

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM ENGENHARIA
QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

**ESTUDO DE CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E
ACÉTICA UTILIZANDO SUBPRODUTO LÁCTEO E DIFERENTES
LEVEDURAS**

KEITI LOPES MAESTRE

TOLEDO – PR - BRASIL
Março de 2017

KEITI LOPES MAESTRE

**ESTUDO DE CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E
ACÉTICA UTILIZANDO SUBPRODUTO LÁCTEO E DIFERENTES
LEVEDURAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em **Processos Químicos e Bioquímicos**.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Palú
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Mônica Lady Fiorese
Co-Orientador: Prof Dr. Edson Antônio da Silva

TOLEDO – PR - BRASIL
Março de 2017

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por todas as oportunidades, bênçãos e proteção. A minha mãe Aparecida, mulher guerreira a quem eu dedico cada conquista. Aos meus amáveis irmãos Kathia e Renan, que sempre me apoiam.

Ao Professor orientador Fernando Palú pela orientação e oportunidade.

A Professora co-orientadora Mônica Fiorese, pela orientação, paciência, apoio, compreensão, dedicação, atenção e amizade.

Ao Professor co-orientador Edson Antônio pela orientação, compreensão, atenção e oportunidade.

Ao meu namorado Andrei, pela paciência e amor.

Aos companheiros de laboratório Ana Cecília, Carol, Cleuciane, Fernanda R., Fernanda T., Kátia, Paula, Rafael e Tércio, pelo apoio e incentivo.

Aos alunos de iniciação científica Juliana S., Henan, Millene, Juliana C., Denise e Beatriz.

Ao Professor Reinaldo por todas as sugestões e contribuições.

Aos professores que participaram das bancas.

A Cris e Professor Silvio da agrícola pela ajuda.

Ao Frederico da Fundetec, pela ajuda na realização de análises.

A UTFPR Toledo, por toda ajuda.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A empresa SOORO Ingredientes Ltda pelas contribuições na pesquisa.

Enfim, ao término dessa etapa tão importante para minha formação de Mestre, quero agradecer de forma carinhosa àqueles que, direto ou indiretamente, contribuíram para seu desenvolvimento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
NOMENCLATURA	vii
RESUMO.....	6
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	10
1.2 Objetivos da pesquisa	12
1.2.1 Objetivo Geral	12
1.2.2 Objetivos específicos.....	12
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
PARTE I - CONTEXTUALIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA DO TEMA	13
2.1 Leite	13
2.2 Queijo.....	14
2.3 Soro de queijo	15
2.4 Permeado de soro de queijo	17
2.5 Aplicações do soro e permeado de soro de queijo em processos biotecnológicos.....	18
PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA APLICADA	24
2.6 Processos fermentativos	24
2.7 Fermentação alcoólica	25
2.8 Leveduras para a produção de etanol.....	27
2.8.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	27
2.8.2 <i>Saccharomyces</i>	30
2.8.2.1 <i>Saccharomyces boulardii</i>	30
2.9 Fermentação Acética	33
2.10 Bactérias acéticas	35
2.11 Processos de obtenção de vinagre	35
2.11.1 Método Orleans ou Lento	36
2.11.2 Método Rápido ou Alemão	37
2.11.3 Método Submerso	39

2.12 Vinagre	40
2.12.1 Pesquisas relacionadas a obtenção de vinagre	42
2.13 Justificativa da pesquisa.....	45
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Fermentação Alcoólica	47
3.1.1 Caracterização do permeado de soro de queijo em pó	47
3.1.2 Microrganismos, ativação celular e manutenção.....	48
3.1.3 Condições dos meios de cultura	48
3.1.3.1 Hidrólise enzimática do permeado para composição dos meios com <i>S. boulardii</i>	48
3.1.3.2 Preparo do pré-inóculo	49
3.1.3.3 Preparo do inóculo	49
3.1.3.4 Reatores – Fermentação Alcoólica	50
3.2 Fermentação Acética	54
3.2.1 Microrganismo, ativação celular e manutenção	54
3.2.2 Preparo do fermentado acético	55
3.2.3 Fermentação Acética pelo Método Orleans	55
3.2.4 Fermentação Acética pelo Método Orleans Modificado com adição de Oxigênio	56
3.2.5 Fermentação Acética pelo Método Orleans Modificado com agitação	57
3.3 Determinações analíticas empregadas nas fermentações alcoólicas e acéticas	58
3.3.1 Determinação do pH	58
3.3.2 Determinação da concentração celular	58
3.3.3 Determinação de açúcares redutores	60
3.3.4 Determinação de glicose	60
3.3.5 Determinação de etanol e ácido acético por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	60
3.3.6 Determinação do Oxigênio Dissolvido.....	61
3.4 Quantificação da redução de carga orgânica após processos fermentativos.	61
3.4 Tratamento de dados	62
3.4.1 Velocidade específica de crescimento celular	62

3.4.2 Fatores de conversão.....	62
3.4.2.1 Fator de conversão de substrato em etanol	62
3.4.2.2 Fator de conversão de substrato em célula.....	62
3.4.9.3 Produtividade	63
3.5 Análise estatística dos planejamentos experimentais	63
3.6 Caracterização do fermentado acético.....	63
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.1 Caracterização do permeado de soro de queijo em pó.....	64
4.2 Fermentação Alcoólica.....	66
4.2.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	66
4.2.1 <i>Saccharomyces boulardii</i>	76
4.3 Fermentação acética.....	85
4.4 Caracterização do fermentado acético.....	88
4.5 Análise do potencial de redução da carga orgânica após os processos fermentativos.....	89
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	92
CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÊNDICES.....	116
APÊNDICE A.....	117
APÊNDICE B.....	119
APÊNDICE C	121
APÊNDICE D	122
APÊNDICE E.....	123
ANEXOS	124
ANEXO A	125
ANEXO B	126
ANEXO C	127
ANEXO D	130
ANEXO E	131
ANEXO F.....	132
ANEXO G.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Produção de queijo no Brasil	15
Figura 2.2: Gerador de Vinagre utilizado no Processo Orleans	36
Figura 2.3: Gerador de Vinagre utilizado no Processo Rápido	38
Figura 2.4: Acetificador Frings em aço inoxidável utilizado no Processo Submerso	40
Figura 3.1: Reator utilizado nas fermentações alcoólicas	51
Figura 3.2: Fermentado Alcoólico	52
Figura 3.3: Fermentado Acético	56
Figura 3.4: Reatores utilizados na Fermentação Acética pelo método de Orléans.....	57
Figura 4.1: Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações verificadas no planejamento 2^3 para a levedura <i>K. marxianus</i> ao nível de significância de 90%	68
Figura 4.2: Resultado estatístico do planejamento experimental 2^3 para a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> – (a) resíduos em função dos valores preditos e (b) valores preditos por valores observados	70
Figura 4.3: Superfície de resposta para as variáveis: (a) pH e temperatura; (b) permeado e temperatura e (c) permeado e pH	71
Figura 4.4: Perfil cinético de produção de etanol (g.L^{-1}), concentração celular (g.L^{-1}), consumo de substrato (g.L^{-1}) e pH durante 45 horas de fermentação: (a) Ensaio 1 ($T = 29\text{ }^\circ\text{C}$; pH (4,5); [Permeado] = 100 g.L^{-1}) e (b) Ensaio 8 ($T = 45\text{ }^\circ\text{C}$; pH (6,5); [Permeado] = 300 g.L^{-1}), etanol (g.L^{-1}) (●), concentração celular (g.L^{-1}) (□), consumo de substrato (g.L^{-1}) (▨) e pH (▩)	72
Figura 4.5: Perfil cinético de produção de etanol (g.L^{-1}), concentração celular (g.L^{-1}), consumo de substrato (g.L^{-1}) e pH durante 45 horas de fermentação para o Ensaio 5 ($T = 29\text{ }^\circ\text{C}$; pH (4,5); [Permeado] = 300 g.L^{-1}) em que: etanol (g.L^{-1}) (●), concentração celular (g.L^{-1}) (□), consumo de substrato (g.L^{-1}) (▨) e pH (▩)	73
Figura 4.6: Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações verificadas no planejamento 2^3 para a levedura <i>Saccharomyces boulardii</i> para um nível de significância de 90%	78

Figura 4.7: Resultado estatístico do planejamento experimental 2 ³ para a levedura <i>Saccharomyces boulardii</i> – (a) resíduos em função dos valores preditos e (b) valores preditos por valores observados	80
Figura 4.8: Superfície de resposta para as variáveis: (a) pH e temperatura; (b) permeado e temperatura e (c) permeado e pH	81
Figura 4.9: Cinética de produção de etanol (g.L ⁻¹), concentração celular (g.L ⁻¹), consumo de substrato (g.L ⁻¹) e pH durante o processo fermentativo: (a) Ensaio 3 (T = 26°C; pH (6,0); [Permeado] = 100 g.L ⁻¹), (b) Ensaio 4 (T = 37°C; pH (6,0); [Permeado] = 100 g.L ⁻¹), (c) Ensaio 7 (T = 26°C; pH (6,0); [Permeado] = 300 g.L ⁻¹), (d) Ensaio 8 (T = 37 °C; pH (6,0); [Permeado] = 300 g.L ⁻¹), em que: etanol (g.L ⁻¹) (●), concentração celular (g.L ⁻¹) (◻), consumo de substrato (g.L ⁻¹) (◻) e pH (◻)	82
Figura 4.10: Concentração de ácido acético (g.100mL ⁻¹) obtido pelo Método Orleans durante os processos fermentativos: Ensaio 1: Fermentação alcoólica: <i>K. marxianus</i> e fermentação acética: <i>A. acetii</i> ; Ensaio 2: Fermentação alcoólica: <i>K. marxianus</i> e fermentação acética: “mãe do vinagre”; Ensaio 3: Fermentação alcoólica: <i>S. boulardii</i> e fermentação acética: <i>A. acetii</i> ; Ensaio 4: Fermentação alcoólica: <i>S. boulardii</i> e fermentação acética: “mãe do vinagre”	85
Figura 4.11: Concentração de ácido acético (g.100mL ⁻¹) obtido pelo Método Orleans Modificado com adição de oxigênio durante os processos fermentativos: Ensaio 5: Fermentação alcoólica: <i>K. marxianus</i> e fermentação acética: <i>A. acetii</i> ; Ensaio 6: Fermentação alcoólica: <i>K. marxianus</i> e fermentação acética: “mãe do vinagre”; Ensaio 7: Fermentação alcoólica: <i>S. boulardii</i> e fermentação acética: <i>A. acetii</i> ; Ensaio 8: Fermentação alcoólica: <i>S. boulardii</i> e fermentação acética: “mãe do vinagre”	86
Figura 4.12: Concentração de ácido acético (g.100mL ⁻¹) obtido pelo Método Orleans Modificado com agitação durante os processos fermentativos: Ensaio 9 Fermentação alcoólica: <i>K. marxianus</i> e fermentação acética: <i>A. acetii</i> ; Ensaio10: Fermentação alcoólica: <i>K. marxianus</i> e fermentação acética: “mãe do vinagre”; Ensaio 11: Fermentação alcoólica: <i>S. boulardii</i> e fermentação acética: <i>A. acetii</i> ; Ensaio 12: Fermentação alcoólica: <i>S. boulardii</i> e fermentação acética: “mãe do vinagre”	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição média do leite	14
Tabela 2.2: Composição média do soro de queijo	16
Tabela 2.3: Composição média do permeado de soro de queijo	18
Tabela 3.1: Caracterização do permeado de soro de queijo em pó	47
Tabela 3.2: Níveis e valores reais das variáveis empregadas no planejamento 2 ³ da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	53
Tabela 3.3: Níveis e valores reais das variáveis empregadas no planejamento 2 ³ da levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	53
Tabela 3.4: Matriz do planejamento fatorial 2 ³ para a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> , com valores reais e codificados para suas variáveis	54
Tabela 3.5: Matriz do planejamento fatorial 2 ³ para a levedura <i>Saccharomyces boulardii</i> , com valores reais e codificados para suas variáveis	54
Tabela 3.6: Diluição da suspensão celular para leituras de densidade óptica a 600 nm	59
Tabela 4.1: Caracterização do permeado de soro de queijo em pó	64
Tabela 4.2: Matriz do planejamento experimental 2 ³ com os valores reais das variáveis averiguadas e a resposta para o etanol (g.L ⁻¹) para a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> no tempo de 45 h de fermentação	67
Tabela 4.3: Estimativa dos efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas no planejamento experimental 2 ³ para a levedura <i>K. marxianus</i> no tempo de 45 h de fermentação	68
Tabela 4.4: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento 2 ³ para a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	69
Tabela 4.5: Concentração celular (ΔX), velocidade específica de crescimento (μ), consumo do substrato (ΔS), conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$), conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade para a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> em 45 h de fermentação	73
Tabela 4.6: Matriz de planejamento experimental 2 ³ com os valores reais das variáveis averiguadas e resposta para o etanol (g.L ⁻¹) para a levedura <i>Saccharomyces boulardii</i> no tempo de 45 h de fermentação	77

Tabela 4.7: Estimativa de efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas no planejamento experimental 2^3 para a levedura <i>Saccharomyces boulardii</i> em 45 h de fermentação	78
Tabela 4.8: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento 2^3 para a levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	79
Tabela 4.9: Concentração celular (ΔX), velocidade específica de crescimento (μ), consumo do substrato (ΔS), conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$), conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade para a levedura <i>Saccharomyces boulardii</i> em 45 horas de fermentação	83
Tabela 4.10: Concentração de etanol para os fermentados acéticos no início e final das fermentações	87
Tabela 4.11: Caracterização dos fermentados acéticos no final das fermentações.....	89
Tabela 4.12: Análise de DQO e DBO para a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	90
Tabela 4.13: Análise de DQO e DBO para a levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	90

NOMENCLATURA

μ_X	Velocidade específica de crescimento celular	(s ⁻¹)
μ_S	Velocidade específica de consumo do substrato	(s ⁻¹)
μ_P	Velocidade específica de geração de produto	(s ⁻¹)
μ_m	Máxima velocidade específica de crescimento	(s ⁻¹)
μ_m^P	Máxima velocidade de formação de produto	(s ⁻¹)
X	Concentração celular	(g.L ⁻¹)
X_0	Concentração inicial celular	(g.L ⁻¹)
S	Concentração do substrato	(g.L ⁻¹)
S_0	Concentração inicial do substrato	(g.L ⁻¹)
P	Concentração do produto	(g.L ⁻¹)
P_0	Concentração inicial do produto	(g.L ⁻¹)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em célula	(g.g ⁻¹)
$Y_{X/P}$	Fator de conversão de produto em célula	(g.g ⁻¹)
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto	(g.g ⁻¹)
t_g	Tempo	(h ⁻¹)
t_0	Tempo inicial	(h ⁻¹)
M	Massa Seca	(g)
V	Volume de amostra filtrada	(L)
R_i	DBO ou DQO inicial	(mg.L ⁻¹)
R_f	DBO ou DQO final	(mg.L ⁻¹)
C_1	Concentração inicial	(g.L ⁻¹)
C_2	Concentração final	(g.L ⁻¹)
V_1	Volume inicial	(L)
V_2	Volume final	(L)

ESTUDO DE CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E ACÉTICA UTILIZANDO SUBPRODUTO LÁCTEO E DIFERENTES LEVEDURAS

AUTORA: KEITI LOPES MAESTRE

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO PALÚ

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a MÔNICA LADY FIORESE

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTÔNIO DA SILVA

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defendida em 13 de março de 2017. 139 p.

RESUMO

A indústria láctea produz diariamente altos volumes de efluentes. Um dos subprodutos é o permeado de soro de queijo, que apresenta elevada carga orgânica, devido seu alto teor de lactose e sais minerais. No intuito de aplicar resíduos industriais e minimizar os impactos ambientais provocados por ele, busca-se por meio da biotecnologia obter novos produtos empregando estes subprodutos. Nessa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi produzir vinagre (fermentado acético), utilizando as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces marxianus* na etapa de fermentação etanólica, seguida de fermentação acética pelas bactérias acéticas *Acetobacter aceti* (cepa pura), e “mãe do vinagre” (cepa mista). A partir do permeado de soro de queijo foi aplicado um delineamento experimental fatorial 2^3 para cada levedura, para avaliar a produção de etanol. Com a melhor condição de formação de etanol para as leveduras, realizou-se 12 ensaios acéticos com as duas bactérias acéticas pelos Métodos: Orleans, Orleans Modificado com adição de oxigênio e Orleans Modificado com agitação. Para a *K. marxianus*, a maior produção de etanol, 56,52

g.L⁻¹, foi obtida para as seguintes condições de processo 29°C; pH (4,5) e 100 g.L⁻¹ de permeado, com a *S. boulardii* alcançou-se 69,43 g.L⁻¹ de etanol, na fermentação a 37°C; pH (6,0) e 300 g.L⁻¹ de permeado. Na etapa acética, obteve-se 4,34g.100mL⁻¹ de ácido acético para o ensaio oriundo da *K. marxianus* e fermentado aceticamente com a “mãe do vinagre” e 4,23 g.100mL⁻¹ para o ensaio da *K. marxianus* e *A. aceti*, todos fermentados pelo Método Orleans, os quais podem ser considerados vinagre, pois atingiram o previsto na legislação brasileira (4% de ácido acético). Assim, com o presente estudo verificou-se que é possível produzir vinagre e fermentado acético com o resíduo lácteo permeado de soro de queijo. Com isso obter novos produtos e reduzir os danos ambientais causados por ele devido à redução do seu potencial poluidor (DBO e DQO).

Palavras-chaves: permeado de soro de queijo; etanol; vinagre.

STUDY OF ALCOHOLIC AND ACETIC FERMENTATION CONDITIONS USING DAIRY BY-PRODUCTS AND DIFFERENT TYPES OF YEASTS

AUTHOR: KEITI LOPES MAESTRE

SUPERVISOR: PROF. DR. FERNANDO PALÚ

CO - SUPERVISOR: PROF^a DR^a MÔNICA LADY FIORESE

SUPERVISOR: PROF. DR. EDSON ANTÔNIO DA SILVA

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on March, 13th 2017. 139 p.

ABSTRACT

The dairy industry daily produces high volumes of effluents. One of these co-products is the cheese whey permeate, which presents high organic load due to its high lactose content and mineral salts. In order to reuse industrial waste and minimize the environmental impacts caused by it, new products are sought through the use of biotechnology and these by-products. In this perspective, the aim of this study is the production of vinegar (acetic fermented), using the yeast *Saccharomyces boulardii* and *Kluyveromyces marxianus* in the ethanolic fermentation step. Followed by acetic fermentation using the acetic bacteria *Acetobacter aceti* (pure strain), and the "mother of vinegar" (mixed strain). A 2³ factorial experimental design was applied to each yeast to evaluate ethanol production. Under the best ethanol yielding condition, 12 acetic assays were performed using two acetic bacteria by methods: Orleans, Modified Orleans with oxygen addition and Modified Orleans under stirring. The highest ethanol production for *K. marxianus* was found as 56.52 g.L⁻¹, carried out under 29°C, pH (4,5) and 100 g.L⁻¹ of whey permeate, where as *S. boulardii* reached 69,43 g.L⁻¹ of ethanol under 37°C; pH (6.0) and 300 g.L⁻¹ of permeate. In the acetic step, 4,34.100mL⁻¹ of acetic acid was obtained from *K. marxianus* and "mother vinegar",

and $4.23 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ for the *K. marxianus* and *A. aceti*, both fermented by the Orleans Method, which can be considered as vinegar once they reached the acetic acid content required by the Brazilian legislation (4% reached the acetic acid). Thus, over the present study it was verified that it is possible to produce vinegar and acetic fermented through the co-product cheese whey permeate, thereby obtaining new products and reducing the damages caused by it due to the reduction of its potential pollutant load (BOD and COD).

Key-words: cheese whey permeate; ethanol; vinegar.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

No segmento industrial de laticínios, durante as etapas de produção, são gerados resíduos na forma de efluentes líquidos, sólidos, e também emissões atmosféricas, os quais não havendo controle e mitigação, podem causar sérios impactos ambientais. À exemplo, a indústria láctea produtora de queijos, a qual é geradora do efluente líquido denominado de soro de leite ou queijo. Estima-se que 90% do volume de leite que entra nas queijarias para ser processado, saia na forma de soro de leite, e este é, considerado um efluente de alto teor nutricional, por ser rico em proteínas, lipídeos e lactose.

Em meados dos anos 90, surgiram as primeiras aplicações do soro, na forma de concentrado protéico de soro, o qual é obtido por filtração em membrana do tipo ultrafiltração. Os concentrados protéicos têm larga aplicação na fabricação de suplementos de elevado valor nutritivo e biológico, os denominados *Whey Protein* (WCP) e *Whey Protein Isolate* (WCPI), além disso, também é utilizado na forma de mix, para os setores de panificação, confeitaria e processamento de carnes, devido as suas propriedades de formação de espuma e gelificação.

Porém, no processo de obtenção do concentrado protéico, há novamente a geração de um efluente líquido, denominado de permeado de soro de leite ou de queijo ou então soro de leite desproteinizado. Este permeado tem características, em termos de composição e quantidade de nutrientes, semelhantes às contidas no soro de leite, possuindo cerca de 5% do total de sólidos presentes originalmente na matéria-prima (leite), sendo a lactose o composto predominante (70-90%), seguido por minerais (até 10%), além de outros sólidos solúveis em menores quantidades.

Assim, devido à composição do permeado de soro, serem semelhantes as já conferidas ao soro de leite, estão presentes neste efluente, e, portanto, conferindo-lhe elevada carga orgânica, passível de causar danos ambientais, se não tratado adequadamente. O que para o setor lácteo, em termos econômicos, é hoje um grande gargalo, dispendendo elevados valores para o seu tratamento.

Diante disso, estudos vêm estão sendo desenvolvidos, no intuito de reaproveitar o permeado de soro para a geração de produtos com valor agregado.

Alguns exemplos de aplicação são: suplementação alimentar em dietas de suínos (BERTOL *et al.*, 1996; EMBRAPA, 1996; HAUPTLI *et al.*, 2005) e bezerros (FONTES *et al.*, 2006), enriquecimento de bebidas (PELEGRINE & CARRASQUEIRA, 2008), bem como, em aplicações biotecnológicas para a produção de subprodutos tais como, etanol, butanol, hidrogênio, lipídios (EVANGELISTA, 2000; ZACARCHENCO *et al.*, 2012; HADIYANTO *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2014; HU & DICKSON, 2015; PESCUMA *et al.*, 2015; WOYENGO *et al.*, 2015), biomassa microbiana (TRIGUEIROS *et al.*, 2016), galacto-oligosacarídeos (PADILLA *et al.*, 2015), entre outros.

Do ponto de vista da biotecnologia, os processos fermentativos envolvendo leveduras ganham destaque em número de aplicações, nos quais são utilizados subprodutos de indústrias alimentícias, isso ocorre devido sua elevada eficiência em converter estes resíduos, em novos metabólitos com potencial de aplicação. Uma vez que, para o desenvolvimento do processo, é fundamental que a fonte de carbono disponível no substrato fermentativo esteja presente em grande quantidade, como é o caso do permeado de soro, constituído por cerca de 70 a 90% de lactose.

Uma alternativa viável de aplicação deste permeado de soro seria transformá-lo, por meio de processos biotecnológicos, em fermentado acético ou “vinagre”. Já que para Parrondo *et al.* (2003), o vinagre é, sem dúvida, um dos mais antigos produtos de fermentação utilizados pelo homem na alimentação.

Por definição da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), vinagre é o produto resultante de duas fermentações consecutivas: uma alcoólica utilizando leveduras, que converte qualquer fonte de carboidrato fermentescível (frutos, vegetais, xaropes, molasses, vinhos, etc.) em etanol, seguida de uma fermentação acética empregando bactérias acéticas, a qual converte o etanol em ácido acético, tendo ao final o produto principal, denominado de vinagre (FAO, 2016).

Neste contexto, a presente pesquisa objetiva o reaproveitamento do permeado de soro utilizando processos fermentativos (alcoólico e acético), visando obter ao final, um fermentado acético com características próximas ou iguais ao produto comercial vinagre.

1.2 Objetivos da pesquisa

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar condições de produção de fermentado acético, utilizando como matéria-prima o permeado de soro de queijo, e as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces marxianus* na etapa de fermentação alcoólica, com posterior conversão deste fermentado por bactérias do gênero *Acetobacter aceti* (cultura pura), e de um mix de bactérias popularmente conhecido como “mãe do vinagre”, no intuito de obter ao final, um fermentado acético com características similares ao vinagre comercial.

1.2.2 Objetivos específicos

- Na etapa da fermentação alcoólica para as duas leveduras estudadas, serão avaliados os efeitos da concentração de permeado de soro de queijo, pH e temperatura, por meio de um delineamento experimental do tipo fatorial 2³, tendo como resposta a produção de etanol;
- Avaliar a produção de fermentado acético, utilizando diferentes tipos de inóculos, *Acetobacter aceti* (cultura pura) e “mãe do vinagre” (mix de microrganismos), em três métodos diferenciados de produção: Orleans, Orleans Modificado com adição de oxigênio e Orleans Modificado com agitação;
- Caracterização dos fermentados acéticos em termos de demanda bioquímica e química de oxigênio, proteínas, cinzas, umidade, pH e teor de ácido acético, e comparar os valores obtidos com a legislação específica para bebidas;
- Quantificar-se-á a carga orgânica inicial presente no permeado de soro, e seu potencial de redução após as etapas de fermentação alcoólica e acética, por meio de medidas de demanda química e bioquímica de oxigênio.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo foi dividido em duas partes. Na primeira parte (I) denominada de Contextualização e importância do tema. Além disso, foram apresentadas as características gerais e informações sobre: leite, queijo, subprodutos soro e permeado de soro de queijo, e os estudos já desenvolvidos aplicando estes dois resíduos lácteo, esta parte fundamenta e justificava o desenvolvimento da presente pesquisa.

Na segunda parte (II) denominada de revisão bibliográfica aplicada. Foram abordados os assuntos que vão caracterizar de forma direta o objetivo desta pesquisa, sendo eles: processos fermentativos, leveduras e bactérias utilizadas na produção de fermentado alcoólico e acético, tipos e métodos utilizados em fermentações acéticas. Bem como, a importância da biotecnologia na conversão de resíduos da indústria láctea.

PARTE I - CONTEXTUALIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA DO TEMA

2.1 Leite

De acordo com a Instrução Normativa Nº 51 de 18 de setembro de 2002, Leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, com condições de higiene adequadas, de vacas sadias, descansadas e bem alimentadas. Dessa forma, quando citar-se o leite de outros animais deve referir-se na sequência à espécie do animal (BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998; BRASIL, 2002).

Baseado na Resolução nº 065/2005, define-se leite como o produto fresco e integral, segregado pelas glândulas mamárias de fêmeas sadias, com ordenha ininterrupta (SILVA, 1997; EVANGELISTA, 2000; BRASIL, 2005), em condições higiênico-sanitárias (EVANGELISTA, 2000), com cor, sabor, odor e consistência normais (SILVA, 1997; BRASIL, 2005). A caracterização do leite é descrita na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composição média do leite

Componente	% (p/v)*	Graus Dornic	g.mL ⁻¹
Gordura mínimo	3		
Acidez		14 a 18	
Densidade (15°C)			1,028 a 1,034
Cinzas	0,9		
Lactose mínima	4,3		
Proteína mínima	2,9		
Água	87,8		

* peso por volume

Fonte: Adaptado de Silva (1997); Gava (2002); Brasil (2005); Mohanty *et al.* (2016)

De modo geral, o leite possibilita a obtenção de derivados muito importantes, tais como, leites desnatados, fermentados, manteiga, doce de leite e queijos (BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998). A principal transformação do leite é na fabricação de queijos, sendo que neste processo, 90% dos constituintes iniciais do leite não são aproveitados. Assim, colocando as indústrias processadoras de lácteos como sendo um dos segmentos com maior geração de resíduos poluentes e, portanto, ocasionando problemas e elevados custos nas estações de tratamento de águas residuais (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001; YADAV *et al.*, 2015).

2.2 Queijo

Queijo é o produto fresco ou maturado obtido da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, integral, parcial, totalmente desnatado ou soro lácteo, pelo processo de coalhar. Este processo pode ser feito por ação física, enzimática, bactérias específicas ou ácidos orgânicos, e a massa do queijo podendo ter presença ou ausência de especiarias, condimentos, substâncias aromatizantes e matérias corantes (MAPA, 2005). Ao seu final, o queijo deve ter em torno de 48% de gordura, cerca de 23-25% de proteína de alto valor protéico (PERRY, 2004), sais minerais, cálcio, fósforo, além de carboidratos e vitaminas (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001; PERRY, 2004).

Segundo *United States Department of Agriculture* (USDA), a produção de queijo no Brasil, nos últimos 5 anos, aumentou aproximadamente 10,60 %, sendo publicado em 2015 uma produção de 751 mil toneladas (Figura 2.1) (USDA, 2016).

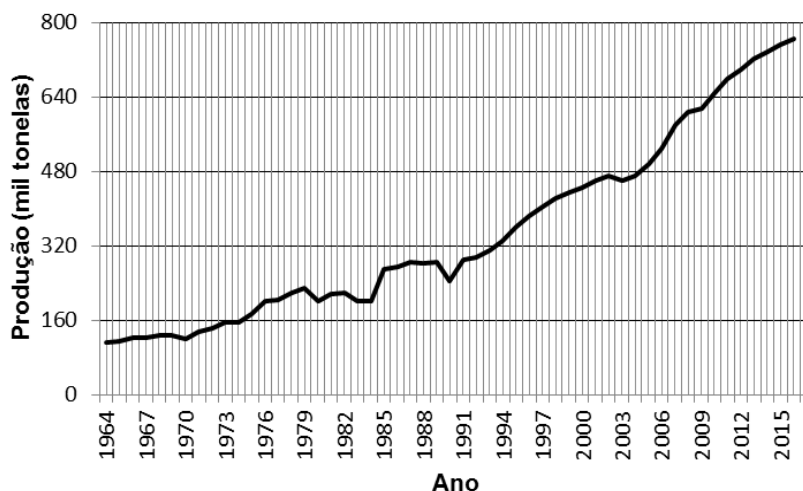


Figura 2.1: Produção de queijo no Brasil

Fonte: Brazil Dairy (2015).

Para Teixeira & Fonseca (2008) e Yorgun *et al.* (2008), em termos de volume, e em função das técnicas utilizadas na produção de queijos, este processo pode gerar proporções de resíduo, no caso do soro, em torno de 85-90% do volume de leite utilizado inicialmente, restando ao final, 55% dos nutrientes do leite (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Ou seja, dependendo do produto (requeijão, *quark*, *cottage*, minas frescal, minas padrão, mussarela, prato, colonial, entre outros), são gerados de 9 a 12 litros de soro, com uma média de 10 litros para cada quilograma de queijo produzido (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001; HADIYANTO *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2015), assim, totalizando em 2015, portanto um volume de 7,51 bilhões de litros de soro.

2.3 Soro de queijo

O soro de queijo também é conhecido por soro de leite, lactossoro, ou ainda no âmbito do setor de lácteos, denominado apenas de soro (BARBOSA *et al.*, 2010; PRAZERES *et al.*, 2012; ZACARCHENCO *et al.*, 2012). Ele tem suas características dependentes da origem animal, reprodução, do tipo de leite, bem como da alimentação, saúde e higiene durante o processo de ordenha, sendo basicamente constituído por água, lactose, proteínas, sais minerais, ácido lático e gorduras (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001; PRAZERES *et al.*, 2012), conforme Tabela 2.2, além dos componentes em menores proporções, tais como, ácido cítrico, ureia e vitaminas (PRAZERES *et al.*, 2012).

Tabela 2.2: Composição média do soro de queijo

Componentes	% (v/v)*	% (p/v)**
Lactose		5
Proteínas		0,8 – 1
Minerais		0,5 – 1
Gorduras		0,06 – 0,6
Água	93	-

* volume por volume; ** peso por volume.

Fonte: Adaptado de Ghaly & Bemssan (1995); Talabardon *et al.* (2000); Giroto & Pawlowsky (2001); Gava (2002); Coté *et al.* (2004); Serpa *et al.* (2009); Barbosa *et al.* (2010); Prazeres *et al.* (2012); Hadiyanto *et al.* (2014); Gabardo *et al.* (2015)

Devido sua composição, o soro de queijo tem como característica determinante ser de natureza altamente perecível, o que ocasiona problemas práticos e econômicos, principalmente no que se referem à poluição ambiental de rios, esgotos e oceanos. Esta rápida degradabilidade deve-se à grande presença de lactose e proteínas, constituintes estes, facilmente utilizados como substrato pelas mais variadas espécies de microrganismos (TALABARDON *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2010; PRAZERES *et al.*, 2012; ZACARCHENCO *et al.*, 2012; HADIYANTO *et al.*, 2014; GABARDO *et al.*, 2015; MOHANTY *et al.*, 2016).

O soro de queijo possui expressivos valores em termos de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), apresentando faixas de 60 a 80 g.L⁻¹ e 50 a 102 g.L⁻¹, respectivamente (GAVA, 2002; SERPA *et al.*, 2009; PRAZERES *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015; HUGO *et al.*, 2016).

Embora a maioria das indústrias lácteas, principalmente as de pequeno e médio porte, considere o soro de queijo apenas como um resíduo, o mesmo devido sua composição nutricional, já comprovou ter grande potencial de aplicação no desenvolvimento de novos produtos com elevado valor agregado, (PRAZERES *et al.*, 2012; ZACARCHENCO *et al.*, 2012; HADIYANTO *et al.*, 2014; GABARDO *et al.*, 2015). Dentre as aplicações, podem-se citar concentrados protéicos por processos fermentativos, elaboração de novos alimentos e bebidas, além de metabólitos para indústrias de alimentos e produtos farmacêuticos, como o ácido láctico e polissacarídeos, entre outros (PESCUMA *et al.*, 2015), produção

de biocombustíveis, polímeros biodegradáveis e bioetanol (YADAV *et al.*, 2015), minimizando assim, os efeitos ambientais causados pelo descarte indevido do soro (SERPA *et al.*, 2009; YADAV *et al.*, 2014; PESCUMA *et al.*, 2015; YADAV *et al.*, 2015).

Na atualidade, e com aplicações já em escala industrial, a alternativa mais rentável de uso e transformação do soro é a obtenção de concentrados protéicos. Neste processo de concentração, aplica-se a tecnologia de filtração por membranas, sendo a ultrafiltração a resultante para este processo, onde ao final tem-se um retentado composto por proteínas, gordura e minerais coloidais, e um permeado líquido (LAGRANGE & DALLAS, 1997; ZACARCHENCO *et al.*, 2012). Para a produção de 1 Kg de permeado são necessários aproximadamente 26 Kg de leite (RUSSO, 2016),

Dados informados pela empresa SOORO Ingredientes mostram que para cada quilograma de concentrado protéico produzido, gera-se em torno de 3 Kg de permeado. Já a elaboração de concentrado protéico com 80 % de proteínas em sua composição libera para cada 1 Kg produzido em torno de 8 Kg de permeado. Logo, a geração de permeado depende do teor protéico que se almeja como produto final. Mas de qualquer forma, são quantidades elevadas em termos de custo para o tratamento deste, se apenas considerado como um efluente líquido industrial (SOORO Ingredientes Ltda 2016).

2.4 Permeado de soro de queijo

O permeado de soro de queijo ou de leite, ou comumente denominado apenas de permeado, é constituído por nutrientes importantes, como lactose, minerais, proteína (MOULIN & GALZI, 1984; ZACARCHENCO *et al.*, 2012; HU & DICKSON, 2015; WOYENGO *et al.*, 2015; SOORO Ingredientes Ltda 2016), além de macro e micronutrientes, como vitaminas (HU & DICKSON, 2015; HUGO *et al.*, 2016). Conforme pode ser visualizado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Composição média do permeado de soro de queijo

Componente	(mg.100 g⁻¹)	% (p/p)
Lactose		70 – 90
Sais Minerais		4 – 20
Proteínas		0,5 – 5
Gorduras		<0,1 – 2
Cálcio	500	
Sódio	434	
Fósforo	470	
Manganês	90	
Potássio	40	
Zinco	30 – 33	
Ferro	3 – 11	
Cobre	1 – 3	
Vitamina A	80	
Riboflavina (B ₂)	15 – 20	
Piridoxina (B ₆)	5 – 10	
Tiamina (B ₁)	5 – 6	
Cobalamina (B ₁₂)	0,02 – 0,05	
Vitamina C	20 – 40	
Pantotenato de cálcio (B ₅)	50 – 60	
Biotina (B ₈)	0,1 – 0,3	

Fonte: Adaptado de Moulin & Galzi (1984); Talabardon *et al.* (2000); Prazeres *et al.* (2012); Zacarchenco *et al.* (2012); Hu & Dickson, (2015); Woyengo *et al.* (2015); Gabardo *et al.* (2016); Sooro Ingredientes Ltda (2016)

Segundo a empresa SOORO Ingredientes Ltda., e relato por Russo (2016), o permeado tem diversas aplicações, tais como, suplemento alimentar, ração animal, confeitaria, panificação, lácteos, salgadinhos, entre outras aplicabilidades. Entretanto, o seu valor comercial é baixo, sendo comercializado a R\$ 2,20 o quilograma de permeado em pó. Diante disso, pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de agregar valor ao permeado de soro, dentre estas, a principal aplicação envolve processos fermentativos (ZACARCHENCO *et al.*, 2012).

2.5 Aplicações do soro e permeado de soro de queijo em processos biotecnológicos

Estima-se que aproximadamente 50% do total de soro de queijo e permeado são utilizados em processos biotecnológicos (COTÉ *et al.*, 2004; PRAZERES *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2015), dentre os

quais destacam-se a fermentação para a obtenção de etanol (DOMINGUES *et al.*, 1999; KOURKOUTAS *et al.*, 2002; COTÉ *et al.*, 2004; ZAFAR & OWAIS, 2006; OZMIHCI & KARGI, 2007-a; OZMIHCI & KARGI, 2007-b; DRAGONE *et al.*, 2009; SANSONETTI *et al.*, 2009; BACH *et al.*, 2014; GABARDO *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015; GABARDO *et al.*, 2016), biopolímeros, hidrogênio, metano, proteína unicelular e probióticos (YADAV *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2015, TRIGUEIROS *et al.*, 2016).

Assim, devido à vasta gama de aplicações do soro e permeado de soro de queijo, a seguir foram apresentados os resultados de algumas pesquisas envolvendo aplicações biotecnológicas e uso destes como matérias-primas.

Sachdeva *et al.* (2014) avaliaram o uso de leites fermentados enriquecidos com proteínas do soro de leite como terapia complementar no tratamento de doenças crônicas de gastrite oriundas de *Helicobacter pylori*. Os autores concluíram que a lactoférrica bovina apresenta efeito benéfico na erradicação da *Helicobacter pylori* em organismo humano, embora acreditem que novos estudos (práticos) devam ser desenvolvidos.

A produção de biomassa microbiana foi estudada por Assunção (2014) em meio contendo permeado de soro de queijo suplementado com sais (sulfato de amônio, sulfato de magnésio e fosfato monobásico de potássio) e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (S.c), *Saccharomyces boulardii* (S.b) e *Kluyveromyces marxianus* (K.m). Neste estudo, as maiores produções de biomassa foram de 14,22 g.L⁻¹ (30°C, 150 g.L⁻¹ de permeado, pH (4,0), 26 h), 22,85 g.L⁻¹ (30°C, 150 g.L⁻¹ de permeado, pH (5,5), 24 h) e 15,70 g.L⁻¹ (30°C, 150 g.L⁻¹ de permeado, pH (4,0), 26 h), para a S.c, S.b e K.m, respectivamente. Todos os ensaios realizados pelo autor foram conduzidos sob agitação de 100 rpm. Ao final dos cultivos, o autor realizou análises de DQO e DBO do meio e concluiu que a produção de biomassa com permeado de soro reduziu a DQO em 69,31; 97,67 e 83,53%, respectivamente para as leveduras estudadas, assim como também reduziu a DBO em 97,19 % (S.c), 99,53% (S.b) e 93,14% (K.m), tornando o efluente gerado após os cultivos facilmente tratável e com menores custos, além de obter um novo produto, a proteína de origem microbiana.

Nadai (2015) e Trigueiros *et al.* (2016), utilizando a levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* em sistema descontínuo com meio de cultivo formulado com permeado de soro de leite e sais (sulfato de amônio, sulfato de magnésio e

fosfato monobásico de potássio), objetivando a produção de biomassa microbiana probiótica, atingiram valores de 40,06 g.L⁻¹ com 180 g.L⁻¹ de permeado, a 30 °C, pH (5,5) e a 100 rpm (NADAI, 2015), e 10,00 g.L⁻¹ (30 °C, pH (5,5) e a 100 rpm) com 145 g.L⁻¹ de permeado (TRIGUEIROS *et al.*, 2016). Ambos os estudos apontaram que é possível à produção de biomassa microbiana probiótica de *S. boularii* a partir do subproduto permeado de soro, sendo esta uma aplicação lucrativa e diferencial para as empresas geradoras deste resíduo.

A produção de proteína microbiana a partir de soro de leite e cultura mista de leveduras, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida krusei*, além do potencial de remoção de carga orgânica após os cultivos foram avaliados por Yadav *et al.* (2014). Em 24 h, alcançaram produtividade máxima de proteína microbiana de 0,38 g.L⁻¹h⁻¹, com 34% de remoção de DQO em 6 h. Os autores concluíram que é possível trabalhar com cultura mista, e melhorar a eficiência de remoção de carga orgânica em temperaturas maiores (40°C) e pH baixos (3,5), obtendo produtividade ao final uma produção de proteína microbiana na faixa de 0,17 a 0,31 g.L⁻¹h⁻¹.

Os mesmos autores (YADAV *et al.*, 2015) também avaliaram a transformação do soro de queijo em bioproteínas, as chamadas proteínas funcionais e seus peptídeos. Nesse estudo, foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus*, sendo que os autores concluíram que há possibilidade de produção de bioproteínas, pois o processo apresenta vantagem tanto pelo emprego do resíduo quanto pela produção de proteínas funcionais.

Padilla *et al.* (2015) estudaram a obtenção de oligossacarídeos de lactose por meio da isomerização de transgalactosilação do permeado de soro de queijo pela enzima β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Os resultados mostraram que com 6 h de reação em pH (6,5), temperatura de 50°C e 250 g.L⁻¹ de permeado de soro, foram obtidos 50 g.100 g⁻¹ de carboidratos totais, correspondendo a 322 g de prebióticos por Kg de permeado de soro de leite. Fato que aguçou o interessante da indústria alimentar, devido à aplicabilidade do subproduto da indústria láctea, bem como ao valor agregado ao produto obtido.

O mesmo assunto foi pesquisado por Vasileva *et al.* (2016), que promoveram a hidrólise da lactose do soro de leite utilizando a β-galactosidase (*Kluyveromyces lactis*) na forma imobilizada e em condições de processo de 40°C; pH (6,8) e 10 h de reação. Os autores obtiveram atividade enzimática de

13,6 U. Assim, eles concluíram que a hidrólise com enzimas na forma imobilizada é 16 vezes mais eficiente quando comparada com a hidrólise enzimática tradicional.

Hugo *et al.* (2016) utilizaram permeado de soro contendo galactooligosacarídeos como meio de cultivo para a obtenção de biomassa microbiana de *Lactobacillus plantarum* em temperatura de 37°C, pH (4,5), agitação de 150rpm e 10 g enzima (β -galactosidase). Posteriormente ao cultivo, foi realizada a secagem por atomização em spray drying. Os autores obtiveram como maior produção de biomassa microbiana 27,40 g por cada 100 g de lactose utilizada na formulação do meio.

Além disso, o soro de leite também é aplicado a fim de reduzir custos de produção dos polihidroxialcanoatos (PHAs), polímeros considerados 100% biodegradáveis, os quais vêm sendo avaliados como uma alternativa para substituir plásticos oriundos da petroquímica (MARANGONI *et al.*, 2002; ZORTÉA *et al.*, 2013).

Nessa perspectiva, Marangoni (2000) estudou a produção de PHAs empregando como substrato (fonte de carbono) o soro de leite para o crescimento da bactéria *Ralstonia eutropha*, atualmente denominada de *Cupriavidus necator*. Uma velocidade específica máxima de crescimento de 0,20 h⁻¹ foi obtida, com isso, verifica-se que a bactéria metabolizou a lactose presente no substrato. Tal fato evidencia que o soro de leite pode ser uma alternativa renovável e viável de substrato para a obtenção de PHAs. Em outro estudo Marangoni *et al.* (2002) averiguaram o crescimento de *R. eutropha* em lactose hidrolisada e soro de leite, e concluíram que a bactéria foi capaz de se desenvolver muito bem em ambos substratos aplicados.

Zortéa *et al.* (2013) também investigaram a produção de PHAs em diferentes fontes renováveis de substrato, tais como soro de queijo, óleo de soja e bagaço de mandioca, com a bactéria *Cupriavidus necator*. Nesse estudo, os autores concluíram que todas as fontes estudadas podem ser utilizadas como substrato para o crescimento de *C. necator*, pois verificaram que não houve resultados significativamente diferentes, entre as fontes de carbono.

Hassemer *et al.* (2015), objetivando a obtenção de polihidroxibutirato (P3HB), cultivaram *Bacillus megaterium* em substrato permeado de soro (condições de cultivo: 30°C, 180 rpm por 36 h) e obtiveram em 20 h de processo,

uma concentração celular de $4,80 \text{ g.L}^{-1}$ com 23 g.L^{-1} de permeado como fonte de carbono.

Além destes, outros trabalhos abrangendo a produção de PHAs com resíduos lácteos também foram reportados (YELORRE & DESAI, 1998; POLOVO & CASELLA, 2003; KOLLER *et al.*, 2007; NATH *et al.*, 2007; KOLLER *et al.*, 2008; OBRUCA *et al.*, 2011).

Barbosa *et al.* (2010) verificaram a elaboração de aguardente empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, soro de queijo de coalho acrescido de 100 g.L^{-1} de sacarose como substrato, em pH (4,6), a 30°C e 24 h de cultivo e obtiveram como resultado, $7,33 \text{ }^\circ\text{GL}$ de etanol. Com o estudo, os autores concluíram que a levedura (*S. cerevisiae*) mostrou-se eficiente para a produção de etanol (aguardente) em resíduo lácteo.

Dragone *et al.* (2009) estudaram a obtenção de compostos voláteis a partir da fermentação de soro de leite aplicando a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus*. As maiores produções obtidas foram de álcool isoamílico, isobutírico e 1-propanol, sendo, os valores de 887 , 542 e 266 mg.L^{-1} , respectivamente. Concluiu-se então, que o uso de soro de leite na produção de compostos voláteis por processos fermentativos contínuos é uma alternativa viável de agregação de valor a este subproduto.

Espinosa-Gonzalez *et al.* (2014) pesquisaram a produção de biocombustível por microalgas utilizando a espécie *Chlorella protothecoides* e permeado de soro de leite em um sistema descontínuo, mantido em temperatura fixa de 30°C , agitação de 200 rpm e tempo de cultivo de 24 h. Ao final do processo, obtiveram $9,10 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa celular, com um acúmulo interno de lipídeos totais de 42% (base seca). Os resultados mostraram que a matéria-prima utilizada apresentou grande potencial de aplicação em tecnologias de cultivo de algas para produção de biocombustíveis.

Bach *et al.* (2014) avaliaram a influência da temperatura, agitação, concentração de enzima e de glicose durante a produção de bioetanol de soro de leite *in natura* a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram obtidos 6,41% (v/v) de etanol em 59 h de fermentação nas seguintes condições 28°C , 100 rpm, 0,05% de enzima lactase, 65 g.L^{-1} de sacarose e pH ($\approx 6,00$). Constata-se que, além da obtenção de etanol, foi possível reduzir a carga orgânica deste resíduo lácteo, pela redução de 73,8% para a DBO e 75% para a DQO.

Ferreira *et al.* (2015) investigaram condições de processo para otimização da produção de etanol pela levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* em uma mistura de bagaço de cana e soro de ricota. Os resultados foram avaliados em termos de concentração de etanol, concentração de celulase, concentração de biomassa celulósica, pH, temperatura e agitação. O melhor ensaio obteve rendimento de etanol de 49,65 g.L⁻¹, concentração de celulase 20,50 FPU, biomassa celulósica de 80 g.L⁻¹, pH (5,05), agitação a 65 rpm e temperatura de 39,2°C. Os autores verificaram que esta mistura pode ser promissora para a produção de etanol, pois o rendimento foi superior ao etanol de 2^o geração, produzido apenas com bagaço de cana.

Gabardo *et al.* (2014) estudaram a bioconversão de permeado de soro de leite em etanol pela *Kluyveromyces marxianus*. A maior produtividade de etanol para o meio de cultivo nas condições: 60 g.L⁻¹ permeado de soro, 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ peptona bacteriológica, agitação de 150 rpm, 30°C e pH (7,0) foi de 1,15 g.L⁻¹h⁻¹, enquanto que, para o ensaio desenvolvido em biorreator de leite fluidizado, com células imobilizada em alginato de cálcio, permeado puro a 60 g.L⁻¹, 30°C e pH (7,0), a maior produtividade de etanol foi 2,53 g.L⁻¹h⁻¹.

Em outro trabalho Gabardo *et al.* (2016) averiguaram a obtenção de etanol em biorreatores de leite fluidizado a partir de soro e permeado de soro de leite, empregando a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* e a não industrial *Kluyveromyces marxianus*. As duas leveduras converteram substrato em etanol na faixa de 0,47 a 0,49 g.g⁻¹, com produtividade de 1,39 a 1,68 g.L⁻¹h⁻¹ em soro e permeado de soro, respectivamente. A maior produtividade (1,68 g.L⁻¹h⁻¹) foi alcançada pela *K. marxianus* em permeado na concentração de 180 g.L⁻¹; nesta condição, o rendimento foi de 0,46 g.g⁻¹ e 79,1 g.L⁻¹ de etanol. Para os autores, a *K. marxianus* mostrou-se mais eficiente para a produção de etanol quando comparada com a *S. cerevisiae*, devido a esta levedura não necessitar de uma etapa adicional no processo, no caso a hidrólise da lactose.

O mesmo assunto foi pesquisado por Hadiyanto *et al.* (2014) quando avaliaram tanto a produção de biomassa quanto a produção de etanol a partir do soro do queijo contendo 4,1% de lactose e 0,1% de extrato de levedura, com a levedura *Kluyveromyces marxianus*, e fermentações conduzidas em sistema de batelada alimentada. Os melhores resultados para a concentração de biomassa e

etanol foram de 13,40 g.L⁻¹ e 7,96 g.L⁻¹ em ensaio desenvolvido em pH (4,5) e 30°C em 10 h de fermentação.

Tang *et al.* (1988) analisaram a obtenção de ácido acético a partir da lactose do soro de leite por *Streptococcus lactis* e *Clostridium formicoaceticum*. O teor de ácido acético atingido foi de 20 g.L⁻¹ em 20 h de fermentação, para o ensaio conduzido a 35°C e pH (7,6). Os autores observaram que a lactose do soro pode ser convertida em ácido acético em média em 30 h de cultivo com esta cultura mista.

Diante do exposto, verifica-se que são inúmeras as possibilidades de uso dos subprodutos soro e permeado de soro em processos biotecnológicos, principalmente os que empregam metabolismos fermentativos, o que possibilita que as indústrias geradoras tenham alternativas viáveis de transformação e aplicação destes resíduos. Concomitante, reduzindo os efeitos ambientais provocados por eles, e ou, custos necessários para o seu tratamento, se forem considerados apenas efluentes.

PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA APLICADA

2.6 Processos fermentativos

Para Amorim & Leão (2005), “o verbo fermentar é derivado da palavra “*fervere*” que significa ferver ou efervescer”, sendo que Louis Pasteur foi o primeiro cientista a mostrar que a fermentação é diretamente provocada pelo processo vital de pequeninos organismos (SHREVE, 1997).

Em microbiologia industrial, o termo fermentação se refere ao processo microbiano, seja ele ou não, bioquimicamente uma fermentação. A fermentação propriamente dita ocorre num recipiente denominado de fermentador, onde o microrganismo é o agente promotor da fermentação, uma vez que, em condições favoráveis, inicia sua multiplicação e crescimento celular (GAVA, 2002; SPINOSA, 2002).

O processo de fermentação pode ser realizado com substratos oriundos de matérias-primas orgânicas complexas até compostos mais simples (BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998; AMORIM & LEÃO, 2005), os quais, dependendo do tipo de microrganismo (leveduras, bactérias e fungos) e

condições de processo, possibilitam a geração de inúmeros produtos, sejam estes metabólitos ou elevação de massa celular (GAVA, 2002; SPINOSA, 2002).

Shreve (1997) ainda acrescenta que, em um processo fermentativo, não se pode esquecer os fatores que são considerados críticos, tais como, pH, temperatura, aeração, agitação e a cultura pura de microrganismo, para que o mesmo obtenha, ao final, sua melhor conversão e máxima eficiência (CARVALHO & SATO, 2001; PALMA *et al.*, 2001; SPINOSA, 2002; BACH, 2012).

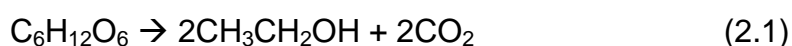
Dentre os processos fermentativos existentes, têm-se os que promovem a conversão de matérias-primas em ácido acético para a produção de vinagre. Sendo que para este fenômeno ocorrer, dois processos bioquímicos, ambos resultantes da ação de microrganismos, se fazem necessários (PALMA *et al.*, 2001; AMORIM & LEÃO, 2005).

De forma geral, o primeiro ocorre quando a fermentação é conduzida sem adição de oxigênio (anaeróbia) e por ação de leveduras sob matérias-primas açucaradas e amiláceas, denominado de alcoólica. O segundo processo é a fermentação acética - oxidativa, desenvolvida por bactérias obrigatoriamente aeróbias, em destaque o gênero *Acetobacter*, sob matérias-primas alcoólicas (BORZANI *et al.*, 2001; SACHS, 2001; PARRONDO *et al.*, 2003; AMORIM & LEÃO, 2005; SAKURAI *et al.*, 2013; FAO, 2016).

2.7 Fermentação alcoólica

Segundo Shreve (1997) e Lima *et al.* (2001), a fermentação alcoólica surgiu com os povos primitivos a milhares de anos. Evoluiu com a ciência que está em contínuo desenvolvimento de pesquisas, consistindo em um processo no qual, açúcares solúveis são transformados em etanol como produto principal (GAVA, 2002).

Por definição, a fermentação alcoólica é um processo anaeróbio para produção de energia, com degradação de carboidratos, formação de etanol e dióxido de carbono (BORZANI *et al.*, 2001). A equação geral da fermentação alcoólica foi definida por Gay Lussac, conforme Reação (2.1):



Na fermentação alcoólica, as leveduras são os microrganismos utilizados (BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998; BORZANI *et al.*, 2001; SACHS, 2001), e estas devem apresentar, como característica principal excelente capacidade para produção e resistência ao etanol. Entretanto, para isso, deve-se considerar fatores como pH, concentração de substrato e temperatura, nos quais melhor se adapte cada espécie, e também que gere o menor número de interferentes (HASHIZUME, 2001; GAVA, 2002; HADIYANTO *et al.*, 2014).

É válido ressaltar que, neste tipo de fermentação, além do etanol e dióxido de carbono, também são gerados produtos secundários, tais como, glicerol, ácido succínico, outros álcoois superiores, além de ácidos orgânicos (EVANGELISTA, 2000; BORZANI *et al.*, 2001; SACHS, 2001; SPINOSA, 2002), os quais, dependendo das condições empregadas no processo, podem fazer com que a levedura, gere-os em maior ou menor quantidade.

No que se refere à temperatura, tem-se que, em temperaturas muito baixas, há pouca produção de etanol, enquanto temperaturas muito elevadas propiciam a perda por evaporação, bem como, afetam as fermentações paralelas, às quais produzem os compostos secundários (HASHIZUME, 2001; GAVA, 2002; BACH, 2012); portanto, usualmente são empregadas as temperaturas intermediárias, entre 26 a 35°C, para se obter alto rendimento de etanol (EVANGELISTA, 2000; GAVA, 2002).

Para Gava (2002), o pH deve ser em torno de (4,5), uma vez que, o pH assim como a temperatura, é um interferente no meio fermentativo, que pode favorecer a produção de compostos secundários, bem como afetar o crescimento celular. Hashizume (2001) acrescenta ainda, que fermentações alcoólicas conduzidas em meios ácidos favorecem a produção, implicando em maiores rendimentos de etanol.

Em relação à matéria-prima (substrato), os processos fermentativos podem ser classificados como simples ou complexos, dependendo do tipo de substrato empregado, tais como, celulose, pectina, açúcares, melaços (residual), resíduos agroindustriais como palhas, cascas, bagaços (GAVA, 2002), milho, cana-de-açúcar, trigo, entre outros (LIMA *et al.*, 2001).

Além disso, para uma boa fermentação alcoólica, é imprescindível que o mosto contenha substâncias que sejam nutritivas e que promovam o desenvolvimento das leveduras, como substâncias nitrogenadas que são

indispensáveis, por exemplo, para a levedura de vinificação. Também faz necessário o controle da quantidade de oxigênio disponível no meio, devendo este ser mantido em quantidades mínimas, ou até mesmo, isento deste componente, pois o excesso de oxigênio irá promover como produto principal o crescimento celular (biomassa) em detrimento à produção de etanol (HASHIZUME, 2001; LIMA *et al.*, 2001; GAVA, 2002).

2.8 Leveduras para a produção de etanol

Como já mencionado, as leveduras, as quais são fungos unicelulares (GAVA, 2002), são os microrganismos preferidos para os processos em que se objetiva a produção de etanol. Os mais usualmente empregados são cepas do gênero *Saccharomyces* e suas subespécies, tendo destaque à subespécie *S. cerevisiae*. O outro gênero de leveduras que vêm sendo aplicado com grande potencial é o *Kluyveromyces*, com destaque a subespécie *K. marxianus*.

Estudos visando à produção de biomassa microbiana probiótica (MULLER, 2006; MULLER *et al.*, 2007; DU *et al.*, 2011; ASSUNÇÃO, 2014; NADAI, 2015; FIORESE *et al.*, 2015; TRIGUEIROS *et al.*, 2016) apontaram a levedura *Sacchomyces boulardii* com potencial para a produção de etanol, devido sua resistência em concentrações elevadas deste metabólito (DU *et al.*, 2011).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* tem sido estudada na produção de etanol por ter resistência a elevadas temperaturas de processo, e também por utilizar substratos lácteos, além de outros açúcares de forma direta, não necessitando de prévia hidrólise dos mesmos (COTÉ *et al.*, 2004; HADIYANTO *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016).

2.8.1 *Kluyveromyces marxianus*

A levedura *Kluyveromyces marxianus* foi descoberta e descrita por E. C. Hansen, após ser isolada da uva, sendo denominada inicialmente de *Saccharomyces marxianus* por apresentar características semelhantes às do gênero *Saccharomyces* (FONSECA *et al.*, 2008).

Em 1956, foi relatado um novo gênero denominado *Kluyveromyces*. Observou-se que as leveduras *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces*

fragilis e *Saccharomyces lactis* apresentavam capacidade de metabolizar diferentes açúcares que as demais leveduras do gênero *Saccharomyces*, assim estas leveduras passaram a fazer parte do novo gênero, sendo então denominadas de *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis* (FONSECA *et al.*, 2008).

A temperatura ótima dessa levedura é mais alta do que a das demais (FONSECA *et al.*, 2008; YADAV *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016), podendo fermentar em temperaturas de 30 a 45°C (HADIYANTO *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2014), sendo conhecida como uma levedura termotolerante (FONSECA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2015; NACHAIWIENG *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016). Além disso, é classificada como uma levedura facultativa em termos de necessidade do componente oxigênio (FERREIRA *et al.*, 2015; NACHAIWIENG *et al.*, 2015; YADAV *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016), o pH mais empregado encontra-se na faixa de (4,5) a (6,5) (FERREIRA *et al.*, 2015; NACHAIWIENG *et al.*, 2015).

Seu grande destaque com certeza é o fato de diferente das leveduras do gênero *Saccharomyces* como mencionado, metabolizar de forma direta a lactose presente nos subprodutos da indústria láctea, o que tem motivado inúmeras pesquisas para as mais diversificadas aplicações (SILVEIRA *et al.*, 2005; GABARDO *et al.*, 2014; HADIYANTO *et al.*, 2014; TOFALO *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2014; NACHAIWIENG *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016; YADAV *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2017).

Estudos envolvendo *Kluyveromyces marxianus* e os resíduos lácteos soro e/ou permeado de soro para a produção de etanol já foram desenvolvidos por Coté *et al.* (2004); Silveira *et al.* (2005); Sansonetti *et al.* (2009); Guimarães *et al.* (2010); Oda *et al.* (2010); Zoppellari & Bardi (2013); Burlani (2014); Gabardo *et al.* (2014); Ferreira *et al.* (2015) e Gabardo *et al.* (2016). Em todos esses estudos, foram obtidos produção de etanol em quantidades consideráveis (10 a 60 g.L⁻¹) com esta levedura.

Outras pesquisas com *K. marxianus*, para as mais diversas finalidades, mostraram o grande potencial de aplicação desta levedura em processos biotecnológicos, como a de:

- Zhang *et al.* (2016) promoveram a fermentação simultânea de glicose e xilose para obtenção de etanol e xilitol, com concentrações de 120 g.L⁻¹

de glicose e 60 g.L⁻¹ de xilose em conjunto. Eles produziram 50,10 g.L⁻¹ de etanol e 55,88 g.L⁻¹ de xilitol a 42°C, destacando o rendimento desta levedura em alta temperatura;

- Flores *et al.* (2013) avaliaram a produção de bioetanol com *K. marxianus* e substrato de indústrias de tequila (agave tequilana fructans (ATF)). Os autores obtiveram produção de etanol de 49,90 g.L⁻¹ em 96 h, a 30°C, pH (4,5), suplementado com 200 g.L⁻¹ de ATF, 8 g.L⁻¹ de ureia, 3 g.L⁻¹ de fosfato de potássio e 2 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio. Além do etanol, os autores detectaram também a produção de álcool isobutílico;
- Li *et al.* (2015) investigaram a purificação e a identificação de novos peptídeos obtidos em processos de produção de leite fermentado com *K. marxianus*. Os resultados evidenciaram que houve inibição da enzima conversora da angiotensina no leite fermentado. Os experimentos foram conduzidos a 32°C, pH (6,5) e 189 rpm. Os autores destacaram que os resultados deste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de uma bebida funcional com efeito anti-hipertensivo;
- Güneser *et al.* (2016) avaliaram a obtenção de metabólitos voláteis produzidos a partir de resíduos industriais (substratos), tais como, soro de leite, polpas de tomates, uva e pimentões. A maior produção de etanol foi obtida em substrato soro de leite. Além do etanol, foram produzidos acetato de etila, álcool isoamílico, acetato de isoamílico, acetato de fenil-etila e álcool fenil-etílico;
- Barros *et al.* (2017) compararam estratégias para a sacarificação simultânea de fermentação de bagaço de maçã e caju utilizando a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus*, visando aumentar a produção de etanol celulósico. Os ensaios foram conduzidos a pH (4,5-5,0) suplementado com 1 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 1 g.L⁻¹ sulfato de amônio a 40°C e 150 rpm. O meio fermentativo foi constituído de 15% de caju pré-tratado (ácido-alcálico) com bagaço de maçã. Os autores concluíram que há alta conversão da glicose em etanol, com produção de 58 g.L⁻¹ de etanol.

Diante do exposto, optou-se pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, uma vez que esta levedura é capaz de assimilar diretamente a lactose (dissacarídeo) presente no substrato utilizado neste trabalho, visto que, com esta

levedura, elimina-se a etapa de hidrólise do permeado durante o processo fermentativo para a produção de etanol.

2.8.2 *Saccharomyces*

O gênero *Saccharomyces* apresenta a habilidade de se ajustar ao meio, obtendo diferentes produtos finais. São leveduras aeróbias facultativas, possuem capacidade de adaptar-se metabolicamente quando cultivada em aerobiose, convertendo açúcar em biomassa, enquanto se cultivada em anaerobiose produzem etanol e dióxido de carbono (LIMA *et al.*, 2001; SUZART & DIAS, 2007). Para o cultivo desse gênero de levedura, a faixa de temperatura usual é de 30 a 37°C (CZERUCKA *et al.*, 2007; LIONG, 2011) e o crescimento ótimo é observado em pH (4,5) e (6,5), embora adapte-se bem a pH mais ácido (3,5) (CZERUCKA *et al.*, 2007; GRAFF *et al.*, 2008).

2.8.2.1 *Saccharomyces boulardii*

A levedura *Saccharomyces boulardii* é usualmente conhecida, por ser um microrganismo probiótico, uma vez que oferece benefícios ao hospedeiro e tem sido largamente utilizada no tratamento ou prevenção de doenças do trato gastrointestinal, de modo particular no tratamento da diarreia causada por *Clostridium difficile*, sendo capaz de manter equilibrada a flora gastrointestinal microbiana (CZERUCKA & RAMPAL, 2002; EDWARDS-INGRAM *et al.*, 2007; GRAFF *et al.*, 2008; LOPES & PINTO, 2010; THOMAS *et al.*, 2014; TRIGUEIROS *et al.*, 2016).

Segundo Martins *et al.* (2005) e Hugo *et al.* (2016), os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

A *Saccharomyces boulardii* foi descoberta em 1950, através de estudiosos da Indochina, que isolaram a levedura a partir da fruta lichia. O nome da levedura deve-se ao seu descobridor, o microbiologista francês, Henri Boulard (McFARLAND & BERNASCONI, 1993; MARTINS *et al.*, 2005; MULLER, 2006; MULLER *et al.*, 2007). Por ser um microrganismo considerado como probiótico, tem como principal característica a sua não patogenicidade (McFARLAND, 2010),

podendo ser empregada na valorização de resíduos por processos fermentativos, como a fermentação para a obtenção de biomassa microbiana e também etanol (ASSUNÇÃO, 2014).

Porém, poucos são os estudos relatados na literatura que utilizam a *S. boulardii* em processos fermentativos, sendo os existentes mais aplicados à finalidade de produção de biomassa, como são os apresentados a seguir.

Em estudos empregando como substrato o permeado de soro (ASSUNÇÃO, 2014; NADAI, 2015; FIORESE *et al.*, 2015), foi verificado que é possível produzir biomassa microbiana probiótica em quantidades significativas (10 a 40 g.L⁻¹) com *S. boulardii*. No estudo de Assunção (2014), há ainda dados referentes à redução do teor poluente de DBO e DQO em 97,67 e 99,53%, respectivamente, e produção de etanol de 27 g.L⁻¹ na condição de pH (5,5), 30°C, 150 g.L⁻¹ de permeado, a 100 rpm em 24 h de fermentação.

Trigueiros *et al.* (2016) avaliaram a otimização do processo de produção de *S. boulardii* em meio composto por permeado de soro de queijo hidrolisado e sais inorgânicos, com condições de cultivo de 30°C, agitação de 100 rpm e tempo de 30 h. Os resultados mostraram que a suplementação com potássio e magnésio não apresentou influência no crescimento celular desta levedura. Os autores atribuem isso, ao fato do permeado já possuir esses elementos em quantidades suficientes em sua composição. Concluíram também que a faixa ótima de pH para esta levedura é de (4,5 - 5,5), e a razão (C:N) deve estar entre 8 e 20, favorecendo assim, a obtenção de maiores taxas de crescimento e consequentemente, maior quantidade de biomassa microbiana probiótica.

O mesmo assunto foi estudado por Muller (2006) o qual verificou o crescimento da *S. boulardii* em *shaker* empregando glicose como substrato. As condições de fermentação foram 30°C, pH (3,0) e agitação de 200 min⁻¹. Foram observadas produção celular de 3,90 g.L⁻¹, velocidade específica de crescimento de 0,35 h⁻¹, produtividade 0,32 g.L⁻¹h⁻¹ e conversão de substrato em células 0,41 g.g⁻¹.

Em outro estudo Muller *et al.* (2007) avaliaram o crescimento da *S. boulardii* em fermentador tipo *air lift*. O meio foi suplementado com glicose (10 g.L⁻¹), peptona de carne (2 g.L⁻¹), extrato de levedura (2 g.L⁻¹), fosfato monopotássio (0,6 g.L⁻¹), ureia (0,36 g.L⁻¹), sulfato de amônia (0,12 g.L⁻¹) e sulfato de magnésio (0,24 g.L⁻¹), empregando vazões de ar de 1,0 e 1,5 vvm. No ensaio conduzido a

30°C, pH (3,0) e 1,0 vvm, foram obtidos 3,15 g.L⁻¹ de massa celular, 0,35 h⁻¹ de velocidade específica e produtividade em células de 0,26 g.L⁻¹h⁻¹, enquanto que no teste de 1,5 vvm, pH (3,0) e 30°C, atingiu-se 3,96 g.L⁻¹ de concentração celular, 0,38 h⁻¹ de velocidade específica e produtividade em células de 0,32 g.L⁻¹h⁻¹. Os autores concluíram que a relação da oxigenação foi responsável pelo aumento da velocidade específica de crescimento.

Kitamura (2013) investigou a produção de biomassa probiótica enriquecida com selênio a partir da *S. boulardii* e melaço de cana-de-açúcar como substrato por fermentação submersa. As condições do processo fermentativo foram agitação de 300 rpm, 30°C, pH (5,5), meio suplementado com glicose (40 g.L⁻¹), melaço de cana (50 g.L⁻¹) e extrato de levedura (12 g.L⁻¹), com alimentação, no tempo de 4 h, de melaço de cana a 100 g.L⁻¹. A maior produção de biomassa seca foi de 13,18 g.L⁻¹ em 10 h de cultivo, com uma produtividade de 1,32 g.L⁻¹h⁻¹. O autor concluiu que é possível enriquecer com selênio o meio fermentativo a fim de aumentar a produção de biomassa.

Du *et al.* (2011) averiguaram as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da *S. boulardii* em meio YEPD (*yeast extract peptone dextrose*), pH (6,5), 600 rpm, 32°C por 24 h. Com o estudo, evidenciaram que *S. boulardii* é uma levedura considerada como termotolerante, bem como tolerante a condição ácida, pois apresentou capacidade de desenvolver-se a 30°C em pH (2,0), enquanto que sua morte térmica ocorreu em torno de 55°C. Além disso, concluíram que a levedura suporta aproximadamente 20% de etanol.

Graff *et al.* (2008) estudaram a levedura *S. boulardii* em condições sensíveis que simulam o pH do estômago (pH (1,1) com ácido clorídrico) e o pH intestinal (pH (6,8) com tampão de fosfato). Os autores concluíram que a viabilidade celular diminuiu para a levedura *S. boulardii* a partir de 5 min em pH (1,1), enquanto permanece estável em pH (6,8) por 6 h.

Verifica-se que, apesar de pouco explorada para a finalidade de produção de etanol, esta levedura, por ter características próximas às da *S. cerevisiae*, apresenta grande potencial de uso para esta finalidade, e, portanto escolhida para ser avaliada nesta pesquisa.

2.9 Fermentação Acética

A fermentação acética é realizada por um conjunto de bactérias do gênero *Acetobacter*. Esse processo refere-se à oxidação do etanol e consumo de oxigênio, com conseqüente liberação de energia (MORETTO *et al.*, 1988; EVANGELISTA, 2000; SACHS, 2001; SPINOSA, 2002; KRUSONG *et al.*, 2014; KRUSONG & TANTRATIAN, 2014; GUIDICI *et al.*, 2015; KRUSONG *et al.*, 2015; MOUNIR *et al.*, 2015; SAMUEL *et al.*, 2016).

A fim de se obter a acetificação, as bactérias acéticas precisam ter contato direto com o oxigênio, multiplicando-se na parte superior do mosto, e formando um véu conhecido por “mãe do vinagre” sobre o mosto e assim, transformando o etanol em vinagre (SHREVE, 1997; GAVA, 2002; SPINOSA, 2002; RIZZON, 2006).

Para Zancanaro (2001) (Reação 2.2), o processo de formação do ácido acético e água são obtidos com a transformação de 1,0 g de etanol oxidado, podendo, este, fornecer até 1,304 g de ácido acético, valores estes obtidos em processos de alto rendimento.



A “mãe do vinagre” refere-se às bactérias acéticas mistas de origem selvagem da *Acetobacter aceti* (SACHS, 2001; BACH, 2012), é popularmente obtida pela oxidação do vinho a vinagre, devido à presença de oxigênio no interior do recipiente de armazenamento do vinho, o qual permite que as bactérias se proliferem na parte superior, obtendo vinagre (TAKEMOTO, 2000; RIZZON & MENEGUZZO, 2006).

As espécies do gênero *Acetobacter*, de modo geral, oxidam o etanol para produzir ácido acético, e como ocorre em todos os processos fermentativos, é natural o aparecimento de fermentações paralelas, as quais geram outros produtos desejáveis ou não ao processo, tais como, aldeídos, cetonas, ésteres e outros ácidos orgânicos, sendo o acetaldeído o composto secundário predominante em fermentações acéticas (BARROS, 1990; SACHS, 2001).

As bactérias acéticas, denominadas como ideais, são aquelas que resistem à alta concentração de álcool e de ácido acético, e ainda exigem poucos

nutrientes para que o processo de transformação ocorra (RIZZON & MENEGUZZO, 2006; KRUSONG *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015). Ainda devem apresentar bom rendimento de transformação, sem hiperoxidar o ácido acético para não ocorrer características sensoriais indesejáveis ao produto final de interesse, no caso o vinagre (RIZZON & MENEGUZZO, 2006).

Quando se objetiva ter elevado rendimento em ácido acético, alguns cuidados ainda são necessários, tais como, escolha correta do tipo de processo fermentativo a ser empregado, tempo de fermentação, excesso ou carência de nutrientes, natureza da matéria-prima, embalagens adequadas, presença de contaminantes na fase de produção, acabamento e armazenamento do ácido acético obtido (PALMA *et al.*, 2001; SACHS, 2001; SPINOSA, 2002).

Isto para evitar perdas de ácido acético durante o processo de acetificação, provocadas pelo consumo elevado de álcool pelas bactérias, e ou evaporação natural dos constituintes voláteis (álcool, ácido acético), além de problemas industriais (RIZZON & MENEGUZZO, 2006; KRUSONG *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015; MOUNIR *et al.*, 2015; SAMUEL *et al.*, 2016),

Na fermentação acética, a temperatura ótima varia de 25°C a 30°C (RIZZON, 2006; KRUSONG *et al.*, 2015; SAMUEL *et al.*, 2016), o pH ideal fica entre (2,2) a (3,5), tendo como ótimo pH (3,0) (BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998; GUIDICI *et al.*, 2015). Em relação à temperatura, podem ser realizadas fermentações em condições baixas, como 4°C a 5°C, além de elevadas como 43°C. Porém, em temperaturas menores que 15°C e superiores a 35°C, têm-se redução na atividade bacteriana, tornando a fermentação acética muito lenta (RIZZON, 2006; KRUSONG *et al.*, 2015; SAMUEL *et al.*, 2016).

A temperatura pode ainda acelerar reações químicas, reduzir a solubilidade dos gases, e acentuar a sensação de sabor e odor, o que muitas vezes pode descaracterizar o produto, ou até mesmo inviabilizar o seu uso na produção de vinagre (RICHTER & NETO, 1991; EVANGELISTA, 2000; SACHS, 2001; GAVA, 2002; RIZZON, 2006; KRUSONG *et al.*, 2015; SAMUEL *et al.*, 2016).

2.10 Bactérias acéticas

As bactérias acéticas como já citado, são as utilizadas na produção de vinagre sendo o gênero *Acetobacter* o mais empregado (EVANGELISTA, 2000; GAVA, 2002; RIZZON, 2006; GUIDICI *et al.*, 2015; SAMUEL *et al.*, 2016). Dentro deste gênero, a principal espécie empregada é a *Acetobacter aceti*, a qual é uma bactéria gram negativa, que se apresentam nas formas elipsoidais, bastonetes e cocos, formando correntes e filamentos, e pode ser isolada em pares ou em cadeias (GAVA, 2002; RIZZON, 2006; SAMUEL *et al.*, 2016).

Estas bactérias apresentam também mobilidade (EVANGELISTA, 2000; SAMUEL *et al.*, 2016) e realizam oxidação incompleta de álcoois, resultando no acúmulo de ácidos orgânicos como produto final (SAMUEL *et al.*, 2016). São tolerantes às condições ácidas, e a maioria das linhagens dessa espécie é capaz de crescer em H menor que (5,0) (BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998; GAVA, 2002; RIZZON, 2006; SAMUEL *et al.*, 2016).

De acordo com o interesse das indústrias produtoras de vinagre, as bactérias acéticas podem crescer em diferentes substratos, desde que as necessidades nutricionais sejam garantidas. As melhores fontes de carbono relatadas para o crescimento e nutrição deste tipo de microrganismo são manitol, etanol, n-butanol, glicerol e lactato (ZANCANARO, 2001; SPINOSA, 2002; RIZZON, 2006).

Para alcançar elevada produtividade de vinagre com *Acetobacter aceti* (cultura pura), é fundamental conhecer suas unidades produtoras de vinagre, uma vez que apresentam competição entre os microrganismos por recursos disponíveis no meio. Assim, avaliando a taxa de integração dos nutrientes, metabólicas e velocidade de crescimento, isso quando utilizado cultura mista, com a “mãe do vinagre” (SPINOSA, 2002).

2.11 Processos de obtenção de vinagre

De acordo Palma *et al.* (2001), existem três métodos atualmente conhecidos para a fabricação de vinagre: o método lento (conhecido como método francês ou orleans), o método rápido (também conhecido por método

alemão) e o método submerso que consiste em promover a fermentação com bactérias acéticas submersas no mosto.

2.11.1 Método Orleans ou Lento

O processo Orleans, também denominado por lento, superficial ou estacionário, é a técnica mais antiga de produção de vinagre, sendo até hoje utilizada na produção caseira desta bebida. Teve seu surgimento em meados dos anos 1670 (COSTA *et al.*, 2006), quando se observou que barricas não cheias contendo vinho, e este em repouso, apresentavam avinagramento mais rápido, devido a maior superfície de contato com o ar, o que provocava maior aeração do sistema (PALMA *et al.*, 2001; SOLIERI & GIUDICI, 2009).

Na Figura 2.2 é apresentada uma ilustração do equipamento usado para a produção de vinagre pelo processo Orleans.

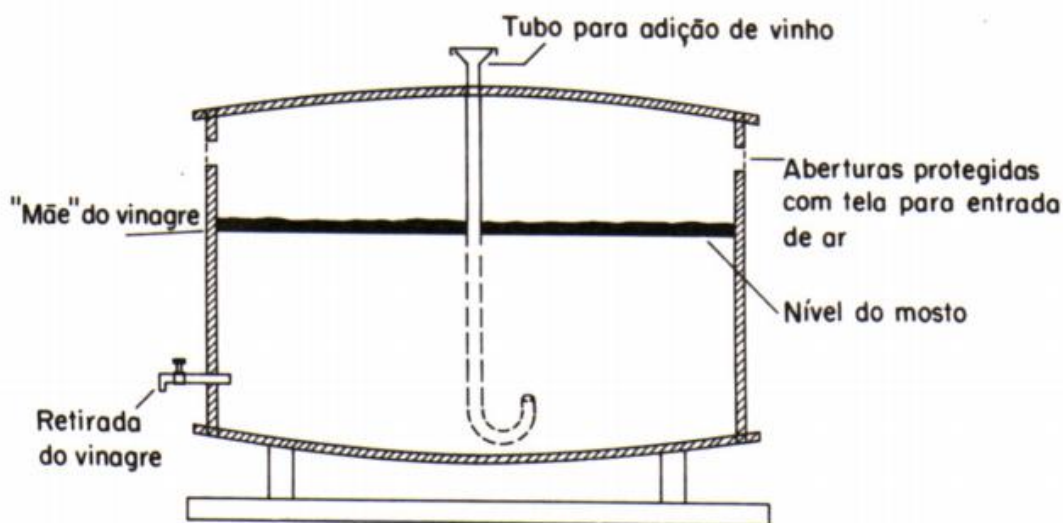


Figura 2.2: Gerador de Vinagre utilizado no Processo Orleans

Fonte: Palma *et al.* 2001

Neste método, e devido às necessidades fisiológicas das bactérias acéticas por oxigênio, realizam-se aberturas laterais nas extremidades das barricas, permitindo a entrada de ar responsável pela oxidação acética, e assim favorecendo a multiplicação dos microrganismos na parte superior do mosto, formando o véu "mãe do vinagre" (SOLIERI & GIUDICI, 2009).

A superfície dos orifícios da barrica é coberta com tecido, de modo a evitar a entrada de insetos. Além disso, na barrica, coloca-se um tubo em forma de “J” até o fundo para a adição de vinho, e assim, ao adicionar novo substrato, não ocasionando a ruptura da película formada (véu) (TAKEMOTO, 2000; RIZZON & MENEGUZZO, 2006).

O vinagre produzido por este método é considerado de qualidade superior aos outros métodos, devido ao amadurecimento natural do vinagre, uma vez que este reduz o sabor picante, produzindo um líquido suave e agradável ao paladar (PALMA *et al.*, 2001; SPINOSA, 2002).

2.11.2 Método Rápido ou Alemão

O processo rápido de acetificação Schuetzenbach ou Boerhave, também conhecido como método alemão de produção de vinagre, surgiu na Alemanha no início do século XIX, em meados de 1832, com a observação da importância da aeração do método lento. Este mérito foi atribuído ao químico Schuetzenbach (MORETTO *et al.*, 1988; SOLIERI & GIUDICI, 2009).

Este método consiste basicamente em passar a mistura vinho/vinagre através de um material com grande superfície exposta, como o carvão, bagaço de cana, madeira (raspas de madeira), sabugo de milho e outros, contendo as bactérias acéticas imobilizadas, e passagem de ar atmosférico em contracorrente (MORETTO *et al.*, 1988; PALMA *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2006).

O equipamento utilizado no processo fermentativo é conhecido por gerador de vinagre ou vinagreira (Figura 2.3), construído normalmente com madeira, aço inoxidável, alvenaria ou outro material que não seja atacado pelo ácido acético, e que não passe propriedades estranhas ou indesejadas ao vinagre (MORETTO *et al.*, 1988; TAKEMOTO, 2000). É formado por três seções: a superior, a maior (parte intermediária) que possui o preenchimento do recheio, e a inferior (SPINOSA, 2002).

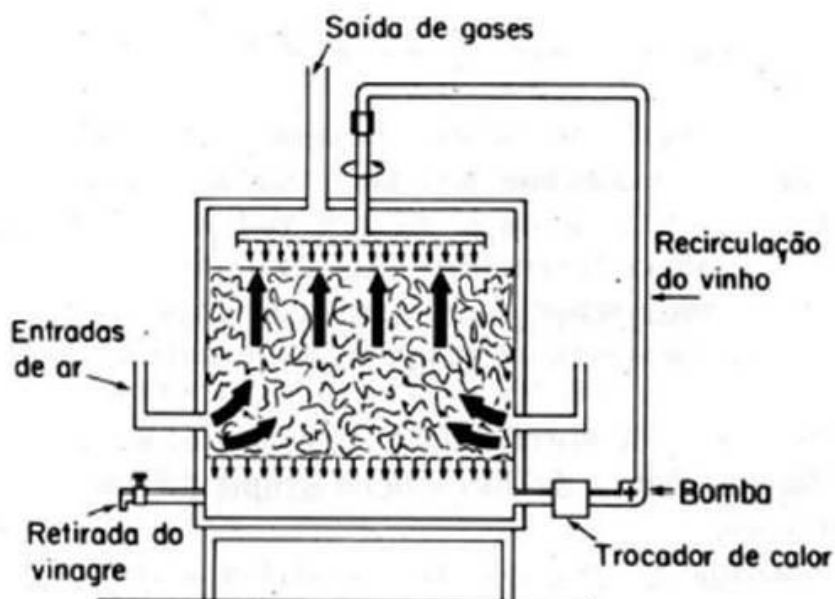


Figura 2.3: Gerador de Vinagre utilizado no Processo Rápido

Fonte: Palma *et al.* 2001

O líquido a ser acetificado pelo processo de avinagramento é distribuído na parte superior, por meio de um alimentador ou por dispositivo borrifador (ZANCANARO, 2001; SPINOSA, 2002). Este líquido passa à seção intermediária, por meio de gotejamento onde ocorre a oxidação do álcool a ácido acético pelas bactérias acéticas desenvolvidas no material de suporte e já na forma de filme de bactérias, posteriormente, por meio desse gotejamento, o líquido chega à parte inferior, já como vinagre (MORETTO *et al.*, 1988; SPINOSA, 2002).

Assim, a matéria-prima é recirculada desde a parte inferior até a parte superior, entrando constantemente em contato com as bactérias e promovendo a sua transformação em ácido acético. Este processo de recirculação ocorre quantas vezes forem necessárias até atingir o teor necessário de ácido acético para o produto pretendido (MORETTO *et al.*, 1988; PALMA *et al.*, 2001; MOUNIR *et al.*, 2015).

Quando ocorre a transformação de etanol em ácido acético, metade do fermentado é coletado, voltando a adicionar um novo volume de vinho para renovar o meio e o processo fermentativo continuar. Entretanto, este método apresenta um problema operacional, a proliferação de bactérias da espécie *Acetobacter xilynum*, produtora de quantidade elevada de substância gelatinosa que, com o tempo, acaba obstruindo a passagem do vinho em acetificação

através do suporte poroso (EVANGELISTA, 2000; ZARDINI, 2000; PALMA *et al.*, 2001; GAVA, 2002; RIZZON & MENEGUZZO, 2006).

Para Spinosa (2002) se o equipamento for alimentado regularmente com vinho contendo teor alcoólico de no máximo 10% (m/m), o processo ocorre em torno de 10 dias. Podendo ser retirados 10% do volume colocado inicialmente para avinagramento, e dar-se início a outro processo com a adição de vinho base (SPINOSA, 2002; LEE *et al.*, 2015).

2.11.3 Método Submerso

O método submerso possibilita que a fermentação acética ocorra com alta eficiência e produtividade, pois se utilizam fermentadores de aço ou madeira, com aeradores especiais para abastecer todos os pontos do mosto com a mesma quantidade de ar, controle de temperatura com serpentina, quebra-espuma, alcoógrafo, carga e descarga automáticas (PALMA *et al.*, 2001; ZANCANARO, 2001; GUIDICI *et al.*, 2015).

A fermentação ocorre devido à presença dos microrganismos (bactérias acéticas) submersos no líquido a ser acetificado. Estes microrganismos são saturados por microbolhas e se multiplicam, retirando energia da reação de oxidação do álcool etílico a ácido acético (Figura 2.4) (TAKEMOTO, 2000; SPINOSA, 2002). Devido ao tamanho do fermentador, é necessário que as bactérias recebam oxigênio de maneira contínua e adequada, em todos os pontos do fermentador, visto que uma pequena interrupção na aeração pode comprometer o rendimento e a produtividade do processo (COSTA *et al.*, 2006).

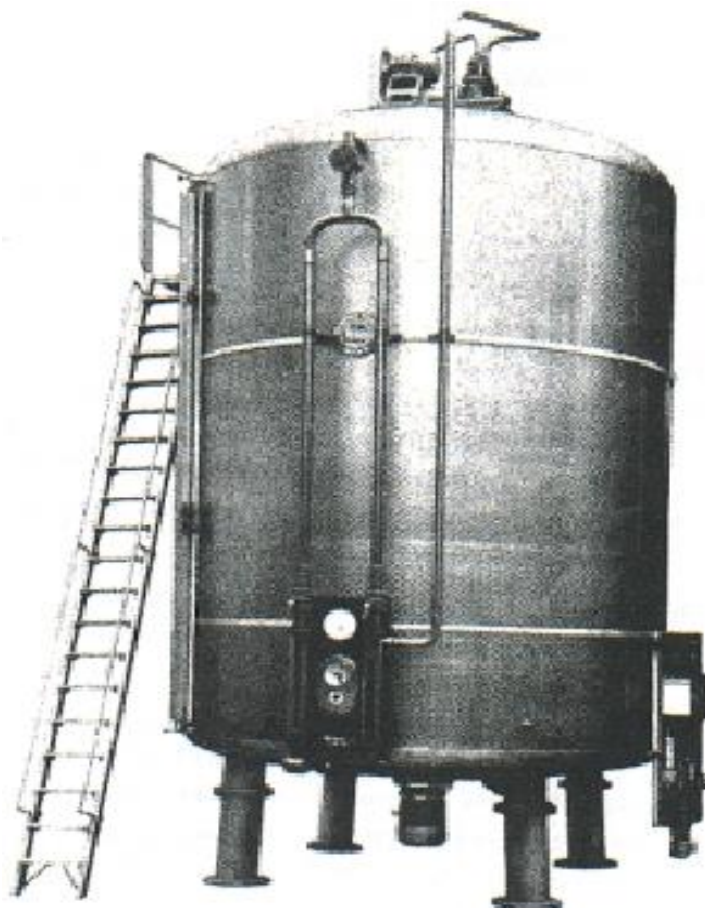


Figura 2.4: Acetificador Frings em aço inoxidável utilizado no Processo Submerso

Fonte: 1979, apud Mecca, Takemoto (2000)

2.12 Vinagre

A palavra vinagre provém do francês *vinaigre*, que significa vinho azedo (MORETTO *et al.*, 1988; THACKER, 1995; PALMA *et al.*, 2001; SOLIERI & GIUDICI, 2009). A sua origem se deu por meio de fermentações espontâneas ou naturais de vinho de uva. Esta bebida já foi citada no Antigo e no Novo Testamento, bem como no triste episódio da morte de Jesus Cristo, quando o mesmo antes de ser crucificado, recebeu uma esponja embebida em vinagre. Nesta época, já consideravam o vinagre com funções medicamentosas (PALMA *et al.*, 2001; SOLIERI & GIUDICI, 2009).

Uma das referências mais antigas do vinagre provém da cultura babilônica, aproximadamente 5000 A.C., quando produziram vinagre de tâmara, que também era utilizado como medicamento, além de cosméticos, preparo de

bebidas, e principalmente como condimento (THACKER, 1995; SACHS, 2001; COSTA *et al.*, 2006).

O ácido acético contido no vinagre foi, durante séculos, o ácido mais forte existente, e este era utilizado, mesmo sem conhecer seu princípio ativo, por soldados romanos, que recebiam um pequeno volume de vinagre para que durante suas viagens usassem na água antes de ingeri-lá, evitando assim doenças provocadas por águas contaminadas (COSTA *et al.*, 2006).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define fermentado acético como sendo os produtos gerados a partir “da fermentação acética realizada com fermentado alcoólico, este devendo ser produzido a partir do mosto de frutas, cereais, vegetais, mel, mistura de vegetais (BRASIL, 1977; BRASIL, 1999; BRASIL, 2012; GUIDICI *et al.*, 2015), ou mistura hidroalcoólica e apresentar uma acidez volátil mínima de 40 g de ácido acético por litro, expressa em (4%)” (BRASIL, 1977; BRASIL, 1999; BRASIL, 2012).

O teor alcoólico não deve exceder a 1ºGL e obrigatoriamente deve ser pasteurizado. Vinagre com mais de 80 g por litro de acidez volátil é denominado de concentrado de vinagre e é utilizado exclusivamente para diluição, conforme Portaria nº 745 de 24 de outubro de 1977 e Instrução Normativa nº 36 de 14 de outubro de 1999 do MAPA (BRASIL, 1977; BRASIL, 1999). No Brasil, é proibida a produção e venda de vinagre artificial, ou seja, vinagre produzido a partir da diluição do ácido acético, obtido a partir da síntese do etileno ou da destilação seca da madeira (BRASIL, 1990).

Quando o teor alcoólico inicial da fermentação apresentar concentrações de álcool etílico inferior a 40 g.L⁻¹, e devido a contaminações e perdas de álcool por evaporação durante o seu desenvolvimento, o produto gerado será considerado vinagre fraco, pois terá menos de 4% de ácido acético (HISS, 2001).

Pode-se empregar sidra, malte ou vinho, como matéria-prima para a fermentação de vinagres, neste caso o ácido acético resultante raramente excede a 5%, devido à limitação do teor de açúcar. Quando o álcool diluído é a matéria-prima, o ácido acético pode atingir 12 a 14%, pois a acidez impede a atividade das bactérias. Por isso, quando se transformam sucos de frutos em vinagre, formam-se certos ésteres de acordo com a matéria-prima, que atribui ao produto um paladar característico (SHREVE, 1997; PARRONDO *et al.*, 2003).

Quando o ácido acético é produzido pela oxidação incompleta dos álcoois e açúcares, gera-se o etino, assim, após o consumo do etanol, o acetato produzido é completamente oxidado. Este fenômeno é denominado de superoxidação de acetato, e é desfavorável para a produção de vinagre, devido à diminuição de rendimentos (SAKURAI *et al.*, 2013).

Durante a fermentação acética, ocorre um conjunto complexo de fermentações paralelas, as quais podem consumir o ácido acético produzido, gerando como produtos finais água e gás carbônico. Esse comportamento contribui para o sabor, aroma e preservação do fermentado acético. Estes produtos são resultantes da matéria-prima empregada como substrato, tais como, ácidos voláteis e não voláteis, glicose, formaldeído, metanol, glicerol, acetona e piridina (AQUARONE *et al.*, 1983; BARROS, 1990; SHREVE, 1997; SPINOSA, 2002; PARRONDO *et al.*, 2003; SAKURAI *et al.*, 2013).

2.12.1 Pesquisas relacionadas a obtenção de vinagre

Pereira (2014) estudou a otimização da produção de vinagre de mel, utilizando dois tipos de mel, claro (eucalipto) e escuro (urze), como substrato na fermentação alcoólica e *Sacharomyces cerevisiae* (condições de processo, 30°C e 100 rpm) para se obter o hidromel, enquanto a fermentação acética foi realizada com culturas puras de bactérias acéticas isoladas de vinhos tintos em temperatura ambiente e 150 rpm (método agitado). Para o mel urze, obteve-se em 960 h de fermentação, 2,27 g.L⁻¹ de ácido acético, enquanto que para o mel de eucalipto, teve-se uma produção de 2,35 g.L⁻¹ de ácido acético em 840 h de fermentação. O autor concluiu que a produção de vinagre não foi influenciada de forma significativa para os diferentes tipos de mel utilizados como substrato.

Samuel *et al.* (2016) avaliaram a produção de vinagre de vinho de palma com bactéria *Acetobacter aceti* isolada da banana podre. Na primeira etapa, foram utilizadas as leveduras presentes no vinho de palma e a fermentação alcoólica ocorreu por sete dias a 30°C e pH (4,6), obtendo-se 10,0% de etanol. A fermentação acética foi realizada pelo Método Orleans durante 4 semanas, produzindo um vinagre com 7,1% de ácido acético e pH (3,5). Os autores constataram que a bactéria acética obtida a partir da banana podre é uma opção viável para a produção de ácido acético, assim como, o substrato utilizado.

Lee *et al.* (2015) estudaram o isolamento e a caracterização de espécies de *Acetobacter* de um vinagre tradicional de Namhae. Os autores identificaram neste tipo de vinagre estirpes *Acetobacter pasteurianus* e *Acetobacter aceti*. Para o processo de isolamento da *A. pasteurianus*, empregaram-se os seguintes substratos: etanol, glicerol, D-frutose, D-glicose, D-manitol, D-sorbitol, ácido glutâmico e acetato de sódio, enquanto que para o isolamento da *A. aceti*, utilizaram-se: etanol, n-propanol, glicerol, D-manitol e acetato de sódio. Para ambas as bactérias, acrescentaram-se 0,5% de extrato de levedura. Com o estudo os autores verificaram que a bactéria acética *A. pasteurianus* mostrou-se mais tolerante durante o isolamento, assim optou-se por realizar a fermentação acética apenas desta estirpe. Na melhor condição de produção (30°C, pH (3,4) e concentração inicial de etanol de 5%), foram obtidos teores de ácido acético na faixa de 7,3 a 7,7%.

Krusong *et al.* (2015) investigaram a influência da temperatura do cloreto de cálcio na acetificação do vinagre, empregando a bactéria acética *Acetobacter aceti*. A fermentação alcoólica ocorreu de forma espontânea (leveduras presentes no vinho) com vinho de milho (substrato) a 30°C, obtendo-se 5% (v/v) de etanol. Em seguida as fermentações acéticas do tipo semi-contínua foram desenvolvidas a 36°C, com adição de 0 a 15% de cloreto de cálcio ao meio, por 21 dias. Os resultados mostraram que o aumento da temperatura provocou alterações na camada lipídica das células, alterando a espessura da parede celular, e na atividade das enzimas ligada à membrana das bactérias acéticas. Com a adição de 0,15% de cloreto de cálcio foi possível verificar um aumento da produção de ácido acético (30°C), atingindo 30,00 g.L⁻¹ de ácido acético no sexto ciclo fermentativo.

Spinosa *et al.* (2015) desenvolveram um fermentado alcoólico de arroz (vinho de arroz (*Oryza sativa* L.)) para a produção de vinagre pelo método submerso com *Acetobacter* sp. Os autores oxidaram uma solução alcoólica de 6,28% (p/v) de etanol a 30°C numa vinagreira Frings (Alemanha) durante 10 dias. O vinagre (décimo dia) apresentou 61,50 g.L⁻¹ de ácido acético, acidez total de 6,85% (p/v), 0,17% (p/v) de álcool, 1,26% (p/v) de minerais e 1,78% (p/v) de extrato seco, e ainda, composição de ácidos orgânicos como, ácido cis-aconítico, ácido maleico, ácido trans-aconítico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido fumárico e ácido itacônico.

Wang *et al.* (2013) utilizaram cultura mista de *Saccharomyces cerevisiae* e *Acetobacter pasteurianus* em meio contendo como fonte de carbono, a glicose. Iniciou-se a fermentação com 4% de etanol, 90 g.L⁻¹ de glicose, temperatura de 32°C e taxa de aeração de 0,2 vvm. O volume de inóculo de *A.pasteurianus* e *S. cerevisiae* foi de 16% e 0,06%, respectivamente. Em 20 h e 40 h de fermentação, o mosto foi alimentado com 120 g.L⁻¹ de glicose. O rendimento médio obtido para o ácido acético foi de 66,0 g.L⁻¹. Com este resultado, os autores concluíram que o uso de cultura mista pode reduzir o tempo de fermentação, além de minimizar as perdas durante o processo, e aumentar a produção de ácido acético.

Bach (2012) estudou a produção de ácido acético a partir de soro de leite, utilizando a levedura *Sacharomyces cerevisaie* (etapa alcoólica) e uma cultura mista de *Acetobacter aceti* (“mãe do vinagre”) (etapa acética). Os métodos empregados foram Método Orleans, Orleans Modificado (adição de oxigênio) e agitado (100 rpm). No sétimo dia de fermentação com o Método Orleans, o autor obteve 4,43 g.100 mL⁻¹ de ácido acético, enquanto que pelo Método Orleans Modificado em dez dias de fermentação, a produção foi de 4,51 g.100 mL⁻¹ de ácido acético, e pelo método agitado, alcançou-se 1,99 g.100 mL⁻¹ de ácido acético no décimo dia de fermentação. O autor constatou-se que o método Orleans Modificado foi o mais indicado, pois a produção de ácido acético se deu em um menor tempo, e, portanto, mais rentável.

Parrondo *et al.* (2003) utilizaram soro de queijo suplementado com lactose (100 g.L⁻¹ de lactose sintética) para produzir vinagre. Na etapa da fermentação alcoólica (30°C, 200 rpm por 96 h), o substrato soro de queijo foi convertido em etanol pela levedura *Kluyveromyces fragilis*, obtendo-se ≈ 50,00 g.L⁻¹ de etanol. Este produto alcoólico foi utilizado posteriormente como mosto para a fermentação acética com *Acetobacter pasteurianus*, sendo os ensaios conduzidos a 30°C e 250 rpm, durante 96 h. O teor de ácido acético obtido neste estudo foi de 5,30%. Os autores verificaram que o vinagre obtido está de acordo com a legislação para consumo humano, e ainda que a eficiência da biotransformação do etanol em ácido acético foi de 84%.

Talabardon *et al.* (2000) avaliaram o efeito da fermentação termofílica anaeróbia na produção de ácido acético a partir do permeado de soro de leite hidrolisado. Para tanto, foi empregada uma cultura mista de bactérias *Moorella thermoautotrophica* e *Moorella thermoacetica*. A lactose presente no substrato

permeado foi primeiramente convertida em ácido láctico (*M. thermoautotrophica*), para posterior conversão em ácido acético (*M. thermoacetica*). O ensaio com maior rendimento foi desenvolvido a 58°C, pH (7,68), 100 rpm por 100 h, assim detectou-se ao final da pesquisa uma produção de 2,5 mols de ácido acético por mol de galactose consumida, obtendo rendimento de 0,93 g.g⁻¹.

Lustrato *et al.* (2013) reciclaram o soro de leite a fim de produzir vinagre para ser adicionado na nutrição de vacas leiteiras. Para a etapa alcoólica (32°C, pH (4,0), agitação a 350 rpm e sem fluxo de ar por 11 dias), empregou-se a *Kluyveromyces marxianus*, enquanto que para a etapa acética (32°C, 250 rpm, razão de fluxo de ar 2: 1 vvm e adição de 10% v/v de inóculo de *A. acetii*), aplicou-se a *Acetobacter acetii*. No processo fermentativo com meio de cultivo de 20 L, obteve-se 11,92 g.L⁻¹ de etanol, 0,50 g.L⁻¹h⁻¹ de produtividade e recuperação de biomassa de 0,95 Kg, atingindo-se 8,70 g.L⁻¹ de ácido acético. Com as duas etapas fermentativas, detectaram a redução da carga poluente desse subproduto, uma vez que a DQO total foi minimizada em 47% após a fermentação alcoólica (30,9 g.L⁻¹) e 50% para a acética (28,8 g.L⁻¹). Os autores relataram que com os processos de produção de vinagre de soro de leite foi possível encontrar uma fonte alimentar para ruminantes (nutrição da vaca leiteira), devido à sua estabilidade unida à sua palatabilidade e valor nutritivo.

2.13 Justificativa da pesquisa

Diante do exposto, verifica-se que há pouca informação na literatura ao que se refere à produção de vinagre ou ácido acético empregando como substrato (fonte de carbono) o permeado de soro queijo ou leite, e as leveduras *S. boulardii* (não há relatos) e *K. marxianus*, assim, motivando o desenvolvimento da presente pesquisa. A qual visa utilizar o permeado de soro, de forma que o processo seja economicamente viável, bem como tenha potencial para possíveis utilizações em escala industrial, e assim, agregar valor econômico e de aplicabilidade para o permeado, bem como para o segmento de lácteos.

O presente trabalho abordou o estudo sobre a avaliação das condições de produção de fermentado acético utilizando, como matéria-prima o permeado de soro de queijo, e as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces marxianus* na etapa alcoólica, e bactérias acéticas provenientes de cultura pura e

mista (mãe do vinagre) na etapa acética, visando como produto final, um fermentado acético que tenha enquadramento nos parâmetros exigidos pela legislação brasileira para o produto comercial, vinagre.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo encontram-se descritos os procedimentos que foram utilizados na execução deste trabalho experimental. Essa descrição envolve as etapas de desenvolvimento da pesquisa, técnicas, procedimentos, equipamentos e materiais necessários para a concretização do trabalho.

3.1 Fermentação Alcoólica

3.1.1 Caracterização do permeado de soro de queijo em pó

Na etapa referente às fermentações alcoólicas, o substrato utilizado foi o permeado de soro de queijo em pó (embalagens de 1 Kg), o qual foi cedido gentilmente pela empresa SOORO Ingredientes Ltda, localizada na cidade de Marechal Candido Rondon, região Oeste do Paraná. A empresa disponibilizou também especificação técnica do produto, conforme Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Caracterização do permeado de soro de queijo em pó

Componente	Concentração (%)
Lactose	> 88
Proteína	> 3,0
Sais minerais	5,28

Fonte: SOORO Ingredientes LTDA

Foi realizada também a caracterização do permeado do soro de queijo por equipamento de Plasma Acoplado por Indução (ICP) marca Thermo Scientific, no laboratório de físico-química da Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNDETEC), da cidade de Cascavel, localizada no Oeste do Paraná, e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), as quais foram realizadas segundo metodologia Apha (2005), no laboratório de Limnologia Aplicada, do Grupo de Pesquisa em Recursos Pesqueiros e Limnologia (GERPEL) da Unioeste, Câmpus de Toledo-PR.

3.1.2 Microrganismos, ativação celular e manutenção

Foram utilizadas duas leveduras na etapa de fermentação alcoólica, a *Kluyveromyces marxianus* e a *Saccharomyces boulardii*. A *Kluyveromyces marxianus*, CCT 4086, Referência ATCC 46537, foi doada pela indústria SOORO Ingredientes Ltda, oriunda da Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosello. O microrganismo foi obtido na forma liofilizada, fazendo-se necessária a sua ativação em meio YMA (*yeast malt extract agar*) adaptado, composto por extrato de levedura (3 g.L⁻¹), peptona (5 g.L⁻¹) e dextrose (10 g.L⁻¹). O mesmo foi esterilizado a 121°C por 15 min em autoclave vertical marca Prismatec, modelo CS, conforme instruções do fabricante, sendo posteriormente utilizado na ativação.

A *Saccharomyces boulardii* CCT 4308, Referência UFPEDA 1176, foi adquirida também da Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosello. Também foi obtida na forma liofilizada, sendo ativada em meio YEPD (*yeast extract peptone dextrose*), composto por extrato de levedura (5 g.L⁻¹), peptona de carne (10 g.L⁻¹) e glicose (20 g.L⁻¹), de acordo com Casal *et al.* (2004) e orientações do fabricante, o mesmo procedimento de esterilização utilizado para a *K. marxianus* foi aqui também adotado.

Ambas as leveduras foram incubadoras em agitação orbital em equipamento do tipo *shaker* da marca New Lab, modelo NL 161-04 a 100 rpm, temperatura de 30°C, por 24 h. Posteriormente, foram preservadas pelo método de repique em tubos inclinados, com composição idêntica ao meio de ativação acrescidos do componente ágar (20 g.L⁻¹) em temperatura de 4°C. Repiques periódicos foram realizados em média a cada 45 dias.

3.1.3 Condições dos meios de cultura

3.1.3.1 Hidrólise enzimática do permeado para composição dos meios com *S. boulardii*

A lactose presente no permeado de soro de queijo, um dissacarídeo redutor, não é metabolizada de forma direta pela levedura *S. boulardii* (HOLSINGER *et al.*, 1974; WALSTRA & JENNESS, 1982; FERREIRA, 2005;

ASSUNÇÃO, 2014; NADAI, 2015; FIORESE *et al.*, 2015; TRIGUEIROS *et al.*, 2016). Dessa forma, foi realizado o processo de hidrólise desta molécula por via enzimática, obtendo ao final, monossacarídeos de glicose e galactose. As condições experimentais utilizadas nesta etapa seguiram a metodologia proposta por Assunção (2014). É importante ressaltar que a reação de quebra da lactose em glicose e galactose é uma reação estequiométrica na proporção de 1:1 para cada constituinte.

A enzima utilizada na hidrólise foi a β -galactosidase (Lactozym Pure® TM 6500L), obtida da espécie *Kluyveromyces lactis*, disponibilizada pela empresa Novozymes®.

O processo consistiu em adicionar 0,16 g.L⁻¹ da enzima na solução de permeado de soro, sendo então o pH ajustado para (6,5), com posterior incubação a 100 rpm por 6 h em temperatura de 30°C. Após a hidrólise, a enzima foi desativada por aquecimento da solução em banho-maria, marca Quimis, modelo 128-2 a 100°C por 5 min (ASSUNÇÃO, 2014; NADAI, 2015, FIORESE *et al.*, 2015; TRIGUEIROS *et al.*, 2016).

3.1.3.2 Preparo do pré-inóculo

O meio denominado de pré-inóculo foi preparado em frasco de Erlenmeyer de 500 mL, sendo este, composto pelos mesmos nutrientes utilizado na etapa de ativação celular (item 3.1.2). O volume de meio preparado foi de 250 mL para cada cepa (*K. marxianus* e *S. boulardii*) e ambos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. Transferiram-se para cada meio autoclavado duas alçadas da cepa, sendo o meio inoculado com *K. marxianus* foi incubado a 100 rpm e temperatura de 30°C, por 18 h, enquanto o meio contendo *S. boulardii* foi mantido em temperatura de 30°C, a 100 rpm, por 24 h.

3.1.3.3 Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados com a finalidade de eliminar a etapa de adaptação dos microrganismos ao meio de cultivo. Dessa forma, foram elaborados em condições semelhantes às serem utilizadas durante as fermentações.

O volume de meio preparado para o inóculo de cada levedura foi de 270 mL. Os meios eram compostos por permeado de soro de leite (100 g.L^{-1}) e sais, como: ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) (6 g.L^{-1}), sulfato de magnésio (MgSO_4) ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) e extrato de levedura (6 g.L^{-1}). Ambos foram pasteurizados a 65°C em estufa de secagem e esterilização marca Nova Instruments, modelo NI 1514, por 30 min, baseado na metodologia de Parrondo *et al.* (2003) e Nadai (2015).

Na sequência, foram adicionados 10% do volume total (CARVALHO & SATO, 2001), correspondendo a 30 mL de pré-inóculo no inóculo. O pH dos inóculos foi ajustado para (5,5) quando os cultivos eram realizados para *K. marxianus*, e para a *S.boulardii*, este foi corrigido para (6,0). Para o ajuste do pH, foram utilizadas soluções de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH), ambos 1 mol.L^{-1} . Os dois inóculos foram incubados com agitação orbital de 100 rpm por 24 h em temperatura de 37°C para *K. marxianus* e 30°C para *S.boulardii*.

3.1.3.4 Reatores – Fermentação Alcoólica

Os cultivos foram realizados em reatores de vidro cujo volume útil foi de 3 L (Figura 3.1). O mesmo tinha dois orifícios na parte superior (tampa), um para a coleta de amostras por meio de uma seringa acoplada em mangueira de silicone, e outro orifício para alívio da pressão interna do reator.



Figura 3.1: Reator utilizado nas fermentações alcoólicas

Fonte: o Próprio.

Os meios de cultivos utilizados na etapa de fermentação alcoólica tanto para *K. marxianus* quanto para a *S. boulardii*, foram preparados com volume de 1800 mL de meio a fermentar, composto pelos sais: ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) (6 g.L^{-1}), sulfato de magnésio (MgSO_4) ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$), extrato de levedura (6 g.L^{-1}) e concentrações de permeado definidas conforme níveis do planejamento experimental (Tabela 3.2 (*K. marxianus*) e 3.3 (*S. boulardii*)).

Para iniciar as fermentações alcoólicas, fez-se a adição de 10% do volume total a ser fermentando (2000 mL) (CARVALHO & SATO, 2001) de inóculo (200 mL). O pH e a temperatura foram definidos pelos planejamentos experimentais aplicados (Tabela 3.2 (*K. marxianus*) e 3.3 (*S. boulardii*)). Todos os cultivos foram incubados em agitação orbital a 100 rpm, por 45 h.

A cinética de todos os cultivos foi acompanhada em tempos pré-estabelecidos, por medidas de etanol, concentração de biomassa, consumo de substrato e pH, conforme descritas posteriormente (item 3.3).

Ao término de cada experimento, o fermentado alcoólico foi envasado em garrafas PET com volume útil de 2 L (Figura 3.2), devidamente identificadas e higienizadas. Em seguida, foram submetidos ao tratamento térmico de pasteurização em estufa de secagem e esterilização, onde permaneceram a 65°C

por 30 min (BRASIL, 2002), este procedimento foi aplicado com base no que determina a Instrução Normativa 51 de 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002), tendo como finalidade, inativar as leveduras e parar o processo de fermentação.



Figura 3.2: Fermentado Alcoólico

Fonte: o Próprio.

Após pasteurização, os fermentados foram armazenados em freezer à temperatura de -10°C , para posterior uso na etapa de fermentação acética (BACH, 2012).

3.1.3.6 Coleta de amostras

Amostras foram coletadas no início das fermentações em intervalos de 2,5 em 2,5 h até completar 15 h, período este correspondente à etapa referente à fase exponencial do processo, onde a atividade fermentativa é mais elevada (BONONI & SCHMIDELL, 2001). Posteriormente, foram retiradas amostras em intervalos de 4 h até o tempo de 45 h de experimento.

Em cada amostragem, foi coletado um volume de 16 mL, dos quais, 5 mL foram utilizados para leitura de pH e absorvância; 4,5 mL foram armazenados em

microtubos de 1,5 mL para posterior determinação de etanol; e 6,5 mL foram centrifugados a 14000 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante separado do precipitado. O sobrenadante foi então armazenado em freezer à temperatura de -10°C para subsequente análise de açúcares redutores e glicose.

3.1.4 Planejamento experimental

Um planejamento experimental fatorial 2^3 com duplicata no ponto central foi utilizado para avaliar a influência das seguintes variáveis: temperatura, pH e concentração de permeado de soro de queijo, tanto para *K. marxianus* quanto para a *S. boulardi*. A variável resposta foi a produção de etanol. Totalizando 10 ensaios para cada levedura, sendo 8 realizados nos níveis (+1) e (-1), e 2 no ponto central (0).

Os níveis e valores reais das variáveis utilizadas em cada planejamento, com *K. marxianus* e *S. boulardii* estão dispostos nas Tabelas 3.2 e 3.3, respectivamente. As Tabelas 3.4 e 3.5 apresentam os ensaios do planejamento experimental fatorial 2^3 , juntamente com os valores codificados e reais de suas variáveis. As faixas escolhidas foram baseadas em estudos realizados por Assunção (2014); Nadai (2015); Fiorese *et al.* (2015) e Trigueiros *et al.* (2016).

Tabela 3.2: Níveis e valores reais das variáveis empregadas no planejamento 2^3 da levedura *Kluyveromyces marxianus*

Variáveis	Unidades	Níveis		
		-1	0	+1
Temperatura	(°C)	29	37	45
pH		4,5	5,5	6,5
[Permeado]	(g.L ⁻¹)	100	200	300

Tabela 3.3: Níveis e valores reais das variáveis empregadas no planejamento 2^3 da levedura *Saccharomyces boulardii*

Variáveis	Unidades	Níveis		
		-1	0	+1
Temperatura	(°C)	26	32	37
pH		4,0	5,0	6,0
[Permeado]	(g.L ⁻¹)	100	200	300

Tabela 3.4: Matriz do planejamento fatorial 2^3 para a levedura *Kluyveromyces marxianus*, com valores reais e codificados para suas variáveis

Ensaio	Variáveis					
	Temperatura (°C)		pH		[Permeado (g.L ⁻¹)]	
	Reais	Codificados	Reais	Codificados	Reais	Codificados
1	29	-1	4,5	-1	100	-1
2	45	+1	4,5	-1	100	-1
3	29	-1	6,5	+1	100	-1
4	45	+1	6,5	+1	100	-1
5	29	-1	4,5	-1	300	+1
6	45	+1	4,5	-1	300	+1
7	29	-1	6,5	+1	300	+1
8	45	+1	6,5	+1	300	+1
9	37	0	5,5	0	200	0
10	37	0	5,5	0	200	0

Tabela 3.5: Matriz do planejamento fatorial 2^3 para a levedura *Saccharomyces boulardii*, com valores reais e codificados para suas variáveis

Ensaio	Variáveis					
	Temperatura (°C)		pH		[Permeado (g.L ⁻¹)]	
	Reais	Codificados	Reais	Codificados	Reais	Codificados
1	26	-1	4,0	-1	100	-1
2	37	+1	4,0	-1	100	-1
3	26	-1	6,0	+1	100	-1
4	37	+1	6,0	+1	100	-1
5	26	-1	4,0	-1	300	+1
6	37	+1	4,0	-1	300	+1
7	26	-1	6,0	+1	300	+1
8	37	+1	6,0	+1	300	+1
9	32	0	5,0	0	200	0
10	32	0	5,0	0	200	0

Os fermentados alcoólicos que obtiveram maiores teores de etanol para as duas leveduras estudadas (*K. marxianus* e *S. boulardii*) foram utilizados como meio de cultivo nas fermentações acéticas com a bactéria acética *Acetobacter aceti* (cepa pura) e “mãe do vinagre” (cepa mista).

3.2 Fermentação Acética

3.2.1 Microrganismo, ativação celular e manutenção

A bactéria acética *Acetobacter aceti* CCT 2565, Referência ATCC 15973, também foi adquirida na forma liofilizada da Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosello. Ela foi ativada em meio Manitol Ágar (MA), constituído

de D-Manitol (25 g.L^{-1}), extrato de levedura (5 g.L^{-1}) e peptona bacteriológica (3 g.L^{-1}), a qual foi preparado e esterilizado conforme orientações do fabricante. A ativação foi conduzida em temperatura de 30°C por 48 h.

A *A. acetii* foi preservada pela técnica de repique em tubos inclinados contendo meio MA acrescido de ágar (15 g.L^{-1}), com posterior armazenamento em refrigerador a 4°C . Repiques periódicos foram realizados a cada 10 dias.

3.2.2 Preparo do fermentado acético

Para iniciar a fermentação acética, o fermentado alcoólico passou por uma etapa de filtração, para remover as partes sólidas presentes no mesmo (restos de meio e levedura). A filtração foi realizada em bomba a vácuo, interligada em dois frascos de Kitassato conectados em série, funil e papel filtro qualitativo. Após filtração, o fermentado alcoólico foi adicionado nos reatores acéticos.

3.2.3 Fermentação Acética pelo Método Orleans

As fermentações empregando o método Orleans foram realizadas em reator igual ao descrito no item (3.1.3.4) com batoque para a liberação dos gases, entretanto, neste método os reatores foram mantidos em repouso por 27 dias, conforme estudos de Zancanaro (2001); Spinosa (2002) e Bach (2012). A Figura 3.3 representa o fermentado acético.

A cada 3 ou 4 dias, retirou-se uma alíquota de 4,5 mL de cada fermentado, a qual foi armazenada em microtubos de 1,5 mL com posterior congelamento, para ser utilizada na determinação de ácido acético por Cromatografia de Alta Eficiência (item 3.3).



Figura 3.3: Fermentado Acético

Fonte: o Próprio.

3.2.4 Fermentação Acética pelo Método Orleans Modificado com adição de Oxigênio

A fermentação acética pelo Método de Orleans modificado com inserção de O_2 foi realizada em um recipiente confeccionado em policloreto de vinila (PVC) com 200 mm de diâmetro e 45,0 cm de altura, cuja capacidade é de aproximadamente 10 L. Na parte superior do reator (tampa), existem aberturas com mangueiras acopladas para retirada de amostra, empregando-se seringas (Figura 3.4), ou para adição de oxigênio e batoque. Na parte inferior do fermentador, há um amostrador, o qual foi utilizado para retirada do fermentado acético (no final do processo).



Figura 3.4: Reatores utilizados na Fermentação Acética pelo Método de Orleans Modificado com adição de O_2 .

Fonte: o Próprio.

Os reatores foram mantidos em temperatura ambiente, com adição de 20% oxigênio dissolvido, a ser monitorado por medidor portátil de O_2 . A incorporação de oxigênio foi realizada por compressor marca Maruri, modelo H-9800, conectado a uma mangueira que vai até o fundo do reator. Na extremidade final desta mangueira (dentro do reator), foi acoplado um dispersor de pedra porosa, para melhor distribuição e menor tamanho de bolha, o que facilita a transferência de massa do O_2 no meio alcoólico.

Este tipo de fermentação teve duração de 27 dias, segundo estudo de Bach (2012). Amostras foram coletadas e analisadas conforme descrito no item (3.2.3).

3.2 5 Fermentação Acética pelo Método Orleans Modificado com agitação

Baseado em estudo de Bach (2012), esta fermentação foi realizada em reatores de vidro (Figura 3.1) com batoque, sendo os mesmos incubados com agitação orbital de 100 rpm por 27 dias. As amostragens serão realizadas a cada 3 ou 4 dias, com determinações iguais as citadas no item (3.2.3).

3.3 Determinações analíticas empregadas nas fermentações alcoólicas e acéticas

3.3.1 Determinação do pH

Os valores de potencial hidrogeniônico (pH) foram determinados em medido de pH: Digital Portátil pH/mV marca Akso, modelo AK 103 com eletrodo de vidro, adequadamente calibrado, conforme metodologia de Lutz (2008).

3.3.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular para cada microrganismo foi determinada por meio da curva de correlação entre os métodos de espectrofotometria UV-VIS e concentração celular, conforme metodologia de Muller (2006); Muller *et al.* (2007); Assunção (2014); Fiorese *et al.* (2015) e Nadai (2015).

O método de espectrofotometria UV-VIS corresponde à densidade óptica da suspensão celular. A amostra foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS marca Shimadzu (modelo 1800) no comprimento de onda de 600 nm, conforme Ludwig *et al.* (2001), sendo esta determinação realizada em triplicata. Quando necessário, foram realizadas diluições das amostras de forma a manter a linearidade da absorção inferior a 0,800 unidades. A absorbância foi expressa na forma logarítmica $\ln(N/N_0)$, em que: N_0 é a absorbância no tempo zero e N é a absorbância no tempo t .

A massa seca foi determinada pela filtração de 20 mL de amostra (V) coletada no final das fermentações. O processo de filtração ocorreu em membrana de acetato de celulose (25 mm de diâmetro com poro de 0,22 μm), previamente seca em estufa de secagem a 90°C até massa constante (m_1). Em seguida, a membrana contendo a amostra filtrada foi seca novamente em estufa de secagem nas condições citadas, (m_2). A massa celular (m) foi obtida pela diferença entre m_2 e m_1 . A Equação (3.1) foi utilizada para determinação da concentração celular $[X]$ (g.L^{-1}):

$$[X] = \frac{m (g)}{V (L)} \quad \text{Eq. (3.1)}$$

Em que, X é a concentração celular (g.L^{-1}); M é a massa seca (g) e V é a volume de amostra filtrada (L).

Para a construção da curva de calibração, fez-se diluições da amostra final em diferentes volumes de água destilada, conforme Tabela 3.6, e estas diluições foram lidas em espectrofotômetro a 600 nm.

Tabela 3.6: Diluição da suspensão celular para leituras de densidade óptica a 600 nm

Amostra	Volume do fermentado (mL)	Volume de água (mL)
1	20	0
2	18	2
3	16	4
4	14	6
5	12	8
6	10	10
7	8	12
8	6	14
9	4	16
10	2	18
11	0	20

A partir da concentração celular obtida (Eq. (3.1)), as correspondentes concentrações celulares para os volumes de amostra especificados na Tabela 3.6 foram calculadas pela Equação (3.2).

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad \text{Eq. (3.2)}$$

Na qual, C_1 e C_2 são a concentração inicial e final (g.L^{-1}), respectivamente e, V_1 e V_2 são o volume inicial e final (L), respectivamente.

Com os valores de concentração celular e leitura de densidade óptica obtidos, plotou-se a curva de correlação, a qual gerou uma equação linear do tipo $y = ax + b$. Esta equação foi utilizada para estimar os valores de concentração celular (g.L^{-1}) ao longo do tempo de cultivo a partir da leitura da densidade óptica realizada em cada amostragem.

3.3.3 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores totais foram quantificados em triplicata pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS), com aquecimento da solução em banho-maria, marca Dellta, modelo 105 Di-F, a 100°C por 5 min, segundo Miller (1959), de acordo com o Anexo A.

3.3.4 Determinação de glicose

A glicose foi determinada em triplicata pelo Kit de Glicose PP, método enzimático-colorimétrico (Trinder), marca Gold Analisa, conforme descrito no Anexo B.

3.3.5 Determinação de etanol e ácido acético por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para quantificar a produção de etanol e ácido acético, aplicou-se a metodologia baseada em estudos realizados por Lazaro *et al.* (2012) e Penteado (2012).

O etanol foi determinado em equipamento Cromatógrafo Shimadzu® Proeminence com coluna Aminex® HP-87H Biorad (300 mm x 7,8 mm), forno CTO-20A a temperatura de 64°C, bomba LC-20AT, controlador CBM-20^a e detector por índice de refração RID-10^a.

A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,005 mol.L⁻¹ em fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, e o volume de injeção de 20 µL. Os dados foram obtidos pelo Software LS Solutions.

As amostras do fermentado, para determinação de etanol, foram preparadas em alíquotas de 2 mL. Em seguida, elas foram filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,2 µm.

Para determinação do etanol construiu-se uma curva padrão com soluções de etanol conhecidas (0; 5; 10; 15; 20 e 25 g.L⁻¹).

Ao avaliar o teor de ácido acético empregou-se detector do tipo UV SPD-20A com arranjo de diodos e leitura a 208 nm. As amostras foram preparadas em alíquotas de 1 mL, filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade

de 0,2 μm e acidificada com 40 μL de H_2SO_4 2 mol.L^{-1} (PECINA *et al.*, 1984), para melhor separação dos analitos na coluna.

Elaborou-se uma curva padrão com soluções de ácido acético conhecido (0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 e 1,00 g.L^{-1}).

3.3.6 Determinação do Oxigênio Dissolvido

Monitorou-se o oxigênio dissolvido com medidor de oxigênio dissolvido portátil marca HANNA, modelo HI 9146, com sonda de 4 m, conforme orientação do fabricante, de modo a manter constante a adição de oxigênio no fermentado acético pelo método Orleans Modificado com adição de oxigênio.

3.4 Quantificação da redução de carga orgânica após processos fermentativos

A determinação da carga orgânica inicial presente no permeado de soro de queijo (substrato), bem como da final após as etapas de fermentação alcoólica e acética foi realizado em termos de demanda química e bioquímica de oxigênio, DQO e DBO, respectivamente.

As análises de DQO e DBO foram realizadas segundo método Apha (2005), no laboratório de físico-química da Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNDETEC), Cascavel-PR. A redução em porcentagem da carga orgânica foi avaliada segundo a Equação (3.3).

$$\text{Redução (\%)} = \left(\frac{R_i - R_f}{R_i} \right) * 100 \quad \text{Eq. (3.3)}$$

Na qual, R_i e R_f são os valores de DBO ou DQO inicial e final (g.L^{-1}).

3.4 Tratamento de dados

3.4.1 Velocidade específica de crescimento celular

Ajustaram-se os dados experimentais de concentração celular (X) em função do tempo (t) a um polinômio e derivou-se esta equação polinomial, obtendo-se a Equação (3.4), a partir da qual se pode determinar a velocidade específica de crescimento celular (μ) (h^{-1}). dX/dt foi calculada na fase exponencial utilizando a regra do trapézio (ponto inicial e final da fase exponencial) (HISS, 2001):

$$\mu = \frac{1}{\bar{X}} \frac{dX}{dt} \quad \text{Eq. (3.4)}$$

3.4.2 Fatores de conversão

3.4.2.1 Fator de conversão de substrato em etanol

O fator de conversão de substrato em etanol (produto de interesse) ($Y_{P/S}$) ($g \cdot g^{-1}$) foi obtido a partir do etanol formado (P) durante a fermentação em relação ao substrato consumido (S), conforme Equação (3.5) (HISS, 2001):

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad \text{Eq. (3.5)}$$

3.4.2.2 Fator de conversão de substrato em célula

Determinou-se o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/P}$) ($g \cdot g^{-1}$) a partir da massa de células formada (X) pela massa do substrato consumido (S), baseado na Equação (3.6) (HISS, 2001):

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{Eq. (3.6)}$$

3.4.9.3 Produtividade

A produtividade ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) foi determinada pela razão entre a quantidade de etanol formado e o tempo total de fermentação, consoante a Equação (3.7) (HISS, 2001):

$$\text{Produtividade} = \frac{P - P_0}{\text{tempo total}} \quad \text{Eq. (3.7)}$$

3.5 Análise estatística dos planejamentos experimentais

Os resultados dos planejamentos experimentais foram avaliados a partir do *software* STATISTICA™ (versão 8.0, Statsoft, Inc.). Dessa forma, calcularam-se os principais efeitos das variáveis estudadas, verificando suas interações, superfície de resposta, a validação do modelo ao nível de 10% de significância, análise de variância (ANOVA) e teste F (BARROS *et al.*, 2010; RODRIGUES & IEMMA, 2014).

3.6 Caracterização do fermentado acético

Os fermentados acéticos com maiores teores de ácido acético, verificando a combinação entre leveduras fermentativas e bactérias acéticas, foram caracterizados quanto à demanda bioquímica e química de oxigênio (item 3.4), proteínas (Anexo C), cinzas (Anexo C), umidade (Anexo C), pH (item 3.3.1) e teor de ácido acético (item 3.3.5).

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados os resultados e discussões, obtidos durante a pesquisa de avaliação das condições de produção de fermentado alcoólico e acético utilizando permeado de soro de queijo, com diferentes leveduras e as culturas acéticas.

4.1 Caracterização do permeado de soro de queijo em pó

Na etapa de fermentação alcoólica, o permeado de soro de queijo foi utilizado como fonte de substrato para o crescimento e produção de etanol pelas leveduras *K. marxianus* e *S. boulardii*. Portanto, fez-se necessária a determinação quantitativa dos constituintes presentes neste substrato, sendo que a fonte de carbono (C) é o elemento requerido em maior quantidade. Apesar do nitrogênio (N) ser um elemento necessário para a síntese de proteínas ($\approx 16\%$) e outros componentes celulares, como ácidos nucleicos, entre outros, o carbono é imprescindível como fonte de energia para que o processo se desenvolva.

Na Tabela 4.1 é apresentada a caracterização do permeado de soro de queijo em pó quanto ao teor de lactose, carboidratos, proteínas, lipídios, umidade, cinzas, acidez, DBO e DQO (Anexo D), sais minerais e pH. Nos anexos E e F, estão dispostos maiores detalhes referente às características do permeado, fornecidos pela empresa SOORO Ingredientes Ltda.

Tabela 4.1: Caracterização do permeado de soro de queijo em pó

Caracterização	(mg.L ⁻¹)	(mg.Kg ⁻¹)	(g.100g ⁻¹)	(%)
DBO	65.149			
DQO	168.300			
Lactose				89,42
Proteínas			4,16	
Cálcio		250		
Magnésio		50		
Potássio		751		
Sódio		305		
Carboidratos			90	
Gordura Total			0,1	
Umidade				1,14
Acidez (% ácido láctico)				1,03
Cinzas (sais minerais)				5,28
pH				6,47

De acordo com a Tabela 4.1, verifica-se que o teor de lactose presente no permeado (89,42%) foi condizendo com os relatados de Zacarchenco *et al.* (2012) e Hu & Dickson (2015), os quais citam frações mássicas médias deste componente na faixa de 68 a 90%.

Em relação ao teor de proteína (fonte de N), verifica-se que o permeado apresentou uma quantidade baixa deste nutriente, sendo o valor obtido de 4,16 g.100g⁻¹. Para Esposito (2004), os macroelementos adicionados no meio fermentescível onde o produto de interesse é o etanol, devem ter uma relação (C:N), onde o componente (C) esteja em excesso, pois favorecerá o acúmulo de etanol e outros metabólitos secundários. Já uma relação (C:N) maior ou igual a 10, promoverá alto conteúdo protéico (biomassa celular), e conseqüentemente menor quantidade de etanol. Verifica-se, portanto (Tabela 4.1), que o permeado atende esta relação (C:N), tendo elevado teor de lactose, frente a pequena quantidade de proteína presente, o que favorece sua aplicação na etapa de fermentação alcoólica.

O permeado também é formado por sais minerais, considerados macronutrientes na composição de meios de cultura, como o cálcio, magnésio, e potássio e também pelo micronutriente, sódio (Tabela 4.1). Nutrientes estes essenciais para o metabolismo e crescimento de leveduras (ROSE, 1976), e segundo Rehm *et al.* (1995), eles são requeridos no meio por serem responsáveis pela regulação do transporte de cátions divalentes, como é o caso do potássio. Ainda os íons de potássio servem de coenzima. O magnésio é utilizado como cofator ou ativador de enzimas na etapa de glicólise, e na membrana ATP-ases, aumentando a síntese de ácidos graxos e regulando o nível de íons intracelulares. Já o sódio, requerido em menores quantidades, também apresenta papel fundamental na regulação da pressão osmótica da célula, sendo responsável pela manutenção da viabilidade celular.

Em relação aos valores de DBO e DQO, verificou-se que o permeado apresentou elevados valores (Tabela 4.1), retratando seu potencial poluidor. Observa-se que a DBO do permeado (65.149 mg.L⁻¹) é condizente com a literatura, a qual cita valores entre 30.000 e 60.000 mg.L⁻¹ (GUIMARÃES *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2012; PRAZERES *et al.*, 2012; ZACARCHENCO *et al.*, 2012). Em relação à DQO, Guimarães *et al.* (2010) relataram valores entre 60.000 e

80.000 mg.L⁻¹. Já Assunção (2014) encontrou valores de DQO de 168.100 mg.L⁻¹ e DBO de 85.314 mg.L⁻¹. Valores estes, muito próximos aos obtidos nesta pesquisa.

4.2 Fermentação Alcoólica

Os perfis cinéticos, em termos de produção de etanol (g.L⁻¹), concentração celular (g.L⁻¹), consumo de substrato (g.L⁻¹) e pH, foram determinados para todos os ensaios, sendo que neste item, serão apresentados apenas os perfis para as condições que promoveram os melhores resultados em termo de produção de etanol para *K. marxianus* e *S. boulardii*. Os demais perfis cinéticos encontram-se nas Figuras A 1 e B 1, nos Apêndices A (*K. marxianus*) e E (*S. boulardii*). Avaliou-se a concentração celular aplicando a curva de correlação disposta no Apêndice C. E, a curva padrão de etanol, obtida por Cromatografia líquida de alta eficiência, empregada para quantificação do etanol encontra-se no Apêndice D.

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada no tempo de 45 h de fermentação para todos os ensaios com as duas leveduras estudadas.

4.2.1 *Kluyveromyces marxianus*

As variáveis utilizadas no planejamento experimental fatorial 2³ foram permeado de soro de queijo, pH e temperatura, e a variável resposta foi a produção de etanol (g.L⁻¹) obtida nas fermentações com a levedura *K. marxianus* em 45 h de fermentação. Os resultados são apresentados na Tabela 4.2.

Verifica-se (Tabela 4.2) que, em todos os ensaios, houve produção de etanol, evidenciando a capacidade desta levedura em metabolizar de forma direta o permeado de soro de queijo, convertendo-o em biomassa e etanol. Este resultado foi condizente com estudos realizados por Coté *et al.* (2004); Silveira *et al.* (2005); Gabardo *et al.* (2014); Ferreira *et al.* (2015); Fasoli *et al.* (2016) e Gabardo *et al.* (2016).

Tabela 4.2: Matriz do planejamento experimental 2³ com os valores reais das variáveis averiguadas e a resposta para o etanol (g.L⁻¹) para a levedura *Kluyveromyces marxianus* no tempo de 45 h de fermentação

Ensaio	Variáveis independentes			Variável resposta
	Temperatura (°C)	pH	[Permeado] (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)
1	29	4,5	100	56,52
2	45	4,5	100	27,36
3	29	6,5	100	33,11
4	45	6,5	100	19,00
5	29	4,5	300	42,80
6	45	4,5	300	18,04
7	29	6,5	300	33,84
8	45	6,5	300	5,55
9	37	5,5	200	37,53
10	37	5,5	200	37,00

Ainda na Tabela 4.2, tem-se que o ensaio 1 (T = 29°C; pH (4,5); [Permeado] = 100 g.L⁻¹) apresentou a maior produção de etanol, obtendo uma concentração de 56,52 g.L⁻¹. Seguido pelos ensaios 5; 9 e 10, os quais apresentaram comportamento similar, visto que a produção de etanol foi 42,80; 37,53 e 37,00 g.L⁻¹, respectivamente. Verifica-se também, que o ensaio 8 (T = 45°C; pH (6,5); [Permeado] = 300 g.L⁻¹) teve a menor produção de etanol, obtendo 5,55 g.L⁻¹ em 45 h de fermentação. Essa redução de produção está relacionada ao aumento da temperatura e pH, como pode ser visto a seguir no planejamento experimental.

A análise estatística dos resultados é apresentada pelo Diagrama de Pareto (Figura 4.1), pela estimativa de efeitos principais e interações das variáveis (Tabela 4.3), análise de variância (ANOVA) (Tabela 4.4), modelo de regressão (Eq. 4.1), gráfico dos resíduos em função dos valores preditos e valores preditos por valores observados (Figura 4.2) e as superfícies de resposta (Figura 4.3).

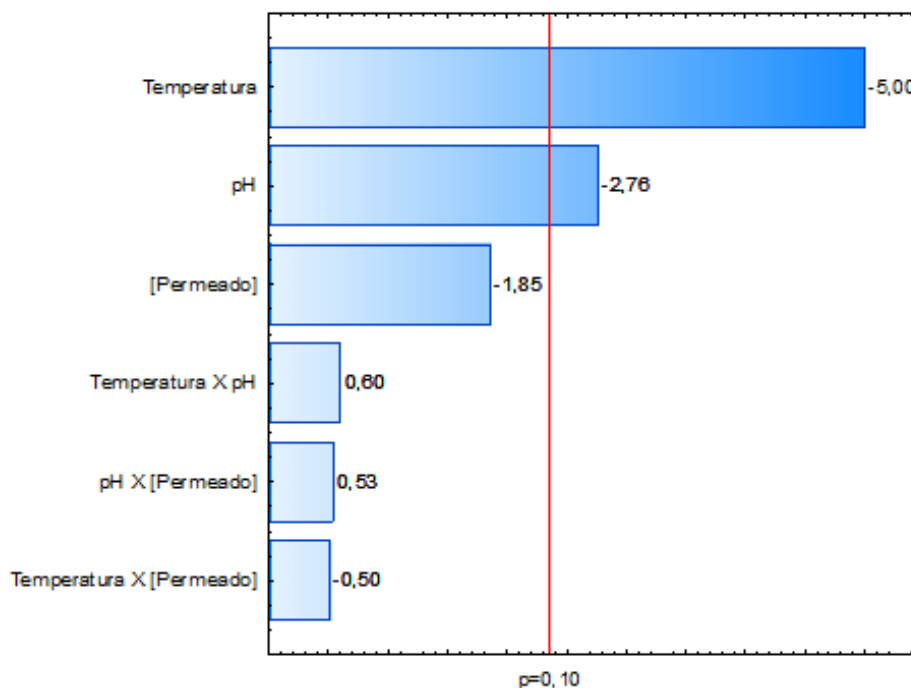


Figura 4.1: Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações verificadas no planejamento 2^3 para a levedura *K. marxianus* ao nível de significância de 90%

Tabela 4.3: Estimativa dos efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas no planejamento experimental 2^3 para a levedura *K. marxianus* no tempo de 45 h de fermentação

Variáveis	Efeito	p-valor	Coefficiente	Erro padrão do coeficiente
Média/Intercepto	31,07	0,00	31,07	2,15
Temperatura (°C)	-24,08	0,01	-12,04	2,40
pH	-13,30	0,06	-6,65	2,40
[Permeado] (g.L ⁻¹)	-8,94	0,16	-4,47	2,40
Temperatura X pH	2,88	0,59	1,44	2,40
Temperatura X [Permeado]	-2,44	0,64	-1,22	2,40
pH X [Permeado]	2,58	0,62	1,29	2,40

R²: 0,925

De acordo com diagrama de Pareto (Figura 4.1) e o p-valor (Tabela 4.3), verifica-se que, dentre as variáveis avaliadas, a temperatura e o pH são significativas, ou seja, possuem influência na produção de etanol dentro de um intervalo de confiança de 90% ($p\text{-valor} < 0,10$). Pelo diagrama de Pareto (Figura 4.1), torna-se mais evidente que a variável temperatura apresentou maior influência sobre o processo. Esse efeito é um efeito negativo, assim como, o do pH. A produção diminui com o aumento da temperatura e do pH.

A Tabela 4.4 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA), a qual foi utilizada na regressão dos dados experimentais e das superfícies de

respostas. A partir do teste F, comparou-se o valor de F calculado (F_{calc}) com F tabelado (F_{tab}). O valor de F tabelado para um intervalo de confiança de 90% é de $F_{\text{tab } 2;7;0,10} = 3,26$ (BARROS *et al.*, 2010).

Tabela 4.4: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento 2^3 para a levedura *Kluyveromyces marxianus*

Fonte de variância	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F_{calc}	Coefficiente de determinação (R^2)
Modelo	1513,73	2	756,86	15,54	0,925
Erro	340,79	7	48,68		
TOTAL	1854,52	9			

Verifica-se que o valor do F_{calc} é aproximadamente 5 vezes maior que o F_{tab} , assim o modelo proposto é válido para o comportamento desta levedura (*K. marxianus*). A equação obtida pela análise estatística do modelo de regressão pelas variáveis codificadas é apresentada na Equação 4.1:

Etanol (g. L^{-1}) (Eq. 4.1)

$$\begin{aligned}
 &= -24,08 \cdot \text{Temperatura} - 13,30 \cdot \text{pH} - 8,94 \cdot [\text{Permeado}] \\
 &+ 2,88 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{pH} \\
 &- 2,44 \cdot \text{Temperatura} \cdot [\text{Permeado}] \\
 &+ 2,58 \cdot \text{pH} \cdot [\text{Permeado}]
 \end{aligned}$$

A validação do modelo pela ANOVA pode ser ainda comprovada pelo comportamento observado no gráfico de resíduos em função dos valores preditos pelo modelo de regressão e valores observados, além do gráfico da probabilidade normal dos resíduos, sendo estes apresentados na Figura 4.2.

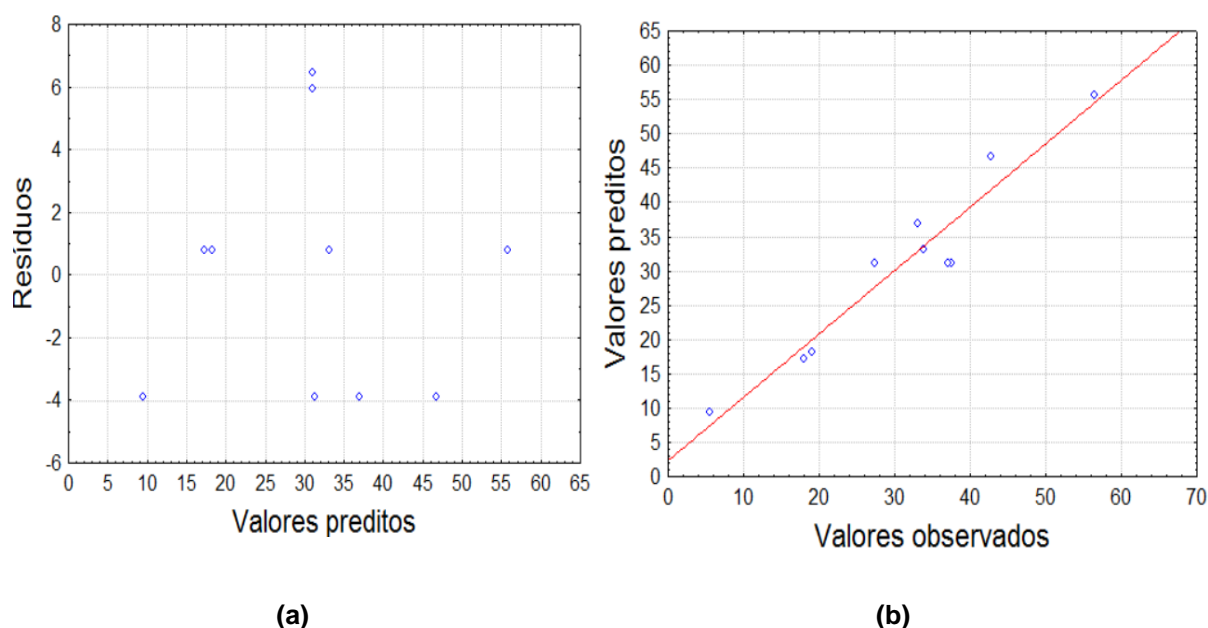


Figura 4.2: Resultado estatístico do planejamento experimental 2³ para a levedura *Kluyveromyces marxianus* – **(a)** resíduos em função dos valores preditos e **(b)** valores preditos por valores observados

Ao observar a Figura 4.2 (a), constata-se que a distribuição dos resíduos ocorreu de modo aleatório e próximo do zero para os valores preditos, o que confirma um ajuste adequado do modelo de regressão e sem tendências durante a predição dos valores calculados. Pela Figura 4.2 (b), verifica-se ausência de valores discrepantes ou *outliers*.

As superfícies de resposta geradas a partir da análise estatística dos resultados são apresentadas na Figura 4.3 (a), (b) e (c).

Avaliando (Figura 4.3 (a), (b) e (c)) as relações existentes entre as variáveis significativas e a produção de etanol, tem-se que a temperatura e o pH apresentam maior influência, sendo esta negativa para ambos, ou seja, para aumentar a produção de etanol a partir de permeado de soro de queijo deve-se trabalhar em temperaturas e pH menores (Figura 4.4 (a)). Uma vez que, em temperaturas e pH maiores, houve o favorecimento da produção celular ao invés de etanol (Figura 4.4 (b)), conjuntamente, o mesmo comportamento ocorre quando há elevada concentração de permeado de soro de queijo no meio.

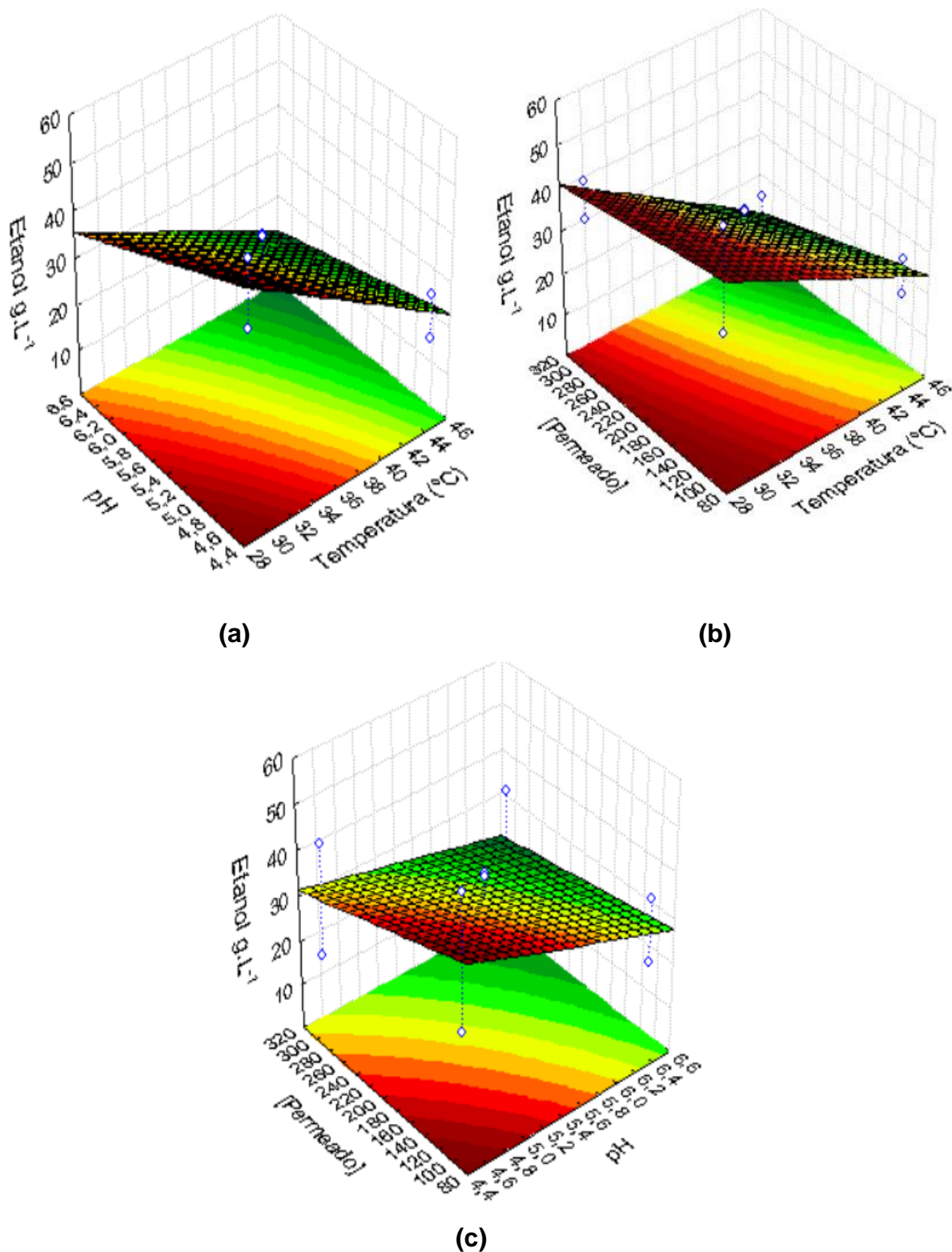


Figura 4.3: Superfície de resposta para as variáveis: (a) pH e temperatura; (b) permeado e temperatura e (c) permeado e pH

Hadiyanto *et al.* (2014) afirmaram que a concentração de substratos, pH e temperatura são variáveis que afetam diretamente a produção de etanol.

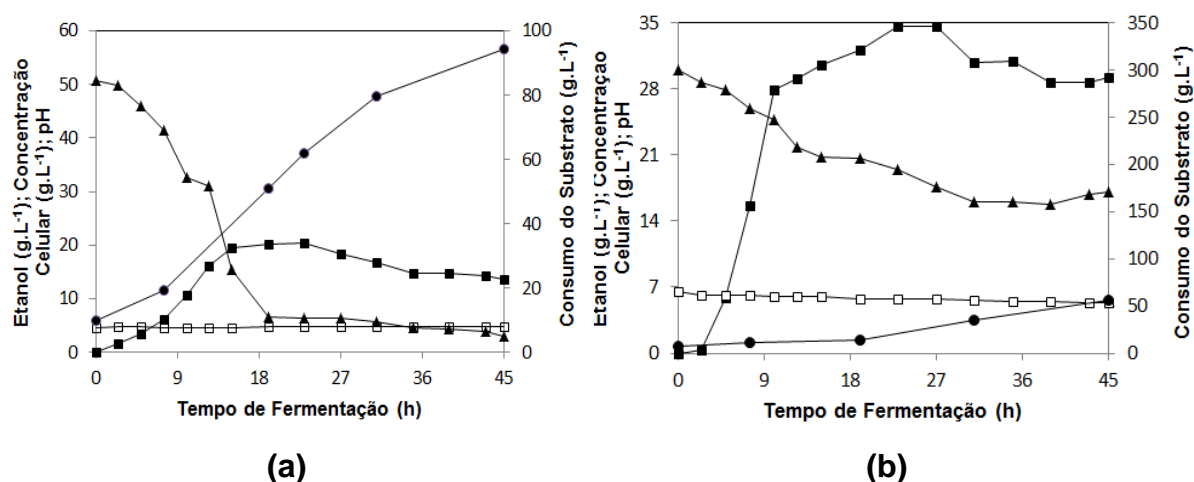


Figura 4.4: Perfil cinético de produção de etanol (g.L⁻¹), concentração celular (g.L⁻¹), consumo de substrato (g.L⁻¹) e pH durante 45 horas de fermentação: **(a)** Ensaio 1 (T = 29°C; pH (4,5); [Permeado] = 100 g.L⁻¹) e **(b)** Ensaio 8 (T = 45°C; pH (6,5); [Permeado] = 300 g.L⁻¹), etanol (g.L⁻¹) (●), concentração celular (g.L⁻¹) (◻), consumo de substrato (g.L⁻¹) (◻) e pH (◻)

Assunção (2014), utilizando a levedura *K. marxianus* e meio composto por permeado de soro de queijo na concentração de 150 g.L⁻¹, suplementado com sulfato de amônio (2,0 g.L⁻¹), sulfato de magnésio (2,5 g.L⁻¹) e fosfato monobásico de potássio (1,0 g.L⁻¹), nas condições de processo: 30°C, pH (6,5), agitação de 100 rpm e adição de 1,0 vvm de oxigênio, obteve 52,10 g.L⁻¹ de etanol em 24 h de fermentação. Já no presente estudo, a maior produção (56,52 g.L⁻¹) de etanol foi obtida nas condições do ensaio 1 (100 g.L⁻¹ de permeado, 29°C e pH (4,5)), assim, evidenciando que pH menores com menor concentração de permeado, promoveram maior produção de etanol com a *K. marxianus*.

Na Tabela 4.5 são apresentados os valores de concentração celular (ΔX (g.L⁻¹)), velocidade específica de crescimento (μ (h⁻¹)), consumo de substrato (açúcar redutor consumido) (ΔS (g.L⁻¹)), conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$ (g.g⁻¹)), conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$ (g.g⁻¹)) e produtividade (g.L⁻¹h⁻¹) para a levedura *K. marxianus* nos 10 ensaios definidos pelo planejamento experimental.

Tabela 4.5: Concentração celular (ΔX), velocidade específica de crescimento (μ), consumo do substrato (ΔS), conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$), conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade para a levedura *Kluyveromyces marxianus* em 45 h de fermentação

Ensaio	ΔX (g.L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	ΔS (g.L ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ h ⁻¹)
1	13,58	0,12	79,50	0,17	0,63	1,12
2	5,48	0,07	68,50	0,08	0,30	0,50
3	4,80	0,13	62,70	0,07	0,46	0,64
4	8,89	0,08	67,70	0,07	0,24	0,36
5	3,38	0,07	139,50	0,02	0,27	0,86
6	22,35	0,16	148,10	0,15	0,06	0,19
7	9,44	0,03	226,10	0,04	0,13	0,69
8	29,21	0,18	129,8	0,20	0,03	0,10
9	18,61	0,02	111,20	0,16	0,30	0,71
10	19,50	0,01	110,5	0,17	0,28	0,70

De acordo com a Tabela 4.5, verifica-se que o ensaio 1 ($T = 29^{\circ}\text{C}$; pH (4,5); [Permeado] = 100 g.L⁻¹), além de elevada produção de etanol, também apresentou maior produtividade 1,12 g.L⁻¹h⁻¹, seguido pelo ensaio 5 ($T = 29^{\circ}\text{C}$; pH (4,5); [Permeado] = 300 g.L⁻¹) com 0,86 g.L⁻¹h⁻¹. Verifica-se que as duas melhores condições em termos de produtividade, empregaram a mesma temperatura e pH, tendo como única variável a concentração de permeado, sendo esta maior no ensaio 5 (Figura 4.5). Acredita-se que o excesso de permeado pode ter desfavorecido o crescimento celular, provocando inibição (ANDREWS, 1968), obtendo menor produção de biomassa celular frente ao ensaio 1 (Figura 4.4 (a)), e conseqüentemente menor formação de etanol. Resultado esperado, conforme Figura 4.3 (c).

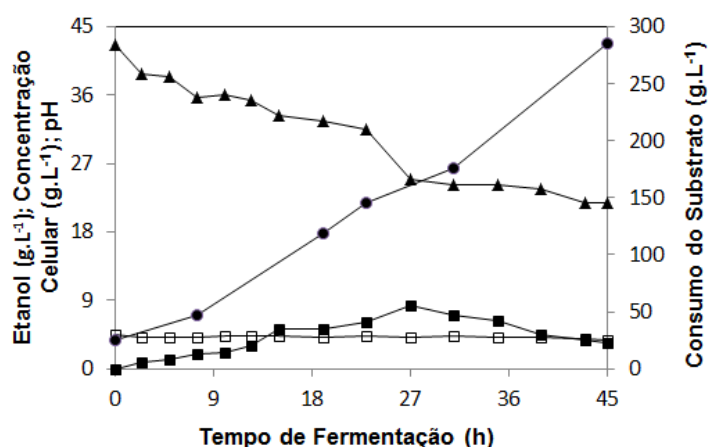


Figura 4.5: Perfil cinético de produção de etanol (g.L⁻¹), concentração celular (g.L⁻¹), consumo de substrato (g.L⁻¹) e pH durante 45 horas de fermentação para o Ensaio 5 ($T = 29^{\circ}\text{C}$; pH (4,5); [Permeado] = 300 g.L⁻¹) em que: etanol (g.L⁻¹) (●), concentração celular (g.L⁻¹) (■), consumo de substrato (g.L⁻¹) (▲) e pH (□)

Lucero *et al.* (1993); Entian (1997); Does & Bisson (1998); Ozmihci & Kargi (2007-c); Staniszewski *et al.* (2009) e Trigueiros *et al.* (2016), relataram que comportamentos assim, podem ser explicados, devido à glicose ser rapidamente metabolizável pelas mais diversas espécies de microrganismos. Assim, dependendo das condições de cultivo, inibindo/reprimindo a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono, particularmente, enzimas envolvidas na glicogênese, ciclo do ácido tricarboxílico, ácido glioxilato e catabolismo de açúcar fornecido ao meio, tais como, maltose, sacarose e galactose, e, portanto não sendo capaz de metabolizá-las, limitando a continuidade do processo fermentativo. Além de redução na velocidade de crescimento, e conseqüentemente, sofrendo também inibição pelos substratos formados (ANDREWS, 1968; TRIGUEIROS *et al.*, 2016).

No estudo desenvolvido por Hadiyanto *et al.* (2014) com objetivo de produção de etanol a partir de soro de leite usando *K. marxianus* em reator batelada alimentada, com meio contendo 4,1% de soro de leite suplementado com 0,1% de extrato de levedura, a 30°C e pH (4,5). Os autores obtiveram produção de biomassa e etanol de 0,32 g de biomassa por g de substrato consumido e 5,46 g.L⁻¹, respectivamente, com velocidade específica de crescimento de 0,186 h⁻¹ e conversão de substrato em etanol Y_{P/S} (0,21 g.g⁻¹).

Gabardo *et al.* (2014) objetivando a produção de etanol com soro e permeado de soro de leite com *K. marxianus*, compararam cultivos agitados com células livres e cultivos em biorreator de leite fluidizado em lote com célula imobilizada. A maior produtividade de etanol (1,15 g.L⁻¹h⁻¹) foi observada em cultivos agitados, enquanto que para a levedura imobilizada e cultivada em biorreator de leite fluidizado em lote, a maior produtividade de etanol foi 2,53 g.L⁻¹h⁻¹. Os autores concluíram que o sistema de leite fluidizado e célula imobilizada propiciaram uma maior área de contato entre o substrato e a célula.

Os mesmos autores (GABARDO *et al.*, 2016) em outro estudo de produção de bioetanol com soro e permeado de soro de leite, em biorreatores de leite fluidizado empregando *S. cerevisiae* e *K. marxianus*, obtiveram conversões de substrato em etanol na faixa de 0,47 a 0,49 g.g⁻¹ e produtividade de 1,39 a 1,68 g.L⁻¹h⁻¹ em soro e permeado de soro, respectivamente. A maior produtividade detectada foi com a *K. marxianus*, 180 g.L⁻¹ de permeado, 30°C e

pH (7,0), obtendo-se rendimento de $0,46 \text{ g.g}^{-1}$ e $79,1 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. Finalizaram verificando a viabilidade em empregar a levedura *K. marxianus* no processo de obtenção de etanol, uma vez que esta levedura metaboliza com facilidade a lactose presente no substrato, reduzindo a etapa de hidrólise presente no processo quando aplicada a levedura *S. cerevisiae*.

Oda *et al.* (2010) investigaram a produção de etanol com *K. marxianus*, empregando como substrato suco de beterraba com soro de queijo, à 30°C , aeração de 15 mL.min^{-1} em 72 h de fermentação, e obtiveram 102 mg.mL^{-1} de etanol, rendimento de 92,9% e produtividade de $48,7 \text{ mg.mL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Concluíram que a levedura (*K. marxianus*) produziu etanol de forma eficiente neste substrato e, além disso, contribuiriam para uma destinação adequada para o soro de leite.

Burlani (2014) obteve uma produção de etanol de $10,40 \text{ g.L}^{-1}$ com *K. marxianus* e permeado de soro de queijo puro ($\approx 50 \text{ g.L}^{-1}$ de lactose) em 24 h de fermentação, a 37°C , agitação de 150 rpm e pH (5,0). Além disso, o autor verificou 63% de redução da carga orgânica (DQO) do permeado com 24 h de fermentação, confirmando que o potencial poluidor deste resíduo lácteo pode ser reduzido ao empregar processos fermentativos. O autor relatou, ainda, que a levedura (*K. marxianus*) pode ser empregada para a obtenção de etanol, uma vez que se o processo for empregado em escala industrial é possível obter um novo produto.

Os resultados obtidos por Ferreira *et al.* (2015), na fermentação com mistura de bagaço de cana e soro de ricota e *K. marxianus*, foram de $49,65 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol com biomassa celulósica de 80 g.L^{-1} , pH (5,05), agitação de 65 rpm e temperatura de $39,20^{\circ}\text{C}$. Resultado similar ao obtido por esta pesquisa no ensaio 5 ($T = 29^{\circ}\text{C}$, pH(4,5) e 300 g.L^{-1} de permeado). Os autores concluíram que adição de soro de ricota ao bagaço de cana é promissora para a produção de etanol, pois o rendimento foi superior ao etanol produzido apenas por bagaço de cana puro.

Zoppellari & Bardi (2013) analisaram a produção de bioetanol a partir de soro de leite com *K. marxianus*. Alcançaram maiores produções nas fermentações anaeróbias, conduzidas a 400 rpm e em duas temperaturas. Os autores obtiveram $17,04 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol na fermentação (quarto dia), conduzida a 28°C , e $14,91 \text{ g.L}^{-1}$ (terceiro dia) no ensaio a 40°C . Por fim, eles concluíram que empregar o soro

para a produção de bioetanol foi adequado e que temperaturas menores favoreceram a produção de etanol.

Sansonetti *et al.* (2009) também avaliaram a produção de bioetanol por *K. marxianus* com soro de ricota e permeado de soro de leite. No ensaio realizado com permeado de soro, a 37°C, 150 rpm, pH (5,0) e adição de oxigênio de 0,2%, obtiveram aproximadamente 5,00 g.L⁻¹ de etanol em 18 h. Enquanto que no ensaio com soro de ricota nas mesmas condições, foram obtidos, em 18 h, em torno de 20,00 g.L⁻¹ de etanol. Verificaram que o substrato soro de ricota apresentou melhor desempenho para obtenção de bioetanol, retratando ser uma fonte alternativa para a geração de etanol.

Silveira *et al.* (2005), empregando a mesma levedura (*K. marxianus*), 240 g.L⁻¹ de lactose, adição de oxigênio, a 250 rpm e 30°C, obtiveram 57.00 g.L⁻¹ de etanol. Resultado próximo ao obtido no ensaio 1 (presente estudo) (T = 29°C; pH (4,5); [Permeado] = 100 g.L⁻¹). Os autores concluíram que altas concentrações de permeado com baixos níveis de oxigênio, promovem uma melhor conversão de lactose em etanol.

Assim, a partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, bem como dos estudos desenvolvidos pelos diversos autores citados, ficou evidenciado que a temperatura é fundamental para a produção de etanol com *K. marxianus* em resíduos lácteos.

4.2.1 *Saccharomyces boulardii*

Para a levedura *S. boulardii*, foi realizado um planejamento experimental fatorial 2³ para avaliar os efeitos da concentração de permeado de soro de queijo, pH e temperatura, obtendo como variável resposta a produção de etanol em 45 h de fermentação. Na Tabela 4.6 são apresentadas as variáveis do processo e variável resposta para o etanol (g.L⁻¹).

Ao se analisar a Tabela 4.6, verifica-se que o permeado de soro de queijo foi assimilado pela levedura *S. boulardii*, favorecendo o seu crescimento neste meio e a obtenção de etanol, visto que essa levedura não metaboliza de forma direta, em condição de anaerobiose, a fonte de carbono galactose (FERREIRA, 2005). Esse comportamento também foi observado por Assunção (2014); Fiorese *et al.* (2015); Nadai (2015) e Trigueiros *et al.* (2016).

Tabela 4.6: Matriz de planejamento experimental 2^3 com os valores reais das variáveis averiguadas e resposta para o etanol (g.L^{-1}) para a levedura *Saccharomyces boulardii* no tempo de 45 h de fermentação

Ensaio	Variáveis independentes			Variável resposta
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH	[Permeado] (g.L^{-1})	Etanol (g.L^{-1})
1	26	4,0	100	9,00
2	37	4,0	100	24,44
3	26	6,0	100	2,22
4	37	6,0	100	4,82
5	26	4,0	300	9,19
6	37	4,0	300	4,00
7	26	6,0	300	57,79
8	37	6,0	300	69,43
9	32	5,0	200	7,22
10	32	5,0	200	7,16

De acordo com a Tabela 4.6, observa-se que o ensaio 8 ($T = 37^{\circ}\text{C}$; pH (6,0); [Permeado] = 300 g.L^{-1}) apresentou a maior produção de etanol ($69,43 \text{ g.L}^{-1}$), seguido pelo ensaio 7 com $57,79 \text{ g.L}^{-1}$ ($T = 26^{\circ}\text{C}$; pH (6,0); [Permeado] = 300 g.L^{-1}). A menor produção de etanol ocorreu no ensaio 3, sendo esta de $2,22 \text{ g.L}^{-1}$ ($T = 26^{\circ}\text{C}$; pH (6,0); [Permeado] = 100 g.L^{-1}).

A análise estatística dos resultados foi obtida pelo Diagrama de Pareto (Figura 4.6), estimativa de efeitos principais e interações das variáveis (Tabela 4.7), análise de variância (ANOVA) (Tabela 4.8), modelo de regressão (Eq. 4.2), gráfico dos resíduos em função dos valores preditos e valores preditos por valores observados (Figura 4.7), além de superfícies de resposta (Figura 4.7).

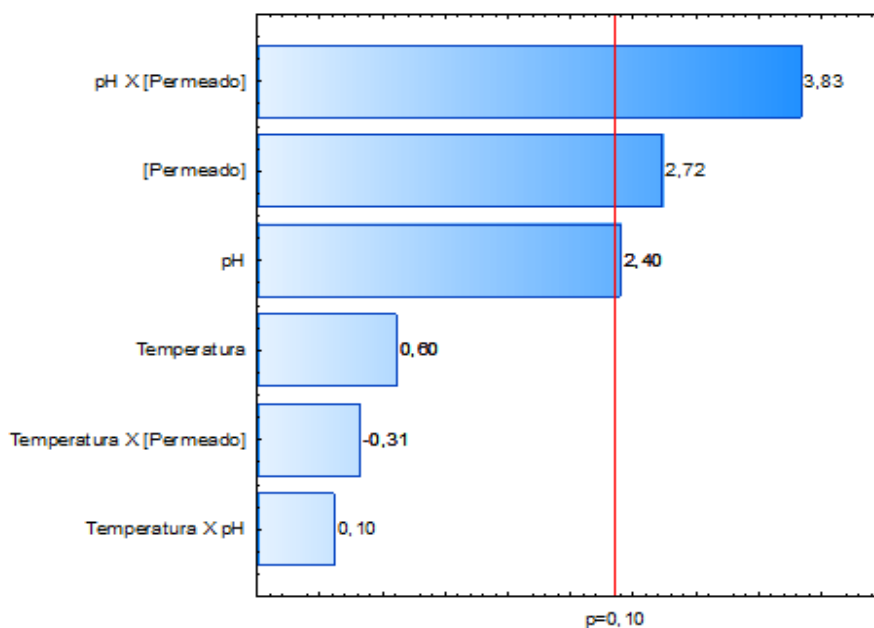


Figura 4.6: Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações verificadas no planejamento 2^3 para a levedura *Saccharomyces boulardii* para um nível de significância de 90%

Tabela 4.7: Estimativa de efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas no planejamento experimental 2^3 para a levedura *Saccharomyces boulardii* em 45 h de fermentação

Variáveis	Efeito	p-valor	Coefficiente	Erro padrão do coeficiente
Média/Intercepto	19,47	0,01	19,47	4,09
Temperatura (°C)	5,55	0,58	2,77	4,57
pH	21,90	0,09	10,95	4,58
[Permeado] (g.L⁻¹)	24,98	0,07	12,49	4,58
Temperatura X pH	0,99	0,92	0,49	4,58
Temperatura X [Permeado]	-2,89	0,77	-1,44	4,58
pH X [Permeado]	35,10	0,03	17,55	4,58

R²: 0,9041.

Analisando o diagrama de Pareto (Figura 4.6) e o p-valor (Tabela 4.7), observa-se que o pH, a concentração de permeado e a interação entre estas duas variáveis, influenciaram de forma significativa e positiva o processo de produção de etanol por *S. boulardii*, sendo a interação entre as variáveis, a maior significância observada (Figura 4.6), dentro de um intervalo de confiança de 90% (p-valor<0,10). Além disso, verifica-se que o fator temperatura no pH maior e concentração de permeado maior, influenciam a produção de etanol.

A Tabela 4.8 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA), para a resposta etanol.

Tabela 4.8: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento 2^3 para a levedura *Saccharomyces boulardii*

Fonte de variância	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F _{calc}	Coefficiente de determinação (R ²)
Modelo	4673,20	3	1557,73	15,99	0,9041
Erro	584,29	6	97,38		
TOTAL	5257,49	9			

Observa-se (Tabela 4.8) que o modelo foi significativo quando empregado para fins preditivos, uma vez que o mesmo proporcionou um coeficiente de determinação de $R^2 = 0,9041$. Aplicando o teste F (Tabela 4.8), tem-se que o valor de $F(\text{calc}) = 15,99$ foi 5 vezes maior que o valor de $F_{\text{tab } 3,6,0,10} = 3,29$ (BARROS *et al.*, 2010) para um intervalo de confiança de 90%.

Assim, pode-se afirmar que o modelo de regressão proposto (Eq. 4.2) é válido, e permite descrever o comportamento de *S. boulardii* em meio permeado de soro para a produção de etanol, com as variáveis (codificadas) e faixas propostas, e assim, os parâmetros da equação ajustando-se aos dados experimentais.

$$\begin{aligned}
 \text{Etanol (g. L}^{-1}\text{)} & \hspace{20em} \text{(Eq. 4.2)} \\
 &= 5,55. \text{Temperatura} + 21,90. \text{pH} + 24,98. [\text{Permeado}] \\
 &+ 0,99. \text{Temperatura X pH} \\
 &- 2,89. \text{Temperatura X } [\text{Permeado}] \\
 &+ 35,10 \text{ pH X } [\text{Permeado}]
 \end{aligned}$$

O modelo obtido pela ANOVA pode ainda ser validado, pelo comportamento observado no gráfico dos resíduos em função dos valores preditos pelo modelo de regressão, e no gráfico da probabilidade normal dos resíduos, apresentados na Figura 4.6 (a) e (b).

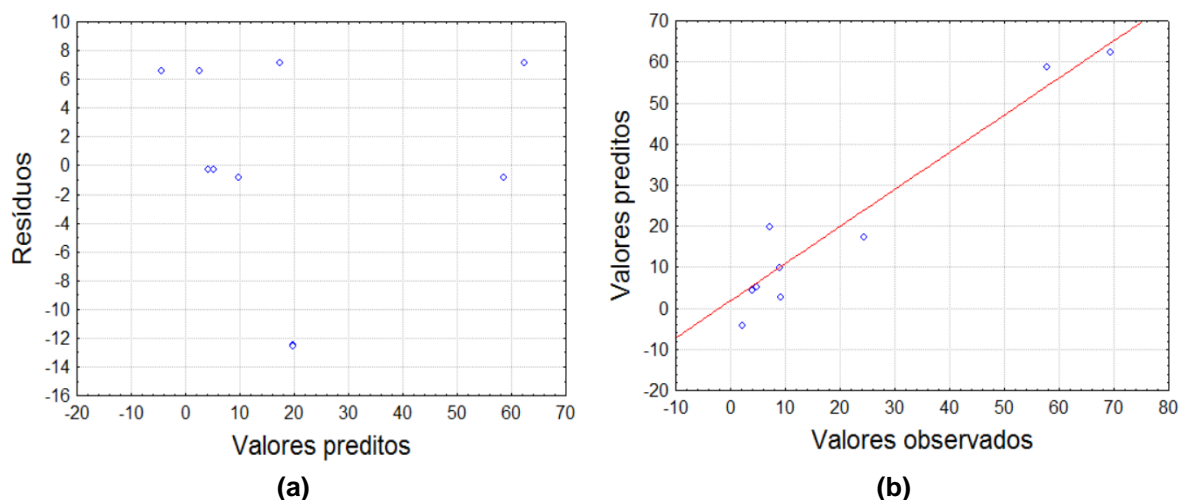


Figura 4.7: Resultado estatístico do planejamento experimental 2^3 para a levedura *Saccharomyces boulardii* – **(a)** resíduos em função dos valores preditos e **(b)** valores preditos por valores observados

Na Figura 4.7 (a), verifica-se que as distribuições dos resíduos ocorreram de modo aleatório, conforme os valores preditos próximo do zero e valores superiores a 1. Enquanto, a Figura 4.7 (b) mostra que os valores observados estão em boa concordância com os valores preditos, conforme análise de variância.

As superfícies de resposta geradas a partir da análise estatística dos resultados são apresentadas na Figura 4.8.

Verifica-se na Figura 4.8 (a), (b) e (c), que os parâmetros pH X Permeado, permeado e pH apresentaram influência positiva, uma vez que, maior pH e concentrações elevadas de permeado favoreceram a produção etanol. Já a temperatura, dentro da faixa avaliada, não apresentou influência na produção de etanol.

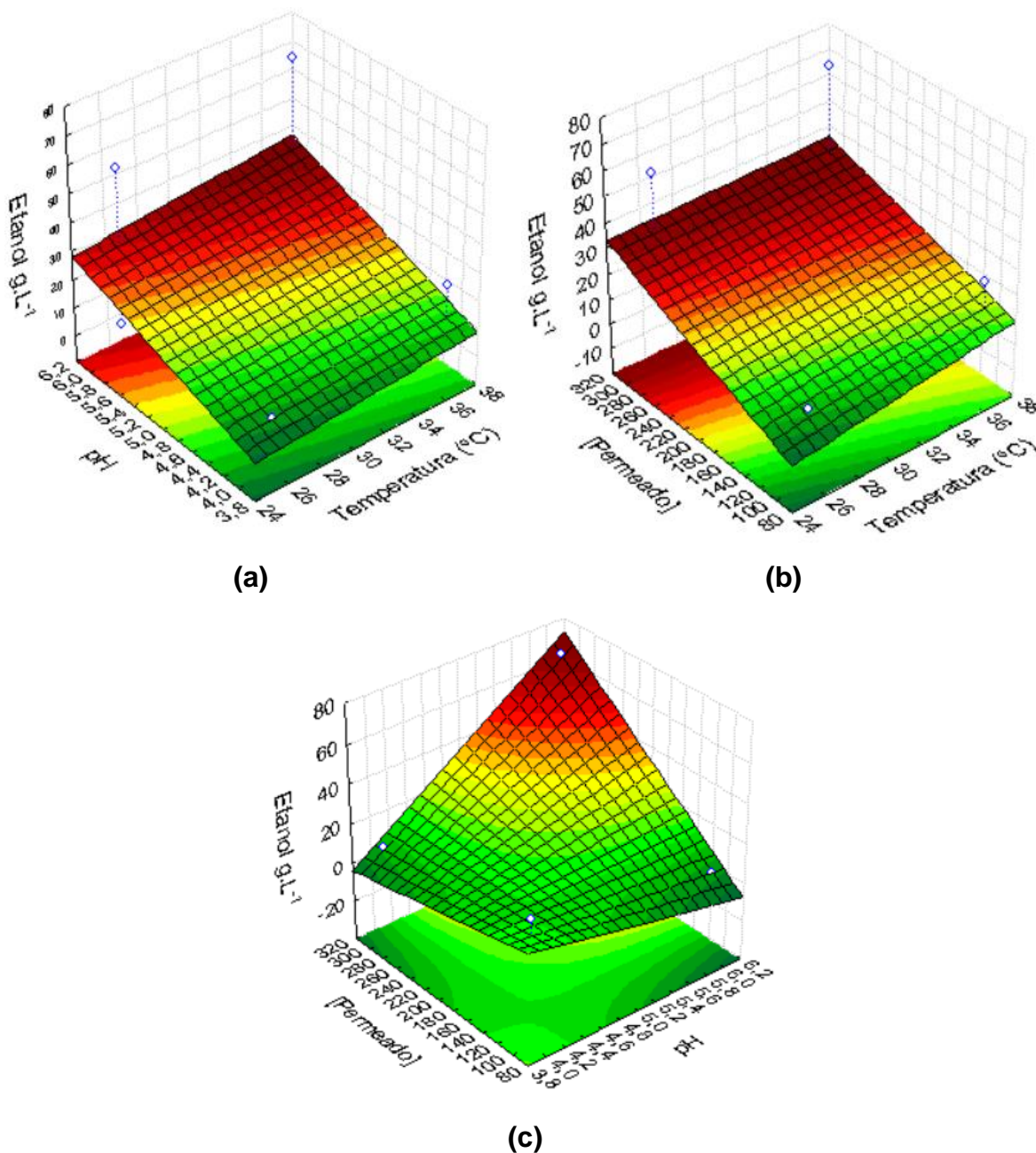


Figura 4.8: Superfície de resposta para as variáveis: **(a)** pH e temperatura; **(b)** permeado e temperatura e **(c)** permeado e pH

Esta resposta positiva, em elevados valores de pH e permeado de soro, pode ser melhor visualizada na Figura 4.9 ((a), (b), (c) e (d)), a qual apresenta o perfil cinético dos ensaios 3 ($T = 26^{\circ}\text{C}$; pH (6,0); [Permeado] = 100 g.L^{-1}), 4 ($T = 37^{\circ}\text{C}$; pH (6,0); [Permeado] = 100 g.L^{-1}), 7 ($T = 26^{\circ}\text{C}$; pH (6,0); [Permeado] = 300 g.L^{-1}) e 8 ($T = 37^{\circ}\text{C}$; pH (6,0); [Permeado] = 300 g.L^{-1}) com *S. boulardii*, de produção de etanol (g.L^{-1}), crescimento celular (g.L^{-1}), consumo do substrato (g.L^{-1}) e pH ao longo de 45 h de fermentação.

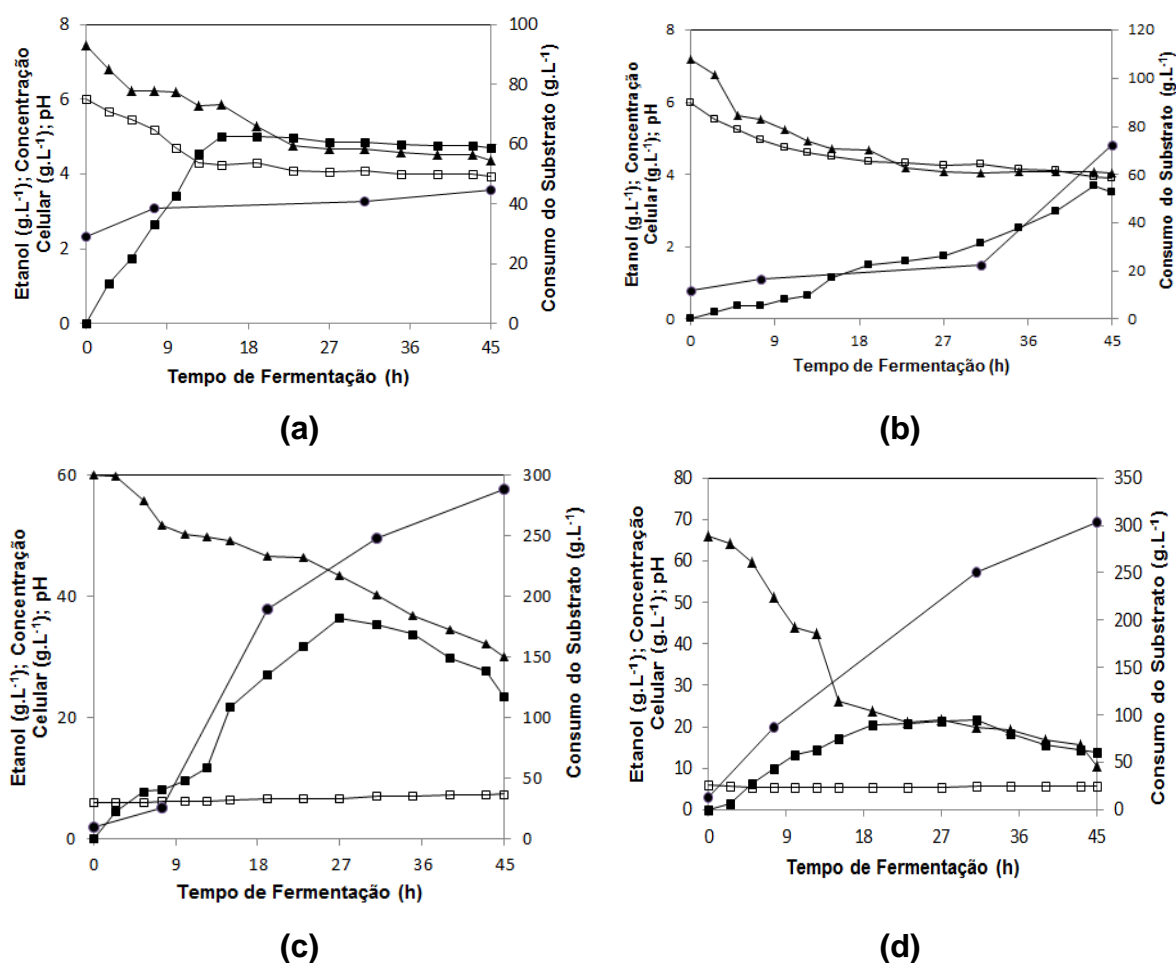


Figura 4.9: Cinética de produção de etanol (g.L⁻¹), concentração celular (g.L⁻¹), consumo de substrato (g.L⁻¹) e pH durante o processo fermentativo: **(a)** Ensaio 3 (T = 26°C; pH (6,0); [Permeado] = 100 g.L⁻¹), **(b)** Ensaio 4 (T = 37°C; pH (6,0); [Permeado] = 100 g.L⁻¹), **(c)** Ensaio 7 (T = 26°C; pH (6,0); [Permeado] = 300 g.L⁻¹), **(d)** Ensaio 8 (T = 37°C; pH (6,0); [Permeado] = 300 g.L⁻¹), em que: etanol (g.L⁻¹) (●), concentração celular (g.L⁻¹) (◻), consumo de substrato (g.L⁻¹) (◻) e pH (◻)

Avaliando a Figura 4.9 ((a), (b), (c) e (d)), torna-se evidente que a associação de pH e permeado em condições elevadas favorece a produção de etanol com *S. boulardii*. O ensaio de maior produção de etanol (ensaio 8) apresentou maior consumo de substrato, menor produção celular e maior geração de etanol. Enquanto que no ensaio 3, houve pouco consumo de substrato, bem como produção de etanol e células reduzidas. O ensaio 4, conduzido no mesmo pH e concentração de permeado que o ensaio 3, também apresentou pouca produção tanto de célula quanto de etanol. Já o ensaio 7, com temperatura e pH

igual ao ensaio 4, entretanto com maior fonte carbono (permeado), apresentou a segunda maior produção de etanol ($57,99 \text{ g.L}^{-1}$).

Na Tabela 4.9 são apresentados os resultados obtidos para concentração celular ($\Delta X \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$), velocidade específica de crescimento ($\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$), consumo do substrato (açúcar redutor consumido) ($\Delta S \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$), conversão de substrato em célula ($Y_{X/S} \text{ (g.g}^{-1}\text{)}$), conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S} \text{ (g.g}^{-1}\text{)}$) e produtividade ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$), para o planejamento experimental (10 ensaios) utilizado para avaliar a eficiência de *S. boulardii* em meio permeado de soro para a produção de etanol, para posterior conversão em ácido acético.

Tabela 4.9: Concentração celular (ΔX), velocidade específica de crescimento (μ), consumo do substrato (ΔS), conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$), conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade para a levedura *Saccharomyces boulardii* em 45 horas de fermentação

Ensaio	ΔX (g.L^{-1})	μ (h^{-1})	ΔS (g.L^{-1})	$Y_{X/S}$ (g.g^{-1})	$Y_{P/S}$ (g.g^{-1})	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)
1	22,61	0,24	63,57	0,47	0,10	0,20
2	11,42	0,13	57,21	0,19	0,37	0,47
3	4,71	0,05	38,70	0,12	0,01	0,01
4	5,60	0,01	47,20	0,07	0,08	0,08
5	0,21	0,01	86,50	0,01	0,05	0,11
6	12,19	0,03	145,50	0,08	0,02	0,06
7	23,45	0,16	154,80	0,15	0,36	1,23
8	13,73	0,02	242,90	0,05	0,27	1,47
9	4,32	0,01	104,40	0,04	0,04	0,09
10	5,68	0,01	129,8	0,03	0,03	0,10

Conforme Tabela 4.9, verifica-se que o ensaio 8 ($T = 37^\circ\text{C}$; pH (6,0) ; $[\text{Permeado}] = 300 \text{ g.L}^{-1}$), o qual apresentou maior concentração de etanol $69,43 \text{ g.L}^{-1}$, também obteve maior produtividade ($1,47 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$). O ensaio 3 ($T = 26^\circ\text{C}$; pH (6,0) ; $[\text{Permeado}] = 100 \text{ g.L}^{-1}$) foi o que apresentou menor produtividade ($0,01 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) e também menor produção de etanol.

Nadai (2015) obteve velocidade específica de crescimento de $0,19 \text{ h}^{-1}$, e conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) de $0,75 \text{ g.g}^{-1}$ com a *S. boulardii* em 220 g.L^{-1} de permeado, a 30°C , pH (5,5) , 150 rpm e aeração de $1,5 \text{ (vvm)}$. O autor neste estudo tinha como objetivo produzir biomassa e não analisou a produção de etanol.

No estudo realizado por Assunção (2014), utilizando a *S. boulardii* (30°C , pH (5,5) , a 100 rpm) com 150 g.L^{-1} de permeado suplementado com $9,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio, $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de magnésio e $9,0 \text{ g.L}^{-1}$ fosfato monobásico

de potássio, em 24 h de fermentação, foram obtidos produtividade (células) de $0,84 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, conversão de substrato em células de $0,29 \text{ g.g}^{-1}$, velocidade específica de crescimento de $1,17 \text{ h}^{-1}$, consumo de substrato de $69,98 \text{ g.L}^{-1}$ e 27 g.L^{-1} de etanol. Valor este inferior ao obtido no presente estudo na melhor condição (Ensaio 8: $T = 37^\circ\text{C}$; $\text{pH} (6,0)$; $[\text{Permeado}] = 300 \text{ g.L}^{-1}$).

Muller (2006) verificou a produção de etanol e biomassa com *S. boulardii* em glicose. A maior produção de etanol foi de $3,49 \text{ g.L}^{-1}$ em 5 h de fermentação, atingindo velocidade específica de crescimento de $0,38 \text{ h}^{-1}$ e biomassa de $3,98 \text{ g.L}^{-1}$. O ensaio foi realizado a 30°C , por 12 h, em biorreator Air lift, com aeração $1,5\text{vvm}$, meio suplementado com $10,00 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose, $2,00 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona de carne, $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, $0,36 \text{ g.L}^{-1}$ de ureia, $0,12 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio, $0,24 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de magnésio e $0,60 \text{ g.L}^{-1}$ de fosfato monopotássico.

Trigueiros *et al.* (2016), em seu estudo de otimização de produção de *S. boulardii* em meio composto por permeado de soro de queijo hidrolisado e sais inorgânicos, a partir de modelagem matemática, simularam a produção de etanol na melhor condição (30°C , 100 rpm e 150 g.L^{-1} de permeado hidrolisado). Foi obtida por estimativa a conversão de substrato em etanol de $0,40 \text{ g.g}^{-1}$ e os autores verificaram que quanto maior a concentração de etanol produzida durante a fermentação, menor será a taxa específica de crescimento.

Bach (2012) avaliou a obtenção de etanol com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em soro de leite (substrato). O ensaio foi desenvolvido em 28°C , $\text{pH} (\approx 6,00)$, 0,10% de enzima lactase, 65 g.L^{-1} de sacarose e em repouso. Obteve-se 5,60% (v/v) de etanol no final da fermentação (59 h).

Barbosa *et al.* (2010) na produção de aguardente utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e como substrato o soro de queijo de coalho adicionado de 100 g.L^{-1} de sacarose em $\text{pH} (4,6)$, obtiveram ao final de 24 h de fermentação, $7,33^\circ\text{GL}$ de etanol.

Para Rodrigues *et al.* (2016), esses estudos fermentativos são eficientes, pois direcionam novas aplicações biotecnológicas para o emprego dos resíduos agroindustriais que podem ser implementados com sucesso, sustentabilidade econômica e ambiental com uma proposta industrial de bioetanol.

Nesse sentido, verifica-se que ambas as leveduras estudadas apresentaram potencial para produção de etanol. Entretanto, na fermentação

subsequente (etapa acética) pode surgir perdas de etanol por evaporação, influenciando o processo fermentativo.

Além disso, a biomassa produzida durante esse processo alcoólico pode ser recuperada e adicionada em alimentos baseados em suas propriedades. Uma vez que a levedura *S. boulardii* apresenta propriedades probióticas, enquanto a *K. marxianus* pode ser associada a probióticos, pois esta levedura é um prebiótico.

4.3 Fermentação acética

Os fermentados alcoólicos que atingiram maiores teores de etanol com *K. marxianus* (ensaio 1 (T = 29°C; pH (4,5); [Permeado] = 100 g.L⁻¹)) e com *S. boulardii* (ensaio 8 (T = 37°C; pH (6,0); [Permeado] = 300 g.L⁻¹)) foram empregados como meio de cultivo nas fermentações acéticas com a bactéria acética *A. acetii* (cepa pura) e “mãe do vinagre” (cepa mista), pelos métodos: Orleans (Figura 4.10), Orleans Modificado com adição de oxigênio (Figura 4.11) e Orleans Modificado com agitação (Figura 4.12). O teor de etanol presentes no início e final das fermentações acéticas encontram-se na Tabela 4.10. Quantificou-se o teor de ácido acético dos fermentados, baseados na curva padrão conforme Apêndice E.

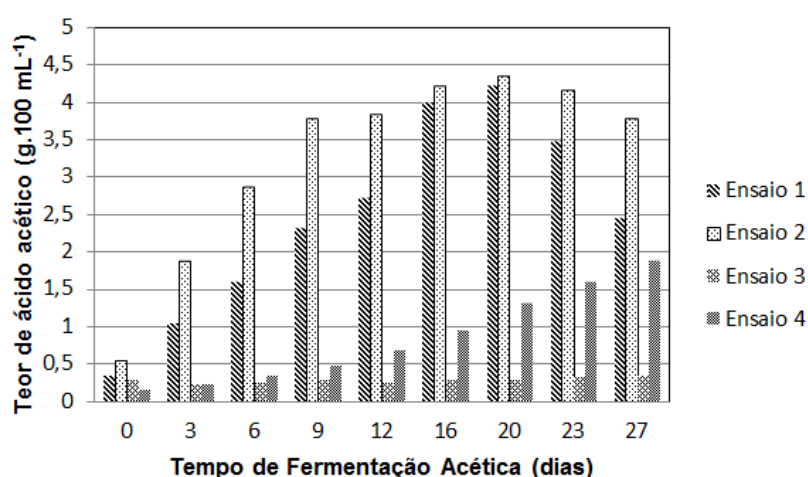


Figura 4.10: Concentração de ácido acético (g.100mL⁻¹) obtido pelo Método Orleans durante os processos fermentativos: Ensaio 1: Fermentação alcoólica: *K. marxianus* e fermentação acética: *A. acetii*; Ensaio 2: Fermentação alcoólica: *K. marxianus* e fermentação acética: “mãe do vinagre”; Ensaio 3: Fermentação alcoólica: *S. boulardii* e fermentação acética: *A. acetii*; Ensaio 4: Fermentação alcoólica: *S. boulardii* e fermentação acética: “mãe do vinagre”

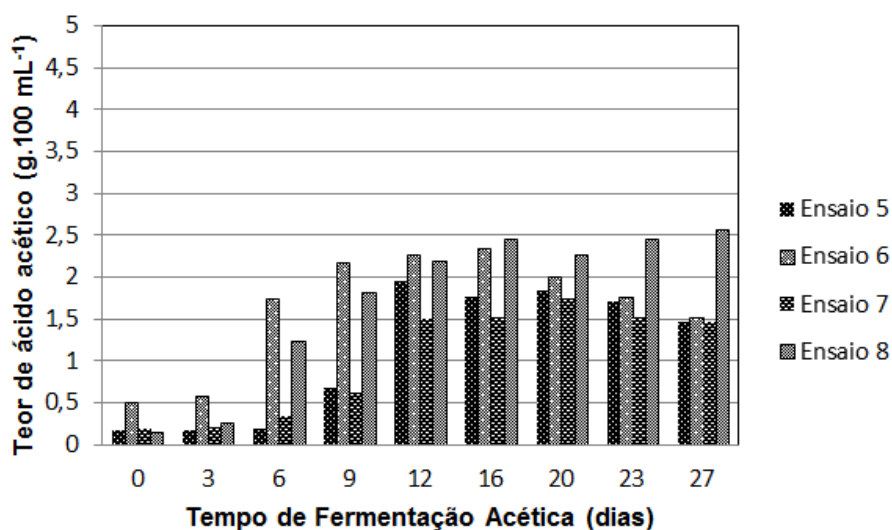


Figura 4.11: Concentração de ácido acético (g.100mL⁻¹) obtido pelo Método Orleans Modificado com adição de oxigênio durante os processos fermentativos: Ensaio 5: Fermentação alcoólica: *K. marxianus* e fermentação acética: *A. acetii*; Ensaio 6: Fermentação alcoólica: *K. marxianus* e fermentação acética: “mãe do vinagre”; Ensaio 7: Fermentação alcoólica: *S. boulardii* e fermentação acética: *A. acetii*; Ensaio 8: Fermentação alcoólica: *S. boulardii* e fermentação acética: “mãe do vinagre”

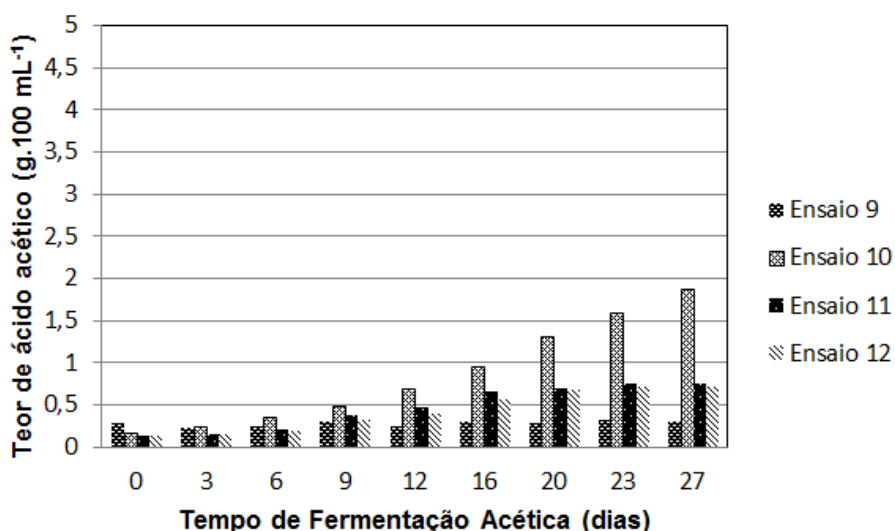


Figura 4.12: Concentração de ácido acético (g.100mL⁻¹) obtido pelo Método Orleans Modificado com agitação durante os processos fermentativos: Ensaio 9 Fermentação alcoólica: *K. marxianus* e fermentação acética: *A. acetii*; Ensaio 10: Fermentação alcoólica: *K. marxianus* e fermentação acética: “mãe do vinagre”; Ensaio 11: Fermentação alcoólica: *S. boulardii* e fermentação acética: *A. acetii*; Ensaio 12: Fermentação alcoólica: *S. boulardii* e fermentação acética: “mãe do vinagre”

Tabela 4.10: Concentração de etanol para os fermentados acéticos no início e final das fermentações acéticas

Ensaio	Método fermentativo	Fermentação Alcoólica	Fermentação acética	Etanol (g.L ⁻¹)	
		Levedura	Bactéria acética	Início	Fínal
1	Orleans	<i>K. marxianus</i>	<i>A. aceti</i>	56,52	2,75
2	Orleans	<i>K. marxianus</i>	“mãe do vinagre”	56,52	3,59
3	Orleans	<i>S. boulardii</i>	<i>A. aceti</i>	69,43	2,05
4	Orleans	<i>S. boulardii</i>	“mãe do vinagre”	69,43	1,20
5	Orleans adição O ₂	<i>K. marxianus</i>	<i>A. aceti</i>	56,52	1,07
6	Orleans adição O ₂	<i>K. marxianus</i>	“mãe do vinagre”	56,52	0,54
7	Orleans adição O ₂	<i>S. boulardii</i>	<i>A. aceti</i>	69,43	0,34
8	Orleans adição O ₂	<i>S. boulardii</i>	“mãe do vinagre”	69,43	0,67
9	Orleans agitado	<i>K. marxianus</i>	<i>A. aceti</i>	56,52	11,79
10	Orleans agitado	<i>K. marxianus</i>	“mãe do vinagre”	56,52	4,60
11	Orleans agitado	<i>S. boulardii</i>	<i>A. aceti</i>	69,43	8,65
12	Orleans agitado	<i>S. boulardii</i>	“mãe do vinagre”	69,43	11,58

Nas Figuras (4.10), (4.11) e (4.12), verifica-se que o fermentado com maior concentração de ácido acético foi o Ensaio 2 (Fermentação alcoólica: *K. marxianus* e fermentação acética: “mãe do vinagre”) que em 20 dias obteve-se 4,34 g.100mL⁻¹ de ácido acético, seguido do Ensaio 1 (Fermentação alcoólica: *K. marxianus* e fermentação acética: *A. aceti*), o qual atingiu 4,23 g.100mL⁻¹ de ácido acético (20 dias), ambos ensaios foram desenvolvidos pelo Método Orleans. Para a levedura *K. marxianus*, o fermentado com menor produção de ácido acético foi o Ensaio 10 (Fermentação alcoólica: *K. marxianus* e fermentação acética: “mãe do vinagre”), desenvolvido pelo Método Orleans Modificado agitado que no vigésimo sétimo dia alcançou 1,88 g.100mL⁻¹ de ácido acético.

Os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, foram semelhantes aos encontrados por Bach (2012), que empregou soro de leite (*S. cerevisiae*) na fermentação alcoólica e cultura mista de *Acetobacter aceti* (“mãe do vinagre”) na etapa de fermentação acética. Foram obtidos 4,51 g.100mL⁻¹ de ácido acético no décimo dia pelo Método Orleans Modificado (adição de oxigênio).

Enquanto que, para os fermentados alcoólicos oriundos da levedura *S. boulardii*, o ensaio com maior obtenção de ácido acético foi o Ensaio 8 (Fermentação alcoólica: *S. boulardii* e fermentação acética: “mãe do vinagre”), obtendo-se 2,57 g.100mL⁻¹ em 27 dias pelo Método Orleans Modificado com adição de oxigênio. Em seguida foi o ensaio 4 (Fermentação alcoólica: *S. boulardii* e fermentação acética: “mãe do vinagre”), o qual foi desenvolvido pelo Método Orleans Modificado agitado (1,88 g.100mL⁻¹ em 27 dias). A menor

produção de ácido acético foi obtida no ensaio 3 (0,35 g.100mL⁻¹ em 27 dias) (Fermentação alcoólica: *S. boulardii* e fermentação acética: *A. aceti*) pelo Método Orleans. Resultados estes similares aos obtidos por Bach (2012) pelo Método agitado, que alcançou 1,99 g.100 mL⁻¹ de ácido acético no décimo dia de fermentação.

A pequena formação de ácido acético nos ensaios agitados pode ser consequência da evaporação do etanol, pois neste método ocorre agitação de 100 rpm, e a movimentação do fermentado pode facilitar a evaporação. Na Tabela 4:10 detecta-se que ao término da fermentação o etanol estava em baixas concentrações, mas com pouca conversão em ácido acético. Para Hashizume (2001) e Rizzon & Menegusso (2006), quando o processo não alcançar 100% de eficiência em sua condução, pode provavelmente ocorrer perdas por evaporação natural, uma vez que, o etanol é volátil.

Parrondo *et al.* (2003) obtiveram 5,30% (5,30 g.100mL) de ácido acético em 96 h de fermentação pelo Método Agitado (250 rpm), empregando na etapa alcoólica a levedura *Kluyveromyces fragilis*, combinada com o substrato soro de queijo suplementado com lactose e a *Acetobacter pasteurianus*, na etapa acética. Resultados estes, superiores aos encontrados por esta pesquisa.

Lustrato *et al.* (2013) atingiram 8,70 g.L⁻¹ de ácido acético em 11 dias de fermentação acética com a *A. aceti* pelo Método Agitado (250 rpm), utilizando o mosto fermentativo alcoólico derivado da fermentação de soro de leite e *Kluyveromyces marxianus*.

4.4 Caracterização do fermentado acético

Os fermentados acéticos com maiores teores de ácido acético, combinando as leveduras fermentativas e bactérias acéticas, foram caracterizados conforme Tabela 4.11 e Anexo G.

Verifica-se, na Tabela 4.11, que o valor do pH do fermentado 3 está menor do estabelecido na legislação brasileira para vinagre comercial, a qual sugere faixa de 2,63 a 2,81 (BRASIL, 1977; BRASIL, 1999; BRASIL, 2012). Para o teor de cinzas, os fermentados obtidos nos ensaios 3 e 4 estão de acordo com a legislação. Além disso, avaliou-se o teor de proteína no fermentado, obtendo-se

1,35% para o ensaio 2, valor este superior ao encontrado por Bach (2012) (0,71%).

Tabela 4.11: Caracterização dos fermentados acéticos ao final das fermentações

Fermentado acético	DQO (mg.L ⁻¹)	DBO (mg.L ⁻¹)	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)	pH	Ácido acético (g.100 mL ⁻¹)
1	103.000	219.000	1,89	0,91	97,24	2,65	4, 23
2	67.000	149.000	1,35	0,71	98,43	3,65	4,34
3	578.000	1285.000	2,15	1,28	89,69	2,40	0,35
4	565.000	807.000	2,34	1,26	89,43	3,41	1,88

Para ser considerado como vinagre, o fermentado acético deve apresentar um teor de ácido acético correspondente a 4% (BRASIL, 1977; BRASIL, 1999; BRASIL, 2012). Sendo assim, somente os ensaios 1 e 2 podem ser considerados como vinagre, pois atingiram o esperado pela legislação vigente, logo, denominados de fermentado acético de permeado de soro de queijo. Entretanto, seria necessário que o fermentado passasse pela etapa de filtração para remoção de sólidos residuais e bactérias acéticas, clarificação para melhorar as características do produto, para então, enquadrar-se nos parâmetros assegurados na legislação brasileira.

4.5 Análise do potencial de redução da carga orgânica após os processos fermentativos

Devido ao potencial poluidor (elevada carga orgânica) presente no permeado de soro de queijo, o qual é detectado pelas análises de DQO e DBO (PRAZERES *et al.*, 2012; ZACARCHENCO *et al.*, 2012). Uma vez que este resíduo quando não empregado para a obtenção de outros produtos, gera altos custos de tratamento para as indústrias.

A avaliação da redução de matéria orgânica foi realizada ao final das fermentações alcoólicas (*K. marxianus* (T = 29°C; pH (4,5); [Permeado] = 100 g.L⁻¹); *S. boulardii* (T = 37°C; pH (6,0); [Permeado] = 300 g.L⁻¹)) e nas acéticas (*A. aceti* e cepa mista “mãe do vinagre”), conforme apresentado na Tabela 4.12 (*K. marxianus*) e Tabela 4.13 (*S. boulardii*), dados consoante ao Anexo G.

Tabela 4.12: Análise de DQO e DBO para a levedura *Kluyveromyces marxianus*

Análise	Permeado (mg.L ⁻¹)	Fermentado Alcoólico (mg.L ⁻¹)	Redução (%)	Bactéria acética	Fermentado Acético (mg.L ⁻¹)	Redução (%)
DQO	668.000	513.000	23,20	<i>A. aceti</i>	219.000	57,34
				Cepa mista	149.000	70,95
DBO	341.000	272.000	20,23	<i>A. aceti</i>	103.000	62,13
				Cepa mista	67.000	75,37

Tabela 4.13: Análise de DQO e DBO para a levedura *Saccharomyces boulardii*

Análise	Permeado (mg.L ⁻¹)	Fermentado Alcoólico (mg.L ⁻¹)	Redução (%)	Bactéria acética	Fermentado Acético (mg.L ⁻¹)	Redução (%)
DQO	1477.000	1383.000	6,36	<i>A. aceti</i>	1285.000	7,08
				Cepa mista	807.000	41,65
DBO	709.000	649.000	8,46	<i>A. aceti</i>	578.000	10,94
				Cepa mista	565.000	12,95

De acordo com as Tabelas 4.12 e 4.13, constata-se que houve redução da carga orgânica (DQO e DBO) para os processos fermentativos alcoólicos e acéticos, visto que, durante os processos fermentativos, há consumo do substrato para a produção de etanol e ácido acético. Entretanto, percebe-se que as fermentações conduzidas com *S. boulardii* apresentaram menores reduções (DQO e DBO), devido à presença da galactose ainda nos fermentados, uma vez que esta não foi consumida na etapa de fermentação alcoólica.

Em estudo de Assunção (2014) empregando a *S. boulardii* (30°C, pH (5,5), a 100 rpm) com 150 g.L⁻¹ de permeado, obteve-se uma redução de 97,67 e 99,53% para DQO e DBO, respectivamente, em 30 h de fermentação. Valores estes superiores ao encontrado nesta pesquisa, todavia é válido ressaltar que no presente trabalho empregou-se na fermentação concentrações mais elevadas de permeado (300 g.L⁻¹) em comparação ao da literatura.

As fermentações com a *K. marxianus* apresentaram reduções significativas, tanto na etapa alcoólica quanto acética, para a DQO e DBO. Assunção (2014), utilizando a levedura *K. marxianus* (30°C, pH (6,5), 100 rpm e adição de 1,0 vvm de oxigênio) e 150 g.L⁻¹ de permeado, após 30 h de fermentação, teve-se uma redução de 83,53 % para a DQO e 93,14% para a DBO após a fermentação alcoólica.

Burlani (2014), empregando a *K. marxianus* e permeado de soro de queijo puro (\approx 50 g.L⁻¹ de lactose) (37°C, pH (5,0) a 150 rpm) em 24 h de fermentação, detectou após a fermentação alcoólica uma redução de 63% para a DQO. Já,

Lustrato *et al.* (2013), nos ensaios conduzidos com *K. marxianus* em meio soro de leite e produção de vinagre, obtiveram uma redução de DQO na etapa alcoólica de 47% e na etapa acética, 50% de redução.

A partir das análises de DBO e DQO, confirma-se que o potencial poluidor deste resíduo lácteo. O qual pode ser reduzido ao empregar processos fermentativos, minimizando custos de tratamento desses subprodutos, bem como obtendo um novo produto com valor agregado.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

Com a realização deste estudo, pôde-se verificar que:

- As condições no processo fermentativo são imprescindíveis para atingir maiores índices de produção de etanol ou outros produtos de interesse;
- Na fermentação alcoólica, a temperatura é o fator determinante, quando se emprega a levedura *K. marxianus*;
- Para a *S. boulardii*, o permeado e sua relação com o pH apresentaram maior significância, sendo que o pH para as duas leveduras também influenciou no processo de fermentação alcoólica;
- É possível aproveitar o fermentado alcoólico em outra fermentação, para posterior conversão em fermentado acético, uma vez que os teores de etanol encontrados na fermentação alcoólica propiciaram a produção de fermentado acético;
- Os ensaios acéticos 1 e 2 podem ser considerados vinagre, pois atingiram o assegurado pela legislação (4% de ácido acético), podendo ser denominado de fermentado acético de permeado de soro de queijo;
- Os melhores teores acéticos foram produzidos pelo Método Orleans e para a levedura *K. marxianus*, com a *A. aceti* e “mãe do vinagre”, respectivamente;
- Em todas as etapas fermentativas, a carga orgânica (DBO e DQO) do substrato fermentativo foi reduzida. Para tanto, evidencia-se que é viável aplicar o resíduo lácteo em processos fermentativos, e assim, contribuir para a redução dos impactos ambientais causados por ele e obter produtos com valor agregado.

CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Fermentação alcoólica

- Acompanhar a fermentação alcoólica (*S. boulardii* e *K. marxianus*) por tempo prolongado, a fim de verificar o perfil de produção de etanol em fermentações mais longas;
- Avaliar a produção de etanol (*S. boulardii* e *K. marxianus*) com concentrações de permeado menores a 100 g.L⁻¹, e ademais com concentrações superiores a 300 g.L⁻¹;
- Explorar a fermentação alcoólica com a *S. boulardii*, uma vez que não há estudos de produção de etanol, bem como a otimização do processo etanólico com essa levedura probiótica;
- Realizar a modelagem matemática, com o intuito de definir as condições ótimas e avaliar pela estimação de parâmetros cinéticos a produção de etanol.

Fermentação acética

- Desenvolver um planejamento experimental para o fermentado alcoólico da *S. boulardii* e *K. marxianus*, para definir quais são as melhores condições de fermentação acética para a *A. aceti* e “mãe do vinagre”. Com isso, aprimorar o processo de fermentação acética, visto que não há relatos de fermentação acética empregando *S. boulardii* e *K. marxianus* na etapa alcoólica;
- Acompanhar o consumo de etanol durante a fermentação acética;
- Quantificar os demais ácidos e produtos secundários produzidos;
- Realizar fermentações pelo Método Orleans Modificado Agitado com agitação superior a 100 rpm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M.; **Fermentação alcoólica: Ciência e tecnologia.** Piracicaba: Fermentec, 2005. 434 p.
- ANDREWS, J. F. **A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates.** *Biotechnol. Bioeng.*, 10: 707–723. 1968.
- AQUARONE, E.; ZANCANARO, J.; **Vinagres: Alimentos e bebidas produzidas por fermentação.** São Paulo: Edgar Blücher Ltda, 1983.
- ASSUNÇÃO, G. M. **Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de queijo.** Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 132 p. 2014. Dissertação (Mestrado).
- BACH, F. **Avaliação das condições de produção de fermentado acético de soro de leite.** Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 136 p. 2012. Dissertação (Mestrado).
- BACH, F.; FIORESE, M. L.; HASAN, S. D. M.; MOREJON, C. F. M. **Estudo da influência de variáveis no processo de produção de bioetanol de soro de leite.** *Engevista*, V. 16, n. 3, p.392-409, set. 2014.
- BARBOSA, A.S.; Florentino, E.R.; Florêncio, I.M.; Araújo, A.S. **Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: Estudo Cinético de produção de etanol.** *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa (GVAA)*. Mossoró – Rio Grande do norte, v.5, n.1, p.07 – 25, janeiro/março de 2010.

- BARROS, F. G.; **Determinação condutométrica e colorimétrica de acidez volátil de vinagres e vinhos por injeção de fluxo..** Universidade Estadual de Campinas, 1990. Tese (Doutorado).
- BARROS, E. M.; CARVALHO, V. C.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. **Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic ethanol production.** Chemical Engineering Journal, V. 307, 939–947. 2017.
- BARUFFALDI, R. OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de Tecnologia de Alimentos.** São Paulo: Atheneu Editora. 1998.
- BARROS NETO B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos - Aplicações na ciência e na indústria.** 4.ed. Editora Bookman, 2010.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Padrões de Qualidade.** Portaria nº 745 de 24 de outubro de 1977.
- BRASIL. **Decreto nº 99.066 de 08 de Março de 1990.** Brasília: Imprensa Nacional, 1990.
- BRASIL. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa.** Suíno cultura dinâmica. Soro de leite integral na alimentação dos suínos. 1996.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa Nº 36 de 14 de outubro de 1999. **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para fermentados acéticos.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF. 1999.

BRASIL, MAPA. **Produção de Leite**. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002.

BRASIL. **Resolução** Nº 065/2005. Regulamento da inspeção sanitária e industrial para leite e seus derivados. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 6, de 3 de abril de 2012**. Brasília, 2012.

BRASIL. **Annual Dairy Report Dairy and Products Annual**. 2016

BERTOL, T. M. FILHO, J. I. S. BONETT, L. **Soro de leite integral na alimentação dos suínos**. Periódico técnico-informativo elaborado pela EMBRAPA–CNPSA. Ano IV – No 17 – Abril/1996.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U.A. e SCHMIDELL, W.; **Biotecnologia Industrial**; Volume 2; Editora Edgard Blucher LTDA, 2001; 522p.

BONANI, A.; SCHMIDELL, W. **Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos**, em SCHMIDELL, Willibaldo ;LIMA, Urgel de Almeida Eugênio; BORZANI, Walter; AQUARONE, Biotecnologia industrial: Biotecnologia da Produção de Alimentos. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA., v. 4, 2001.

BURLANI, E. L. **Avaliação do potencial da levedura Kluyveromyces spp. Para biotransformação da lactose do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol**. Centro Universitário Univates. Programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia. 2014. Dissertação (Mestrado).

CASAL, M.; SCHULLER, D.; RODRIGUES, G. M. M.; PAIS, C. **Métodos convencionais em microbiologia**. In: CASAL, Margarida, coord. – “Microbiologia e genética molecular microbiana: manual de laboratório”. [S.l.]: Copissaurio, 2004.

- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.. **Fermentação descontínua**, em SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida Eugênio; BORZANI, Walter; AQUARONE, *Biotecnologia industrial: Biotecnologia da Produção de Alimentos*. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA., v. 4, 2001.
- COSTA, C. M.; TAKAHASHI, J.; VILLAMONTE, M.; **Produção de vinagre**. Universidade Federal de Santa Catarina: Centro Tecnológico Departamento de Engenharia Química, Engenharia de Alimentos e Engenharia Bioquímica, 2006.
- COTÉ, A. BROWN, W.A. CAMERON, D. WALSUM, G. P. **Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate for Subsequent Fermentation to Ethanol**. American Dairy Science Association, *J. Dairy Sci.* 87:1608–1620. 2004.
- CZERUCKA, D. PICHE, T. RAMPAL, P. **Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii***. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. *Aliment Pharmacol Ther* 26, 767–778. 2007.
- CZERUCKA, D.; RAMPAL P. **Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens**. *Microbes and Infection*. V. 4, p.733-739, 2002.
- DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A. **Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation**. *Food Chem.* n.112, V.4, p.929-935, 2009.
- DOES, A.L.; BISSON, L.F. **Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts**. *Journal of Bacteriology*. Baltimore. V. 171: (3), p.1303-1308, 1989.
- DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. **Novas Metodologias para a Fermentação Alcoólica do Soro de Queijo**. In: *Actas da 6ª Conferência*

Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, vol. 3. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, p.271-280. 1999.

DU, L.P.; HAO, R.X.; XIAO, D.G.; GUO, L.L.; GAI, W.D. **Research on the Characteristics and Culture Conditions of *Saccharomyces boulardii***, Adv. Mater. Res. 343-344, 594–598. 2011.

EDWARDS-INGRAM, L, GISTSHAM, P, BURTON, N. WARHURST, G. CLARKE, I. HOYLE, D. OLIVER, S.G. STATEVA, L. **Genotypic and Physiological Characterization of *Saccharomyces boulardii*, the Probiotic Strain of *Saccharomyces cerevisiae***. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Apr. 2007, p. 2458–2467. 2007.

ENTIAN, K. D. Sugar Phosphorylation in yeast. In: ZIMMERMANN, F. K. ENTIAN, K. D., (Coord.). **Yeast sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications**. Lancaster: Technomic, p.67-79. 1997.

ESPINOSA-GONZALEZ, I.E.; PARASHAR, A.; BRESSLER, D.C. **Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production**. Bioresource Technology, n. 155, p. 170–176, 2014.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 664 p. 2000.

FAO. **Brazil Dairy, Cheese Production by Year**. 2016.

FASOLI, G. BARRIO, E. TOFALO, R. SUZZI, G. BELLOCH, C. **Multilocus analysis reveals large genetic diversity in *Kluyveromyces marxianus* strains isolated from Parmigiano Reggiano and Pecorino diN**

Farindola cheeses. International Journal of Food Microbiology 233 1–10. 2016.

FERREIRA, P. G. SILVEIRA, F. A. SANTOS, R. C. V. GENIER, H. L. A. DINIZ, R. H. JÚNIOR, J. I. R. FIETTO, L. G. PASSOS, F. M. L. SILVEIRA, W. B. **Optimizing Ethanol Production by Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 in a Mixture of Sugarcane Bagasse and Ricotta Whey.** Food Sci. Biotechnol. 24(4): 1421-1427. 2015.

FERREIRA, É. **Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em Batelada-Alimentada.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Dissertação (Mestrado).

FIORESE, M. L. HASAN, S. D. M. SANTANA, V. S. MIOTTO, I. **Quantificação do crescimento celular de *Saccharomyces boulardii* utilizando diferentes metodologias.** Capítulo de livro. II Encontro de Pesquisa da FATEB – Telêmaco Borba - PR, 29 e 30 de outubro de 2015. 2015.

FLORES, J. A.; GSCHAEDLER, A.; DELGADO, L. A.; LÓPEZ, E. J. H.; ARELLANO, M.; ARRIZON, J. **Simultaneous saccharification and fermentation of Agave tequilana fructans by *Kluyveromyces marxianus* yeasts for bioethanol and tequila production.** Bioresource Technology, V. 146, 267–273. 2013.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. **The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential.** Appl Microbiol Biotechnol, São Paulo, V. 79. p.339-354, 2008.

FONTES, F. A. P. V.; COELHO, S. G.; LANA, A. M. Q.; COSTA, T. C.; CARVALHO, A. U.; FERREIRA, M. I. C.; SATURNINO, H. M.; REIS, R. B.; SERRANO, A. L. **Desempenho de bezerros alimentados com dietas líquidas à base de leite integral ou soro de leite.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, [s.l.], V. 58, n. 2, p.212-219, abr. 2006.

- GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. **Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors.** Renewable Energy, V. 69, 89-96. 2014.
- GABARDO, A. PEREIRA, G. F. RECHM R. AYUB, M. A. Z. **The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors.** Ind Microbiol Biotechnol. 42:1243–1253. 2015.
- GABARDO, S. G.; PEREIRA. G. F.; KLEIN, M. P.; RECH, R.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. **Dynamics of yeast immobilized-cell fluidized-bed bioreactors systems in ethanol fermentation from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate.** Bioprocess Biosyst Eng 39:141–150. 2016.
- GAVA, Altanir J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos.** São Paulo, Sp: Nobel,1984. Reimpresso em 2002.
- GHALY, A. E.; BEN-HASSAN, R. M. **Kinetics of bath production of single-cell protein from cheese whey.** Applied Biochemistry and Biotechnology, V.50, n.1, p.79-92, 1995.
- GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. **O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento.** Revista Brasil Alimentos. Setembro/Outubro: 2001.
- GRAFF, C.C. S; CHAUMEIL, J.-C.;BOY, P. LAI-KUEN, R. **Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast.** J. Gen. Appl. Microbiol. V. 5 91–6221–227. 2008.
- 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, [s.l.], v. 28, n. 3, p.375-384, maio 2010.

- GUIDICI, P.; LEMMETTI, F.; MAZZA, S. **Balsamic Vinegar: Tradition, Technology, Trade**. Springer. ISBN 978-3-319-13757-5. 2015.
- GUNESER, O.; YUCEER, Y. K.; WILKOWSKA, A.; KREGIEL, D.; **Volatile metabolites produced from agro-industrialwastes by Na-alginate entrapped *Kluyveromycesmarxianus***. Brazilian Journal of Microbiology, V. 1517. 2016.
- HADIYANTO. ARIYANTI, D. AINIA. A. P. PINUNDIA, D. S. **Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-Batch Fermentation Using *Kluyveromyces marxianus***. Energy Procedia V.47, 108 – 112. 2014.
- HASSEMER, G.; DALLAGNOL, G.;FACCIN, D. J. L.; RECH, R. **AVALIAÇÃO DO PERMEADO DE SORO COMO MEIO DE CULTIVO DE *Bacillus megaterium***. 5º Simpósio de Segurança Alimentar e Alimentação e Saúde. Bento Gonçalves, RS. 2015.
- HAUPTLI, L; LOVATTO, P. A.; SILVA, J. H. S.; GARCIA, G. G.; JUNIOR, B. S. B.; OLIVEIRA, J. L. S. **Níveis de soro de leite integral na dieta de leitões na creche**. Ciência Rural. V. 35, n. 5, p.1161-1165, set-out, 2005.
- HAZHIZUME, Takuo. **Tecnologia do vinho**, em AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida. Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA., V. 2, 2001.
- HISS, Haroldo. **Cinética de Processos Fermentativos**, em AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida. Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA., v. 2, 2001.

- HOLSINGER, V. H.; POSATI, L. P. & DE VILDISS, E. D. **Whey beverages: a review**. Journal of dairy science, v.57, p. 8549-859, 1974.
- HU, K. DICKSON, J.M., **Membrane Processing for Dairy Ingredient Separation**, John Wiley and Sons Ltd., 2015.
- HUGO, A. BRUNO, F. GOLOWCZYW, M. A. **Whey permeate containing galacto-oligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA**. LWT - Food Science and Technology 69,185-190. 2016.
- KITAMURA, D.H. **Produção de biomassa probiótica e enriquecida com selênio de *Saccharomyces boulardii* utilizando o melaço de cana-de-açúcar**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2013. Dissertação (Mestrado).
- KOLLER, M., HESSE, P., BONA, R., KUTSCHERA, C., ATLIC, A., BRAUNEGG, G. **Potential of various archae and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoates producers from whey**. Macromol. Biosci., V.7, p.218 - 226, 2007.
- KOLLER, M., BONA, R., CHIELLINI, E., FERNANDES, E.G., HORVAT, P., KUTSCHERA, C., HESSE, P., BRAUNEGG, G. **Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovova***. Bioresour. Technol., v. 99, p.4854–4863, 2008.
- KOURKOUTAS, Y.; DIMITROPOULOU, S.; KANELLAKI, M.; MARCHANT, R.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; KOUTINAS, A.A. **High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material**. Bioresour. Technol., V.82,n.2, p.177-181. 2002.

- KRUSONG, W. KERDPIBOON,S. JINDAPRASERT, A. YAIYEN, PORNPUKDEEWATANA, S. TANTRATIAN, S. **Influence of calcium chloride in the high temperature acetification by strain *Acetobacter aceti* WK for vinegar.** Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072. Journal of Applied Microbiology V.119, 1291—1300. 2015.
- KRUSONG, W. YAIYEN, S. PORNPUKDEEWATANA, S. **Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor.** Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072. Journal of Applied Microbiology 118, 629—640. 2014.
- KRUSONG, W. TANTRATION, S. **Acetification of rice wine by *Acetobacter aceti* using loofa sponge in a low-cost reciprocating shaker.** Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072. Journal of Applied Microbiology 117, 1348—1357. 2014.
- LAGRANGE, V. E DALLAS, P. **Inovação de Produto com Concentrados de Proteína de Soro de Leite dos USA.** Boletim da Sociedade brasileira de ciência e tecnologia de alimentos, Campinas, v. 31, n. 1, p. 17-21, 1997.
- LAZARO, C. Z.; VICH, D. V.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. **Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototropic microbial consortium.** International Journal of Hydrogen Energy, V. 37, p. 11691-11700, 2012.
- LEE, K. W. SHIM, J. M. KIM, G. M. SHIN, JOH. KIM, J. H. **Isolation and Characterization of *Acetobacter* Species from a Traditionally Prepared Vinegar.** Microbiol. Biotechnol. Lett., 43(3), 219–226. 2015.
- LI, Y.; SADIQ, F.. A.; LIU, T. J.; CHEN, J. C.; HE, G. Q. **Purification and identification of novel peptides with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of process conditions in milk fermented with the yeast *Kluyveromyces marxianus*.** Journal of Functional Foods, V. 16, 278–288. 2015.

- LIMA, U.A.; AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W, **Produção de Etanol**, em AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida. **Biotecnologia industrial: Processos Fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA., V. 3, 2001.
- LIMA, G. J. M. M. de; MANZKE, N. E.; TAVERNARI, F. de C.; KLEIN, C. H.; COSTA, O. A. D. **Uso de permeado *spray-dried* (PERLAC 850®) produzido a partir de soro de leite doce em substituição ao soro de leite e à lactose pura em dietas de leitões recém-desmamados**. Comunicado Técnico 507. ISSN nº 0100-8862. Versão eletrônica. 2012.
- LIONG, M. T. **Probiotcs: biology, genetics and health aspects**. 2011.
- LOPES, T. dos R.; PINTO, M. A. de O. **Aplicação terapêutica de *Saccharomyces boulardii* em diarreias: uma revisão**. HU Revista, Juiz de Fora, v. 36, n. 2, p. 107-122, abr./jun. 2010.
- LUCERO, P.; HERWNIER, M.; LAGUNA, R. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. **FEBS Letters**, v. 333, n. 1-2, p.165-168, out., 1993.
- LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. de. **Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 21, n. 1, 2001.
- LUTZ, Instituto Adolfo. (2008). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed. Brasília – DF: Ministério da Saúde.
- LUSTRATO, G.; SALIMEI, E. ALFANO, G.; BELLI, C.; FANTUZ, F. **Cheese whey recycling in traditional dairy food chain: effects of vinegar from whey in dairy cow nutrition**. Acetic Acid Bacteria; V. 2(s1):e8. 2013.

- MARTNS, F. dos S.; TIAGO, F. da C. P.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. **Utilização de leveduras como probióticos**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, Campina Grande, v. 5, n. 2, 2005.
- MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de Poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico**. (Dissertação de Mestrado) Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, p.191. 2000.
- MARANGONI, C.; FURIGO, JR, A.; ARAGÃO, G. M. F. **Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding**. Process Biochemistry, v. 38, p. 137-141. 2002.
- MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. ***Saccharomyces boulardii*: a Review of an innovative biotherapeutic agent**. Microbial Ecology in Health and Disease, n. 6, p. 157–171. 1993.
- McFARLAND, L.V (2010). **Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients**. World J. Gastroenterology, 14, 2202-2222. 2010.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars**. Analytical Chemistry, V. 31, p.426-8, 1959.
- MOHANTY, D. P. MOHAPATRA, S. MISRA, S. SAHU, P.S. **Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review**. Saudi Journal of Biological Sciences, V.23, 577–583. 2016.

- MORESI, M., TRUUFIO, A., PARENTE, E. **Kinetics of continuous whey fermentation by *Kluyveromyces fragilis***. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 49 (2), 205–222, 1990.
- MORETTO, Eliane; ALVES, Roseane Fett; CAMPOS, Célia Maria Teixeira; ARCHER, Rita Maria Battisti; PRUDÊNCIO, Antônio José. **Vinhos e Vinagres: Processamento e Análises**. Florianópolis: Editora da UFSC, p. 168. 1988.
- MOULIN, G.; GALZY, P. **Whey, a potential substrate for biotechnology**. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v. 1, n. 1, p. 347–374, 1984.
- MOUNIR, M. SHAFIEI, R. ZARMEHRKHORSHIRD, R. HAMOUDA, A. ALAOUI, M. I. THONART, P. **Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor**. Journal of Bioscience and Bioengineering. 1- 6, 2015.
- MULLER, J. L. **Cultivo de *Saccharomyces boulardii* em biorreator tipo *air-lift* e em frascos agitados mecanicamente**. Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado).
- MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V. BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. **Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *air lift* e *shaker***. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(4): 688-693, out.-dez. 2007.
- NADAI, B.L. **Efeito da suplementação de nutrientes e da concentração de permeado de soro de leite no crescimento de *S. boulardii* em sistema descontínuo**. Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade

Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 2015. 96 p. Dissertação (Mestrado).

NACHAIWIENG, W. LUMYONG, S. YOSHIOKA, K. WATANABE, T. KLANONGNUCH, C. **Bioethanol production from rice husk under elevated temperature simultaneous saccharification and fermentation using *Kluyveromyces marxianus* CK8.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 543–549. 2015.

NATH, A., DIXIT, M., BANDIYA, A., CHAVDA, S., DESAI, A.J. **Enhanced production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24.** Bioresour. Technol., V. 99, p. 5749–5755. 2007.

OBRUCA, S., MAROVA, I., MELUSOVA, S., MRAVCOVA, L. **Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037.** Annals of Microbiology, V. 61, p. 947–953. 2011.

ODA, Y.; NAKAMURA, K.; SHINOMIYA, N.; OHDA, K. **Ethanol fermentation of sugar beet thick juice diluted with crude cheese whey by the flex yeast *Kluyveromyces marxianus* KD-15.** Biomass and bioenergy, V. 34, 1263-1266. 2010.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. **Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP).** Enzyme Microb. Technol., V.41, n.6-7, p.876-880. 2007-a.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. **Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation.** Enzyme Microb. Technol., V.41, n.1-2, p.169-174. 2007-b.

OZMIHCI S., KARGI F. **Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations.** Bioresource Technology, V.98. 2978–2984. 2007-c.

- PADILLA, B.; FRAU, F. MATUTE, A. I. R.; MONTILLA, A.; BELLOCH, C.; MANZANARES, P.; CORZO, N. **Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by β -galactosidases from dairy *Kluyveromyces***. Journal of Dairy Research, V.82, 356–364. 2015.
- PALMA, Mauri Sergio Alves; CARVALHO, Lilian F. C. Priosti; GAVÓGLIO, Lilian Cristina, **Vinagres**, em AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida. **Biotecnologia industrial: Biotecnologia da Produção de Alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA., v. 4, 2001.
- PARRONDO, Javier. HERRERO, Mónica. GARCÍA, Luis A. DÍAZ, Mario. **A note - Production of Vinegar from Whey**. Journal of the Institute of Brewing. G-2003-1215-175. 2003.
- PECINA, R.; BONN, G.; BURTSCHER, E.; BOBLETER, O. **High-performance liquid-chromatographic elution behaviour of alcohols, aldehydes, ketones, organic-acids and carbohydrates on a strong cation-exchange stationary phase**. Journal of Chromatography, V.287, p. 245-248, 1984.
- PELEGRINE, D. H. G; CARRASQUEIRA, R. L. **Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas**. Brazilian Journal of Food Technology. 0BMCFB, dez 2008.
- PENTEADO, E. D. **Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios**. Universidade de São Paulo, São Carlos. 2012. 143 f. Dissertação (Mestrado).

- PERRY, K. S. P. **Queijos: Aspectos químicos, Bioquímicos e Microbiológicos.** Química Nova, São Paulo, V. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.
- PEREIRA, A. F. **Otimização da produção de vinagre de mel.** Programa de Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança. 2014. Dissertação (Mestrado).
- PESCUMA, M; VALDEZ, G. F.; MOZZI, F.; **Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation.** Appl Microbiol Biotechnol, [s.l.], V. 99, n. 15, p.6183-6196, 28 jun. 2015.
- POLOVO, S; CASELLA, S. **Bacterial production of PHA from lactose and cheese whey permeate.** Macromolecular Symposia, V.197, p.1-9. 2003.
- PHISALAPHONG, M., SRIRATTANA, N., & TANTHAPANICHAKOON, W. **Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation,** 28, 36–43. 2006.
- PRAZERES, A.R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. **Cheese whey management: A review.** J ournal of Environmental Management, n. 110, p. 48-68. 2012.
- REHM, H.J., REED, G., PÜHLER, A. & STADLER, P. Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise, 2a ed. Vol.9, **Enzymes, biomass, food and feed,** ed. By G. Reed and T.W. Nagodawithana. 1995.
- RICHTER, Carlos A.; NETO, José M de A. **Tratamento de Água: Tecnologia Atualizada.** 1. ed. São Paulo: Blucher, 1991, 7ª reimpressão 2007.
- RIZZON, Luiz Antenor;. **Sistema de produção de vinagre: Fermentação Acética.** EMBRAPA, 2006.
- RIZZON, Luiz Antenor; MENEGUZZO, Júlio. **Sistema de produção de vinagre: Vinho para acetificação.** EMBRAPA, 2006.

- RODRIGUES, M. E. IEMA, A. F. **Planejamento de experimentos & Otimização de processos**. 3ª Edição. Editora Cárita. 2014.
- RODRIGUES, B.; COSTA, M. E. L.; CONSTANTINO, A.; RAPOSO, S.; FELIZARDO, C.; GONÇALVES, D.; FERNANDES, T.; DIONÍSIO, L.; PEINADO, J.M. **Growth kinetics and physiological behavior of co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*, fermenting carob sugars extracted with whey**. *Enzyme and Microbial Technology*, V. 92, 41–48. 2016.
- ROSE, A. **Chemical microbiology**. 3a ed., Plenum Press, New York, 1976.
- RUSSO, J.F. S. **Permeado de soro e suas aplicações: um futuro promissor**. 2016.
- SACHDEVA, A. RAWAT, S. NAGPAL, J. **Efficacy of fermented milk and whey proteins in helicobacter pylori eradication: A review**. *World J Gastroenterol* 2014 January 21; 20(3): 724-737.
- SACHS, L. G. **Vinagre**. Apostila. Fundação Faculdades Luiz Meneghel. 23 p. Paraná, 2011.
- SAKURAI, K.; YAMAZAKI, S.; IGARASHI, Y.; ARAI, H. **Role of the glyoxylate pathway in acetic acid production by *Acetobacter acetii***. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. V. 115 No. 1, 32 e 36, 2013.
- SAMUEL. O. LINA, J. IFEANY, O. **Production of Vinegar from Oil-palm Wine Using *Acetobacter Aceti* Isolated from Rotten Banana Fruits**. *Universal Journal of Biomedical Engineering* 4 (1): 1-5, 2016.
- SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V.; IORIO, G. **Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective**

alternative non-vegetable source. Biomass Bioenerg., v.33, n.12, p.1687-1692. 2009.

SERPA, L.; REGINATO, V.; PRIAMO, W. L. **Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica.** 2nd International Workshop | Advances in Cleaner Production. Universidade Federal de Santa Catarina. São Paulo, Brasil, 20-22 de maio de 2009, p.2.

SHREVE, R. Norris; JÚNIOR, Joseph A. B.. **Indústrias de Processos Químicos.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1997. Tradução de Horacio Macedo, Instituto de Química, UFRJ. 1997.

SILVA, P.H.F. **Leite: Aspectos de composição e propriedades.** Revista: Química e Sociedade. QUÍMICA NOVA NA ESCOLA Leite N° 6, NOVEMBRO 1997.

SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. J. V.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. L. **Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels.** Enzyme and Microbial Technology. Viçosa, v. 36, p. 930-936, 2005.

SOLIERI, L.; GIUDICI, P. **Vinegars of the World.** Springer. ISBN: 978-0-470-0865-6. 2009.

SOORO Ingredientes Ltda (b). **Ficha técnica permeado de soro em pó.** 2016.

SPINOSA, Wilma Aparecida; **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústria de vinagre.** TESE Doutorado. Engenharia de alimentos, Universidade estadual de Campinas, departamento de ciência de alimentos, 2002.

SPINOSA, W. A.; SANTOS JÚNIOR, V.; GALVAN, D.; FIORIO, J. L.; GOMEZ, R. J. H. C. **Vinegar rice (*Oryza sativa* L.) produced by a submerged**

fermentation process from alcoholic fermented rice. Food Sci. Technol, Campinas, 35(1): 196-201, Jan.-Mar. 2015.

STANISZEWSKI M., KUJAWSKI W., LEWANDOWSKA M. **Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product—Kinetic model predictions considering glucose repression.** Journal of Food Engineering 91, 240–249. 2009.

SUZART, C. A. G. DIAS, J. C. T. **Desenvolvimento tecnológico de aguardente de soro de queijo.** Projeto Bolsa BITEC, IEL, SEBRAE e CNPQ. 2007.

TAKEMOTO, Sonia Yasuko. **Avaliação do Teor de Acetoína em vinagres como forma de verificação de sua genuinidade.** Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. Dissertação (Mestrado).

TEIXEIRA, V.L.; FONSECA, L.M. **Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.60, p.243-250, 2008.

THACKER, Emily. **O Vinagre.** 1. ed. São Paulo: Rami, 1995.

TALABARDON, M., SCHWITZGUE, J. P., PERIGER, P. **Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate.** Journal of Biotechnology 76, 83–92. 2000.

TANG. I-C. YANG, S-T. OKOS, M. R. **Acetic acid production from whey lactose by the co-culture of *Streptococcus lactis* and *Clostridium formicoaceticum*.** Appl Microbiol Biotechnol, 28:138--143. 1988.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. **Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas padrão produzidos em várias regiões do Estado de Minas Gerais.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootc. V. 60, n. 1. p. 243-250, 2008.

- THOMAS, M. B. VAIDYANATHAN, M. RADHAKRISHNAN, K. RAICHUR, A. M. **Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes.** Journal of Food Engineering 136, 1–8. 2014.
- TRIGUEIROS, D.E.G.; FIORESE, M.L.; KROUMOV, A.D.; HINTERHOLZ, C.L.; NADAI, B.L.; ASSUNÇÃO, G. M. **Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*.** Biochemical Engineering Journal 110, 71–83. 2016.
- TOFALO, R.; FASOLI, G.; SHIRONE, M. PERPETUINI, G.; PEPE, A.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. **The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese.** International Journal of Food Microbiology, V. 187, 41–49. 2014.
- USDA. United States Department of Agriculture. **Dairy and Products Annual - Annual Dairy Report – Brazil.** 2016.
- VASILEVA, N. IVANOV, Y. DAMYANOVA, S. KOSTOVA, I. GODJEVARGOVA, T. **Hydrolysis of whey lactose by immobilized-galactosidase in abioreactor with a spirally wound membrane.** International Journal of Biological Macromolecules 82. 339–346. 2016.
- WALSTRA, P; JENNESS, R. **Química e Física Lactológica.** Editora Acribia, S.A., Zaragoza, 1984.
- WANG, Z.; YAN, M.; CHEN, X.; LI, D.; QIN, L.; LI, Z.; YAO, J.; LIANG, X. **Mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus* for acetic acid production.** Biochemical Engineering Journal, V.79, 41–45.2013.

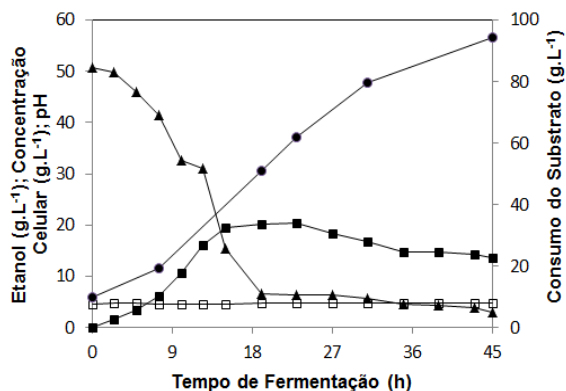
- WOYENGO, T.A. SÁNCHEZA, J.E. YÁNEZA, J.L. CERVANTES, M. ARAIZAB, B.A. ZIJLSTRAA, R.T. **Nutritional value of whey permeate and egg products in ileal-cannulated grower pigs.** *Animal Feed Science and Technology* 210, 209–216. 2015.
- YADAV, J. S. S. BEZAWADA, J. AJULA, C. M. YAN, D. TYAGI, R.D. SURAMPALLI, R.Y. **Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey.** *Bioresource Technology* 164, 119–127. 2014.
- YADAV, J. S. S. YANA, S. PILLI, S. KUMAR, L. TYAGI, R.D. SURAMPALLI, R.Y. **Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides.** *Biotechnology Advances* 33, 756–774. 2015.
- YELLORE, V., DESAI, A. **Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24.** *Lett. Appl. Microbiol.*, V. 26, p. 391–394, 1998.
- YORGUN, M.S.; BALCIOGLU, A.; SAYGIN. O. **Performance comparison of ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis on whey treatment.** *Desalination*, p. 229, 204–216. 2008.
- ZACARCHENCO, Patrícia B. DENDER, Ariene G. F. SPADOTI, Leila M. GALFINA, Darlila A. TRENTO, Fabiana K.H.S. SILVA, Adriana T. **Permeado de Soro.** Guia de referência do Setor Lácteo. Anuário leite e derivados. ISSN 1807-9733, 2012.
- ZAFAR, S.; OWAIS, M. **Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, n. 3, p. 295–298, 2006.
- ZANCANARO, O. Jr. Vinagres. In: AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial.** V. 4. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 523 p. 183-208p. 2001.

- ZARDINI, Fúlvia Arantes; **Construção e operação de um gerador de vinagre.** Universidade estadual de Campinas, departamento de ciência de alimentos, 2000. Dissertação (Mestrado).
- ZHANG, B.; ZHANG, J.; WANG, D.; HAN, R.; DING, R.; GAO, X.; SUN, L.; HONG, J. **Simultaneous fermentation of glucose and xylose at elevated temperatures co-produces ethanol and xylitol through overexpression of a xylose-specific transporter in engineered *Kluyveromyces marxianus*.** *Bioresource Technology*, V. 216, 227–237. 2016.
- ZHOU, H-X.; XIN, F-H.; CHI, Z.; LIU, L. L.; CHI, Z-M. **Inulinase production by the yeast *Kluyveromyces marxianus* with the disrupted MIG1 gene and the over-expressed inulinase gene.** *Process Biochemistry*, V. 49, 1867–1874. 2014.
- ZOPPELLARI, F.; BARDI, L. **Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*.** *New Biotechnology*, V.30. 607-613. September 2013.
- ZORTÉA, M. E.; SAVOLDI, T. E.; GONGOLESKI, M. S.; HASAN, S. D. M.; FIORESE, M. L. **Uso de fontes renováveis de carbono provenientes de resíduos das indústrias de alimentos e óleo de soja visando à produção de poli (3-hidroxibutirato).** *Engevista*, V. 15, n.2p. 166-175, agosto 2013.

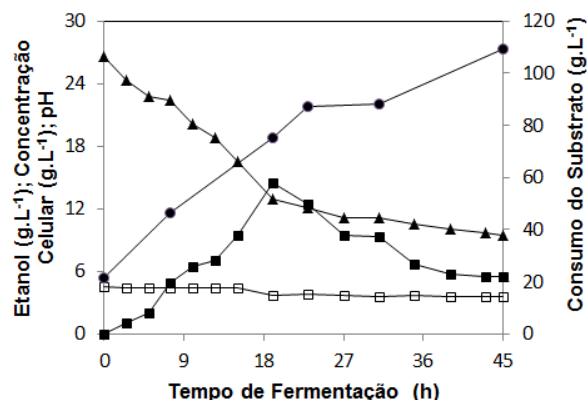
APÊNDICES

APÊNDICE A

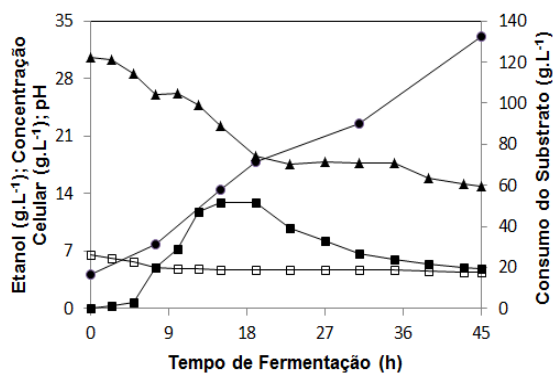
Acompanhamento da concentração celular, consumo de substrato e pH para as fermentações realizadas em planejamento experimental 2^3 para a levedura *Kluyveromyces marxianus*.



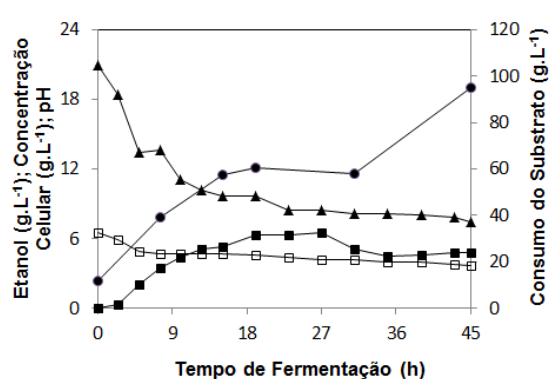
(a)



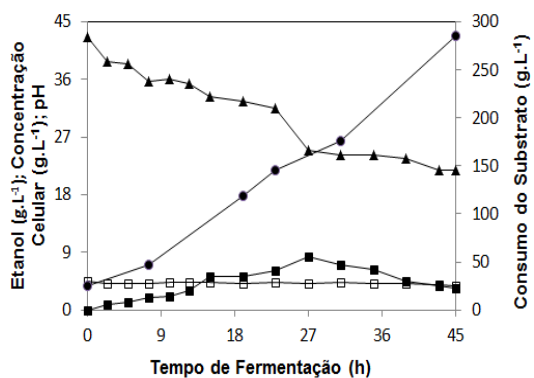
(b)



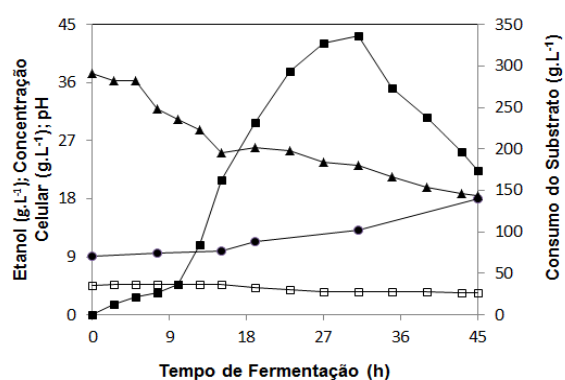
(c)



(d)



(e)



(f)

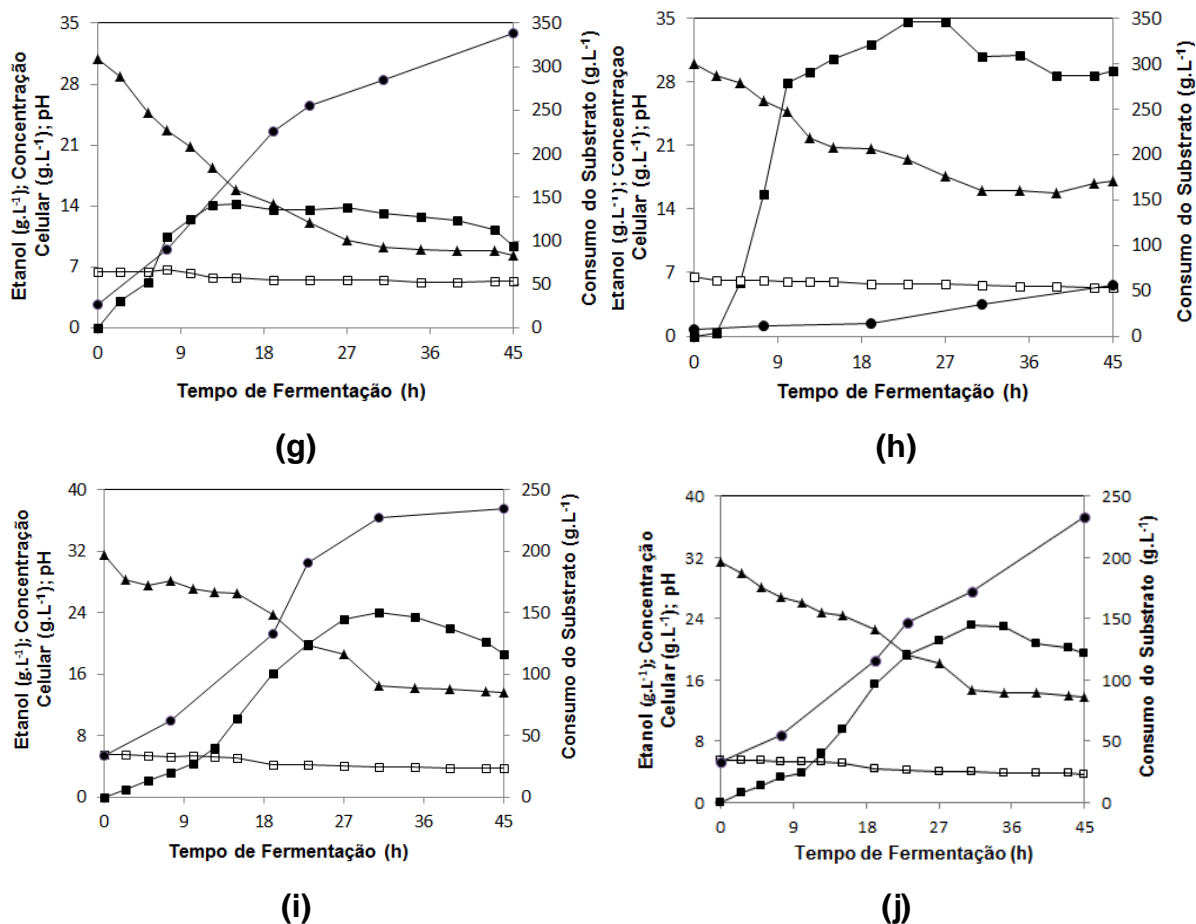
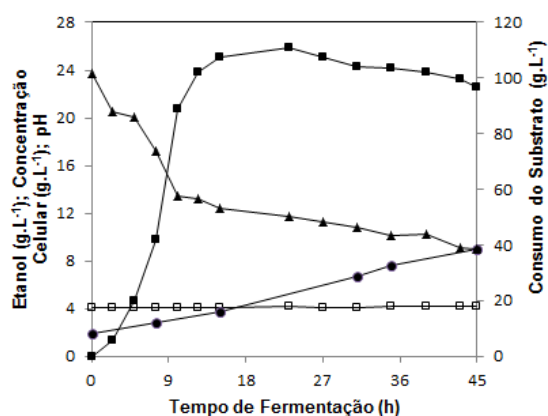


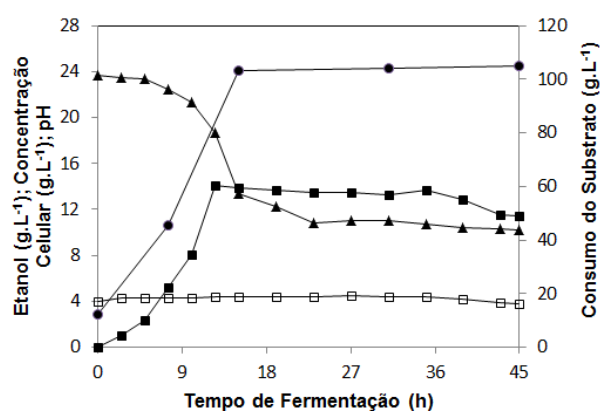
Figura A 1: Cinéticas das fermentações para a levedura *Kluyveromyces marxianus* em que: etanol (g.L⁻¹) (●), concentração celular (g.L⁻¹) (◻), consumo de substrato (g.L⁻¹) (◼) e pH (▲) ao longo do tempo de fermentação para os 10 ensaios: **(a)** Ensaio 1: 29 °C, pH (4,5) e 100 g.L⁻¹ de permeado; **(b)** Ensaio 2: 45 °C, pH (4,5) e 100 g.L⁻¹ de permeado; **(c)** Ensaio 3: 29 °C, pH (6,5) e 100 g.L⁻¹ de permeado; **(d)** Ensaio 4: 45 °C, pH (6,5) e 100 g.L⁻¹ de permeado; **(e)** Ensaio 5: 29 °C, pH (4,5) e 300 g.L⁻¹ de permeado; **(f)** Ensaio 6: 45 °C, pH (4,5) e 300 g.L⁻¹ de permeado; **(g)** Ensaio 7: 29 °C, pH (6,5) e 300 g.L⁻¹ de permeado; **(h)** Ensaio 8: 45 °C, pH (6,5) e 300 g.L⁻¹ de permeado; **(i)** Ensaio 9: 37 °C, pH (5,5) e 200 g.L⁻¹ de permeado; **(j)** Ensaio 10: 37 °C, pH (5,5) e 200 g.L⁻¹ de permeado.

APÊNDICE B

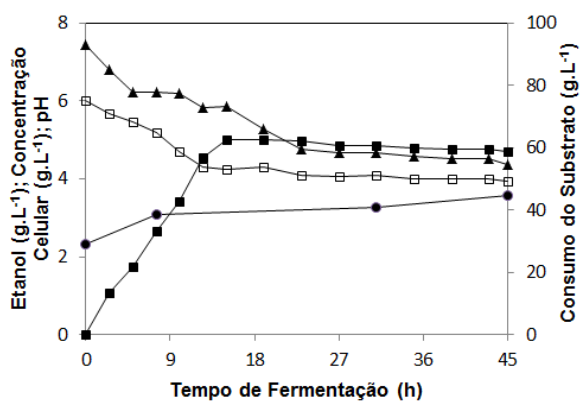
Acompanhamento da concentração celular, consumo de substrato e pH para as fermentações realizadas em planejamento experimental 2^3 para a levedura *Saccharomyces boulardii*.



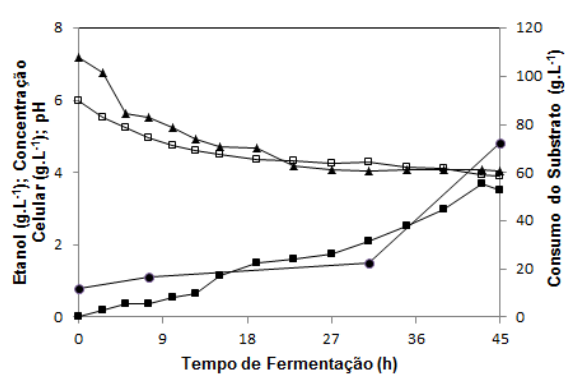
(a)



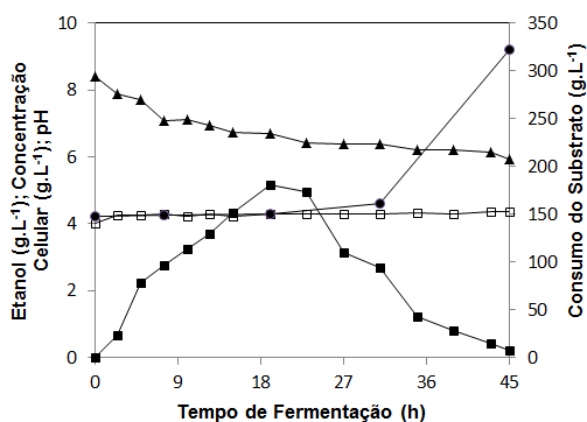
(b)



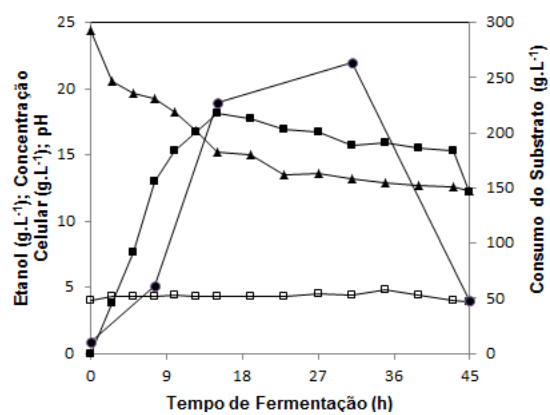
(c)



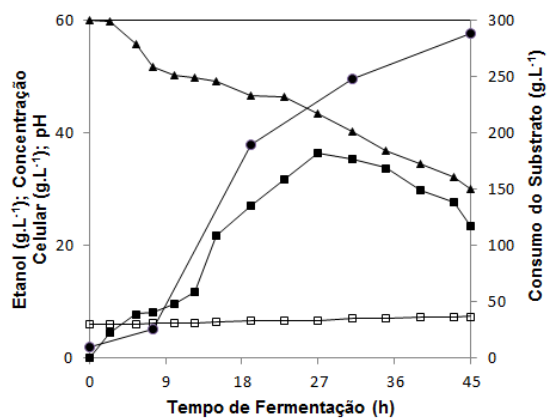
(d)



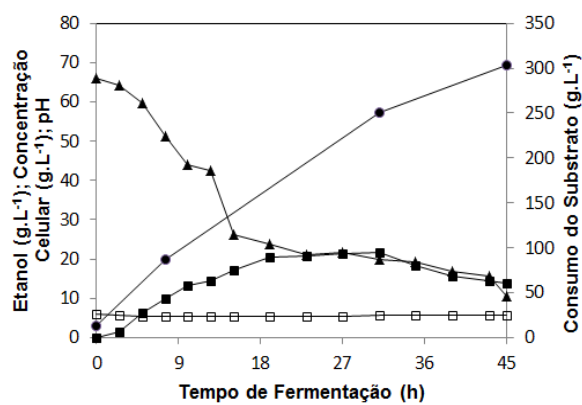
(e)



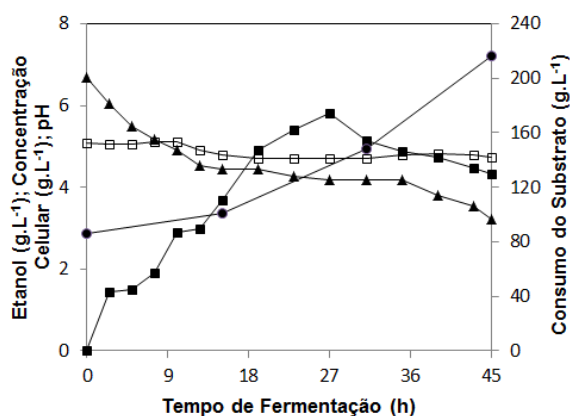
(f)



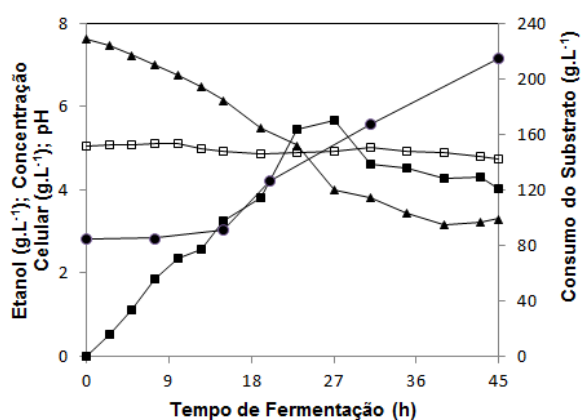
(g)



(h)



(i)



(j)

Figura B 1: Cinéticas das fermentações para a levedura *Saccharomyces boulardii* em que: etanol (g.L^{-1}) (\bullet), concentração celular (g.L^{-1}) (\square), consumo de substrato (g.L^{-1}) (\blacksquare) e pH (\blacktriangle) ao longo do tempo de fermentação para os 10 ensaios: **(a)** Ensaio 1: 26 °C, pH (4,0) e 100 g.L^{-1} de permeado; **(b)** Ensaio 2: 37 °C, pH (4,0) e 100 g.L^{-1} de permeado; **(c)** Ensaio 3: 26 °C, pH (6,0) e 100 g.L^{-1} de permeado; **(d)** Ensaio 4: 37 °C, pH (6,0) e 100 g.L^{-1} de permeado; **(e)** Ensaio 5: 26 °C, pH (4,0) e 300 g.L^{-1} de permeado; **(f)** Ensaio 6: 37 °C, pH (4,0) e 300 g.L^{-1} de permeado; **(g)** Ensaio 7: 26 °C, pH (6,0) e 300 g.L^{-1} de permeado; **(h)** Ensaio 8: 37 °C, pH (6,0) e 300 g.L^{-1} de permeado; **(i)** Ensaio 9: 32 °C, pH (5,0) e 200 g.L^{-1} de permeado; **(j)** Ensaio 10: 32 °C, pH (5,0) e 200 g.L^{-1} de permeado.

APÊNDICE C

Curva de correlação para determinação da concentração celular.

A fim de obter a concentração celular (g.L^{-1}) dos ensaios fermentativos, realizou-se a regressão linear entre a absorbância das diluições das amostras, lida a 600 nm, e a massa seca (item 3.3.2) para cada um dos meios de cultivo. As curvas de correlação para a *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces boulardii* podem ser visualizadas na Figura C (a) e A (b), respectivamente.

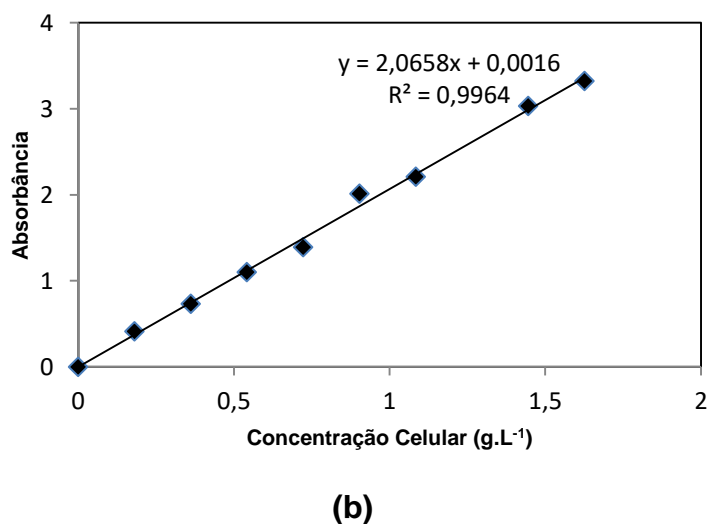
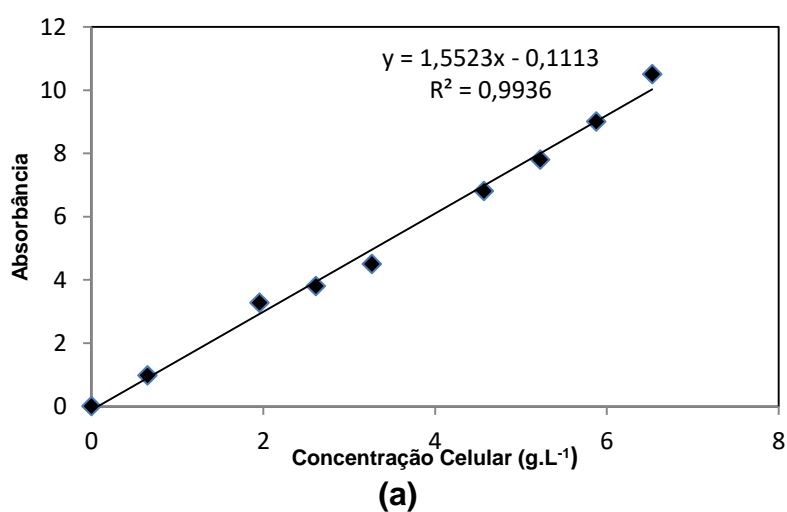


Figura C 1: Curva de correlação entre absorbância e concentração celular: (a) *Kluyveromyces marxianus* e (b) *Saccharomyces boulardii*

APÊNDICE D

Curva padrão de etanol determinada por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a fim de quantificar etanol durante as fermentações alcoólicas.

Conforme item (3.3.5) após leituras cromatográficas das soluções diluídas de etanol padrão para HPLC (100%), determinou-se o perfil de regressão linear apresentado na (Figura D 1) por meio dos picos detectados pelo cromatógrafo.

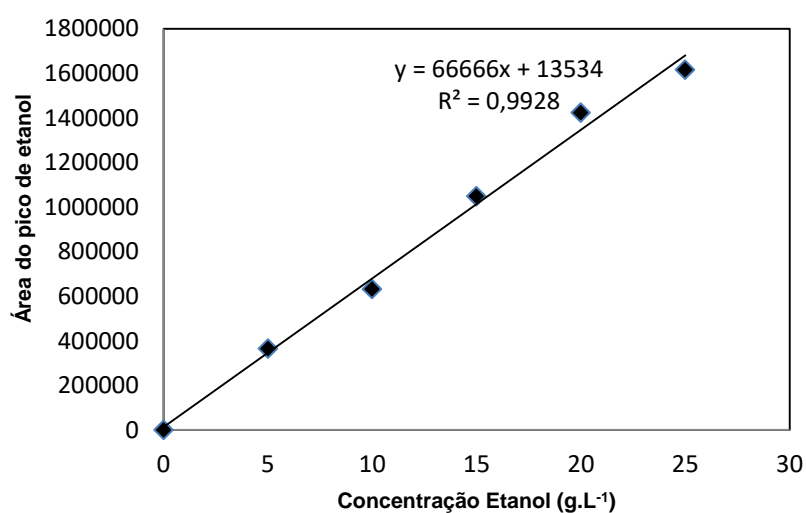


Figura D 1: Curva de padrão de etanol detectada por HPLC

APÊNDICE E

Curva padrão de ácido acético determinado por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a fim de detectar ácido acético durante as fermentações acéticas.

De acordo com o item (3.3.5), realizaram-se diluições com concentrações conhecidas de ácido acético padrão para HPLC (100%), assim quantificou-se o perfil de regressão linear do ácido acético, apresentado na Figura E 1, por meio dos picos detectados pelo cromatógrafo.

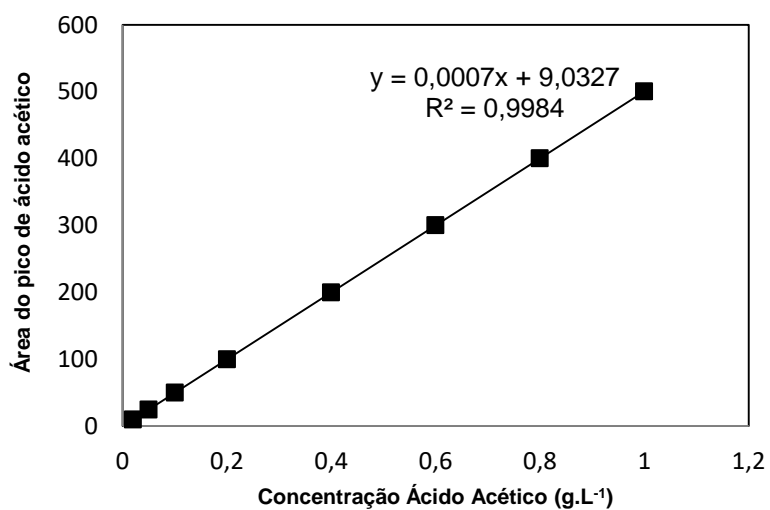


Figura E 1: Curva padrão de ácido acético quantificada por HPLC

ANEXOS

ANEXO A

Método para Determinação de Açúcares Redutores Totais (DNS).

Inicialmente, preparou-se uma curva padrão a partir de soluções padrões de glicose a 3 g.L^{-1} , com concentrações no intervalo de $0,5$ a 3 g.L^{-1} . Em um tubo de ensaio, adicionaram-se $400\mu\text{L}$ da amostra de glicose de acordo com a concentração da faixa e $400\mu\text{L}$ da solução de DNS. O preparo do branco foi pela substituição da amostra por água destilada. Levaram-se as amostras ao aquecimento em banho-maria, a 100°C por 5 min.

Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e foram adicionados 4 mL de água destilada e homogeneizada. Após 10 minelas foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm, zerando o aparelho com o branco preparado.

Em seguida, determinaram-se os açúcares redutores totais das amostras da fermentação em triplicata por meio do método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS). Em um tubo de ensaio, adicionaram-se $400\mu\text{L}$ da amostra diluída proporcional à quantidade de açúcar na amostra e $400\mu\text{L}$ da solução de DNS, conforme condições citadas acima, e baseada na metodologia de Miller (1959).

ANEXO B

Método para Determinação de Açúcar Redutor (Kit de Glicose - PPP).

Inicialmente, prepararam-se as amostras com diluições da fermentação hidrolizada, de modo que a amostra tivesse uma quantidade de açúcar (glicose), que as leituras em espectrofotômetro UV-VIS ocorram entre 0 e 0,8 de absorbância.

As leituras das amostras ocorreram em tubos de ensaios, com 24 μ L da amostra preparada (diluída). Para quantificação da glicose, foi necessária a leitura do padrão (24 μ L do reagente 1). O padrão e as amostras receberam 2400 μ L do reagente 2 (reagente de cor) e 4800 μ L do reagente de cor, foi empregado como como branco. Levaram-se as amostras ao aquecimento em banho-maria, a 37°C por 10 min. Ao retirar as amostras do banho-maria, foi realizada imediatamente a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 505 nm.

ANEXO C

Método para Determinação de Proteína.

Digestão

Pesou-se aproximadamente 0,1000g da amostra e transferiu-se para tubos-Kjeldahl com 5 mL da solução digestora. Aqueceu-se de 50°C aumentando até que atinja 450°C de 30 em 30 min, de acordo com o quadro 1.

Quadro 1: Temperatura e tempo da digestão do bloco digestor

Temperatura (°C)	Tempo (min)
50	30
100	30
150	30
250	30
350	30
450	30

Deixou-se esfriar e adicionou-se aproximadamente 15 mL de água destilada.

Destilação

Em Erlenmeyer, colocaram-se 10 mL de solução receptora, e acoplou-se ao destilador de nitrogênio em local apropriado. Adicionaram-se 20 mL de hidróxido de sódio 18N no destilador de nitrogênio.

Conectou-se o tubo Kjeldahl ao destilador de nitrogênio e acrescentaram-se ao tudo o hidróxido de sódio pela válvula do destilador. Destilou-se por arraste, mantendo o terminal do condensador mergulhado na solução receptora até que toda amônia fosse liberada, ou seja, um volume aproximado de 75 mL na coloração esverdeada.

Titulação

Titulou-se com ácido sulfúrico 0,02 mol.L⁻¹.

A quantidade de nitrogênio presente nas amostras foi determinada a partir da Equação 1:

$$\% \text{ de Nitrogênio} = \frac{V * N * Fc * 14 * 100}{Pa * 1000} \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

V é o volume ácido gasto (mL);

Fc é o fator de correção;

Pa é o peso da amostra (g);

N é a normalidade do ácido (0,05).

A porcentagem de nitrogênio foi convertida em proteína, por:

$$\% \text{ de Proteína Bruta} = \% \text{ de Nitrogênio} * 6,25 \text{ (fator empírico)}$$

Determinação de cinzas (matéria seca e mineral)

Para a determinação da matéria seca (cinzas), pesou-se 2,000 g amostra e colocou-se esta em um cadinho previamente tarado (105°C por 8 h), o conjunto (amostra + cadinho) foi acondicionado em estufa à temperatura de 105°C por 8 h, na sequência foi levado para o dessecador até que este esfriasse, por fim pesou-se o conjunto e anotou-se o valor.

Posteriormente para determinar o conteúdo de matéria mineral, levou-se o conjunto para a mufla a 550°C e este permaneceu até queima total da matéria orgânica (aproximadamente 4 h). Após este tempo, levou-se o conjunto para o dessecador e esperou-se o mesmo esfriar, por fim pesou-se novamente o conjunto. A matéria seca foi determinada utilizando-se a Equação (2) e a matéria mineral foi determinada pela Equação (4).

$$\text{Matéria seca definitiva} = \frac{(\text{peso a } 105^{\circ}\text{C} - \text{peso cadinho}) * 100}{\text{peso da amostra}} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\% \text{ de Cinzas} = \frac{(\text{peso a } 550^{\circ}\text{C} - \text{peso cadinho}) * 100}{\text{peso seco a } 105^{\circ}\text{C}} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\% \text{ de Cinzas M nat.} = \frac{\% \text{ de Cinzas} * \text{Matéria seca definitiva}}{100} \quad \text{Eq. (4)}$$

Determinação de umidade

Utilizando-se placas de petri já previamente taradas à 105°C, foram pesados 20 gramas da amostra do fermentado. Posteriormente, a amostra + placa foram acondicionadas em estufa de secagem por 72 h à 55°C, sendo então retiradas e resfriadas em dessecador, por fim o conjunto (amostra + placa) foi pesado. O valor da umidade foi determinado pela Equação (8).

$$\text{Peso seco} = \text{Peso da amostra} - \text{Peso após secagem a } 55^{\circ} \quad \text{Eq. (5)}$$

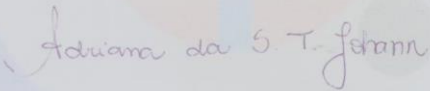
$$(\%) \text{ Pré - seco} = \frac{(\text{peso seco}) * 100}{\text{peso da amostra}} \quad \text{Eq. (6)}$$

$$(\%) \text{ Matéria seca} = \frac{\text{Matéria seca def.} * (\%) \text{ (pré - seco)}}{100} \quad \text{Eq. (7)}$$

$$\% \text{ Umidade} = 100 - (\%) \text{ matéria seca} \quad \text{Eq. (8)}$$


ANEXO D

Laudo GERPEL – Análise de DBO E DQO do permeado de soro de queijo.


GERPEL GRUPO DE PESQUISAS EM RECURSOS PESQUEIROS E LIMNOLOGIA		15 de agosto de 2016	
LAUDO DE ANÁLISES LIMNOLÓGICAS (BIÓTICAS E ABIÓTICAS)			
SOLICITANTE			
Solicitante: Prof. Dra. Mônica L. Fiorese			
Endereço: Toledo/PR			
INFORMAÇÕES DA COLETA			
Data da coleta: Agosto/2016			
Natureza da amostra: Efluente (Soro)			
ENSAIOS REALIZADOS:			
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)			
	Valor	Unidade	Método
Permeada	65.149	mg/L	APHA (2005)
Demanda Química de Oxigênio (DQO)			
	Valor	Unidade	Método
Permeada	168.300	mg/L	APHA (2005)
 Adriana da Silva Tronco Johann Responsável Técnica CRQ - 09100940			
LABORATÓRIO DE LIMNOLOGIA APLICADA Rua da Faculdade, 645, Jardim Sta Maria, Cep 85903-000, Toledo/PR. Fone (45)3379-7084/3379-7088			

ANEXO E

Ficha de especificação técnica do permeado de soro de queijo, disponibilizado pela SOORO Ltda.



Soluções em Ingredientes Confiáveis



ET024
Revisão:06
Data: 26.08.2015

Permeado de Soro de Leite em Pó

Registro no MAPA nº 011/1328

Produto obtido da filtração por membranas de ultrafiltração retirando a proteína de soro, concentrando em evaporador a vácuo e seco através do processo tipo spray dryer.

Ingredientes

Permeado de Soro de Leite Resfriado.

Não contém Glúten

Aplicações

O permeado de soro de soro de leite em pó pode ser utilizado nas aplicações de biscoitos, pães, chocolates, queijos processados entre outros.

Embalagem

Sacos de papel multifolhados com saco de polietileno interno contendo 25 kg. Pallet PBR 1100kg.

Condições de Transporte e Armazenamento

Armazenamento à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e calor, em local fresco e arejado.
Transportar protegido contra umidade e calor, não devendo ser transportado com outros materiais que possam de alguma forma contaminar o produto.

Validade

Armazenado nas condições recomendadas, 12 meses a partir da data de fabricação.

Monitoramento

O monitoramento de contaminantes (Antibióticos, Pesticidas, Metais pesados, Micotoxinas, Microrganismos Patogênicos e Materiais Estranhos) é realizado de acordo com o Plano de Amostragem Interno e Legislações Vigentes.

Características Sensoriais

Pó uniforme sem grumos
Sabor e odor lácteos
Cor branco a amarelado.

Parâmetros Físico Químicos

	Mínimo	Máximo
Umidade (%)	-	3
Acidez (% ácido láctico)	-	2
pH	6,0	6,7
Cinzas (% sais minerais)	-	6
Lactose (%)	88	-
Proteína (%)	3,0	-

Referência de Análise: IN 68 de 12/12/2006

Parâmetros Microbiológicos

Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	Máximo 5x10 ⁴
Coliformes Totais (UFC/g)	1x10 ²
Coliformes Fecais (UFC/g)	1x10 ¹
Staphylococcus aureus (UFC/g)	1x10 ²
Salmonella (25g)	Ausente*
Bacillus cereus (UFC/g)	Máx 1 x 10 ³ **

*Análise semestral - **Análise por lote
Referência de Análise: IN 62 de 26/08/2003
Referência dos Padrões: RDC 12 02/01/2001

Informação Nutricional

Porção de 100g	
Calorias	370 kcal
Carboidratos	90g
Proteínas	2,7g
Gordura Totais	0,1g
Gorduras Saturadas	<0,1g
Gorduras Trans	Não Detectado
Fibras Alimentares	<0,5g
Sódio	604mg


De acordo com a RDC N°26, 02/07/15 Anvisa. O único alergênico presente no produto é classificado no Grupo Leites de todas as Espécies de Animais Mamíferos (Proteína e Lactose).

ACEITE DO CLIENTE

Empresa:
Nome:
Função:

Data:
Visto:


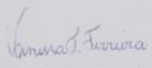
Fone +55 (45) 3284-5300 www.sooro.com.br
 Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda
 Caixa Postal 1066 - CEP 85960-000 - Rodovia BR 163 km 283,8 - Marechal Cândido Rondon - Paraná



Especificação Técnica

ANEXO F

Certificado de análise do permeado de soro de queijo em pó, disponibilizado pela SOORO Ltda.

		CERTIFICADO DE ANÁLISE Laboratório de Controle de Qualidade Sooro Concentrado Ind. de Produtos Lácteos Ltda.	
Produto: Permeado de Soro de Leite em Pó		Data: 26/01/2016	
AMOSTRA			
PARÂMETROS	ESPECIFICAÇÃO	VALORES ANÁLISE	
Lote		150105-SP A	
Quantidade kg		1 kg	
Data de fabricação		21/11/2015	
Validade	12 meses após a data de fabricação	21/11/2016	
Aspecto	Pó uniforme sem grumos	Característicos, conforme especificação	
Cor	Branco a amarelado.	Branco a amarelado, conforme especificação	
Sabor/ Odor	Levemente lácteos	Característicos, conforme especificação	
Umidade (%)	Máximo 3,00	1,14	
Acidez (% ácido láctico)	Máximo 2,00	1,03	
Gordura (%)	Máximo 1,50	0,00	
pH	6,00 – 6,70	6,47	
Cinzas (sais minerais %)	Máximo 6,00	5,28	
Lactose	Mínimo 88,00	89,42	
Proteínas	Mínimo 3,00	4,16	
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	Máximo $5,0 \times 10^4$	$<1,0 \times 10^2$	
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Máximo $1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	
Coliformes totais (NMP/g)	Máximo $1,0 \times 10^2$	< 0,3	
Coliformes fecais (NMP/g)	Máximo $1,0 \times 10^1$	< 0,3	
Enterobactérias (UFC/g)	Máximo $1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	
Bolores e leveduras (UFC/g)	Máximo $1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g): Valor Garantido	Máximo $1,0 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^1$	
<i>Salmonella</i> sp: Valor Garantido	Ausência (25g)	Ausente	
<i>Listeria monocytogenes</i> : Valor Garantido	Ausência (25g)	Ausente	
 Garantia da Qualidade			

ANEXO G**Resultados de DBO e DQO para os fermentados analisados (Quadro****1).****Quadro 1:** Resultados da carga orgânica para DQO e DBO, para o permeado, fermentados alcoólicos e acéticos

Descrição das amostras	DQO (mg.L⁻¹)	DBO (mg.L⁻¹)
Sb-permeado	1477.000	709.000
Km-permeado	668.000	341.000
Sb-ferm. Alcoólica	1383.000	649.000
Km-ferm. Alcoólica	513.000	272.000
Sb-ferm. Acética-Aa	1285.000	578.000
Km-ferm. Acética-Aa	219.000	103.000
Sb-ferm. Acética-Mv	807.000	565.000
Km-ferm. Acética-Mv	149.000	67.000