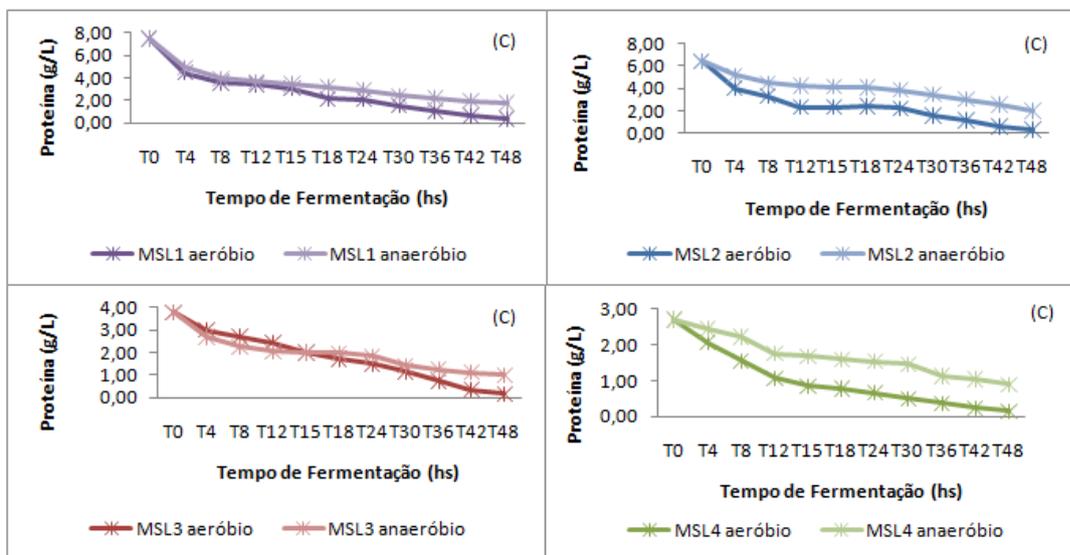
As figuras 15, 16, 17 e 18 mostram o perfil de consumo de proteína pela *K. marxianus* 229, nos diferentes meios fermentativos em aerobiose e anaerobiose.



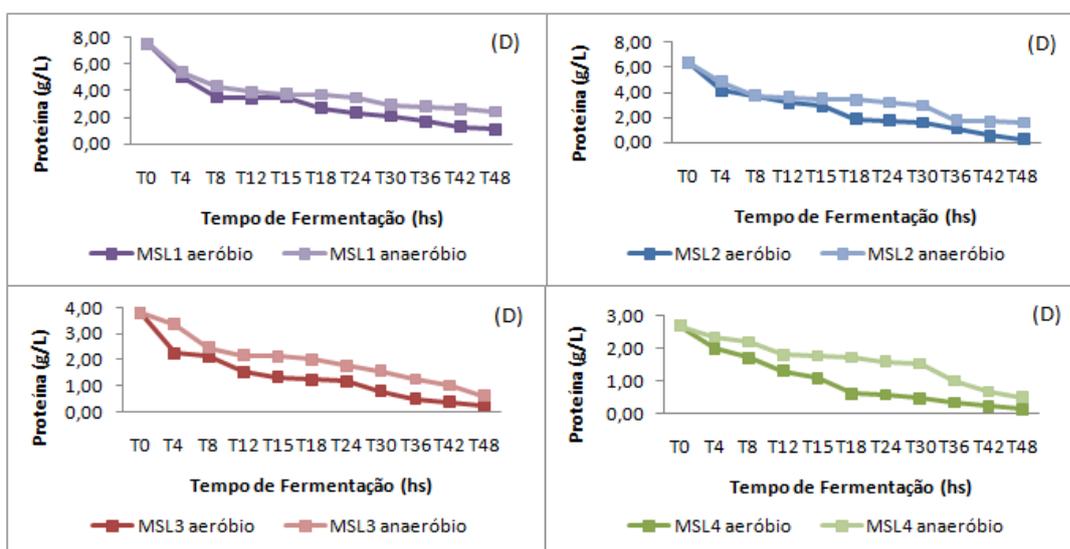
**Figura 15.** Consumo médio de proteína pela *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 16.** Consumo médio de proteína pela *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 17.** Consumo médio de proteína pela *Kluveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 15% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 18.** Consumo médio de proteína pela *Kluveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.

As figuras 15, 16, 17 e 18 mostram que assim como no consumo de carboidrato, todos os meios em condições aeróbias (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e em todos os inóculos testados nas mesmas condições (5%, 10%, 15% e 20%) tiveram um maior consumo significativo (Tukey,  $p < 0,05$ ) de proteínas, quando comparados com os meios anaeróbios. Tal fato, reforça a idéia de que o carboidrato e a proteína foram contidos em massa celular com mais eficiência (Tabelas 10, 11 e 13).

Na tabela 13, é possível observar a diferença no consumo de proteína pelos meios testados em suas respectivas condições de fermentação aeróbias e anaeróbias e concentração de substrato inicial e inoculo.

**Tabela 13.** Comparação do consumo de proteína pela levedura *K. marxianus* 229 , após 48 horas de fermentação em meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais.

Meios	Proteína Inicial (g/L)	Proteína Final (g/L)		Consumo (%)	
		Aeróbio	Anaeróbio	Aeróbio*	Anaeróbio**
<b>5% Inoculo</b>					
<b>MSL1</b>	7,50	0,65	1,03	91,33	86,26
<b>MSL2</b>	6,40	0,58	0,96	90,93	85,00
<b>MSL3</b>	3,80	0,35	0,60	90,78	84,20
<b>MSL4</b>	2,70	0,25	0,40	90,70	85,18
<b>10% Inoculo</b>					
<b>MSL1</b>	7,50	0,40	0,90	94,66	88,00
<b>MSL2</b>	6,40	0,38	0,84	94,06	86,90
<b>MSL3</b>	3,80	0,27	0,55	92,89	85,52
<b>MSL4</b>	2,70	0,18	0,38	92,60	85,92
<b>15% Inoculo</b>					
<b>MSL1</b>	7,50	0,37	0,80	95,06	89,33
<b>MSL2</b>	6,40	0,33	2,00	94,80	88,70
<b>MSL3</b>	3,80	0,22	1,00	94,42	83,60
<b>MSL4</b>	2,70	0,15	0,90	94,40	80,30
<b>20% Inoculo</b>					
<b>MSL1</b>	7,50	0,60	1,00	92,00	86,67
<b>MSL2</b>	6,40	0,52	1,60	91,18	85,00
<b>MSL3</b>	3,80	0,35	0,61	90,78	84,00
<b>MSL4</b>	2,70	0,23	0,50	91,48	82,00

\* Média consumo proteína

\*\* Média consumo proteína

5% = 90,93%  
10% = 93,55%  
15% = 94,67%  
20% = 91,36%

5% = 85,16%  
10% = 86,58%  
15% = 85,48%  
20% = 84,41%

Ao fazer a análise dos resultados de todos os meios aeróbios (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4), submetidos nas diferentes concentrações de inóculos testados (5%,10%,15% e 20%), observa-se que os meios aeróbios que tiveram

maior consumo de proteína foram os meios MSL1 (maior concentração de substrato, tabela 13), fermentados com 10% e 15% de inóculo inicial, com um consumo de 94,66% e 95,06% respectivamente, não havendo, neste caso, diferença significativa entre os mesmos (Tukey,  $p > 0,05$ ), ao final de 48 horas de fermentação. Sendo que estes foram os meios que também tiveram o maior consumo de carboidrato e produção celular. A média de consumo de proteína para os meios com 5% de inóculo foi de 90,93%; 10% de inóculo de 93,55%; 15% de inóculo de 94,67% e para 20% de inóculo foi de 91,36%, não havendo neste caso diferença significativa entre os mesmos (Tukey,  $p > 0,05$ ).

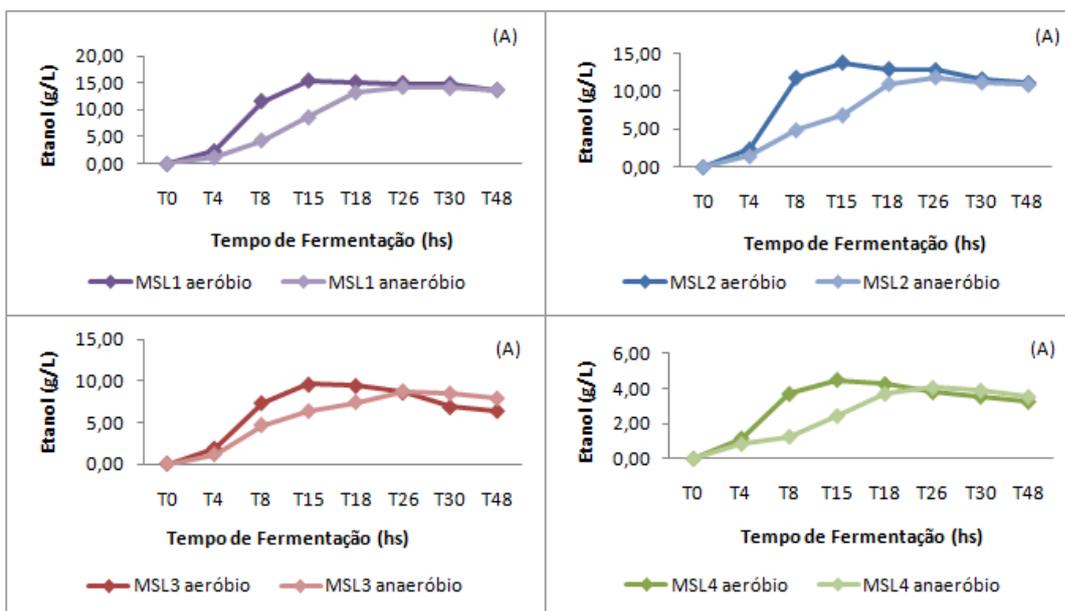
Quanto aos meios anaeróbios, fermentados nas mesmas condições, também observa-se que os meios MSL1 com 10% e 15% de inóculo foram os que apresentaram maior consumo de proteínas com 86,58% e 85,48% respectivamente (tabela 13), não havendo diferença significativa entre os mesmos (Tukey,  $p > 0,05$ ). Os meios anaeróbios apresentaram uma média de consumo de proteína para cada concentração de inóculo de: 5% de inóculo, o consumo de 85,16%; com 10% de inóculo, o consumo foi de 86,58%; 15% de inóculo, foi de 85,48% e com 20% de inóculo, foi de 84,41% (Tukey,  $p > 0,05$ ).

De acordo com os estudos realizados por Murari et al. (2011), ao fermentar o soro de leite para produção de biomassa, com a mesma linhagem de levedura utilizada no presente trabalho, obtiveram um consumo máximo de proteínas de 91,33%, após 24 horas de fermentação. Tais estudos foram realizados em diferentes condições experimentais das encontradas no presente trabalho, porém os resultados se encontram parecidos entre os dois estudos.

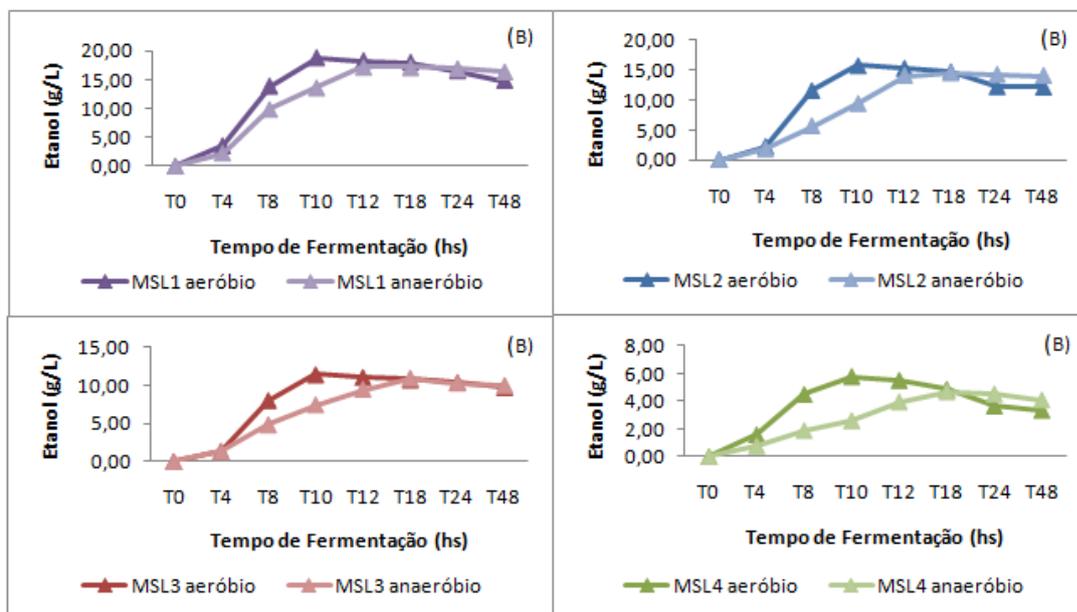
A fermentação dos meios de cultivos aeróbios apresentou maior consumo de proteínas do que os meios anaeróbios, o que coincide com a maior produção celular (tabela 10 e figuras 3, 4, 5 e 6.), a qual também é formada por proteínas.

### 5.3.4. Bioconversão da lactose em etanol em condições aeróbias e anaeróbias pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229.

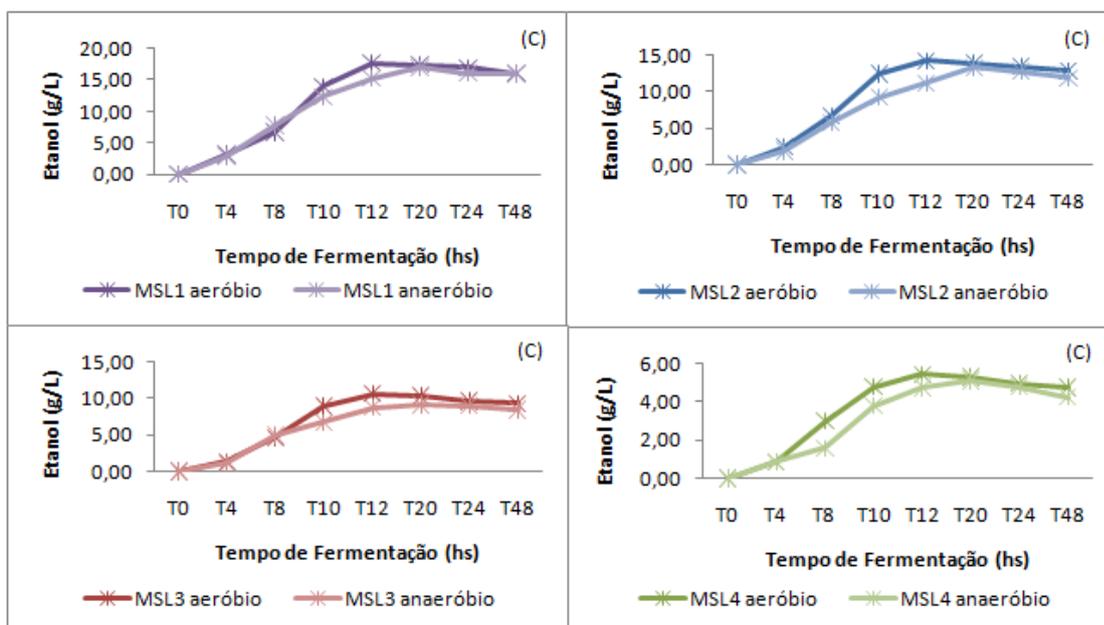
Após 48 horas de fermentação dos meios formulados com soro de leite em diferentes concentrações de nutrientes e inóculos, submetidos em condições aeróbias e anaeróbias, é possível observar, através das figuras 19, 20, 21 e 22, que o perfil de produção de etanol da levedura *K. marxianus* 229 foi diferente para cada meio de cultivo testado.



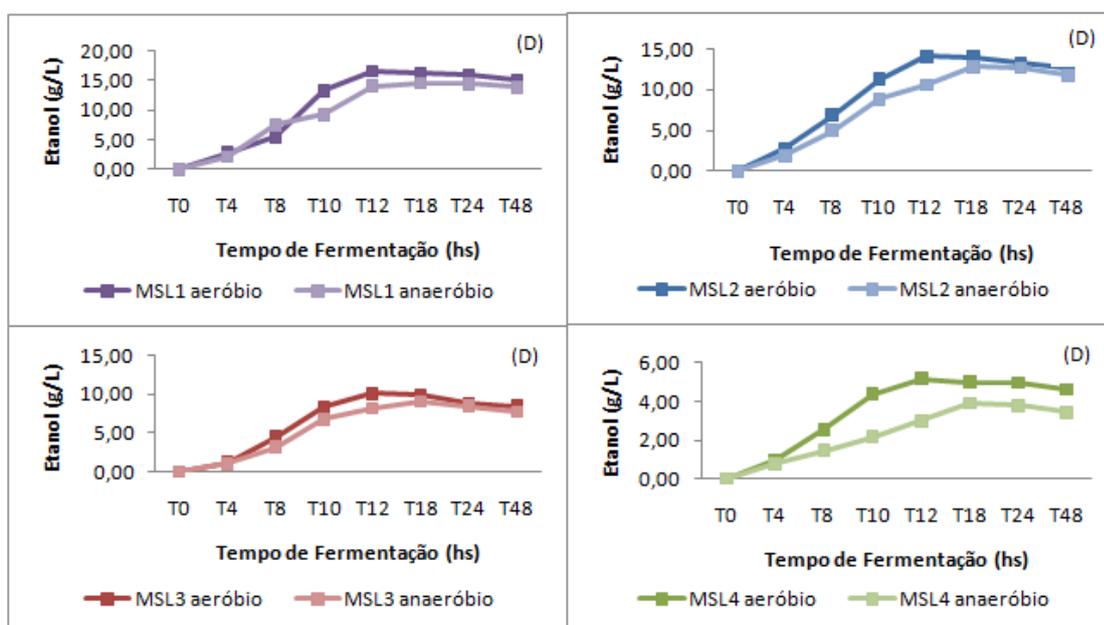
**Figura 19.** Produção média de etanol pela *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 20.** Produção média de etanol pela *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 21.** Produção média de etanol pela *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 15% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 22.** Produção média de etanol pela *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.

De acordo com as figuras acima (19, 20, 20, 21 e 22), observa-se que a maior produção de etanol absoluto, ocorreu nos meios fermentados em aerobiose, em todos os inóculos testados (Tukey,  $p > 0,05$ ).

Os meios que apresentaram maior produção e produtividade ( $P_E$ ) de etanol foram os que apresentaram uma maior concentração de substrato inicial

como os meios MSL1 e MSL2, seguidos dos meios MSL3 e MSL4 (tabela 11 e 14), isso tanto em aerobiose, quanto em anaerobiose, ou seja, observa-se que demanda-se alta carga de substrato-lactose para a produção de etanol. Isso se deve ao fato de que parte do substrato é utilizada para crescimento celular (tabela 10) e outras atividades vitais do micro-organismo.

Já em termos de conversão de substrato a etanol ( $Y_{E/S}$ ) e rendimento etanólico ( $\eta$ ), os meios que apresentaram resultados de maior importância, foram os meios MSL3 (tanto em aerobiose, quanto em anaerobiose, e nos diferentes inóculos testados), cuja concentração de substrato inicial era de 32,50 g/L, sendo este valor 43,57% a menos, que o meio de maior concentração de substrato (MSL1) (tabela 11).

**Tabela 14.** Variáveis analisadas e melhores parâmetros cinéticos obtido pela fermentação aeróbia e anaeróbia da levedura *K.marxianus* 229, em meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais.

Meios	Produção Etanol (g/L)		$Y_{E/S}$ (g/g)		$P_E$ (g/L.h)		$\eta$ (%)	
	Aeróbio	Anaeróbio	Aeróbio	Anaeróbio	Aeróbio	Anaeróbio	Aeróbio	Anaeróbio
<b>5% Inóculo</b>								
<b>MSL1</b>	15,35	14,21	0,31	0,29	1,02	0,54	50,67	47,81
<b>MSL2</b>	13,80	11,88	0,43	0,34	0,92	0,45	56,39	51,83
<b>MSL3</b>	9,65	8,75	0,45	0,36	0,64	0,33	58,87	54,50
<b>MSL4</b>	4,50	4,06	0,28	0,23	0,37	0,15	54,77	43,75
<b>10% Inóculo</b>								
<b>MSL1</b>	18,70	17,20	0,41	0,37	1,87	0,95	69,25	60,12
<b>MSL2</b>	15,70	14,40	0,40	0,38	1,57	0,80	64,31	62,02
<b>MSL3</b>	11,49	10,83	0,47	0,41	1,49	0,60	71,80	68,11
<b>MSL4</b>	5,80	4,70	0,36	0,30	0,58	0,26	61,63	55,62
<b>15% Inóculo</b>								
<b>MSL1</b>	17,60	16,90	0,31	0,32	1,45	0,88	67,70	58,82
<b>MSL2</b>	14,20	13,28	0,30	0,39	1,24	0,71	61,73	57,73
<b>MSL3</b>	10,65	9,17	0,38	0,35	0,78	0,53	69,47	65,50
<b>MSL4</b>	5,44	5,10	0,23	0,28	0,43	0,20	59,78	54,40
<b>20% Inóculo</b>								
<b>MSL1</b>	16,50	14,50	0,31	0,29	1,37	0,80	58,92	55,35
<b>MSL2</b>	14,08	12,80	0,34	0,31	0,93	0,52	57,68	54,30
<b>MSL3</b>	10,00	9,03	0,36	0,34	0,65	0,39	61,23	62,00
<b>MSL4</b>	5,18	3,90	0,29	0,24	0,36	0,21	57,55	51,44

#### **5.3.4.1. Produção Etanol 5% de Inóculo**

Os meios de cultivos fermentados em aerobiose apresentaram maior produção de etanol, com 15 horas de fermentação, já em anaerobiose, estes mesmos meios tiveram maior produção de etanol com 26 horas de fermentação (figura 15).

A tabela 14 mostra que o meio MSL1 aeróbio teve uma produção de 15,35 g/L de etanol ( $P_E$  de 1,02 g/L.h), sendo este valor 7,42% maior quando comparado com o meio MSL1 anaeróbio que teve uma produção de 14,21 g/L ( $P_E$  de 0,54 g/L.h), não havendo, desta maneira, diferença significativa entre os meios testados (Tukey,  $p < 0,05$ ). O consumo de lactose para a produção de etanol foi de 86,45% e 70,00% para aerobiose e anaerobiose respectivamente.

Ao comparar os meios aeróbios, observa-se que o MSL1 teve uma produção de etanol de 10,00%, 37,13% e 70,60% a mais que os meios MSL2, MSL3 e MSL4 respectivamente, nas mesmas condições de cultivo, havendo uma diferença significativa, entre estes (Tukey,  $p > 0,05$ ). Já em anaerobiose, a diferença do MSL1 foi de 16,39%, 38,42% e 71,42% a mais que os meios MSL2, MSL3 e MSL4 respectivamente (Tukey,  $p > 0,05$ ).

Em termos de rendimento etanólico e conversão do substrato a etanol ( $Y_{E/S}$ ), os meios que apresentaram maiores resultados foram os MSL3 (aerobiose e anaerobiose) com um ( $\eta$ ) 58,87% e 54,50%, uma ( $Y_{E/S}$ ) de 0,31 g/g e 0,29 g/g e um consumo de lactose de 85,80% e 74,50% respectivamente.

#### **5.3.4.2. Produção Etanol 10% de Inóculo**

Nestas condições de cultivo, a maior produção de etanol dos meios aeróbios ocorreu com 10 horas de fermentação, já em anaerobiose o mesmo ocorreu com 18 horas de fermentação (figura 16).

O meio aeróbio MSL1 foi o que apresentou maior produção de etanol (18,70 g/L e  $P_E$  de 1,87 g/L.h), porém sua diferença para o MSL1 anaeróbio foi de apenas 7,93%, já que o mesmo teve uma produção de etanol de 17,20 g/L.h ( $P_E$  de 0,95 g/L.h) (Tukey,  $p < 0,05$ ). Em relação ao consumo de lactose, este foi de 89,58% (aerobiose) e 83,00% (anaerobiose).

O meio aeróbio MSL1 teve uma diferença maior de 16,04%, 43,17% e 68,98% dos meios MSL2, MSL3 e MSL4 respectivamente (Tukey,  $p > 0,05$ ). Já em anaerobiose, esta diferença foi de 16,27%, 37,03% e 72,67% dos meios MSL2, MSL3 e MSL4 respectivamente (Tukey,  $p > 0,05$ ).

O maior rendimento e consequente conversão substrato a etanol, também foi dos meios MSL3 aeróbio e anaeróbio com ( $\eta$ ) 71,80% e 68,11% e ( $Y_{E/S}$ ) 0,47 g/g e 0,41 g/g respectivamente. Quanto ao consumo de lactose nestes meios foi de 85,70% e 80,30% para os meios aeróbios e anaeróbios respectivamente.

#### **5.3.4.3. Produção Etanol 15% de Inóculo**

Na fermentação dos meios com 15% de inóculo, os meios aeróbios, obtiveram maior produção de etanol com 12 horas de fermentação, enquanto que em anaerobiose, o mesmo levou 20 horas para atingir seu máximo em produção de etanol (figura 17).

O MSL1 com uma produção de 17,60 g/L de etanol ( $P_E$  de 1,45 g/L.h), apresentou uma diferença de apenas 4,00%, quanto ao mesmo meio fermentado em anaerobiose, que teve uma produção de 16,90 g/L ( $P_E$  de 0,88 g/L.h) (Tukey,  $p < 0,05$ ). O consumo de lactose consistiu em 87,60% em aerobiose e 82,50% em anaerobiose.

A diferença na produção de etanol do meio aeróbio MSL1 para os demais meios, neste caso, foi de 19,31%, 39,48% e 69,09% para o MSL2, MSL3 e MSL4 respectivamente (Tukey,  $p > 0,05$ ). Em anaerobiose esta diferença foi de 21,42%, 45,73% e 69,82% a mais para os meios MSL2, MSL3 e MSL4 respectivamente (Tukey,  $p > 0,05$ ).

Assim como nos inoculos anteriores, os meios MSL3 foram os meios de maior rendimento e conversão do substrato a etanol, apresentando um ( $\eta$ ) 69,47% e 65,50%, e ( $Y_{E/S}$ ) 0,38 g/g e 0,35 g/g, com um consumo de lactose de 86,90% e 85,50% respectivamente.

#### **5.3.4.4. Produção Etanol 20% de Inóculo**

Em aerobiose, os meios fermentados com 20% de inóculo inicial apresentaram maior produção de etanol com 12 horas de fermentação, porém em anaerobiose estes meio atingiram maior produção com 18 horas de fermentação.

Assim como nos inóculos anteriores, a maior produção de etanol ocorreu com o meio aeróbio MSL1 que teve uma produção de 16,50 g/L ( $P_E$  de 1,37 g/L.h), sendo este valor cerca de 12,12% a mais quando comparado com o MSL1 anaeróbio, que teve uma produção de 14,50 g/L ( $P_E$  de 0,80 g/L.h) de etanol (Tukey,  $p < 0,05$ ), com um consumo de lactose de 82,70% quando em aerobiose e de 78,30% quando em anaerobiose.

Ao fazer a análise comparativa entre os meios, aeróbios, tem-se que o meio MSL1 apresentou uma diferença a mais de 14,66%, 40,00% e 68,60%, quando comparado com os meios MSL2, MSL3 e MSL4 respectivamente. Já os mesmos meios quando em anaerobiose, tiveram uma diferença do MSL1 de 11,72%, 37,72% e 73,10% respectivamente (Tukey,  $p > 0,05$ ).

Nestas condições de cultivos, o meio MSL3 apresentou ( $\eta$ ) de 61,23% e 62,00% e um ( $Y_{E/S}$ ) de 0,36 g/g e 0,34 g/g, com um consumo de lactose de 77,00% e 70,60% em aerobiose e anaerobiose respectivamente.

#### **5.3.4.5. Análise geral dos resultados obtidos na fermentação do soro de leite para produção de etanol.**

Como pode ser observado nas figuras 19, 20, 21 e 22, e na tabela 14, o perfil de fermentação da levedura *Kluyveromyces marxianus* 229 foi semelhante para as quatro concentrações de inóculos testados (5%, 10%, 15% e 20%). Os meios fermentativos, cujo substrato inicial se apresentava em maior concentração, ou seja, os meios MSL1 e MSL2, foram os que obtiveram maior produção de etanol, quando comparados com os meios de menor concentração de substrato (MSL3 e MSL4). Observa-se também que à medida que a lactose vai se esgotando (figuras 11, 12, 13 e 14), o etanol começa a diminuir, isso tanto em condições aeróbias quanto em anaeróbias.

Mehaia e Cherya (1993), ao realizarem experimentos em meio sintético com altas concentrações de lactose, constataram que o aumento na concentração de substrato favoreceu a produção de etanol. Tal característica também foi confirmado por Siso et al (1996) que relataram que a fermentação da lactose, conduzida em frascos de erlenmeyers e altas concentrações de açúcar e biomassa, levou a uma produção de etanol significativa, mostrando que é possível que altas concentrações de açúcar possam vir a induzir maior capacidade de transporte de açúcar na membrana celular.

Já em relação à velocidade de consumo de lactose (tabela 12) pela levedura, evidenciou que o aumento na concentração de substrato, juntamente com o nível de oxigênio, proporcionou um aumento no consumo da mesma, como forma de sustentar um fluxo glicolítico para produzir energia para o micro-organismo, o que é confirmado pelo aumento na produção de etanol nestas mesmas condições.

Um aspecto importante em processos fermentativos, é a capacidade da levedura suportar os efeitos tóxicos do etanol por ela mesma produzida durante a fermentação. Isso é observado nas figuras 19, 20, 21 e 22, pois mesmo ao atingir o seu máximo de produção de etanol, esta linhagem de levedura ainda foi capaz de apresentar crescimento durante um tempo de fermentação (figuras 7, 8, 9 e 10 e na tabela 10). Segundo Vienne e Stockar (1985), os efeitos tóxicos do etanol sobre leveduras abrangem desde inibição das enzimas hexoquinase e álcool desidrogenase, até alteração da permeabilidade da membrana celular.

Tais evidências também foram constatadas por Schafer et al. (1985) e Silveira (2004), que notaram que a *Kluyveromyces fragilis* e a *K. marxianus* UFV-3 foram capazes de fermentar o permeado de soro de leite sem perdas de rendimento de etanol e massa celular. A fermentação do soro por *K. marxianus* 229 indicou que, além de não ocorrer perda no rendimento de etanol, este foi favorecido por maiores concentrações de substrato. Sendo assim, o aumento na concentração de substrato aparentemente favoreceu o metabolismo fermentativo.

Em termos de conversão da lactose a etanol ( $Y_{E/S}$ ) e rendimento ( $\eta$ ), os meios MSL3 foram os que apresentaram os maiores resultados quando comparados com os demais meios testados. Segundo Mawson (1994), a levedura do gênero *Kluyceromyces* pode chegar a consumir até ou mais de 95,00% da lactose do soro de leite, podendo apresentar uma eficiência na conversão do substrato a etanol de 80% em relação ao coeficiente teórico de conversão da lactose a etanol (0,5368), dependendo da levedura utilizada. Uma vez que para cada 1g de lactose são produzidos cerca de 0,5 g/L de etanol por esta levedura, o resultado irá depender da concentração do substrato inicial, do total de consumo deste substrato, além do perfil fermentativo e da linhagem a ser utilizada no processo fermentativo (LINS; LEÃO, 2002).

Os meios fermentativos, cuja concentração inicial de inóculo foi de 10% e 15%, apresentaram os melhores resultados de acordo com os experimentos realizados. Isso vale para todos os quatro meios testados (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) nestas condições, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. No entanto, os meios aeróbios foram os que apresentaram os melhores resultados, pois mesmo não havendo uma diferença significativa com os meios anaeróbios, os meios aeróbios levaram 8 horas a menos (tabela 15) para atingir seu máximo de produção em etanol, quando comparados com os meios anaeróbios (figuras 19, 20, 21 e 22). Isso também pode ser percebido nas análises de produção celular (figuras 7, 8, 9 e 10) e consumo de lactose (figuras 11, 12, 13 e 14) e proteínas (figuras 15, 16, 17 e 18).

**Tabela 15.** Comparação do tempo levado pela levedura *K.marxianus* 229 para atingir a produção máxima de etanol, nos meios com diferentes concentrações de lactose (MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4) e diferentes concentrações de inóculos iniciais, em condições aeróbias e anaeróbias.

Meios	Tempo levado para atingir máximo em etanol (horas)	
	Aeróbio	Anaeróbio
<b>5% Inóculo</b>		
<b>MSL1</b>	15	26
<b>MSL2</b>	15	26
<b>MSL3</b>	15	26
<b>MSL4</b>	15	26
<b>10% Inóculo</b>		
<b>MSL1</b>	10	18
<b>MSL2</b>	10	18
<b>MSL3</b>	10	18
<b>MSL4</b>	10	18
<b>15% Inóculo</b>		
<b>MSL1</b>	12	20
<b>MSL2</b>	12	20
<b>MSL3</b>	12	20
<b>MSL4</b>	12	20
<b>20% Inóculo</b>		
<b>MSL1</b>	12	18
<b>MSL2</b>	12	18
<b>MSL3</b>	12	18
<b>MSL4</b>	12	18

Gabardo (2011), ao otimizar a bioconversão da lactose do soro de queijo em etanol em sistema de biorreatores imobilizados pela linhagem da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 em fermentação em batelada, obteve uma ( $Y_{E/S}$ ) de 0,45 g/g, uma ( $P_E$ ) de 0,81 g/L.h com um ( $\eta$ ) de 79,10% na produção de etanol, mostrando que através da imobilização de células se obtém também bons resultados em relação a produção de etanol.

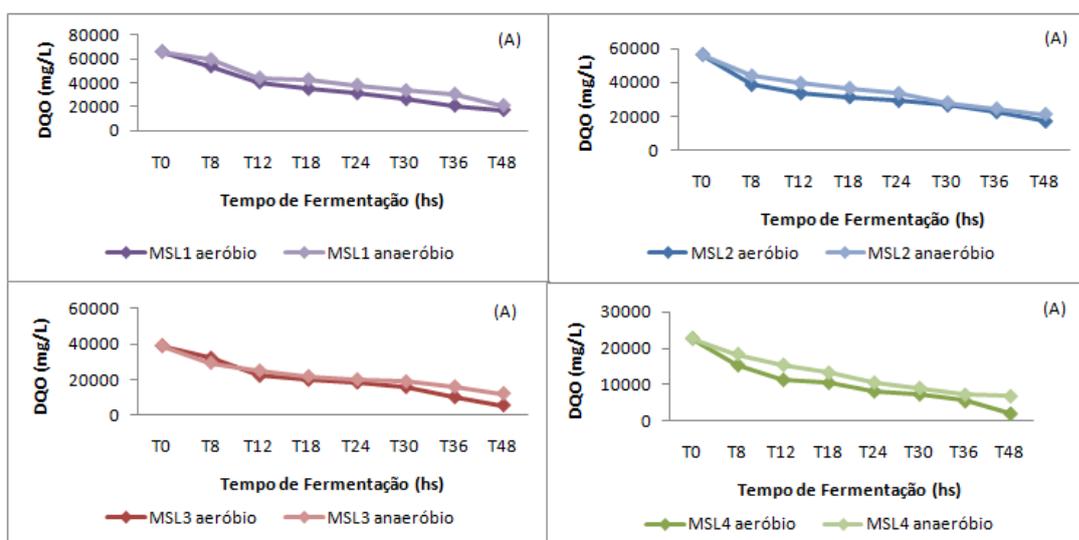
Silveira (2004), ao fermentar o permeado do soro de leite para obtenção de etanol em condições aeróbias e anaeróbias pela levedura *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 isolada do ambiente de laticínio, obteve em condições aeróbias após 24 horas de fermentação um ( $\eta$ ) de 19,51% com um consumo de lactose de 67,00%, porém em condições anaeróbias, após 24 horas de fermentação, conseguiu um ( $\eta$ ) de 84,20% com um consumo de 88,46% de

lactose. Tais resultados obtidos por este autor foram diferentes dos encontrados no presente trabalho, em que a melhor produção de etanol ocorreu em aerobiose.

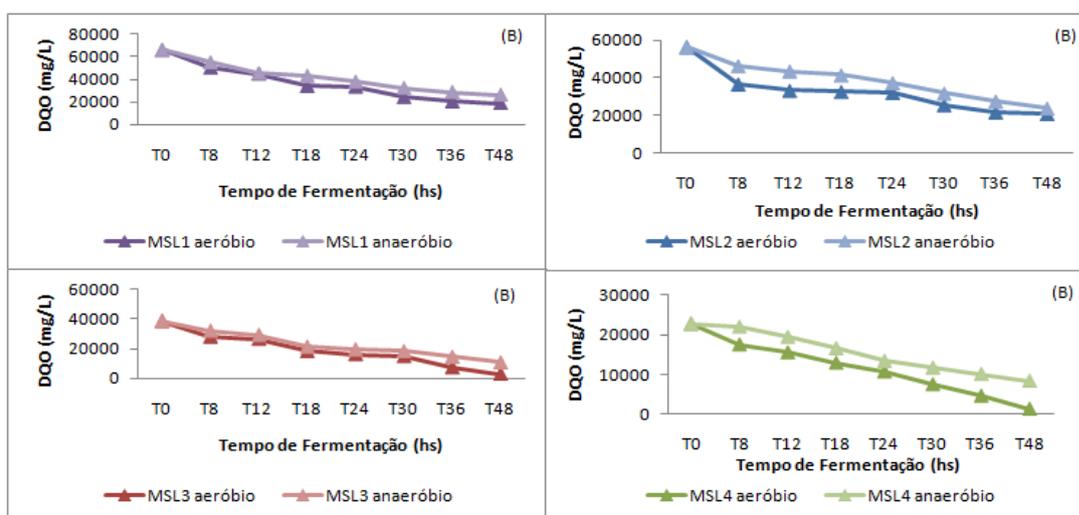
Para explicar esta diferença, é importante lembrar que existem leveduras aeróbias estritas, que não crescem em glicose na ausência de oxigênio e todo o piruvato é incorporado no ciclo do ácido tricarboxílico. E existem também as anaeróbias facultativas que metabolizam glicose na ausência ou presença de oxigênio. Entretanto, o excesso de substrato fermentativo pode inibir a respiração, mesmo em ambientes aeróbios, uma vez que há a saturação da capacidade respiratória dos micro-organismos. Este fenômeno é conhecido na fisiologia das leveduras como efeito Crabtree. Há dois tipos de efeito Crabtree *short-term* e o *long-term*. O efeito Crabtree *short-term* 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. Já o efeito Crabtree *long-term* é caracterizado pela fermentação alcoólica em aerobiose devido a grandes concentrações de carboidrato no meio ou devido a cultivos em altas taxas de velocidade de crescimento (DINIZ, 2009, SILVEIRA, 2004). Portanto de acordo com os resultados obtidos sugere-se a existência do Efeito Crabtree do tipo *long-term* no tipo de linhagem de levedura utilizada neste experimento, podendo dizer que nestas condições temos uma fermentação alcoólica aeróbia com elevada velocidade de crescimento e em concentrações relativamente alta de lactose, como observada por Kiers et al. (1998), explicando então o motivo da maior produção de etanol em condições aeróbias do que em anaerobiose, pela *Kluyveromyces marxianus* 229 utilizada no presente trabalho, além da maior velocidade no consumo de substrato pela mesma.

### 5.3.5. Redução do Potencial Poluidor em Condições Aeróbias e Anaeróbias.

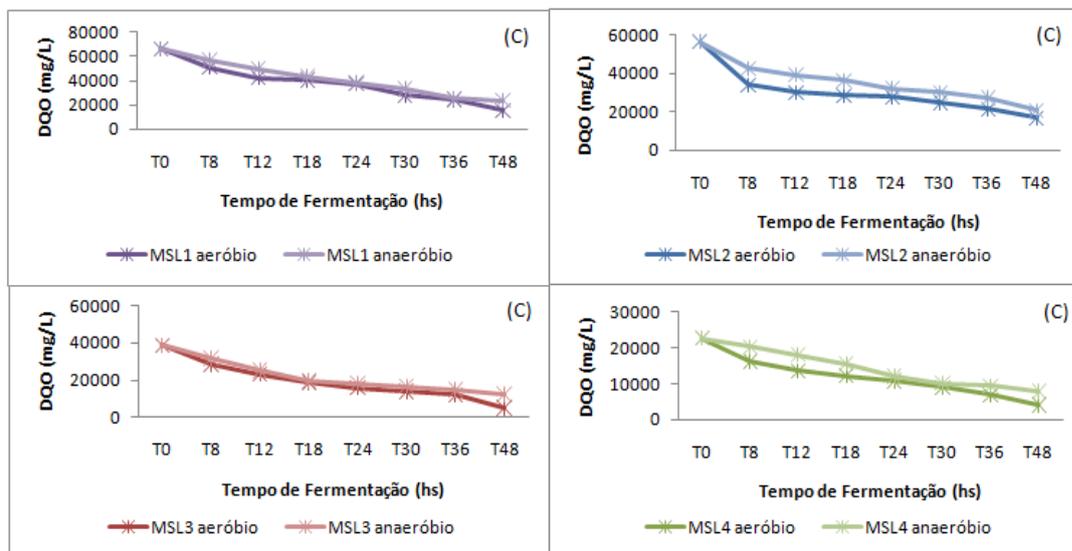
A determinação da demanda química de oxigênio (DQO) foi realizada simultaneamente com a análise de carboidratos no decorrer dos experimentos, sendo um parâmetro importante, pois mede indiretamente a quantidade de compostos orgânicos presentes no efluente.



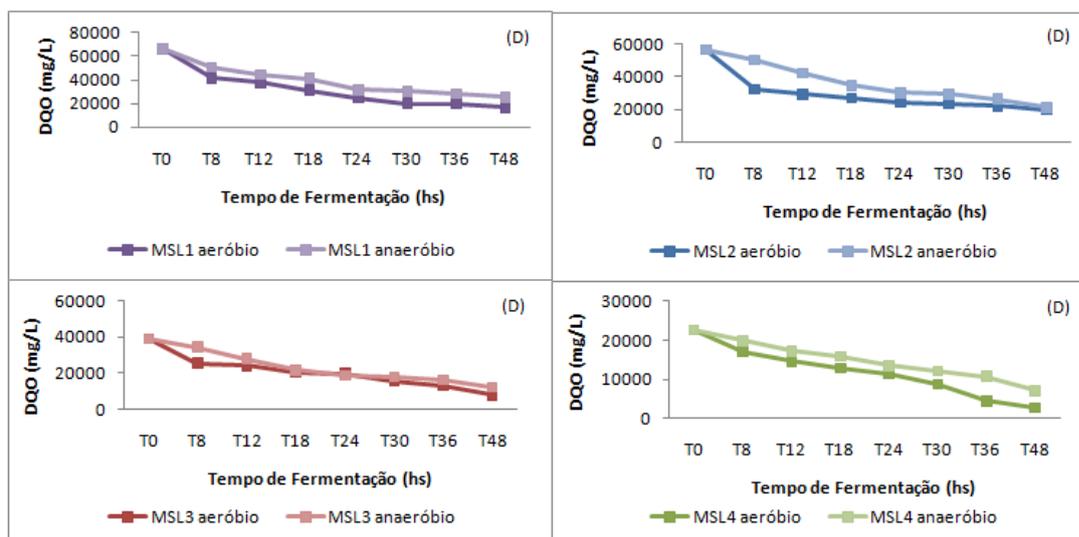
**Figura 23.** Determinação da DQO do soro de leite utilizando *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 5% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 24.** Determinação da DQO do soro de leite utilizando *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 10% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 25.** Determinação da DQO do soro de leite utilizando *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 15% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.



**Figura 26.** Determinação da DQO do soro de leite utilizando *Kluyveromyces marxianus* 229, em diferentes concentrações de substrato MSL1, MSL2, MSL3 e MSL4, com 20% de inóculo inicial, sob condições aeróbias e anaeróbias.

Ao analisar as figuras 23, 24, 25 e 26, observa-se que, assim como no consumo de carboidratos (figuras 11, 12, 13 e 14) após 48 horas de fermentação pela levedura *K. marxianus* 229, os meios de cultivo aeróbio e anaeróbios apresentaram uma redução satisfatória quanto a concentração de matéria orgânica presente nos meios a base de soro de leite, e em diferentes concentrações de nutrientes e inoculos, conforme demonstrado na tabela 16.

**Tabela 16.** Comparação da redução de DQO dos meios fermentativos de soro de leite em diferentes concentrações de lactose e inóculo, após 48 horas de fermentação em condições aeróbias e anaeróbias pela levedura *K. marxianus* 229.

Meios	DQO Inicial (mg/L)	DQO Final (mg/L)		Redução (%)	
		Aeróbio	Anaeróbio	Aeróbio*	Anaeróbio**
<b>5% Inóculo</b>					
<b>MSL1</b>	66200	17930	24280	73,00	66,34
<b>MSL2</b>	56500	16600	21825	70,62	61,37
<b>MSL3</b>	38880	7270	11355	78,72	70,80
<b>MSL4</b>	22680	2450	4310	89,19	81,00
<b>10% Inóculo</b>					
<b>MSL1</b>	66200	16158	20935	75,60	68,37
<b>MSL2</b>	56500	15120	18230	73,00	67,73
<b>MSL3</b>	38880	3000	11010	92,28	71,68
<b>MSL4</b>	22680	1300	3790	94,26	83,28
<b>15% Inóculo</b>					
<b>MSL1</b>	66200	15550	21606	76,51	67,73
<b>MSL2</b>	56500	16850	19546	70,17	65,40
<b>MSL3</b>	38880	4250	11440	89,06	70,57
<b>MSL4</b>	22680	1678	3900	92,60	82,28
<b>20% Inóculo</b>					
<b>MSL1</b>	66200	16580	22210	74,95	66,45
<b>MSL2</b>	56500	17200	20206	69,55	64,40
<b>MSL3</b>	38880	5760	12000	85,20	69,13
<b>MSL4</b>	22680	2370	4135	89,55	81,76

No caso da eficiência na redução de DQO, é possível observar que, em todas as condições de cultivo (aeróbio e anaeróbio) e independentemente da concentração de inóculo (5%, 10% 15% e 20%), os meios que apresentaram uma eficiência maior na redução da matéria orgânica do soro de leite foram os meios MSL4, seguido do MSL3, ou seja, os meios que tiveram uma concentração inicial de substrato menor (18,80 e 32,50 g/L de lactose respectivamente) e conseqüente partiram de uma menor teor de DQO (22680 e 38880 mg/L respectivamente).

#### **5.3.5.1. Redução DQO 5% de Inóculo**

O meio de cultivo MSL4 aeróbio que apresentou uma DQO de 22680 mg/L, apresentou uma eficiência na carga orgânica de 89,19%, sendo este valor 9,00% a mais, quando comparado com o mesmo meio fermentado em anaerobiose, que teve uma redução de 81,00%, após 48 horas de fermentação pela levedura, sendo que esta diferença entre os meios, foi significativa de acordo com teste estatístico aplicado (Tukey,  $p > 0,05$ ). Ao comparar a redução entre o meio de menor concentração de substrato (MSL4) e o de maior (MSL1), estes apresentam uma diferença média, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose de aproximadamente 18,00% a mais para o MSL4.

#### **5.3.5.2. Redução DQO 10% de Inóculo**

Os meios com 10% de inóculos foram os que apresentaram uma maior redução da DQO quando comparados com os demais inoculos testados, onde o MSL4 aeróbio apresentou no final da fermentação uma redução da matéria orgânica de 94,26% e 83,28% quando em anaerobiose, com uma diferença de 11,26% entre os meios. Neste caso, a diferença na redução da DQO do MSL4 para o MSL1 foi de 19,79% (aerobiose) e 17,90% (anaerobiose) (Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### **5.3.5.3. Redução DQO 15% de Inóculo**

De acordo com a tabela 16, observa-se que estas condições de cultivo, foram as que apresentaram a segunda maior eficiência na redução de DQO. O meio MSL4 aeróbio teve uma redução de 92,60%, com uma diferença de 11,14% do meio anaeróbio que apresentou uma redução de 82,28% (Tukey,  $p < 0,05$ ). Já a diferença entre o MSL4 para o MSL1 foi de 17,37% (aerobiose), e de 21,48% em anaerobiose, sendo que em anaerobiose foi o que houve maior diferença destes dois meios testados (Tukey,  $p > 0,05$ ).

#### **5.3.5.4. Redução DQO 20% de Inóculo**

Os meios fermentados com 20% de inóculo apresentaram resultados parecidos com os meios fermentados com 5% de inoculo (Tukey,  $p < 0,05$ ). O

MSL4 aeróbio (20% de inóculo) teve uma redução de matéria orgânica de 89,55%, sendo este valor 8,70% maior que o obtido pelo mesmo meio quando em anaerobiose (81,76%). Nestas condições, o MSL4 teve uma diferença de 16,30% para o MSL1(aeróbio) e 18,72% (anaeróbio) (Tukey,  $p < 0,05$ ).

O que se observa, de acordo com os resultados obtidos, é que mesmo após o micro-organismo atingir seu crescimento máximo (figuras 7, 8, 9 e 10) a DQO continua decaindo até atingir um platô em 48 horas de fermentação. Nesse período, as células se mantêm em fase estacionária. Possivelmente na fase de crescimento, as células consomem a fonte de carbono dissolvida no meio (principalmente lactose) ocorrendo a formação de ácidos orgânicos, que contribuem para a diminuição do pH do meio. Após o início da fase estacionária, presume-se que os micro-organismos utilizem-se destes ácidos para manutenção do metabolismo celular, contribuindo conseqüentemente para a redução de DQO, com concomitante elevação discreta do pH, fato este observado também por outros autores (Reinbold e Takemoto, 1988).

Domingues et al. (1999), ao realizarem a fermentação alcoólica do soro de leite em bioreator *airlift* pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada com os genes *LAC4* e *LAC12* presentes na *Kluyveromyces* ssp, obtiveram uma eficiência na redução de DQO 91,00% . Já Sabra et al. (2011), ao realizarem a suplementação de nutrientes para produção de biomassa a partir do soro de queijo pela levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, após 36 horas de fermentação em aeração constante, obtiveram uma eficiência na redução de DQO de 84%, tais resultados foram parecidos com os obtidos no presente trabalho.

Ao analisar os resultados aeróbios e anaeróbios observa-se que em condições aeróbias houve uma maior eficiência, quanto à redução de DQO do soro de leite pela fermentação da levedura *K. marxianus* 229 após 48 horas de fermentação, assim como foi também na produção de biomassa, consumo de lactose e proteína e na produção de etanol, o que vem a confirmar que o metabolismo fermentativo desta linhagem testada apresenta resultados mais eficientes quando em tais condições fermentativas.

## 6. CONCLUSÕES

A concentração inicial de nutrientes dos meios fermentativos interferiu na produção de etanol e crescimento microbiano, sendo que os meios fermentativos cujo substrato inicial de maior concentração (MSL1) resultaram nos melhores resultados para produção e produtividade celular e etanol. Porém em termos de rendimento etanólico e conversão do substrato a etanol (g/g), os meios que apresentaram 50% de soro de leite, ou seja, metade do substrato (MSL3) foram os que apresentaram melhores resultados, sendo este um dos meios que tiveram melhores redução da matéria orgânica.

O perfil fermentativo da levedura testada foi diferente quando submetida em condições aeróbias e anaeróbias, sendo que em aerobiose o pico máximo de crescimento assim como a maior produção de biomassa ocorreu em menor tempo de fermentação, enquanto que em condições anaeróbias estes mesmos parâmetros ocorreram com 8 horas a mais, mostrando que nestas condições a fermentação é mais lenta por esta linhagem utilizada;

O maior consumo de substrato e proteínas ocorreu em aerobiose, chegando até 99,96% e 94,66% respectivamente como foi o ocorrido no meio com 100% de soro de leite (MSL1) com 10% de inóculo inicial, sendo este o meio que apresentou uma das maiores produção e produtividade celular 6,45 g/L e 0,53 g/L.h respectivamente;

O maior rendimento de etanol ocorreu nos meios de cultivos que apresentavam menores concentrações de nutrientes, isto é, meios compostos por 50% e 25% de soro de leite (MSL3 e MSL4 respectivamente);

A eficiência na redução da demanda química de oxigênio, em condições aeróbias, se mostrou mais eficazes nos meios de cultivo com 50% e 25% de soro de leite, chegando a reduzir até 94,26% e 92,60% respectivamente do teor da matéria orgânica. Porém a redução dos demais meios testados também foi significantes se mostrando uma forma eficaz no tratamento do soro de leite;

Em relação à concentração de inóculo inicial nos meios fermentativos, os meios cultivados com 10% e 15% de inóculo, foram que apresentaram os

resultados mais satisfatórios em todas as análises realizadas (crescimento celular, carboidrato, proteína, etanol e demanda química de oxigênio);

O que se observa é que de fato não houve uma diferença significativa nos resultados obtidos entre os meios aeróbios e anaeróbios, porém os meios quando fermentados em aerobiose pela *K. marxianus* 229 apresentaram-se de certa forma mais eficientes, pois foi obtido praticamente o mesmo resultado que os meios anaeróbios, só que em menor tempo de cultivo como pode ser observado na produção celular e de etanol;

De maneira geral, a bioconversão da lactose do soro de leite por *K. marxianus* 229 em etanol é possível, sendo uma alternativa promissora para se obter uma fonte renovável de biocombustível, além de reduzir o impacto ambiental causado por tal subproduto. Assim novos estudos poderão também contribuir para estabelecer um processo mais eficiente de produção de etanol de soro de leite, em regime de batelada alimentada ou processos contínuos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. R. Processamento do leite e tecnologia de produtos lácteos. Lavras: UFLA, 2005. P. 91-157;

ALMEIDA, E. S. - Tratamento do Efluente da Indústria de queijos por processos biológicos e químicos. 2004. 81f. **Tese** (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, 2004;

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, dezembro 2009;

ANUALPEC. Anuário de Pecuária Brasileira. São Paulo: **Instituto FNP**, 2007;  
APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AWWA – AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WEF – WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed, Washington, 1995;

BALDASSO, C. Fracionamento dos componentes do soro de leite através da tecnologia de separação por membranas. 2011. 310f. **Tese** (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011;

BARBOSA, A. S.; FLORENTINO, E. R.; FLORÊNCIO, I. M. Utilização do soro de leite como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde**, v.5, n.1, p. 07-25 janeiro/março de 2010;

BARROSO, R. R. Avaliação da influência do pH de cultivo na produção de biopolímero pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* em Bioreator de Bancada. **Relatório de atividades**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2010;

BECERRA, M.; BAROLI B.; FADDA, A.M.; MENDEZ, J. B.; SISO, M. I. G. Lactose bioconversion by calciumalginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Enzyme Microbial Technology**. v 29, p. 506–12, 2001a;

BELLAVER, L. H.; CARVALHO, N. M.; NETO, J; GOMBERT, K. Ethanol formation and enzyme activity around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 expose to glucose or lactose excess. **FEMS Yeasts Research**. v. 4, p. 691-698, 2004;

BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Oligossacarídeos extraídos das paredes celulares de *Kluyveromyces marxianus* que cresce em whey. **Biotechnology and Technology**. v 12 (3), p. 229-233, 1998;

BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia Alimentar**. v 2: Fermentaciones alimentarias. Zaragoza: Acribia, 1995, p. 19-29;

CARMINATTI, C. A. Ensaios de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis*. 2001. 79f. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2001;

Conselho de Informação Sobre Biotecnologia. Guia do Combustível Renovável – Agroenergia para um mundo sustentável. Junho, 2009. Disponível em: [http://www.cib.org.br/pdf/guia\\_combustivel\\_renovavel.pdf](http://www.cib.org.br/pdf/guia_combustivel_renovavel.pdf). Acesso em: 05 de junho de 2012;

COSTA, A. M. G. Desempenho de Filtro Anaeróbico no Tratamento de Efluentes Formulado com Diferentes Concentrações de Soro de Queijo. 2008. 93f. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais 2008;

COSTA, D. A. Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico. 2011. 73f. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2011;

CUNHA, V. A. B. Síntese e fracionamento de oligossacarídeos a partir da lactose em reator de membrana. 2010. 247f. **Tese** (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010;

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

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Novas Metodologias Para A Fermentação Alcoólica Do Soro De Queijo. CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 6, Lisboa, 1999. "**Actas da 6.ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente**". Lisboa : Universidade Nova de Lisboa, 1999. v. 3, p. 271-280;

FARIA E. A.; RODRIGUES, I. C.; BORGES, R. V. – Estudos do Impacto Ambiental x Gerado nos Corpos D'Água pelo Efluente de Laticínios em Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais. Curso de Especialização em Engenharia Sanitária do Meio Ambiente, Belo Horizonte 2004;

FONSECA, G. G.; GOMBERT, A. K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. Physiology of the *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **FEMS Yeast Research**. 7 422-435, 2007;

FURLAN, S. A.; CARVALHO-JONAS, M. F.; MERKLE, R.; BÉRTOLI, G. B.; JONAS, R. Aplicação do sistema Microtiter Reader na seleção de micro-organismo produtores de beta-galactosidade. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, p.1261-1261, 1995;

GABARDO, S. Otimização da bioconversão de lactose do soro de queijo em etanol em sistema de biorreatores imobilizados. 2011. 85f. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011;

GARCIA, F. R. C. Avaliação do desempenho de um reator anaeróbio compartimentado no tratamento de soro de queijo. 2009. 103f. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”. Engenharia e Ciência de Alimentos, São José do Rio Preto 2009;

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, p. 375–384, 2010;

HOLSINGER, V.H.; POSATI, L.P.; DEVILBISS, E.D. Whey beverages: A review. **Journal of Dairy Science**, v.57, p.849-859, 1974;

KIERS, J.; ZEEMAN, A. M.; LUTTIK, M.; THIELE, C.; CASTRILHO, J. I.; STEENSMA, H. Y.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. **Yeast**, v.14, p. 459-469, 1998;

KOSIKOWSKI, F. V. “Whey utilization and whey products”. **Journal of Dairy Science**, 62(7): 1149-1160, 1979;

LINS, A.C.; ROCHA LEÃO, M.H. Removal of skim lactose using free and immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 187 – 192, 2002;

MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24(4): 532-535, out.-dez. 2004;

MATOS, A. T. Curso Sobre Tratamento De Resíduos Agroindustriais (Tratamento de resíduos agroindustriais), Fundação Estadual do Meio Ambiente, Universidade Federal de Viçosa, Maio 2005;

MAWSON, A. J. Bioconversion for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, 47, 195-203, 1994;

MEHAIA, M. A.; CHERYAN, M. Hollow fibre bioreactor for ethanol production: application to the conversion of lactose by *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme Microbial Technology**, v.6, p.117-120, 1993;

MENDES, F. B; ARAÚJO, E. H– Produção de Etanol a Partir do Soro de Queijo Utilizando a Levedura *Kluyveromyces marxianus* e Diferentes Concentrações de Lactose. Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química; 2003;

MIZUBUTI, I. Y. Soro de leite: Composição, processamento e utilização na alimentação. **Semana Ciências Agrárias**, v.15, n.1, p. 80-94. 1994;

MOCKAITIS, G. **Relatório Científico**. Avaliação do Reator Anaeróbio com Agitação Contendo Biomassa Granulada Operado em Batelada Seqüencial Aplicado ao Tratamento de Soro de Leite, Instituto Mauá de Tecnologia – IMT, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos – São Caetano do Sul, SP julho/2003;

MURARI, C. S.; VIDOTTI, D.; DORTA, C.; OTOBONI, A. M. M. B. Emprego do soro de leite bovino e bubalino para produção de biomassa pela levedura

*Kluyveromyces marxianus*. 229, **Revista Analytica** - Fevereiro/Março 2011, Nº 51;

OECD-FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2008–2017 Highlights. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development—Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008;

OGRODOWSKI, R. - Produção de Biomassa a Partir do Soro de Queijo para Obtenção de Ribonucleotídeos. 2006. 122f. **Tese** (Doutorado). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2006;

OLIVEIRA, C. G. R. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) rica em organoselênio. 2006. 77f. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 2006;

PELCZAR Jr, J. M.; CHAN, E. C. S. e KRIEG, N. R. - **Microbiologia Conceitos e Aplicações**, 2ª ed. São Paulo, 2005, Editora Pearson, pg.381;

PINHEIRO, R.I.C. - Estudo do Efeito da Pressão na Fisiologia de Leveduras. 2004. 292f. **Dissertação** (Mestrado) – Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga/Portugal, 2004;

PONSANO, E.; CASTRO-GOMES, R. Fermentação do soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa para a redução de sua capacidade poluente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 15 (1), p.170-173, 1975;

REINBOLD, R. S. E TAKEMOTO, J. Use of Swiss Cheese Whey Permeate by *Kluyveromyces fragilis* and Mixed Culture of *Rhodopseudomonas sphaeroides* and *Bacillus megaterium*. **Journal of Dairy Science**, v.71, n. 7, p. 17991802;

RÉVILLION, J. P., BRANDELLI, A; AYUB, M. A. Z. - Production of yeast extracts from whey for food use: market and technical considerations. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Aug 2000, v.20, n.º. 2, p.246-249;

ROEPCKE, C. B. S. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de Biomassa de levedura rica em zinco orgânico. 2007. 148f. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007;

ROUWENHORST, R. Production and localization of inulinases in *Kluyveromyces marxianus* yeasts. 1987. 149f. **Tese** (Doutorado). Department of Microbiology and Enzymology-Delft University of Technology, Netherlands, 1987;

RUSSEL, I. Will a recombinant DNA yeast be able to solve whey disposal problem? **Trends in Biotechnology**. v.4, p. 107-108, 1986;

SABRA, G.; ESPOSITO, E.; SILVA, L. C. P.; ALMEIDA, A; DURÁN, N. Suplementação de nutrientes para produção de biomassa a partir do soro de queijo, Universidade Mogi das Cruzes, Núcleo de ciências ambientais, 2010;

SANTANA, L. N. S.; CORDEIRO, P. T.; OLIVEIRA-LOPES, L. C.; RIBEIRO, E. J. Estudo cinético da produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de sódio. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 27 a 30 de julho de 2009;

SCHAEFER, M. I .G.; VIENNE, P.; STOCKAR, U. V. Alcohol production from whey permeate by yeast and by thermophile strain. **Conservation & Recycling**, v.8, n. 2, p. 153- 164, 1985;

SERPA, L.; PRIAMO, W.; REGINATTO, V. Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade **Econômica**. **2<sup>nd</sup> International**

**Workshop | Advances in Cleaner Production**, São Paulo, Brazil, May 20-22, 2009;

SILVA, M. O. S. A. Análise físico-química para controle de estações de tratamento de esgotos. 1ª Edição. São Paulo: **CETESB**, 1997. P. 226;

SILVEIRA, R. F. - Produção de Etanol por Leveduras em Biorreatores com Células Livres e Imobilizadas Utilizando Soro de Queijo. 2006. 131f. **Dissertação** (Mestrado). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2006;

SILVEIRA, W. B. Produção de etanol em permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. 2004. 69f. **Tese** (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 2004;

SINHA, R., RADHA, C., PRAKASH, J., KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 4, p. 1484-1491, 2007;

SISO, M. I. G.; RAMIL, E.; CERDÁN, M. E. PICOS, M. A. F. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces fragilis*. Ethanol production na crabtree effect. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p. 585-591, 1996;

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**. v.17 n.4 Campinas out./dez. 2004;

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades, degradações e modificações. São Paulo: Livraria Varela, 1996;

SOUZA, K. M.; ANDRADE, A. C.; ARAÚJO, E. H. Estudo Da Fermentação Simultânea À Hidrólise, De Soro De Queijo, Utilizando Lactase e

*Saccharomyces Cerevisiae*. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Unicamp 2005;

TULLIO, L. T. Isolamento e caracterização do Glicomacropéptido do soro de leite, 2007. 97f. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná – em Alimentos, Curitiba, 2007;

VIENNE, P.; STOCKAR, U. V. Na investigation of ethanol inhibition and other limitations occurring during the fermentation of concentrated whey permeate by *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v.7, p. 521-526, 1985;

ZAFAR, S., MOHAMMAD, O., MOHAMMED, S., HUSAIN, S. Batch kinetics and modeling of ethanolic fermentation of whey. **International Journal of Food Science and Technology**. v.40, p. 597-604, 2005;

YANG, S. T. e SILVA, E. M. Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2541-2562, 1995.

## APÊNDICE A

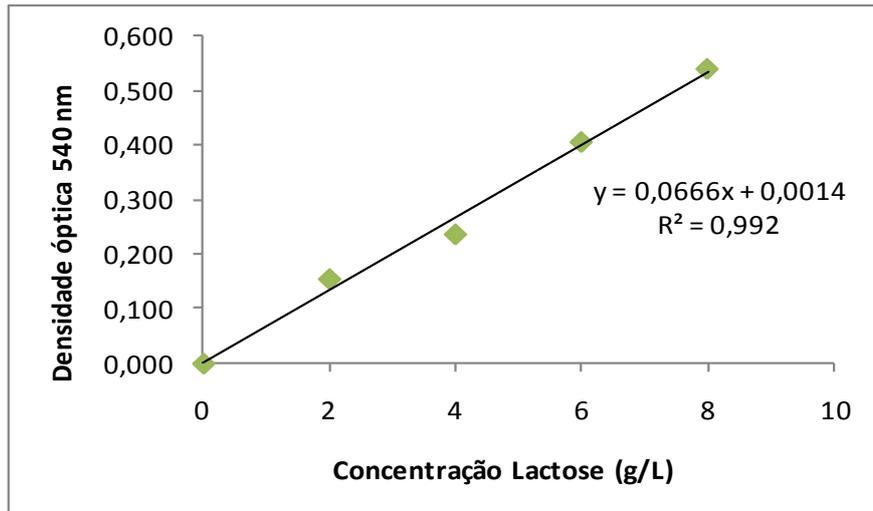


Figura 27. Curva padrão da lactose.

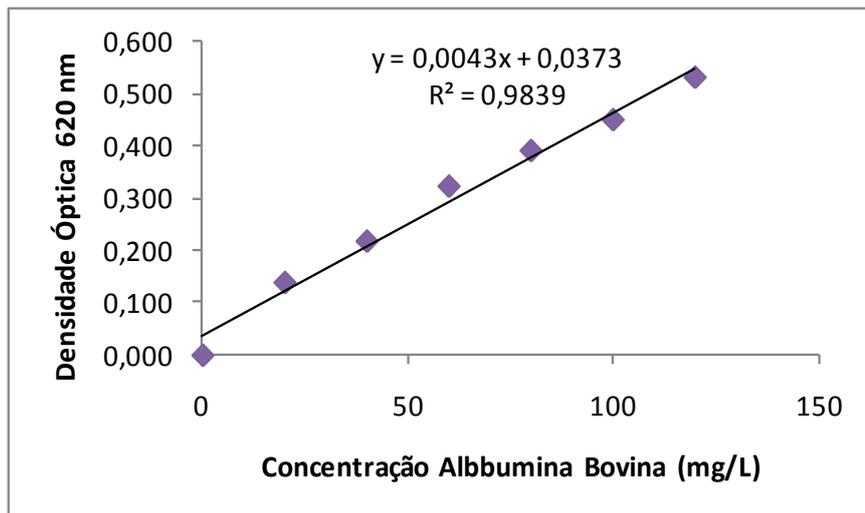


Figura 28. Curva padrão proteína.

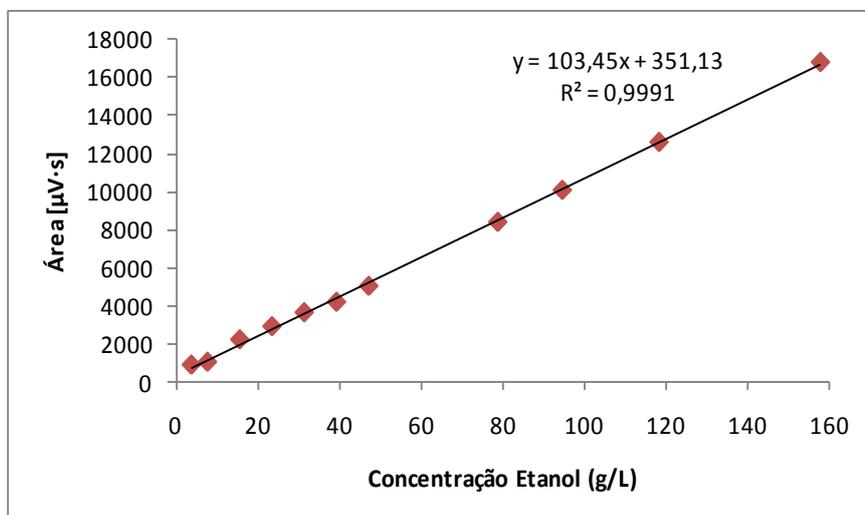


Figura 29. Curva padrão etanol.