

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE**

**CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM  
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL MESTRADO**

**CULTIVO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS UTILIZANDO PERMEADO  
DE SORO DE QUEIJO**

**GRETTYA MARIA ASSUNÇÃO**

**TOLEDO – PR – BRASIL**

**Fevereiro de 2014**

**GRETTYA MARIA ASSUNÇÃO**

**CULTIVO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS UTILIZANDO PERMEADO  
DE SORO DE QUEIJO**

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**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Lady Fiorese

Co-orientador: Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan

**TOLEDO – PR – BRASIL  
Fevereiro de 2014**

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária  
UNIOESTE/Campus de Toledo.  
Bibliotecária: Marilena de Fátima Donadel - CRB - 9/924

A851c Assunção, Gretty Maria  
Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro  
de queijo / Gretty Maria Assunção. -- Toledo, PR: [s. n.], 2014.  
xvii, 107 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Lady Fioresse  
Coorientador: Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan  
Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade  
Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de  
Engenharias e Ciências Exatas.

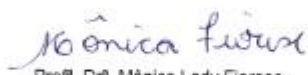
1. Engenharia química – Dissertações 2. Biomassa de levedura  
3. Soro de queijo 4. Ultrafiltração 5. Fermentação 6. Hidrólise  
enzimática Processos de separação por membranas 5. Membranas,  
Filtração de. 6. *Saccharomyces cerevisiae* 10. *Saccharomyces*  
*boulardii* 11. *Kluyveromyces marxianus* I. Fioresse, Mônica Lady,  
Orient. II. Hasan, Salah Din Mahmud, Orient. III. T

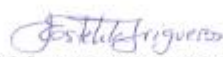
CDD 20. ed. 660.28424

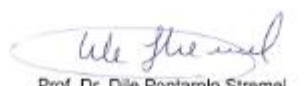
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Grettya Maria Assunção a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 28 de fevereiro de 2014

COMISSÃO JULGADORA

  
Prof.ª. Dr.ª. Mônica Lady Fiorese  
Orientadora

  
Prof.ª. Dr.ª. Daniela Estelita Goes Trigueros  
Membro

  
Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel  
Membro

*Aos meus heróis:*  
*Luiz Assunção, Victar Assunção (in memorian),*  
*Adélia, Adilza, Denis (in memorian), Domingos, Luiz Roberto*  
*minhas cunhadas e sobrinhos(as)!*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, pela presença constante em todos os momentos, principalmente pelo amparo nos mais difíceis.

À TODA a minha família, que foram sempre meus melhores exemplos e meu porto seguro.

Ao Ramon, por fazer a diferença.

À Professora Dra. Mônica L. Fiorese, por toda orientação, suporte, atenção, dedicação e ensinamentos dispensados durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Salah D. M. Hasan por todo auxílio prestado.

Ao Professor Dr. Sérgio L. Lucena, pelas sugestões.

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

A todos os servidores da Unioeste, pela prestatividade.

À empresa SOORO que financiou esta pesquisa, fornecendo matéria-prima, reagentes e bolsa de pesquisa e à Mayara Cereja.

Aos alunos de iniciação científica, Alex Freitas, Izabela Miotto, Juliana Sandri, Karine Andrade, Lincoln Pavan, Matheus Lucas e Millene Prado.

Aos que me ajudaram no laboratório, com informações e/ou sugestões e aquele socorro de última hora, Barbara Nadai, Fabiano Bisinella, Fran, Michele e Rafa (do xérox), Guilherme Bazarin, Huilian Colpo, Maurício Meotti, Pedro Suzaki e Raquel Ratz.

Aos novos amigos e parceiros, que fizeram com que tudo fosse mais prazeroso, Amanda, Bonifácio, Bruninha, Caroline, Fabiano, Grasi, Izabela, Japa, Juliana, Kamila, Mayrinha, Millene, Monique, Negão, Pajé, além de TODOS os outros!

Aos amigos distantes, Adriely, Alessandro, Alex Braga, Alex Sandro, Célia, Elenita, Hilda, Janayna, Joel, Jonas, José Renato, Junior, Patrícia e Pedrinho.

Ao Prof. Marcelo Viegas, pelo incentivo e apoio.

E, simplesmente por existirem, Flick, Memi, Janis, Ariel e Muriel.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                                                       |       |
|-----------------------------------------------------------------------|-------|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                | vi    |
| LISTA DE TABELAS .....                                                | xv    |
| LISTA DE ABREVIACÕES.....                                             | xviii |
| RESUMO.....                                                           | xix   |
| ABSTRACT .....                                                        | xxi   |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                   | 1     |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                        | 3     |
| 2.1 Leite.....                                                        | 3     |
| 2.2 Queijo .....                                                      | 3     |
| 2.3 Soro de queijo .....                                              | 4     |
| 2.3.1 Utilização do soro de queijo.....                               | 5     |
| 2.4 Permeado de soro de queijo.....                                   | 7     |
| 2.5 Fermentação .....                                                 | 9     |
| 2.6 Leveduras.....                                                    | 10    |
| 2.6.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                           | 10    |
| 2.6.2 <i>Saccharomyces boulardii</i> .....                            | 12    |
| 2.6.3 <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....                            | 13    |
| 2.7 Fontes alternativas de alimentos com teor elevado de proteína ... | 15    |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                           | 18    |
| 3.1 Micro-organismos .....                                            | 18    |
| 3.2 Substrato .....                                                   | 18    |
| 3.3 Hidrólise enzimática .....                                        | 19    |
| 3.4 Otimização das condições de hidrólise enzimática .....            | 20    |
| 3.5 Fermentações.....                                                 | 21    |
| 3.5.1 Etapas da fermentação.....                                      | 21    |
| 3.5.2 Meios de cultivo .....                                          | 22    |
| 3.5.3 Avaliação das condições de fermentação .....                    | 24    |
| 3.5.4 Condições da fermentação .....                                  | 25    |
| 3.5.5 Métodos Analíticos .....                                        | 26    |
| 3.5.6 Adição de oxigênio no processo fermentativo .....               | 30    |

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.7 Análise de etanol nas melhores condições de crescimento das leveduras, <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. boulardii</i> e <i>K. marxianus</i> .....                                         | 30 |
| 3.5.8 Análise da redução de DBO e DQO após o processo fermentativo .....                                                                                                                    | 31 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                              | 32 |
| 4.1 Substrato .....                                                                                                                                                                         | 32 |
| 4.2 Hidrólise enzimática .....                                                                                                                                                              | 33 |
| 4.3 Fermentação .....                                                                                                                                                                       | 40 |
| 4.3.1 Fermentações preliminares com permeado de soro de queijo e meio padrão .....                                                                                                          | 41 |
| 4.3.2 Curva de correlação biomassa indireta x biomassa direta .....                                                                                                                         | 42 |
| 4.3.3 Avaliação das condições e nutrientes necessários para o crescimento das leveduras <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. boulardii</i> e <i>K. marxianus</i> em permeado de soro de queijo..... | 43 |
| 4.3.3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – Resultados planejamento experimental.....                                                                                                         | 44 |
| 4.3.3.2 <i>Saccharomyces boulardii</i> - Resultados planejamento experimental.....                                                                                                          | 57 |
| 4.3.3.3 <i>Kluyveromyces marxianus</i> – Resultados Planejamento experimental.....                                                                                                          | 65 |
| 4.3.4 Adição de oxigênio .....                                                                                                                                                              | 73 |
| 4.3.5. Análise da produção de etanol ao final do processo fermentativo para as três leveduras em estudo .....                                                                               | 75 |
| 4.3.6 Análises do potencial de redução da DBO e DQO antes e após o processo fermentativo para as três leveduras.....                                                                        | 75 |
| 5. CONCLUSÃO.....                                                                                                                                                                           | 77 |
| 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....                                                                                                                                                   | 79 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                                                         | 80 |
| LISTA DE ANEXOS .....                                                                                                                                                                       | 92 |
| ANEXO A - Métodos analíticos .....                                                                                                                                                          | 93 |
| ANEXO B - Tabela Teste F .....                                                                                                                                                              | 95 |
| ANEXO C - Resultados das fermentações.....                                                                                                                                                  | 96 |



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Biorreator do tipo descontínuo mostrando duas saídas (para retirada de amostra e eliminação de CO <sub>2</sub> )..                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 26 |
| Figura 2 - Hidrólise da lactose pela enzima β-galactosidase para produção de galactose e glicose.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 27 |
| Figura 3 - Gráfico de Pareto obtido no planejamento DCCR da hidrólise enzimática.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 38 |
| Figura 4 - (a) Valores preditos x resíduos e (b) Diagrama de dispersão obtidos no planejamento DCCR para a hidrólise enzimática. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 39 |
| Figura 5 - (a) Superfície de resposta e (b) Curva de nível obtidos no planejamento DCCR para a hidrólise enzimática .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 40 |
| Figura 6 - Acompanhamento do crescimento microbiano por absorbância expresso em (LN/No), para as leveduras (a) <i>S. cerevisiae</i> ; (b) <i>S. boulardii</i> e (c) <i>K. marxianus</i> , nos meios (♦) sintético, (■) permeado puro e (▲) permeado suplementado com sais. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 41 |
| Figura 7 - Correlação entre absorbância e biomassa celular, para as leveduras (a) <i>S. cerevisiae</i> , (b) <i>S. boulardii</i> e (c) <i>K. marxianus</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 43 |
| Figura 8 - Gráfico de Pareto do planejamento Plackett-Burman para a levedura <i>S. cerevisiae</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 46 |
| Figura 9 - (a) Diagrama de dispersão e (b) Valores preditos x resíduos obtidos no planejamento Plackett-Burman para a fermentação utilizando a levedura <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 49 |
| Figura 10 - Superfície de resposta, (a) T x [permeado]; (b) T x pH; (c) T x [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]; (d) T x [MgSO <sub>4</sub> ]; (e) T x [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]; (f) [permeado] x pH; (g) permeado x [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]; (h) [permeado] x [MgSO <sub>4</sub> ]; (i) [permeado] x [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]; (j) pH x x [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]; (l) pH x [MgSO <sub>4</sub> ]; (m) pH x [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]; (n) [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] x [MgSO <sub>4</sub> ]; (o) [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] x [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]; (p) [MgSO <sub>4</sub> ] x [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]; Curva de nível, , (q) T x [permeado]; (r) T x pH; (s) T x [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]; (t) T x [MgSO <sub>4</sub> ]; (u) T x [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]; (v) [permeado] x pH; (x) permeado x [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]; (z) [permeado] x [MgSO <sub>4</sub> ]; (a1) [permeado] x [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]; (b1) pH x x [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]; (c1) pH x [MgSO <sub>4</sub> ]; (d1) pH x |    |

[KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; (e1) [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] x [MgSO<sub>4</sub>]; (f1) [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] x [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; (g1) [MgSO<sub>4</sub>] x [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]..... 53

Figura 11 – Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) (●), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) (▲) e pH (\*), ao longo do tempo de fermentação, (a) Ensaio 11 (T 30 °C, [permeado] 150,0 g L<sup>-1</sup>, pH 4, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 1,0 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 0,5 g L<sup>-1</sup> e [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 4,0 g L<sup>-1</sup>); (b) Ensaio utilizando apenas permeado (T 30 °C, pH 5; [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>) ..... 54

Figura 12 - Gráfico de Pareto obtido no planejamento Plackett-Burman para a fermentação da levedura *S. boulardii*..... 61

Figura 13 - Superfície de resposta, (a) T x [permeado]; (b) T x pH; (c) [permeado] x pH; Curva de nível, (d) T x [permeado]; (e) T x pH e (f) [permeado] x pH..... 62

Figura 14 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) (▲), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) (■) e pH (x) ao longo do tempo de fermentação: (a) Ensaio 7 (T 30 °C, [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>, pH 5,5, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 9 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 1,2 g L<sup>-1</sup> e [K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 9 g L<sup>-1</sup>); (b) Ensaio utilizando apenas permeado (T 30 °C, pH 5; [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>)..... 63

Figura15 - Gráfico de Pareto do planejamento Plackett-Burman para a levedura *K. marxianus*..... 68

Figura 16 - Superfície de resposta, (a) T x [permeado]; (b) T x pH; (c) T x [KH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)]; (d) [permeado] x pH; (e) [permeado] x [KH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)]; (f) pH x [KH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)]; Curva de nível, (g) T x [permeado]; (h) T x pH; (i) T x [KH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)]; (j) [permeado] x pH; (l) [permeado] x [KH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)]; (m) pH x [KH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)]..... 70

Figura 17 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) (●), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: (a) Ensaio 3 (T 30 °C, [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>, pH 6,5, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 2 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 2,5 g L<sup>-1</sup> e [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 1 g L<sup>-1</sup>); (b) Ensaio utilizando apenas permeado (T 30 °C, pH 5; [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>)..... 71

Figura 18 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) (●), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6; [permeado] 20 g L<sup>-1</sup>, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 1 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 0,5 g L<sup>-1</sup>, [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 1 g L<sup>-1</sup>..... 96

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 19 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 4; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> ..... | 96 |
| Figura 20 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> ..... | 96 |
| Figura 21 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> .....  | 96 |
| Figura 22 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 4; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> ..... | 97 |
| Figura 23 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> ..... | 97 |
| Figura 24 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> ..... | 97 |
| Figura 25 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> .....  | 97 |
| Figura 26 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 4; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> .....  | 98 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 27 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 4; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> .....     | 98 |
| Figura 28 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 4; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> .....    | 98 |
| Figura 29 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 4; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> .....     | 98 |
| Figura 30 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> ..... | 99 |
| Figura 31 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> ..... | 99 |
| Figura 32 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> ..... | 99 |
| Figura 33 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> ..... | 99 |
| Figura 34 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L <sup>-1</sup> ) (●), consumo da fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> ) (▲) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> .....                                                                                                                                                                                   | 99 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 35 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 5,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,2 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> .....  | 100 |
| Figura 36 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 1,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,2 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> ..... | 100 |
| Figura 37 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 5,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 3,6 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> ..... | 100 |
| Figura 38 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 5,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,2 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> .....  | 100 |
| Figura 39 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 1,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 3,6 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> ..... | 101 |
| Figura 40 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 5,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 3,6 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> ..... | 101 |
| Figura 41 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 5,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,2 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> ..... | 101 |
| Figura 42 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 5,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 3,6 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> .....  | 101 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 43 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 1,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 3,6 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> .....   | 102 |
| Figura 44 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 1,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 3,6 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> .....   | 102 |
| Figura 45 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 1,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,2 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 9 g L <sup>-1</sup> .....  | 102 |
| Figura 46 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 1,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,2 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 3 g L <sup>-1</sup> .....   | 102 |
| Figura 47 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 3,5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 6 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 2,4 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 6 g L <sup>-1</sup> ..... | 103 |
| Figura 48 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 3,5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 6 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 2,4 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 6 g L <sup>-1</sup> ..... | 103 |
| Figura 49 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 3,5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 6 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 2,4 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 6 g L <sup>-1</sup> ..... | 103 |
| Figura 50 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 3,5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 6 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 2,4 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 6 g L <sup>-1</sup> ..... | 103 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 51 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 3,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> .....                                                                                                                                                                                 | 103 |
| Figura 52 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 2 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,9 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> .....   | 104 |
| Figura 53 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 15 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,9 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> .....   | 104 |
| Figura 54 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 2 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> .....  | 104 |
| Figura 55 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 15 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,9 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> .....  | 104 |
| Figura 56 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 3,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 15 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> ..... | 105 |
| Figura 57 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 2 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> .....  | 105 |
| Figura 58 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 15 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,9 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> ..... | 105 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 59 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 15 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> .....    | 105 |
| Figura 60 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 3,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 15 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> .....    | 106 |
| Figura 61 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 3,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 2 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> .....     | 106 |
| Figura 62 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 3,5; [permeado] 150 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 2 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,9 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 4 g L <sup>-1</sup> .....    | 106 |
| Figura 63 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 3,5; [permeado] 20 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 2 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 0,9 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 1 g L <sup>-1</sup> .....     | 106 |
| Figura 64 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 8,5 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,7 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> ..... | 107 |
| Figura 65 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 8,5 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,7 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> ..... | 107 |
| Figura 66 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\blacktriangle$ ) e pH (*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85 g L <sup>-1</sup> , [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] 8,5 g L <sup>-1</sup> , [MgSO <sub>4</sub> ] 1,7 g L <sup>-1</sup> , [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] 2,5 g L <sup>-1</sup> ..... | 107 |



Figura 67 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) ( $\blacktriangle$ ) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  8,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,7  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  2,5  $\text{g L}^{-1}$  ..... 107

Figura 68 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) ( $\bullet$ ), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) ( $\blacktriangle$ ) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$  ..... 107

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Composição média do leite .....                                                                                                                              | 3  |
| Tabela 2 - Composição do soro de queijo doce .....                                                                                                                      | 4  |
| Tabela 3 - Composição do permeado de soro de queijo .....                                                                                                               | 8  |
| Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial completo $2^3$ , com 4 pontos centrais, para a hidrólise enzimática.....                                                     | 20 |
| Tabela 5 - Matriz do planejamento DCCR, com 4 pontos centrais, para a hidrólise enzimática .....                                                                        | 21 |
| Tabela 6 - Composição do meio padrão para cada levedura .....                                                                                                           | 23 |
| Tabela 7 - Composição do permeado suplementado com sais para cada levedura .....                                                                                        | 24 |
| Tabela 8 - Matriz do planejamento Plackett-Burman, para cada levedura .....                                                                                             | 25 |
| Tabela 9 - Composição dos meios para correlação entre absorbância e massa seca.....                                                                                     | 28 |
| Tabela 10 - Diluição do meio fermentativo para análise de absorbância .....                                                                                             | 29 |
| Tabela 11 - Condições dos meios utilizados para avaliar o aumento de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) com adição de oxigênio.....                                 | 30 |
| Tabela 12 - Características físico-químicas do permeado de soro de queijo .....                                                                                         | 32 |
| Tabela 13 - Concentração de lactose hidrolisada e suas respectivas conversões durante hidrólise a T 30 °C, pH 6,5 e 0,1% de enzima.....                                 | 33 |
| Tabela 14 - Concentração de lactose hidrolisada e suas respectivas conversões durante a hidrólise a T 30 °C, pH 6,5 a partir de $150 \text{ g L}^{-1}$ de permeado..... | 34 |
| Tabela 15 - Matriz do planejamento fatorial completo $2^3$ , para a hidrólise enzimática, de $150 \text{ g L}^{-1}$ de permeado .....                                   | 34 |
| Tabela 16 - Tabela dos coeficientes de regressão - resposta à hidrólise enzimática para o planejamento fatorial completo $2^3$ , ao nível de 95% de confiança .....     | 35 |

|                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 17- Matriz do planejamento DCCR, para a hidrólise enzimática de 150 g L <sup>-1</sup> de permeado e 0,125% de enzima.....                                                              | 36 |
| Tabela 18 - Tabela dos coeficientes de regressão - resposta à hidrólise enzimática para o planejamento DCCR, ao nível de 95% de confiança .....                                               | 37 |
| Tabela 19- Análise de variância, para o planejamento DCCR, para a hidrólise enzimática .....                                                                                                  | 38 |
| Tabela 20- Matriz do planejamento Plackett-Burman para a levedura <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                  | 45 |
| Tabela 21 - Tabela dos coeficientes de regressão - resposta à biomassa celular para o planejamento Plackett-Burman, ao nível de 95% de confiança, da levedura <i>S. cerevisiae</i> .....      | 46 |
| Tabela 22- Análise de variância, para o planejamento Plackett-Burman, para a produção de biomassa, utilizando a levedura <i>S. cerevisiae</i> .....                                           | 47 |
| Tabela 23 - Resultados de produtividade, conversão de substrato em célula, velocidade específica de crescimento e substrato metabolizado para a levedura <i>S. cerevisiae</i> .....           | 56 |
| Tabela 24- Matriz do planejamento Plackett-Burman para a levedura <i>S.boulardii</i> .....                                                                                                    | 58 |
| Tabela 25- Tabela dos coeficientes de regressão - resposta à biomassa para o planejamento Plackett-Burman, ao nível de 95% de confiança, da levedura <i>S. boulardii</i> .....                | 60 |
| Tabela 26 - Resultados de biomassa, produtividade, conversão de substrato em célula, velocidade específica de crescimento e substrato metabolizado, para a levedura <i>S. boulardii</i> ..... | 64 |
| Tabela 27- Matriz do planejamento Plackett-Burman para a levedura <i>K. marxianus</i> .....                                                                                                   | 65 |
| Tabela 28- Tabela dos coeficientes de regressão - resposta à biomassa para o planejamento Plackett-Burman, ao nível de 95% de confiança, da levedura <i>K. marxianus</i> .....                | 67 |

|                                                                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 29 - Resultados de biomassa, produtividade, conversão de substrato em célula, velocidade específica de crescimento e substrato metabolizado, para a levedura <i>K. marxianus</i> ..... | .72 |
| Tabela 30 - Concentração de biomassa celular obtida para cada levedura com e sem adição de O <sub>2</sub> .....                                                                               | .74 |
| Tabela 31 - Concentração de etanol obtida para cada levedura em % e em g L <sup>-1</sup> .....                                                                                                | .75 |
| Tabela 32 - Resultados de DBO e DQO antes e após cada fermentação para as leveduras <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. boulardii</i> e <i>K. marxianus</i> .....                                    | 76  |

## LISTA DE ABREVIATÖES

|        |                                            |
|--------|--------------------------------------------|
| ANOVA  | Análise de variância                       |
| CPS    | Concentrado protéico de soro               |
| DCCR   | Delineamento composto central rotacional   |
| DBO    | Demanda bioquímica de oxigênio             |
| DNS    | Ácido dinitrosalicílico                    |
| DQO    | Demanda química de oxigênio                |
| FDA    | Food drugs administration                  |
| GRAS   | Generally regarded as safe                 |
| rpm    | Rotações por minuto                        |
| UHT    | Ultra high temperature                     |
| UV-Vis | Ultravioleta-visível                       |
| vvm    | Volume de ar por volume de meio por minuto |
| YEPD   | Yeast extract peptone dextrose             |
| YMA    | Yeast-malt extract agar                    |
| YNB    | Yeast nitrogen base                        |

# **CULTIVO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS UTILIZANDO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO**

**AUTORA: GRETTYA MARIA ASSUNÇÃO**

**ORIENTADORA: PROF. DRA. MÔNICA LADY FIORESE**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85.903-000 – Toledo – PR, Brasil, defendida em 28 de fevereiro de 2014, 107 p.

## **RESUMO**

O soro de queijo é um efluente da indústria láctea. Devido ao seu alto teor nutricional, é utilizado na produção de concentrado proteico de soro por ultrafiltração. Esse processo gera outro resíduo, o permeado de soro de queijo que também contém elevado teor nutricional, pois é rico em lactose, além de alguns sais minerais (P, K, Mg, Na e Ca). Pode ser reutilizado em processos fermentativos como fonte de nutrientes. Um destes processos é a produção de biomassa celular proveniente do crescimento de leveduras, para uso em alimentos para consumo humano e animal. As leveduras utilizadas devem obter o GRAS (*generally regarded as safe*), ou seja, ser consideradas seguras para o uso em alimentos. Algumas são: *S. cerevisiae*, utilizada como micro-organismo padrão por ter suas características bem definidas; *S. boulardii*, utilizada na medicina como probiótico e comercializada como medicamento, não havendo relatos da sua produção a partir de resíduos; *K. marxianus* com potencial de metabolizar a lactose presente no permeado. Este trabalho tem por objetivo estudar o crescimento das três leveduras utilizando como meio de cultivo o resíduo permeado de soro de queijo, para a produção de biomassa. Dois planejamento experimentais foram realizados para a hidrólise enzimática visando obter a melhor condição para esse processo, e um planejamento experimental foi realizado para as fermentações com o intuito de avaliar quais as variáveis são

significativas no processo de produção de biomassa de leveduras. As análises realizadas durante o processo foram: absorbância, açúcares redutores, massa seca indireta e direta e pH. Foi realizada uma fermentação com adição de oxigênio, objetivando um aumento na produção de biomassa celular, análises de DBO e DQO e análise da concentração final de etanol. A melhor condição obtida para a hidrólise foi utilizando [enzima] 0,125%, T 35,35°C e pH 7,7. Para a produção de biomassa sem adição de oxigênio, os melhores valores alcançados para todas as leveduras foram a partir de 150 g L<sup>-1</sup> de permeado e a temperatura de 30 °C, cujos resultados foram respectivamente: 14,22 g L<sup>-1</sup> de *S. cerevisiae* em pH 4, 1 g L<sup>-1</sup> [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 0,5 g L<sup>-1</sup> [MgSO<sub>4</sub>] e 4 g L<sup>-1</sup> [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; 22,85 g L<sup>-1</sup> de *S. boulardii* em pH 5,5, 9 g L<sup>-1</sup> [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 1,2 g L<sup>-1</sup> [MgSO<sub>4</sub>] e 9 g L<sup>-1</sup> [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; 16,90 g L<sup>-1</sup> de *K. marxianus* em pH 6,5, 2 g L<sup>-1</sup> [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 2,5 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] e 1 g L<sup>-1</sup> [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Os resultados de biomassa celular obtidos nessas condições de processo e com a adição de oxigênio ao meio fermentativo foram 16,54 g L<sup>-1</sup> de *S. cerevisiae*, 30,58 g L<sup>-1</sup> de *S. boulardii* e 21,12 g L<sup>-1</sup> de *K. marxianus*. A concentração de etanol ao final do processo para cada levedura foi de 28,8 g L<sup>-1</sup> de etanol a partir de *S. cerevisiae*; 27,0 g L<sup>-1</sup> de etanol a partir de *S. boulardii* e 52,1 g L<sup>-1</sup> de etanol a partir de *K. marxianus*. E a redução nos parâmetros DBO e DQO foi de 69,31% na DQO e 97,19% na DBO utilizando *S. cerevisiae*; 97,67% na DQO e 99,53% na DBO utilizando *S. boulardii*; e 83,53% na DQO e 93,14% na DBO utilizando *K. marxianus*. Desta forma, o estudo demonstrou que o permeado de soro de queijo é um resíduo com grande potencial de aplicação na produção de biomassa de leveduras, as quais possibilitam ao final do processo fermentativo uma redução da carga orgânica inicial do resíduo sendo esse um dos parâmetros vinculados à redução do impacto ambiental, bem como à diminuição dos custos de processos de tratamento do efluente.

**Palavras-chave:** permeado de soro de queijo, biomassa de leveduras, *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, *K. marxianus*.

# **CROP BIOMASS USING YEAST WHEY PERMEATE CHEESE**

**AUTHOR: GRETTYA MARIA ASSUNÇÃO**

**SUPERVISOR: PROF. DRA. MÔNICA LADY FIORESE**

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85.903-000 – Toledo – PR, Brazil, presented on February, 28th 2014, 107 p.

## **ABSTRACT**

The whey is a dairy industry effluent. Due to its high nutritional content, it is used in the production of whey protein concentrate by ultrafiltration. This process generates another residue, cheese whey permeate which also contains high nutritional content, it is rich in lactose, and some minerals (P, K, Mg, Na and Ca). Can be reused in fermentation processes as a source of nutrients. One of these processes is the production of cell biomass from the growth of yeasts for use in food for human and animal consumption. Yeasts are used to obtain the GRAS (generally regarded the safe), in other words, be considered safe for use in foods. Some are: *S. cerevisiae*, used as a standard micro-organism to have its well-defined characteristics; *S. boulardii*, used in medicine as probiotic and marketed as a medicine, there are no reports of its production from waste; *K. marxianus* with potential of metabolizing lactose present in the permeate. This work aims to study the growth of three yeasts, using culture medium as the residue of cheese whey permeate, for the production of biomass. Two experimental design were performed to enzymatic hydrolysis in order to obtain the best condition for this process, and an experimental design was carried out for the fermentations in order to assess which variables are significant in the production of yeast biomass process. The analyzes carried out during the process were: absorbance, reducing sugars, indirect and direct dry weight and pH. Fermentation was carried out with addition of oxygen, aiming an increase in the production of cell biomass, BOD and



COD analysis and analysis of the final concentration of ethanol. The best condition for the hydrolysis was obtained using [enzyme] 0.125% , T 35.35 °C and pH 7,7. For the production of biomass without added oxygen, the best values achieved for all yeasts were from 150 g L<sup>-1</sup> and permeate temperature of 30 °C, the results were: 14.22 g L<sup>-1</sup> of *S. cerevisiae* at pH 4, 1 g L<sup>-1</sup> [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 0.5 g L<sup>-1</sup> [MgSO<sub>4</sub>], and 4 g L<sup>-1</sup> [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ]; 22.85 g L<sup>-1</sup> of *S. boulardii* at pH 5,5, 9 g L<sup>-1</sup> [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 1.2 g L<sup>-1</sup> [MgSO<sub>4</sub>] and 9 g L<sup>-1</sup> [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; and 16.90 g L<sup>-1</sup> of *K. marxianus* at pH 6,5, 2 g L<sup>-1</sup> [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 2.5 g L<sup>-1</sup> [MgSO<sub>4</sub>] and 1 g L<sup>-1</sup> [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. The results of cell biomass obtained in these process conditions and with the addition of oxygen to the fermentation medium were 16.54 g L<sup>-1</sup> of *S. cerevisiae*, 30.58 g L<sup>-1</sup> of *S. boulardii* and 21.12 g L<sup>-1</sup> *K. marxianus*. The ethanol concentration at the end of the process for each yeast was 28.8 g L<sup>-1</sup> of ethanol from *S. cerevisiae*; 27 g L<sup>-1</sup> of ethanol from *S. boulardii* and 52.1 g L<sup>-1</sup> of ethanol from *K. marxianus*. And the reduction in BOD and COD parameters was 69.31% in COD and 97.19% in BOD using *S. cerevisiae*; 97.67 % in COD and 99.53 % in BOD using *S. boulardii*; and 83.53 % in COD and 93.14 % in BOD using *K. marxianus*. Thus, the study demonstrated that permeate cheese whey is a residue with a potential application in the production of yeast biomass, which allow the end of the fermentation process reduced the initial organic load of the waste being one of the bound parameters to reduce the environmental impact as well as the decreasing cost of the wastewater treatment processes.

**Keywords:** cheese whey permeate, biomass yeast, *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, *K. marxianus*.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo, com uma produção de mais de 32,1 bilhões de litros de leite por ano (EMBRAPA, 2013). O Estado de Minas Gerais destaca-se detendo a maior produção nacional (27,3%), seguido do Rio Grande do Sul (12,1%), Paraná (11,9%) e Goiás (10,9%). Nos demais estados a produção é menor, e correspondem juntos a aproximadamente 37,8% (IBGE, 2013).

A composição do leite varia de acordo com alguns fatores, tais como raça do animal, espécie, alimentação, entre outros, porém basicamente apresenta água (87%), gordura (4%), proteína (3,5%), lactose (4,8%) e sais minerais (0,7%) (Valsechi, 2001).

Na utilização do leite no processo de fabricação de queijo, em torno de 90 – 95% do leite é rejeitado como soro de queijo, um resíduo com elevadas propriedades nutricionais e quando descartado inadequadamente no meio ambiente se torna um potencial poluidor (COSTA, 2013; SANTOS *et al.*, 2008).

O soro de queijo apresenta em sua composição aproximadamente 55% dos nutrientes do leite podendo ser reutilizado para variados fins. A sua maior aplicação está na produção de Concentrado Proteico de Soro (CPS). Esse produto é obtido através de separação por membranas, em específico a ultrafiltração, que tem por finalidade a remoção e concentração das proteínas contidas no soro de queijo, gerando ao final do processo de produção do CPS um novo subproduto, o permeado de soro de queijo, que basicamente constitui-se por água, sais minerais e elevado teor lactose.

Devido à sua alta concentração de lactose, o permeado de soro de queijo apresenta potencial de aplicação como fonte de carbono para obtenção de produtos de maior valor em processos biotecnológicos, principalmente os envolvendo leveduras, obtendo-se ao final um produto com elevado teor de nutrientes (proteína, vitaminas e fibras) (ARAÚJO *et al.* 2009).

Um dos produtos que pode ser obtido por processo fermentativo utilizando leveduras é a biomassa microbiana ou biomassa celular, a qual apresenta em sua constituição aminoácidos essenciais, tornando-se assim uma forma alternativa de obtenção de suplementos alimentares/proteína para humanos e animais. Sua produção

a partir do permeado de soro de queijo tem como principais vantagens: a diminuição do impacto ambiental causado pelo permeado de soro quando considerado um resíduo e descartado sem tratamento adequado e o baixo custo para a sua produção. Além disso, muitos estudos têm apontado a biomassa microbiana como uma fonte alternativa de nutrientes para a alimentação, pois ela contém os aminoácidos essenciais, sendo assim considerada um alimento completo que pode ajudar a combater a fome e a desnutrição (KHAN *et al.*, 2010; MODESTI *et al.*, 2007).

Este estudo teve por objetivo utilizar o resíduo permeado de soro de queijo como fonte alternativa de substrato para avaliar o crescimento de biomassa de leveduras a partir de três diferentes gêneros de leveduras. Os objetivos específicos foram:

- Obter a melhor condição de tempo, pH, temperatura e concentração de enzima para a hidrólise enzimática da lactose presente no permeado de soro de queijo;
- Avaliar a capacidade de utilização do permeado para as três leveduras em estudo;
- Testar meios de cultivos com e sem suplementação de nutrientes ao permeado de soro de queijo, visando obter maior produção de biomassa pelas leveduras;
- Avaliar a influência da adição de oxigênio na produção de biomassa;
- Analisar a quantidade de etanol produzido com e sem aeração do meio;
- Quantificar a redução da carga orgânica, pelas análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) após o processo fermentativo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Leite

Leite é um produto de alta complexibilidade cuja composição pode variar de acordo com a espécie, raça, individualidade, alimentação dos animais, entre outros, constituindo-se por água, lactose, proteína, gordura e sais (Valsechi (2001), cujas concentrações médias são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição média do leite (Fonte: Valsechi, 2001).

| Componente    | Concentração (%) |
|---------------|------------------|
| Água          | 87,0             |
| Lactose       | 4,8              |
| Proteínas     | 3,5              |
| Gordura       | 4,0              |
| Sais minerais | 0,7              |

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2013), em 2011 o Brasil foi o quarto maior produtor mundial de leite, ficando atrás dos Estados Unidos da América, Índia e China, além de ser também um grande importador de lácteos. A Região Sul produziu em torno de 9,6 bilhões de litros de leite e o Paraná produziu aproximadamente 3,8 milhões de litros (Secretaria da Agricultura e do Abastecimento - SEAB, 2013), ocupando o terceiro lugar no “ranking” nacional, ficando atrás de Minas Gerais e Rio Grande do Sul (EMBRAPA, 2013; SEAB, 2013).

O queijo é um dos principais produtos lácteos produzidos no Estado do Paraná (SEAB, 2013).

### 2.2 Queijo

Queijo é caracterizado como um produto obtido por separação parcial do soro do leite ou reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulado por ação de enzimas, de qualidade apta para uso alimentar (MAPA, 2005).

A produção de queijo começa com a seleção, filtração, clarificação, padronização e pasteurização do leite, seguida do seu resfriamento e adição dos ingredientes necessários para a coagulação. Após o corte, a primeira e segunda mexeduras, há a dessoragem, processo em que há a liberação do soro de queijo (PAULA *et al.*, 2009; PERRY, 2004; DALGLEISH, 1983).

### 2.3 Soro de queijo

Soro de queijo, também conhecido como soro de leite, é o resíduo gerado na produção do queijo. Consiste em uma fase aquosa obtida após a precipitação da caseína e retém cerca de 55% dos nutrientes do leite, cuja composição está apresentada na Tabela 2 (IMAMURA & MADRONA, 2008; COSTA, 2013).

Tabela 2 - Composição do soro de queijo doce (Fonte: IMAMURA & MADRONA, 2008).

| Componente     | Concentração (%) |
|----------------|------------------|
| Água           | 93,0             |
| Lactose        | 5,0              |
| Proteínas      | 0,9              |
| Cinzas         | 0,6              |
| Lipídeos       | 0,2              |
| Sólidos Totais | 6,7              |

A quantidade de nutrientes presentes no soro de queijo lhe confere uma elevada carga orgânica, com uma DQO em torno de 80000 mg L<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub> e a sua DBO pode chegar a 60000 mg L<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub>. Isso torna o seu tratamento oneroso e, devido a isto, muitas vezes esse resíduo é descartado sem nenhum tratamento prévio (ALMEIDA, 2004; BALDASSO, 2009).

Nos últimos anos, tanto as indústrias como os governos têm realizado grandes esforços para diminuir os problemas de poluição ambiental e, ao mesmo tempo,

aproveitar o valor nutricional que o soro de queijo representa. O soro de queijo é geralmente utilizado pela sua qualidade proteica, como suplemento de ração animal e mais recentemente por suas propriedades funcionais e nutricionais em alimentos processados, além de novas tecnologias que vêm sendo analisadas e estudadas no intuito do seu aproveitamento na íntegra (MAWSON, 1994; PRUDÊNCIO & BENEDET, 2001).

### **2.3.1 Utilização do soro de queijo**

Inúmeros autores realizaram estudos relacionados com a utilização do soro de queijo para os mais diversificados fins.

O soro de queijo foi estudado para a obtenção do extrato de soja, com o intuito de aumentar o teor de nutrientes, resultando em uma melhora no teor de proteínas, além da economia de água neste processo (PRUDÊNCIO & BENEDET, 2001).

Muitos produtores rurais o utilizam na alimentação de gado leiteiro na sua forma *in natura* (LIZIERI & CAMPOS, 2006).

IMAMURA & MADRONA (2008) estudaram o seu reaproveitamento como ingrediente para a produção de pão de queijo, minimizando assim o seu desperdício. Avaliado sensorialmente, a sua substituição parcial ou total no produto final não apresentou diferenças em relação ao produto-padrão.

COUTINHO *et al.* (2009) utilizaram o soro de queijo para a produção de etanol a partir de várias leveduras, obtendo os melhores resultados com a utilização da levedura *Saccharomyces fragilis*.

BARBOSA *et al.* (2010) estudaram a utilização do soro de queijo juntamente com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em fermentação alcoólica, para a produção de aguardente, mostrando-se satisfatório.

A utilização do soro de queijo como substituinte da água para a produção de pães foi estudada por SILVA *et al.*, (2011), fornecendo um produto mais nutritivo e com alto teor de cálcio, além de diminuir a contaminação ambiental por estar reutilizando um resíduo agroindustrial. A avaliação foi feita por análise sensorial e observou-se boa

aceitação do produto, principalmente obtido a partir do soro proveniente de leite de cabra.

Porém estes estudos não são encontrados em grande escala, o que se tem industrialmente para reaproveitamento do soro é a sua concentração pelo uso da tecnologia de separação por membrana para a obtenção de concentrado protéico de soro (CPS) (PAGNO *et al.*, 2009).

A tecnologia de separação por membranas é bastante utilizada para esta finalidade (produção de CPS), pois requer um baixo consumo energético, pode ser realizada a temperatura ambiente, pode ser operada em sistema descontínuo ou contínuo, além de apresentar simples operação, requerer pouco espaço físico, facilidade em ampliar a escala e há a possibilidade da sua interação com outros processos de separação. Dentre os processos de separação por membranas, os encontrados em indústrias de laticínios são: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa, e devido ao tamanho das moléculas das proteínas do soro de queijo, a mais utilizada para a sua recuperação é a ultrafiltração (BOSCHI, 2006).

No processo de ultrafiltração, o fluido é forçado a passar sob pressão através de uma membrana semipermeável e, dependendo do valor do peso molecular de corte da membrana há a separação dos componentes do fluido. O permeado é constituído dos compostos de menor peso molecular que passam pela membrana, e o retentado são os compostos de maior peso molecular que ficam retidos na membrana. Na ultrafiltração do leite, o permeado é constituído por lactose, sais minerais e vitaminas e o retentado por proteínas e gorduras (ROSA *et al.*, 2010).

As membranas de ultrafiltração retêm partículas com massa molecular de 1 a  $10^3$  kDa, em uma porosidade de 0,01-0,1  $\mu\text{m}$ . A separação de colóides e macromoléculas em solução normalmente são realizadas por ultrafiltração (BOSCHI, 2006; FARRO, 2003).

A utilização do processo de ultrafiltração para fabricação de queijo é baseada no método MMV, em homenagem aos seus inventores - Maubois, Mocquot e Vassal - e baseia-se na concentração do leite até obter um líquido pré-queijo com o mesmo teor de sólidos totais que os queijos prontos. Neste processo elimina-se as etapas de corte da massa e dessoragem adicionando coalho diretamente na embalagem comercial final (NETO, 2006; RIBEIRO, 1996).

As vantagens da ultrafiltração são o aumento do rendimento, a fabricação contínua e automatizada, a economia de mão-de-obra e ingredientes e a produção de soro com menor poder poluente(BOSCHI, 2006; NARIMATSU *et al.*, 2003).

Segundo RIBEIRO (2001), o soro obtido pelo processo normal de fabricação do queijo contém aproximadamente 13% de proteína, 76% de lactose, 10% de gordura e 1% de cinzas e esse teor de proteína pode ser concentrado a 35, 50, 70 e 80% tornando-se concentrado proteico de soro. Para a obtenção do concentrado 35%, o soro é pasteurizado, clarificado e concentrado pelo processo de ultrafiltração. Ao final desse processo têm-se duas frações: o permeado de soro de queijo e o retentado proteico. O retentado pode ser concentrado à vácuo e, por fim, destinado ao processo de secagem, normalmente a secagem por atomização, obtendo-se como produto final o concentrado proteico de soro na forma de pó.

#### **2.4 Permeado de soro de queijo**

O permeado de soro de queijo é a fração líquida obtida na ultrafiltração para obtenção do CPS. Esse permeado contém alto teor de lactose e sais minerais (SMITH, 2008), podendo desta forma ser reaproveitado na alimentação de animais, produção de lactose, galactose, álcool, produtos farmacêuticos ou cosméticos (DOMINGUES *et al.*, 1999).

Outra forma da sua reutilização é submeter o permeado *in natura* a um processo de desidratação para a obtenção do permeado em pó. No estado sólido, o permeado contém um teor aproximado de 68 - 85% de lactose e 8 - 20% de sais minerais, ou seja, um produto com alto valor nutricional, entretanto com limitações por seu elevado teor de lactose e sais (DOMINGUES *et al.*, 2001; ZACARCHENCO, 2012).

A Tabela 3 apresenta a composição físico-química do permeado de soro de queijo no estado líquido.



Tabela 3 - Composição do permeado de soro de queijo.

| Parâmetros     | ZEMPULSKI<br>(2012)        | SMITH<br>(2008) | BALDASSO<br>(2009)       | ALMEIDA<br>(2004)        |
|----------------|----------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| DQO            | 149000 mg L <sup>-1</sup>  | -               | -                        | 80000 mg L <sup>-1</sup> |
| DBO            | 351820 mg L <sup>-1</sup>  | -               | 60000 mg L <sup>-1</sup> | -                        |
| Fósforo total  | 1246,9 mg L <sup>-1</sup>  | -               | -                        | -                        |
| Cálcio         | 2024,04 mg L <sup>-1</sup> | -               | -                        | -                        |
| pH             | 6,6                        | -               | -                        | -                        |
| Acidez         | 26° D                      | -               | -                        | -                        |
| Sólidos totais | 15%                        | 5,5%            | -                        | -                        |
| Cinzas         | 0,82%                      | 0,5%            | -                        | -                        |
| Lactose        | -                          | 4,9%            | -                        | -                        |
| Glicose        | 7,5%                       | -               | -                        | -                        |
| Proteína       | <0,18%                     | <0,1%           | -                        | -                        |

Observando-se a Tabela 3, é possível comprovar a presença de sais minerais e lactose no permeado de soro de queijo e, conforme ZACARCHENCO (2012) relata, o permeado pode ser aproveitado com grande potencial como substrato em processos fermentativos, obtendo-se ao final produtos com maior valor agregado.

BRONSTEIN & MONTE ALEGRE (1998) cultivaram *Lactococcus lactis* em permeado de soro de queijo para a obtenção de fermento concentrado, mostrando-se um meio adequado para o crescimento desse micro-organismo.

DOMINGUES *et al.* (1999) estudaram a utilização de uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de metabolizar e fermentar lactose, juntamente com o permeado como fonte de carbono, para a obtenção de etanol, obtendo um fator de conversão de 80% e uma produtividade em torno de 10g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

OLIVEIRA *et al.* (2006) demonstraram a eficiência da utilização do permeado de soro de queijo na produção de bebida fermentada, cujas características sensoriais mostraram-se aceitáveis e composição química semelhante a um repositório hidroeletrólítico.

SOUZA *et al.* (2011) utilizaram o permeado de soro de queijo para a fermentação de *Propioni bacterium freudenreichi* PS1, com o objetivo de produzir ácidos graxos de cadeia curta, juntamente com parâmetros de secagem desses ácidos para a obtenção da estabilidade do bioaroma.

O permeado de soro de queijo pode ser utilizado também como substituinte do sal sem agregar sódio, na mistura de sais minerais no leite e na separação de  $\alpha$ -lactalbumina (ZACARCHENCO, 2012).

Porém, assim como o aproveitamento do soro de queijo tem aplicações comerciais, em grande escala, restritas à conversão em concentrado proteico em pó, o permeado também tem sua aplicação comercial voltada apenas a sua concentração e obtenção na forma de pó, ou então considerado apenas como um efluente a ser tratado, e quando assim tratado, devido ao alto teor de nutrientes, é considerado um potencial poluidor, cujo valores de DQO e DBO são semelhantes aos valores do soro de queijo, em torno de 80000 mg L<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub> e 60000 mg L<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub>, respectivamente (BALDASSO, 2008; LIMA *et al.*, 2012; ZACARCHENCO, 2012).

## 2.5 Fermentação

O processo fermentativo consiste na evolução dos componentes do sistema de cultivo, em função do tempo. Os componentes são constituídos por: micro-organismo, substratos do meio de cultivo e produtos. A cinética do processo fermentativo é feita a partir do estudo dos produtos selecionados e do substrato limitante (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Em processos fermentativos, as reações metabólicas ocasionam aumento na leitura da absorbância, pois, segundo PRESCOTT (2002), a análise de absorbância está diretamente relacionada com a quantidade de células presentes no meio, diminuição do pH, uma vez que a elevação do número de micro-organismos causam a acidificação do meio (PAULA *et al.*, 2009), além do consumo da fonte de carbono, pois são metabolizados e transformados em outros produtos pela atividade das enzimas sintetizadas pelos micro-organismos (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Com o crescimento do micro-organismo há a produção de energia, favorecendo a formação de etanol, além dos metabólitos secundários, que não estão diretamente relacionados com o crescimento celular (NEVES *et al.*, 2010).

Dentre os nutrientes utilizados, o nitrogênio, na forma do íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), é utilizado por ser o responsável por 8 a 12% da massa seca; o magnésio é um co-fator

de muitas reações metabólicas; o fósforo auxilia na síntese dos ácidos nucleicos e é importante para o metabolismo energético e, o potássio atua em algumas etapas do metabolismo além de ser ativador em algumas reações da glicólise (SANTOS, 2008).

## **2.6 Leveduras**

Muitos micro-organismos são utilizados para a produção de alimentos, entre eles estão as bactérias, bolores e leveduras. Em processos fermentativos, os micro-organismos mais utilizados são as leveduras, principalmente na indústria cervejeira, pois elas metabolizam os constituintes do mosto em etanol e também seus co-produtos, produzindo cervejas com maior qualidade, além de estabilidade satisfatórias (CARVALHO, 2006).

As leveduras são fungos unicelulares, sua temperatura ideal para desenvolvimento é entre 20 - 30 °C, algumas se reproduzem em baixas temperaturas e poucas que se desenvolvem acima de 45 °C, seu desenvolvimento é favorecido em pH ácido e podem se reproduzir tanto na presença (oxidação) quanto na ausência (fermentação) de oxigênio (CARVALHO, 2006; GAVA *et al.*, 2008).

Podem ser utilizadas em produtos alimentícios devendo ser consideradas seguras para tal uso, após obtenção de certificação pelo GRAS (*generally regarded as safe*). Algumas leveduras que possuem o GRAS são *Candida lipolytica*, *Candida rugosa*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Yarrowia lipolytica* (HENSING *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2002; SANTOS, 2009).

Segundo SABRA *et al.* (2003), micro-organismos têm sido cada vez mais utilizados em processos fermentativos, para a produção de proteína microbiana, extrato de levedura, produção de aromas, realçadores de sabor e enzimas.

### **2.6.1 *Saccharomyces cerevisiae***

VIANA (2009) classifica essa levedura como sendo do super reino *Eukaryota*, reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales*, família *Saccharomycetaceae*, gênero *Saccharomyces*, espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

É um micro-organismo aeróbio facultativo e dependendo das condições ambientais em que se encontra, resulta em diferentes produtos do metabolismo. Para a obtenção de maior biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, deve-se mantê-la em condições de aerobiose, e para uma maior produção de etanol e CO<sub>2</sub>, deve-se manter as condições de anaerobiose (MULLER, 2006).

É também o principal modelo de organismo eucariótico utilizado em pesquisas e aplicações industriais de etanol, bebidas fermentadas e produção de biomassa (KURTZMAN *et al.*, 2011).

ANDRADE (2005) em seu estudo utilizando soro de queijo (90 g L<sup>-1</sup>), suplementado com sulfato de amônio e extrato de levedura (1 g L<sup>-1</sup>), enzima  $\beta$ -galactosidase (0,4 g L<sup>-1</sup>), inoculo (70 g L<sup>-1</sup>), agitação de 300 rpm, pH 4,5 e temperatura de 30°C, obteve uma produção de biomassa de 33,53 g L<sup>-1</sup>; entretanto cabe ressaltar que a concentração inicial de biomassa expressa pelo autor foi de aproximadamente 30,5 g L<sup>-1</sup>, o que por diferença de valores inicial e final de biomassa, equivale a 3 g L<sup>-1</sup>, em 8 horas de fermentação.

CAZETTA & CELLIGOI (2005) em seus estudos, compararam a produção de proteína microbiana utilizando os micro-organismos *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida lipolytica* e obtiveram o maior valor de biomassa utilizando o micro-organismo *R. mucilaginosa* (7,05 g L<sup>-1</sup>). Entretanto a maior produção de proteína por biomassa foi utilizando a levedura *S. cerevisiae* (2,29 g L<sup>-1</sup> de proteína em 4,55 g L<sup>-1</sup> de biomassa produzida), equivalente a 50,35%, demonstrando a eficiência da levedura para esta finalidade.

GONÇALVES (2012) utilizou um biorreator *air-lift* com uma pressão de 1,50 kgf cm<sup>-2</sup> em meio sintético composto por glicose (54 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (50 g L<sup>-1</sup>) e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (12 g L<sup>-1</sup>) a um pH 5 e temperatura 20 °C e obteve uma concentração celular de 17,25 g L<sup>-1</sup> em 72 h de fermentação.

Uma desvantagem da levedura *S. cerevisiae* é a sua incapacidade de utilizar a lactose diretamente em seu metabolismo, devido a ausência de uma sistema para transportar a lactose e a falta de um gene estrutural para hidrolisar a lactose em glicose e galactose. Com isso o processo utilizando essa levedura é limitado ou encarecido (DOMINGUES, 2001).

A *S. cerevisiae* foi selecionada por ser considerada um micro-organismo com características bem definidas, uma vez que apresenta inúmeros estudos já publicados e processos industriais já implementados envolvendo a sua utilização na produção de biomassa, e neste estudo ela será considerada o micro-organismo padrão.

### **2.6.2 *Saccharomyces boulardii***

A *Saccharomyces boulardii* é um dos micro-organismos considerados probióticos, ou seja, quando ingeridos exerce efeitos benéficos ao hospedeiro e, é uma alternativa para a prevenção ou tratamento de doenças. Seu nome deve-se ao seu descobridor, um microbiologista francês, Henri Boulard. Nos manuais de taxiconomia aparece como um sinônimo de *Saccharomyces cerevisiae* (MARTINS *et al.*, 2005; MULLER, 2006).

Na Indochina, esse microbiologista buscava a linhagem de uma levedura capaz de suportar altas temperaturas para produzir vinho, quando ocorreu uma epidemia de cólera em uma vila que ele encontrava-se, e para aliviar a diarreia, a população utilizava o chá de lichia, e Henri Boulard, com sua pesquisa, descobriu que não a eficácia contra a diarreia, estava na levedura que estava recobrindo-a. A partir disso, a *S. boulardii* tem sido utilizada como probiótico (MARTINS *et al.*, 2005).

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura não patogênica, com maior resistência ao estresse ácido, e apresenta crescimento mais rapidamente à 37 °C (LIONG, 2011; MARTINS *et al.*, 2009). Segundo MULLER (2006), a *Saccharomyces boulardii* é um fungo do filo *Ascomycota*, ordem *Saccharomycetalia*, família *Saccharomycetacea* e gênero *Saccharomyces*. Vários autores afirmam que ela é uma linhagem da *Saccharomyces cerevisiae*, tendo em vista que os métodos convencionais não podem ser utilizados para separar linhagens de *S. cerevisiae*. Entretanto por suas

linhagens serem utilizadas como produto terapêutico diferente da *S. cerevisiae*, e por ser capaz de metabolizar a galactose, considera-se como uma espécie à parte (MARTINS *et al.*, 2009).

Os principais estudos realizados utilizando essa levedura são na prevenção à diarreia causada por *Clostridium difficile*, na colite causada por tratamentos com antibióticos, doença de Crohn e diarreia em crianças, mostrando eficiência em todos os casos. A forma de administração dessa levedura é em cápsulas, comercializada na forma do medicamento Floratil®<sup>TM</sup>, o qual contém 100 mg de *S. boulardii*-17 liofilizada (aproximadamente  $2 \times 10^9$  células) (MULLER, 2006).

MULLER (2006) em seu estudo obteve uma concentração celular de  $3,969 \text{ g L}^{-1}$  utilizando o biorreator *Air-lift* com aeração de 1,5 vvm.

A levedura *Saccharomyces boulardii* foi selecionada por apresentar um efeito benéfico ao organismo humano, por ser considerada o único probiótico considerado seguro e aceito pelo FDA para aplicação em humanos, e por atualmente ter sua comercialização restringida a forma do medicamento Floratil®, sem estudos relatando a produção de biomassa com resíduos agroindustriais.

### **2.6.3 *Kluyveromyces marxianus***

Essa levedura foi inicialmente isolada da uva, e descrita por E. C. Hansen como *Saccharomyces marxianus* pela sua semelhança com o gênero *Saccharomyces*. Entretanto, devido à sua capacidade de metabolizar açúcares diferentes e as diferenças dos esporos e morfologia dos ascos, houve a necessidade de reclassificá-la, juntamente com as espécies *Saccharomyces fragilis* e *Saccharomyces lactis*. Em 1956, um novo gênero foi descrito, *Kluyveromyces*, e percebeu-se a semelhança desse gênero com as três leveduras citadas anteriormente, as quais foram inseridas nesse gênero (FONSECA *et al.*, 2008).

Apesar de a levedura *Kluyveromyces lactis* ser reconhecida como o organismo modelo do gênero *Kluyveromyces*, a levedura *Kluyveromyces marxianus* tem mais vantagens para um novo modelo de levedura e é um hospedeiro potencial para aplicação em processos biotecnológicos. Ela tem sido utilizada para a produção

industrial de várias enzimas, dentre elas a  $\beta$ -galactosidase, que catalisa a hidrólise da lactose e a inulinase (JEONG *et al.*, 2012; LEMES *et al.*, 2012).

Tem também uma ampla faixa de crescimento (30 - 45 °C) e assim como a *S. cerevisiae*, é considerada um micro-organismo termotolerante, que tem a temperatura máxima de crescimento de 48 °C, entretanto alguns estudos afirmam que ela pode crescer até 49 °C e produzir etanol a 40 °C (SILVEIRA, 2006).

SILVA & CASTRO-GOMEZ (1995) estudaram a produção de etanol, utilizando a levedura *K. fragilis*, em meio contendo soro de leite (150 g L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5 g L<sup>-1</sup>), NH<sub>4</sub>SO<sub>2</sub> (5 g L<sup>-1</sup>), em pH 5,3, temperatura de 34 °C e agitação de 300 rpm, obtendo um valor de 28,53 mg mL<sup>-1</sup> (28,53 g L<sup>-1</sup>) com 11 h de fermentação.

Utilizando soro de queijo com e sem suplementação como substrato, SABRA *et al.*, (2003) obtiveram uma biomassa de 4,6 g L<sup>-1</sup> e um consumo de 84,7% de lactose, enquanto em meio suplementado a produção de biomassa foi de 9,6 g L<sup>-1</sup> e a lactose totalmente consumida.

DINIZ (2009) obteve 3,32 g L<sup>-1</sup> de etanol utilizando reator batelada com agitação de 200 rpm, temperatura 30 °C, meio de cultivo composto por YNB sem aminoácidos, suplementado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 g L<sup>-1</sup>) e lactose (21 g L<sup>-1</sup>), utilizando a levedura *K. marxianus* JA-6, e 1,16 g L<sup>-1</sup> com as mesmas condições utilizando a levedura *K. lactis*. Em biorreator utilizando a mesma concentração de lactose (21 g L<sup>-1</sup>), agitação de 250 rpm, aeração de 2 vvm, temperatura 30 °C por 6 h, obteve 9,39 g L<sup>-1</sup> de etanol para a levedura *K. marxianus* JA-6 e 2,88 g L<sup>-1</sup> para a levedura *K. lactis*.

ROCHA (2010) demonstrou que a levedura *K. marxianus* pode ser utilizada como hospedeira para a obtenção de proteínas heterólogas, além de apresentar virtudes fisiológicas que podem resultar em maior produtividade industrial, sugerindo que essa levedura seja adicionada à listas das mais consagradas, dentre elas: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, entre outras.

A utilização dessa levedura para a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase em processo fermentativo também se demonstra eficiente, segundo estudos realizados por MANERA *et al.*, (2011), os quais obtiveram 1400 U g<sup>-1</sup> em 24 h de fermentação.

Essa levedura apresenta aplicação industrial devido a sua capacidade em metabolizar a lactose como fonte de energia, na forma dos monossacarídeos glicose e galactose, pela via glicolítica ou de Leloir, não havendo assim a necessidade de hidrolisar o substrato que contenha esse dissacarídeo (GABARDO *et al.*, 2013).

Selecionou-se a levedura *Kluyveromyces marxianus* devido a sua capacidade de metabolizar dissacarídeos como é o caso da lactose presente no substrato a ser investigado neste trabalho, diminuindo desta forma a etapa adicional de hidrólise do permeado necessária para os cultivos de *S. cerevisiae* e *S. boulardii*, e também por já existirem diversos estudos envolvendo o seu uso na produção de etanol, entretanto sem aplicações voltadas para a produção de biomassa.

## **2.7 Fontes alternativas de alimentos com teor elevado de proteína**

As proteínas são polímeros complexos, constituídas por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, resultantes da combinação de vinte aminoácidos diferentes e são polimerizadas por ligações peptídicas. A sua síntese ocorre nos ribossomos. Os diversos rearranjos entre esses átomos conferem às proteínas sucesso em suas diversas funções, tais como: reparação do tecido corporal, formação de enzima, hormônios e anticorpos, transporte de triglicérides, colesterol e vitaminas pelo corpo e fornecimento de energia para sustentação do esqueleto (ALBUQUERQUE, 2003).

Elas formam uma cadeia de ácidos nucleicos na forma de proteínas histonas, e na forma de enzimas realizam uma série de reações bioquímicas (KHAN *et al.*, 2010).

Podem ser exógenas, ingeridas pela dieta, ou endógenas, derivadas da degradação das proteínas celulares do próprio organismo (GARIB, 2002).

As proteínas mais consumidas são de origem animal, que contém todos os aminoácidos essenciais, sendo assim consideradas completa, entretanto apresenta um alto custo para a sua produção, pois um boi com 450 kg ganha em média apenas 0,45 kg de proteína em um dia, elevando o custo de produção desta fonte proteica.

Já a proteína de origem vegetal possui um custo menor de produção e tem como vantagem a isenção de gordura saturada, entretanto, não é considerada uma fonte



proteica completa, pois não apresenta todos os aminoácidos essenciais, tendo assim um baixo valor nutricional (ARAÚJO *et al.*, 2009).

As proteínas obtidas em legumes, cereais e frutas, além de não serem completas, nem sempre são absorvidas pelo organismo do homem. Sendo assim, outras formas alternativas de alimentação vem sendo pesquisadas, com o intuito descobrir fontes proteicas completas e com um menor custo, além da preocupação em combater a desnutrição e garantir a segurança alimentar e nutricional da população (MODESTI *et al.*, 2007; KHAN *et al.*, 2010).

Uma das fontes alternativas de alimentos que vem sendo pesquisada por possuir valor proteico elevado é obtida a partir de biomassa microbiana e/ou biomassa celular, uma forma proteica viável, pois requer baixo custo para a sua obtenção. É passível de utilização na alimentação humana e animal, tendo em vista que pode ser produzida com o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, como o permeado de soro de queijo. A biomassa celular apresenta-se como uma fonte de proteína completa e de alto teor nutricional, já que apresenta em sua composição aminoácidos essenciais, fibras e vitaminas (KHAN *et al.*, 2010).

A biomassa celular é produzida por processo fermentativo, geralmente utilizando leveduras ou fungos, e apresenta vantagens em relação às proteínas de origem animal e vegetal, como o seu rendimento. Comparando a mesma massa de levedura e de um boi (450 kg, por exemplo), a levedura produzirá toneladas de proteína. Pode ser obtida por processo contínuo, a capacidade de reprodução das leveduras é rápida, independe de fatores climáticos para a sua produção, além de minimizar o impacto ambiental já que, pode ser produzida utilizando resíduos (ARAÚJO *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2010).

Outra vantagem e provavelmente que mereça maior destaque refere-se ao seu conteúdo proteico, pois em torno de 40-56% da massa seca de uma levedura é composto por proteína, sendo 80% do nitrogênio na forma de aminoácidos, 12% na forma de ácidos nucleicos, 8% como amônia e ainda quantidades menores de lecitina, glutatona, ácido adenílico, vitaminas e coenzimas (PULZATTO, 2000).

Além do seu alto rendimento, a proteína microbiana tem também a vantagem de apresentar um baixo custo de produção e maior controle de produção quando comparada com a proteína de origem animal e vegetal (ANVARI & KHAYATI, 2011).

Outra forma do aproveitamento da proteína microbiana é utilizando o próprio micro-organismo (levedura) como matéria-prima para a obtenção de outros produtos,

como os produtos *pet food*. As leveduras, quando processadas para esta finalidade, apresentam benefícios à saúde do animal, como imunidade, desempenho e melhor aproveitamento da dieta (FREIRE, 2011).

Nesse contexto o estudo da produção de biomassa de leveduras torna-se promissor pelo seu baixo custo de produção, alto valor nutricional presente nesse produto e reutilização de resíduos que podem gerar impacto ambiental quando descartados inadequadamente.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Micro-organismos

As leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* foram obtidas liofilizadas a partir do medicamento comercializado como Floratil, 200 mg, da marca Merck®<sup>TM</sup> e do fermento biológico da marca Fleischmann®<sup>TM</sup>, respectivamente. Estas foram ativadas em meio YEPD (*yeast extract peptone dextrose*), contendo extrato de levedura (5 g L<sup>-1</sup>), peptona de carne (10 g L<sup>-1</sup>) e glicose (20 g L<sup>-1</sup>), conforme CASAL *et al.*, (2004), em incubadora com agitação orbital marca Solab, modelo SL/CFR a 100 rpm, pH 7, e temperatura de 30 °C, por 24 h, sendo posteriormente armazenadas no mesmo meio com adição de ágar (20 g L<sup>-1</sup>) em geladeira a 4 °C.

A levedura *Kluyveromyces marxianus*, CCT 4086 Referência ATCC 46537, foi adquirida pela indústria SOORO Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda. A levedura encontrava-se na sua forma liofilizada, sendo ativada em meio YMA (*yeast-malt extract agar*) adaptado, contendo extrato de levedura (3 g L<sup>-1</sup>), peptona (5 g L<sup>-1</sup>) e dextrose (10 g L<sup>-1</sup>), de acordo com as instruções do fabricante, em incubadora com agitação orbital, marca Solab, modelo SL/CFR orbital a 100 rpm, pH 7, e temperatura de 30 °C, por 24 h e armazenada no mesmo meio com adição de ágar (20 g L<sup>-1</sup>) em geladeira a 4 °C.

#### 3.2 Substrato

O substrato utilizado neste estudo foi o permeado do soro de queijo cedido pela empresa SOORO Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda., localizada na cidade de Marechal Candido Rondon, região Oeste do Paraná.

Utilizou-se o permeado em pó, obtido após o processo de secagem/desidratação com um teor aproximado de 90% de lactose, 0,48% de fósforo, 0,04% de potássio, 0,09% de magnésio, 0,429% de sódio e 0,49% de cálcio, devido a maior facilidade de armazenamento, conservação e manuseio em laboratório.

A sua caracterização foi realizada na Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, no laboratório do Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia - GERPEL.

### 3.3 Hidrólise enzimática

Pelo fato da lactose no permeado ser um dissacarídeo redutor não metabolizado pelas leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, optou-se neste caso pelo estudo da hidrólise com enzima comercial.

A hidrólise foi realizada utilizando 150 g L<sup>-1</sup> do permeado em pó, equivalente a 135 g L<sup>-1</sup> de lactose. Utilizou-se a concentração de 150 g L<sup>-1</sup> devido o permeado em sua forma líquida (*in natura*) conter aproximadamente essa quantidade de lactose em sua composição.

A enzima utilizada foi a  $\beta$ -galactosidase, obtida da espécie *Kluyveromyces lactis*, da marca LactozymPure®<sup>TM</sup> 6500L da empresa Novozymes®, cedida pela empresa SOORO.

A hidrólise consistiu em adicionar a enzima ao permeado, mantendo-o na temperatura selecionada por um determinado período de tempo (condições descritas posteriormente) em incubadora de agitação orbital, a 100 rpm. Após esse período o permeado foi aquecido a 100 °C em banho-maria, marca Nova Técnica por 5 min para desativar a enzima e resfriado a temperatura ambiente para posterior uso.

No início da hidrólise fez-se análise da quantidade de açúcares redutores presentes no meio pelo método ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme MILLER (1959), descrito no anexo A.

Durante o período de hidrólise foram realizadas análises de glicose, por kit de glicose enzimático-colorimétrico, da marca Gold Analisa, conforme anexo A, para avaliar o tempo necessário para que toda a lactose fosse convertida em glicose e galactose. Segundo PELCZAR JR *et al.* (1996), a quebra de 1 mol de lactose libera 1 mol de glicose e 1 mol de galactose, por isso a análise de glicose é suficiente para o acompanhamento da hidrólise.

Os testes preliminares foram realizados utilizando 140, 150 e 200 g L<sup>-1</sup> de permeado, com a concentração de enzima fixada em 0,1%. Em seguida, fixou-se a concentração de permeado em 150 g L<sup>-1</sup> e variou-se a concentração de enzima em 0,006%, 0,0125%, 0,025% e 0,05%, utilizando a enzima LactozymPure®<sup>TM</sup> 6500L, em condições fixas de pH, temperatura e tempo (6,5, 30 °C, 180 min). As condições de pH e temperatura foram baseadas em estudos realizados por CARMINATTI, (2001), além do pH do permeado *in natura* ser de aproximadamente 6.

Após realizados os testes preliminares, definiu-se a matriz do planejamento experimental visando obter a melhor condição para a hidrólise do permeado de soro de queijo, no tempo de 180 min.

### 3.4 Otimização das condições de hidrólise enzimática

Para otimizar o processo da hidrólise enzimática, dois planejamentos experimentais foram realizados.

Inicialmente foi feito um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com quatro pontos centrais, com um total de doze ensaios, avaliando pH, temperatura e concentração de enzima, para verificar as variáveis significativas para o processo, cuja matriz é dada na Tabela 4.

Tabela 4- Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, com 4 pontos centrais, para a hidrólise enzimática.

| Ensaio | Temperatura (°C) | pH | [enzima] (%) |
|--------|------------------|----|--------------|
| 1      | -1               | -1 | -1           |
| 2      | 1                | -1 | -1           |
| 3      | -1               | 1  | -1           |
| 4      | 1                | 1  | -1           |
| 5      | -1               | -1 | 1            |
| 6      | 1                | -1 | 1            |
| 7      | -1               | 1  | 1            |
| 8      | 1                | 1  | 1            |
| 9      | 0                | 0  | 0            |
| 10     | 0                | 0  | 0            |
| 11     | 0                | 0  | 0            |
| 12     | 0                | 0  | 0            |

Em seguida, com base nos resultados do planejamento 2<sup>3</sup>, foram realizados novos ensaios para os pontos axiais e essa mesma matriz foi utilizada para o planejamento DCCR, a qual está representada na Tabela 5.

Tabela 5- Matriz do planejamento DCCR, com 4 pontos centrais, para a hidrólise enzimática.

| Ensaio | T (°C) | pH    |
|--------|--------|-------|
| 1      | -1     | -1    |
| 2      | 1      | -1    |
| 3      | -1     | 1     |
| 4      | 1      | 1     |
| 5      | 0      | 0     |
| 6      | 0      | 0     |
| 7      | 0      | 0     |
| 8      | 0      | 0     |
| 9      | -1,41  | 0     |
| 10     | 1,41   | 0     |
| 11     | 0      | -1,41 |
| 12     | 0      | 1,41  |

Utilizando o planejamento experimental como ferramenta é possível verificar e quantificar os efeitos sinérgicos ou antagônicos entre os fatores de interesse, reduzindo o número de experimentos e melhorando a qualidade das informações obtidas com os resultados.

O programa STATISTICA<sup>TM</sup> (versão 7.0, da StatSoft, Inc.), possibilita calcular os efeitos principais das variáveis juntamente com suas interações, a superfície de resposta, além dos dados relativos à Análise de Variância (ANOVA) e o teste F, para a validação do modelo ao nível de 5% de significância (BARROS *et al.*, 2010).

### 3.5 Fermentações

#### 3.5.1 Etapas da fermentação

#### **3.5.1.1 Pré-inoculo**

O pré-inoculo foi preparado em erlenmeyer de 500 mL contendo o mesmo meio utilizado para a ativação das cepas (YMA e YEPD), previamente esterilizado em autoclave marca Phoenix, modelo AV75 a 121 °C por 15 min.

Uma alçada de cada uma das cepas *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* foi transferida para o meio pré-inoculo, que foi mantido a 30 °C e pH 7, por 24 h em incubadora com agitação orbital a 100 rpm.

#### **3.5.1.2 Inoculo**

O inoculo ou pé de cuba foi preparado contendo o mesmo meio utilizado na fermentação, este procedimento foi adotado visando eliminar a fase de adaptação do micro-organismo ao meio de cultivo a ser fermentado. Preparou-se um volume de 270 mL de meio “inoculo”, sendo este pasteurizado a 65 °C por 30 min. Posteriormente adicionou-se 30 mL do meio pré-inoculo (10% do volume total). O inoculo foi mantido por 12 h em incubadora com agitação orbital, a 100 rpm e nas mesmas condições de temperatura e pH utilizadas na fermentação.

### **3.5.2 Meios de cultivo**

#### **3.5.2.1 Meio padrão**

Nas primeiras fermentações utilizaram-se meios formulados para fins de comparação aos meios contendo permeado. Os meios utilizados como padrão foram adaptados dos estudos de BELLAYER *et al.* (2003) para a *K. marxianus*, MULLER, (2007) para *S. boulardii* e SANTOS *et al.* (2010) para *S. cerevisiae* e, encontram-se descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição do meio padrão para cada levedura.

| Reagente                                                                   | Levedura            |                     |                      |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
|                                                                            | <i>K. marxianus</i> | <i>S. boulardii</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| Glicose P.A. (g L <sup>-1</sup> )                                          | 150,0               | 150,0               | 150,0                |
| Peptona de carne P. A. (g L <sup>-1</sup> )                                | -                   | 2,0                 | 1,0                  |
| Extrato de levedura P. A. (g L <sup>-1</sup> )                             | -                   | 2,0                 | 2,0                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> P. A. (g L <sup>-1</sup> )                 | 3,0                 | 0,6                 | 0,5                  |
| Ureia P.A. (g L <sup>-1</sup> )                                            | -                   | 0,36                | -                    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> P. A. (g L <sup>-1</sup> ) | 5,0                 | 0,12                | 0,25                 |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O P. A. (g L <sup>-1</sup> )            | 0,5                 | 2,4                 | 0,24                 |
| EDTA P. A. (mg L <sup>-1</sup> )                                           | 15,0                | -                   | -                    |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O P. A. (mg L <sup>-1</sup> )           | 4,5                 | -                   | -                    |
| MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O P. A. (mg L <sup>-1</sup> )           | 0,84                | -                   | -                    |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O P. A. (mg L <sup>-1</sup> )           | 0,3                 | -                   | -                    |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O P. A. (mg L <sup>-1</sup> )           | 0,3                 | -                   | -                    |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O P. A. (mg L <sup>-1</sup> )           | 4,5                 | -                   | -                    |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O P. A. (mg L <sup>-1</sup> )           | 3,0                 | -                   | -                    |
| Água                                                                       | qsp.*               | qsp.                | qsp.                 |

\*qsp: quantidade suficiente para.

### 3.5.2.2 Meios contendo permeado de soro de queijo

Utilizou-se um meio contendo apenas permeado de soro de queijo, e outro meio contendo permeado de soro de queijo suplementado com sais de acordo com SOUZA *et al.*, (2011) para *S. boulardii* e *S. cerevisiae* e, SABRA *et al.*, (2003) para *K. marxianus* apresentados na Tabela 7.



Tabela 7 - Composição do permeado suplementado com sais para cada levedura.

| Reagente (g L <sup>-1</sup> ) \ Levedura            | <i>K. marxianus</i> | <i>S. boulardii</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
|-----------------------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Permeado de soro de queijo                          | 150,0               | 150,0               | 150,0                |
| Extrato de levedura                                 | 5,0                 | -                   | -                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | -                   | 3,0                 | 3,0                  |
| Ureia P.A.                                          | 4,0                 | -                   | -                    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | 0,5                 | 3,0                 | 3,0                  |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 0,5                 | 1,2                 | 1,2                  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 1,0                 | -                   | -                    |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 0,1                 | -                   | -                    |
| Água                                                | *qsp.               | qsp.                | qsp.                 |

\*qsp: quantidade suficiente para.

### 3.5.3 Avaliação das condições de fermentação

A partir dos resultados obtidos nestas fermentações iniciais foi realizado um planejamento experimental Plackett-Burman (1946), que em as variáveis são temperatura, concentração de permeado, pH, concentração de sulfato de amônio, concentração de sulfato de magnésio heptahidratado e concentração de fosfato monobásico de potássio, tendo em vista que os nutrientes nitrogênio, magnésio e fósforo são relevantes para o metabolismo das leveduras em estudo (GOULART *et al.*, 2003; GUERRA & NODARI, 2006; MONACO, 2007). A matriz está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Matriz do planejamento Plackett-Burman, para cada levedura.

| Ensaio | T (°C) | [permeado]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | pH | [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | [MgSO <sub>4</sub> ]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]<br>(g L <sup>-1</sup> ) |
|--------|--------|------------------------------------|----|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1      | 1      | -1                                 | 1  | -1                                                                         | -1                                           | -1                                                         |
| 2      | 1      | 1                                  | -1 | 1                                                                          | -1                                           | -1                                                         |
| 3      | -1     | 1                                  | 1  | -1                                                                         | 1                                            | -1                                                         |
| 4      | 1      | -1                                 | 1  | 1                                                                          | -1                                           | 1                                                          |
| 5      | 1      | 1                                  | -1 | 1                                                                          | 1                                            | -1                                                         |
| 6      | 1      | 1                                  | 1  | -1                                                                         | 1                                            | 1                                                          |
| 7      | -1     | 1                                  | 1  | 1                                                                          | -1                                           | 1                                                          |
| 8      | -1     | -1                                 | 1  | 1                                                                          | 1                                            | -1                                                         |
| 9      | -1     | -1                                 | -1 | 1                                                                          | 1                                            | 1                                                          |
| 10     | 1      | -1                                 | -1 | -1                                                                         | 1                                            | 1                                                          |
| 11     | -1     | 1                                  | -1 | -1                                                                         | -1                                           | 1                                                          |
| 12     | -1     | -1                                 | -1 | -1                                                                         | -1                                           | -1                                                         |
| 13     | 0      | 0                                  | 0  | 0                                                                          | 0                                            | 0                                                          |
| 14     | 0      | 0                                  | 0  | 0                                                                          | 0                                            | 0                                                          |
| 15     | 0      | 0                                  | 0  | 0                                                                          | 0                                            | 0                                                          |
| 16     | 0      | 0                                  | 0  | 0                                                                          | 0                                            | 0                                                          |

### 3.5.4 Condições da fermentação

Para a fermentação, preparou-se um volume de 1820 mL de meio fermentativo. Desse volume, retirou-se 20 mL (considerado branco) e adicionou-se 200 mL do meio inoculo (10% do volume total do meio fermentativo). O inoculo foi diluído sempre que necessário de forma a manter-se o início das fermentações sempre com o mesmo valor inicial de células, permitindo desta forma a comparação dos resultados. Neste estudo, esse valor inicial foi fixado em 5,1g L<sup>-1</sup> para a levedura *S. cerevisiae*, 6,2 g L<sup>-1</sup> para a *S. boulardii* e 4,6 g L<sup>-1</sup> para a *K. marxianus*. Estes valores não tiveram base em outros estudos, pois o intuito não foi verificar a influência da concentração inicial de levedura, e sim a padronização dos ensaios.

As fermentações foram conduzidas anaerobiamente em frascos de 3 L de volume útil, em sistema descontínuo, em incubadora com agitação orbital, a 100 rpm, por um período de 30 h.

O biorreator é composto por um frasco com duas saídas na parte superior, uma para aliviar a pressão e na outra foi acoplada uma seringa para retirada das amostras, conforme Figura 1.



Figura 1 - Biorreator do tipo descontínuo mostrando duas saídas (para retirada de amostra e eliminação de CO<sub>2</sub>).

Amostragens de 20 mL do meio fermentativo foram realizadas ao longo das 30 h para a realização das análises de absorvância, açúcar redutor total, massa seca e pH.

### **3.5.5 Métodos Analíticos**

Neste item são descritas as metodologias utilizadas para avaliar a hidrólise enzimática e o processo fermentativo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.5.5.1 Análise de açúcar redutor (glicose)**

Os açúcares redutores (glicose) foram analisados com o kit de glicose enzimático-colorimétrico (Trinder) da marca Gold Analisa, conforme anexo A.

#### **3.5.5.2 Análise de açúcar redutor total**

As análises de açúcar redutores totais foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por MILLER (1959), conforme anexo A.

### 3.5.5.3 Conversão da hidrólise da lactose

### 3.5.5.3.1 Estequiometria de hidrólise

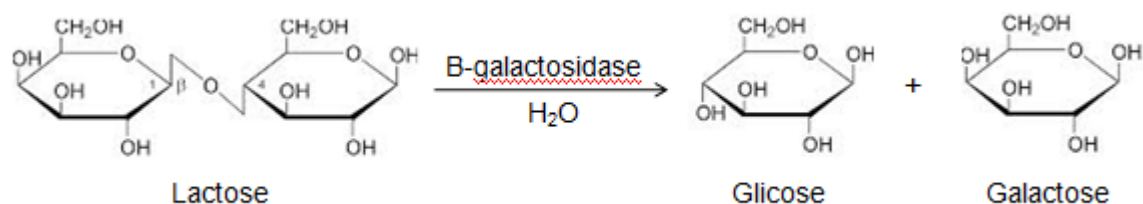


Figura 2 - Hidrólise da lactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase para produção de galactose e glicose. (Fonte: Domingues, 2001).

#### 3.5.5.3.2 Cálculo para a conversão da hidrólise

A conversão da lactose em glicose e galactose foi obtida de acordo com a Equação 1:

$$Convers\tilde{a}o\ (\%) = \left( \frac{([lactose\ inicial] - [lactose\ n\tilde{a}o\ hidrolisada])}{[lactose\ inicial]} \right) \times 100 \quad (1)$$

#### 3.5.5.4 Quantificação do crescimento microbiano

#### 3.5.5.4.1 Método indireto – Leitura da absorbância

A absorbância das amostras foi obtida por leitura direta em espectrofotômetro UV-Vis da marca Shimadzu, modelo UV-1800, para posterior obtenção da concentração celular via correlação.

Os comprimentos de onda testados para as leituras de absorbância foram baseados nos estudos de COSTA *et al.* (2012) e LUDWIG *et al.* (2001), que trabalharam com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em 600nm e 650nm, respectivamente. A maior leitura obtida para todas as leveduras utilizadas foi em 600 nm.

Para manter uma precisão adequada (região linear), a faixa de absorbância utilizada foi entre 0,0 e 0,8. A partir deste valor, foram feitas diluições para manter a linearidade. O valor de absorbância obtido foi expresso na forma logarítmica  $\ln(N/N_0)$ , em que  $N_0$  é a concentração celular no tempo zero e  $N$  é a concentração celular no tempo  $t$ .

#### 3.5.5.4.2 Correlação entre biomassa direta e biomassa indireta

Para quantificar a biomassa foi realizada uma correlação entre absorbância e massa seca, de acordo com Muller (2006).

Células de *S. cerevisiae*, *S. boulardii* e *K. marxianus* foram ativadas nos meios YEPD e YMA, conforme item 3.1 da seção 3. Em seguida foram transferidos 30 mL de cada pré-inóculo para o meio inóculo com mesma concentração do meio de fermentação.

As fermentações foram conduzidas a 30 °C, em incubadora com agitação orbital, por 24 h e amostragens de 10 mL foram realizadas periodicamente. A composição do meio está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição dos meios para correlação entre absorbância e massa seca.

| Variáveis                                                               | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. boulardii</i> | <i>K. marxianus</i> |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| T (°C)                                                                  | 30,0                 | 30,0                | 30,0                |
| pH                                                                      | 4,0                  | 5,5                 | 6,5                 |
| [permeado] (g L <sup>-1</sup> )                                         | 150,0                | 150,0               | 150,0               |
| [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> ) | 1,0                  | 9,0                 | 2,0                 |
| [MgSO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> )                               | 0,5                  | 1,2                 | 2,5                 |
| [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> )                 | 4,0                  | 9,0                 | 1,0                 |

Para obtenção da curva de calibração, ao final da fermentação, 20 mL de meio foram filtrados em filtro de membrana de estéres, previamente secos a 90 °C, em estufa marca Quimis, por 24 h, resfriados em dessecador e pesados (massa 1), em balança, marca Bioprecisa, modelo FA-2104N. Este procedimento foi realizado em sextuplicata.

Após a filtragem, os filtros de membrana foram secos novamente a 90°C, por 24 horas, resfriados em dessecador e pesados novamente (massa 2).

O valor da massa seca foi obtido de acordo com a Equação 2.

$$Massa\ seca\ \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{(massa\ 2 - massa\ 1)}{0,02} \quad (2)$$

A análise de absorbância foi realizada com 20 mL de meio fermentativo, sendo este diluído de acordo com a tabela 10.

Tabela 10 - Diluição do meio fermentativo para análise de absorbância.

| Amostra | Volume de amostra (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                  |

Por regressão linear, utilizando a média da massa seca obtida na Equação 2 e a absorbância obtida em cada diluição referente a Tabela 10, foi obtida a correlação entre a absorbância e a massa seca.

### 3.5.6 Adição de oxigênio no processo fermentativo

Com o intuito de analisar um aumento na produção de biomassa celular, três fermentações foram realizadas utilizando as melhores condições obtidas nos resultados do planejamento experimental Plackett-Burman (1946) com adição de oxigênio na vazão de 1 vvm.

A Tabela 11 apresenta as condições para as fermentações com adição de oxigênio utilizadas em cada levedura em estudo.

O tempo total de fermentação foi de 30 h em todos os ensaios.

Tabela 11 - Condições dos meios utilizados para avaliar o aumento de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) com adição de oxigênio.

| Variáveis                                            | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. boulardii</i> | <i>K. marxianus</i> |
|------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| T ( $^{\circ}\text{C}$ )                             | 30,0                 | 30,0                | 30,0                |
| [permeado] ( $\text{g L}^{-1}$ )                     | 150,0                | 150,0               | 150,0               |
| pH                                                   | 4,0                  | 5,5                 | 6,5                 |
| $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ ( $\text{g L}^{-1}$ ) | 1,0                  | 9,0                 | 2,0                 |
| $[\text{MgSO}_4]$ ( $\text{g L}^{-1}$ )              | 0,5                  | 1,2                 | 2,5                 |
| $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ ( $\text{g L}^{-1}$ )     | 4,0                  | 9,0                 | 1,0                 |

### 3.5.7 Análise de etanol nas melhores condições de crescimento das leveduras, *S. cerevisiae*, *S. boulardii* e *K. marxianus*

Ao final dos ensaios realizados conforme o item 3.5.5.4.3 (Tabela 9), foram retirados 200 mL de cada meio fermentado, este volume foi acondicionado em frasco âmbar e mantido em temperatura de 4  $^{\circ}\text{C}$  até a análise.

As análises de etanol foram realizadas pelo laboratório de uma cervejaria da região de Toledo - PR, em equipamento Beer Alcolyzer Plus, marca Anton Paar, modelo DMA 4500.

A metodologia consistiu em filtrar a amostra em papel filtro para retenção das partículas sólidas. A amostra filtrada foi transferida para cubetas específicas e acoplada ao equipamento, sendo então realizada a leitura pelo equipamento.

### **3.5.8 Análise da redução de DBO e DQO após o processo fermentativo**

Para avaliar a redução da carga orgânica no permeado de soro de queijo, análises de DBO e DQO foram realizadas, antes de iniciar a fermentação e após decorridas 30 h.

Os ensaios utilizados para estas análises foram os mesmos do item 3.5.5.4.3 em que inicialmente foram retirados 500 mL de amostra de cada meio a ser fermentado (Tabela 9), e ao final do processo fermentativo (30 h) novamente foram coletados 500 mL de cada meio. As amostras foram acondicionadas em frascos de polietileno e mantidas sob refrigeração até o momento da análise.

As análise de DBO e DQO iniciais e finais foram realizadas pelo Grupo de Pesquisa em Recursos Pesqueiros e Limnologia (GERPEL) - UNIOESTE - Toledo/PR.

A porcentagem da redução foi calculada pela Equação 3:

$$Redução (\%) = \left( \frac{Res\ i - Res\ f}{Res\ i} \right) \times 100 \quad (3)$$

Em que:

Res f = Resultado final de DBO ou DQO (mg L<sup>-1</sup>)

Res i = Resultado inicial de DBO ou DQO (mg L<sup>-1</sup>)



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Substrato

A caracterização do permeado de soro de queijo foi realizada com a finalidade de conhecer os seus constituintes e as respectivas concentrações. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Características físico-químicas do permeado de soro de queijo.

| Parâmetros     | Caracterização             |
|----------------|----------------------------|
| DQO            | 168100 mg L <sup>-1</sup>  |
| DBO            | 85314 mg L <sup>-1</sup>   |
| Fósforo total  | 1246,9 mg L <sup>-1</sup>  |
| Cálcio         | 2024,04 mg L <sup>-1</sup> |
| pH             | 6,6                        |
| Acidez         | 26 ° D                     |
| Sólidos totais | 15%                        |
| Cinzas         | 0,82%                      |
| Lactose        | 15%                        |
| Glicose        | -                          |
| Proteína       | <0,18%                     |

Verifica-se com esta caracterização que o permeado de soro de queijo apresenta-se como um resíduo altamente poluidor.

O teor de lactose presente no permeado (15%) torna favorável a sua utilização em processo biotecnológico, pois nesse processo é necessário que haja fonte de carbono disponível para o crescimento do micro-organismo.

Outro fator relevante em relação a composição de nutrientes presentes no permeado é a presença de cálcio, pois segundo ADAMS & NOUT, (2001) o cálcio mineral aumenta a tolerância da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ao etanol.

## 4.2 Hidrólise enzimática

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para os primeiros ensaios realizados de hidrólise enzimática e a conversão de lactose obtida. Os parâmetros: temperatura, pH e concentração de enzima foram fixados em 30 °C, 6,5 e 0,1%, respectivamente; as concentrações de permeado testadas foram 140, 150 e 200 g L<sup>-1</sup>. O tempo de hidrólise foi fixado em 180 min, pois, para todas as concentrações testadas, esse foi o tempo que apresentou a maior conversão.

Tabela 13 - Concentração de lactose hidrolisada e suas respectivas conversões durante hidrólise a T 30 °C, pH 6,5 e 0,1% de enzima.

| Hidrólise da lactose                          | Ensaio |       |       |
|-----------------------------------------------|--------|-------|-------|
|                                               | 1      | 2     | 3     |
| Concentração de permeado (g L <sup>-1</sup> ) | 140,0  | 150,0 | 200,0 |
| Concentração de lactose (g L <sup>-1</sup> )  | 126,0  | 135,0 | 180,0 |
| Lactose hidrolisada (g L <sup>-1</sup> )      | 106,5  | 125,6 | 146,4 |
| Conversão (%)                                 | 84,5   | 93,0  | 81,3  |

Observa-se na Tabela 13, que o melhor resultado obtido para as concentrações de permeado e condições testadas foi no ensaio 2, em que tem-se ao final de 180 min de reação 93% de conversão de lactose em seus monômeros glicose+galactose (lactose hidrolisada).

Em uma segunda etapa, foi verificada a influência da concentração de enzima na hidrólise da lactose. Nestes ensaios fixou-se a concentração de permeado de acordo com a melhor resposta obtida no ensaio 2 (ver Tab. 13) (150 g L<sup>-1</sup>), mantendo-se as mesmas condições de pH, temperatura e tempo de hidrólise (6,5, 30 °C e 180 min, respectivamente). As concentrações de enzima testadas foram 0,006%, 0,0125%, 0,025% e 0,05%.

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos nesta etapa, em que se tem como resposta a quantidade de lactose hidrolisada e a % de conversão obtida para cada ensaio.

Tabela 14 - Concentração de lactose hidrolisada e suas respectivas conversões durante a hidrólise a T 30 °C, pH 6,5 a partir de 150 g L<sup>-1</sup> de permeado.

| Hidrólise da lactose                          | Ensaio |        |       |       |
|-----------------------------------------------|--------|--------|-------|-------|
|                                               | 1      | 2      | 3     | 4     |
| Concentração de permeado (g L <sup>-1</sup> ) | 150,0  | 150,0  | 150,0 | 150,0 |
| Concentração de lactose (g L <sup>-1</sup> )  | 135,0  | 135,0  | 135,0 | 135,0 |
| Concentração de enzima (%)                    | 0,006  | 0,0125 | 0,025 | 0,05  |
| Lactose hidrolisada (g L <sup>-1</sup> )      | 40,5   | 43,7   | 68,1  | 101,5 |
| Conversão (%)                                 | 30,0   | 32,4   | 50,5  | 75,2  |

De acordo com os resultados obtidos nos dois testes preliminares, observa-se que o melhor resultado obtido foi o ensaio 2 do primeiro teste preliminar (Tabela 13) e a concentração de enzima foi relevante para o processo, pois apenas neste ensaio houve a conversão quase completa da lactose.

Com base nesses resultados, a concentração de enzima foi selecionada como uma das variáveis para a construção da matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com uma quadruplicata no ponto central, devido a sua influência nos resultados. Outra condição assumida foi a concentração de permeado, a qual foi fixada em 150 g L<sup>-1</sup>.

A Tabela 15 apresenta os valores reais da matriz, os resultados de lactose hidrolisada e as conversões obtidos com a aplicação deste planejamento.

Tabela 15 - Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, para a hidrólise enzimática, de 150 g L<sup>-1</sup> de permeado.

| Ensaio | Temperatura (°C) | pH  | [enzima] (%) | Lactose hidrolisada (g L <sup>-1</sup> ) | Conversão da lactose (%) |
|--------|------------------|-----|--------------|------------------------------------------|--------------------------|
| 1      | 30               | 4,5 | 0,1          | 14,76                                    | 10,93                    |
| 2      | 40               | 4,5 | 0,1          | 1,70                                     | 1,26                     |
| 3      | 30               | 8,5 | 0,1          | 54,56                                    | 40,42                    |
| 4      | 40               | 8,5 | 0,1          | 59,00                                    | 43,70                    |
| 5      | 30               | 4,5 | 0,15         | 3,86                                     | 2,86                     |
| 6      | 40               | 4,5 | 0,15         | 1,70                                     | 1,26                     |
| 7      | 30               | 8,5 | 0,15         | 48,26                                    | 35,75                    |
| 8      | 40               | 8,5 | 0,15         | 73,50                                    | 54,44                    |
| 9      | 35               | 6,5 | 0,125        | 102,22                                   | 75,72                    |
| 10     | 35               | 6,5 | 0,125        | 95,72                                    | 70,90                    |
| 11     | 35               | 6,5 | 0,125        | 99,66                                    | 73,82                    |
| 12     | 35               | 6,5 | 0,125        | 100,94                                   | 74,77                    |

De acordo com a Tabela 15, tem-se que ao utilizar o pH 4,5 obtêm-se os menores resultados de lactose hidrolisada, em qualquer faixa de temperatura e concentração de enzima utilizadas. O pH 8,5 apresentou o valor máximo de lactose hidrolisada em torno de 70 g L<sup>-1</sup>. Segundo GEKAS & LÓPEZ-LEIVA (1985), a enzima proveniente da levedura *Kluyveromyces lactis*, tem como condição ótima pH entre 6,9 - 7,3 e temperatura de 35 °C. Esta condição foi comprovada nesse estudo, onde nos ensaios referente ao ponto central (T 35 °C, pH 6,5 e [enzima] 0,125%) obteve-se as maiores concentrações de lactose hidrolisada, os quais resultaram em um valor médio de aproximadamente 74% de conversão de lactose. Os resultados demonstram repetitividade no processo, tendo em vista que os quatro resultados foram próximos (em torno de 100 g L<sup>-1</sup>).

A Tabela 16 apresenta a influência das variáveis, das suas interações, o p-valor, o coeficiente das variáveis e o erro padrão para o planejamento, além do coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) com um nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Os valores em negrito indicam que a variável é significativa para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

Tabela 16 - Tabela dos coeficientes de regressão - resposta à hidrólise enzimática para o planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, ao nível de 95% de confiança.

| Variável            | p-valor  | Coef.    | Erro     |
|---------------------|----------|----------|----------|
| Média/Intercepto    | 0,000007 | 54,65667 | 0,811602 |
| T(°C)               | 0,166586 | 1,80750  | 0,994005 |
| pH                  | 0,000114 | 26,66250 | 0,994005 |
| [enzima](%)         | 0,756587 | -0,33750 | 0,994005 |
| T(°C) x pH          | 0,010995 | 5,61250  | 0,994005 |
| T(°C) x [enzima](%) | 0,028259 | 3,96250  | 0,994005 |
| pH x [enzima](%)    | 0,095711 | 2,38750  | 0,994005 |

$$R^2 = 33,52\%$$

De acordo com a Tabela 16, dentro das faixas propostas, apenas o pH, a interação entre temperatura e pH e a interação entre temperatura e concentração de enzima foram significativos para esse processo. Entretanto, o coeficiente de determinação apresentou um valor muito baixo (R<sup>2</sup> = 33,52%), indicando que somente esses resultados não são suficientes para obter a condição ideal para a hidrólise enzimática por um modelo matemático.

Nos resultados do planejamento (Tabela 15), a concentração de enzima dentro da faixa testada não foi significativa, sendo os melhores resultados obtidos com a concentração de 0,125% de enzima. Nos estudos de CARMINATTI (2001), a maior conversão de lactose em glicose e galactose obtida foi utilizando a mesma concentração de enzima (0,125%). Devido a esse fato, realizou-se um novo planejamento experimental fixando a concentração de enzima em 0,125%.

O novo planejamento realizado foi um delineamento composto completo rotacional (DCCR) com as variáveis temperatura e pH.

A Tabela 17 apresenta os valores reais utilizados no planejamento DCCR com duas variáveis, os resultados de lactose hidrolisada ( $\text{g L}^{-1}$ ) e as conversões de lactose obtidas para todos os ensaios. Os resultados referentes aos ensaios 1 a 8 por serem iguais aos já executados no planejamento experimental fatorial  $2^3$ , optou-se para fins de otimização no tempo de análise e resposta deste planejamento DCCR a utilização dos resultados já obtidos no planejamento  $2^3$ .

Tabela 17- Matriz do planejamento DCCR, para a hidrólise enzimática de  $150 \text{ g L}^{-1}$  de permeado e 0,125% de enzima.

| Ensaio | T (°C) | pH  | Lactose hidrolisada ( $\text{g L}^{-1}$ ) | Conversão da lactose (%) |
|--------|--------|-----|-------------------------------------------|--------------------------|
| 1      | 30     | 4,5 | 14,76                                     | 10,93                    |
| 2      | 40     | 4,5 | 1,70                                      | 1,26                     |
| 3      | 30     | 8,5 | 54,56                                     | 40,42                    |
| 4      | 40     | 8,5 | 59,00                                     | 43,70                    |
| 5      | 35     | 6,5 | 102,22                                    | 75,72                    |
| 6      | 35     | 6,5 | 95,72                                     | 70,90                    |
| 7      | 35     | 6,5 | 99,66                                     | 73,82                    |
| 8      | 35     | 6,5 | 100,94                                    | 74,77                    |
| 9      | 28     | 6,5 | 1,38                                      | 1,02                     |
| 10     | 42     | 6,5 | 29,90                                     | 22,15                    |
| 11     | 35     | 3,7 | 69,40                                     | 51,41                    |
| 12     | 35     | 9,3 | 91,64                                     | 67,88                    |

De acordo com a Tabela 17, os maiores resultados obtidos permaneceram na condição estipulada no ponto central (pH 6,5 e T 35 °C), valores próximos aos obtidos

por CARMINATTI (2001), o qual obteve os seus melhores resultados utilizando pH 6, temperatura 30-40 °C, e concentração de enzima de 0,125%, com uma conversão de aproximadamente 100%.

Como industrialmente o pH do permeado de soro de queijo encontra-se próximo a 6, essas condições indicam uma viabilidade técnica para a realização deste esse processo de hidrólise.

A Tabela 18 mostra a significância das variáveis e suas interações para o planejamento DCCR, além do coeficiente das variáveis, erro padrão, p-valor e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Tabela 18 - Tabela dos coeficientes de regressão - resposta à hidrólise enzimática para o planejamento DCCR, ao nível de 95% de confiança.

| Variável                | p-valor         | Coef.           | Erro            |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Média/Intercepto</b> | <b>0,000009</b> | <b>99,7802</b>  | <b>7,263709</b> |
| T (L)                   | 0,472889        | 3,9530          | 5,162620        |
| <b>T (Q)</b>            | <b>0,000203</b> | <b>-46,6320</b> | <b>5,824282</b> |
| <b>pH (L)</b>           | <b>0,020163</b> | <b>16,1914</b>  | <b>5,162620</b> |
| pH (Q)                  | 0,059204        | -13,5299        | 5,824282        |
| T x pH                  | 0,569054        | 4,3750          | 7,264450        |

$R^2 = 92,64\%$

De acordo com a Tabela 18, a temperatura quadrática e o pH linear são significativos para esse processo ( $p < 0,05$ ). O efeito da temperatura negativo indica que quanto menor a temperatura, maior será o valor de lactose hidrolisada. O efeito do pH é positivo, ou seja, quanto maior o pH, maior será o resultado de hidrólise.

A Figura 3 apresenta o Gráfico de Pareto, que dispõe visualmente as variáveis significativas.

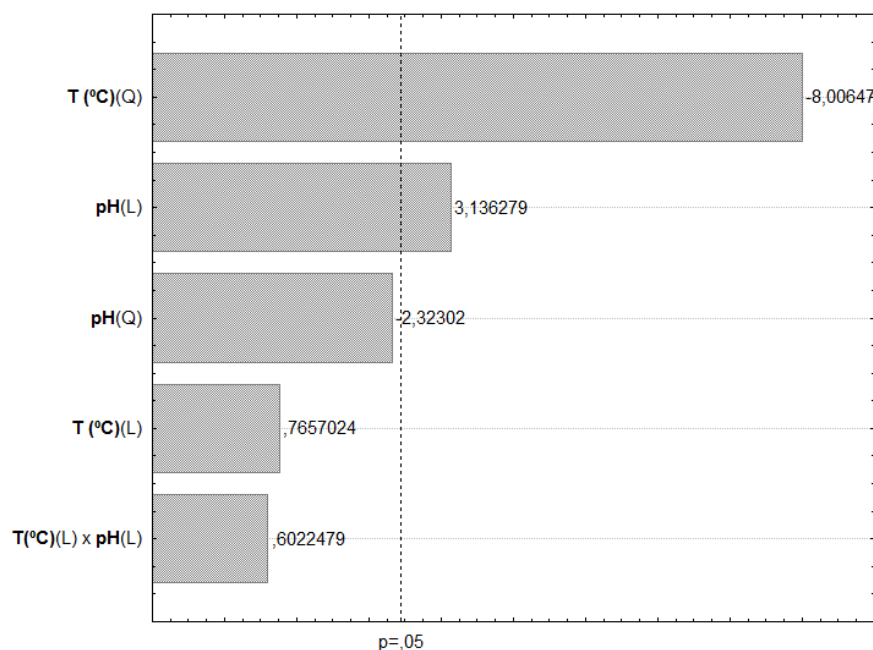


Figura 3 - Gráfico de Pareto obtido no planejamento DCCR da hidrólise enzimática.

A equação do modelo ajustado aos dados do planejamento foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) e sua validação ou grau de ajuste foi determinado pelo teste F, que consiste em relacionar o valor de F calculado ( $F(\text{calc})$ ) com o valor de F tabelado ( $F(\text{tab})$ ) (ANEXO B, Tabela B1). Se o valor de  $F(\text{calc})$  pela ANOVA for maior que o  $F(\text{tab})$ , a regressão obtida ajusta-se aos pontos experimentais de forma satisfatória, validando o modelo no intervalo de confiança de 95%. A Tabela 19 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo.

Tabela 19- Análise de variância, para o planejamento DCCR, para a hidrólise enzimática.

| Fonte de Variação | Soma Quadrática (SQ) | Graus de Liberdade (GL) | Média Quadrática (MQ) | F(calc) |
|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|---------|
| Modelo            | 16947,32             | 5                       | 3389,46               | 16,06   |
| Erro              | 1266,53              | 6                       | 211,09                |         |
| Total SQ          | 17215,29             | 11                      |                       |         |

$$R^2 = 92,64\%$$

A Tabela 19 apresenta o valor de  $F(\text{calc}) = 16,06$  maior que o valor de  $F(\text{tab}) (5; 6; 0,05) = 4,39$  (BARROS *et al.*, 2010). Portanto pode-se afirmar que o modelo proposto é válido descrevendo o comportamento da hidrólise enzimática dentro das

faixas propostas, para as variáveis temperatura e pH, ao nível de 95%, e os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais, com a razão  $F_{cal} > F_{tab} = 3,67$ .

Assim apresenta-se o modelo matemático que representa a concentração de lactose hidrolisada em função das variáveis pH e temperatura, representado pela Equação 4:

$$\text{Lactose hidrolisada} \left( \frac{g}{L} \right) = 99,78 + 3,95.T - 46,63.T^2 + 16,19.pH - 13,53.pH^2 + 4,37.T.pH \quad (4)$$

Isso pode ser constatado observando as Figuras 4 (a) e (b), onde tem-se as respostas gráficas obtidas referentes aos valores preditos x resíduos e diagrama de dispersão.

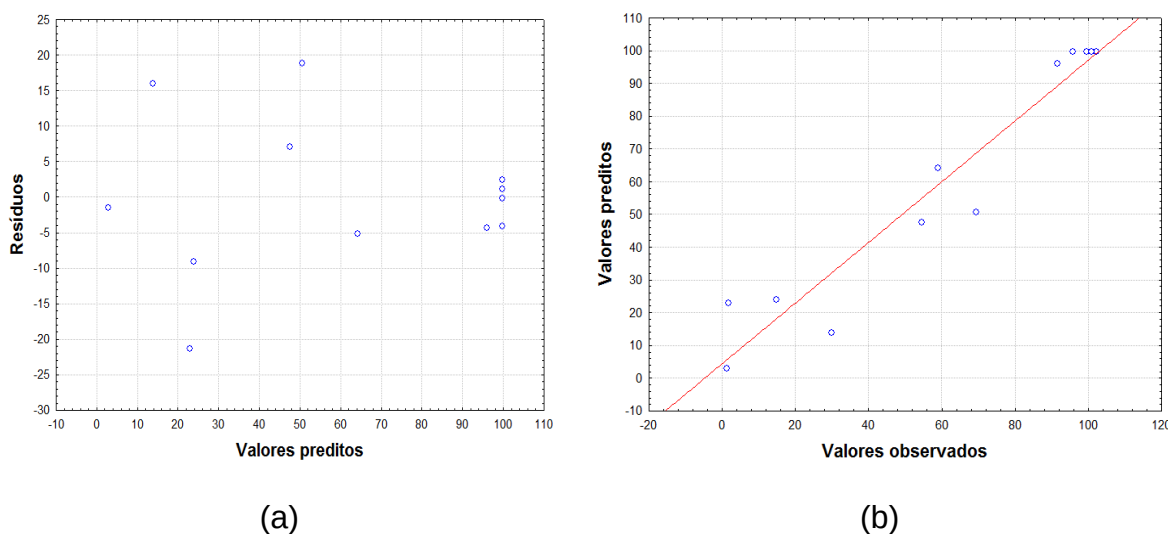


Figura 4 - (a) Valores preditos x resíduos e (b) Diagrama de dispersão obtidos no planejamento DCCR para a hidrólise enzimática.

Na Figura 4 (a) os pontos estão dispersos aleatoriamente em torno do zero, sem a presença de *outliers* (valores afastados dos demais) e na Figura 4 (b) verifica-se que todos os pontos estão dispersos em torno da reta, indicando que o modelo descreve adequadamente o processo.



A superfície de resposta e a curva de nível estão apresentadas nas Figuras 5 (a) e (b), que indicam que para uma maior conversão da lactose em glicose e galactose, deve-se realizar os experimentos com  $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $\text{pH} = 6,5$ .

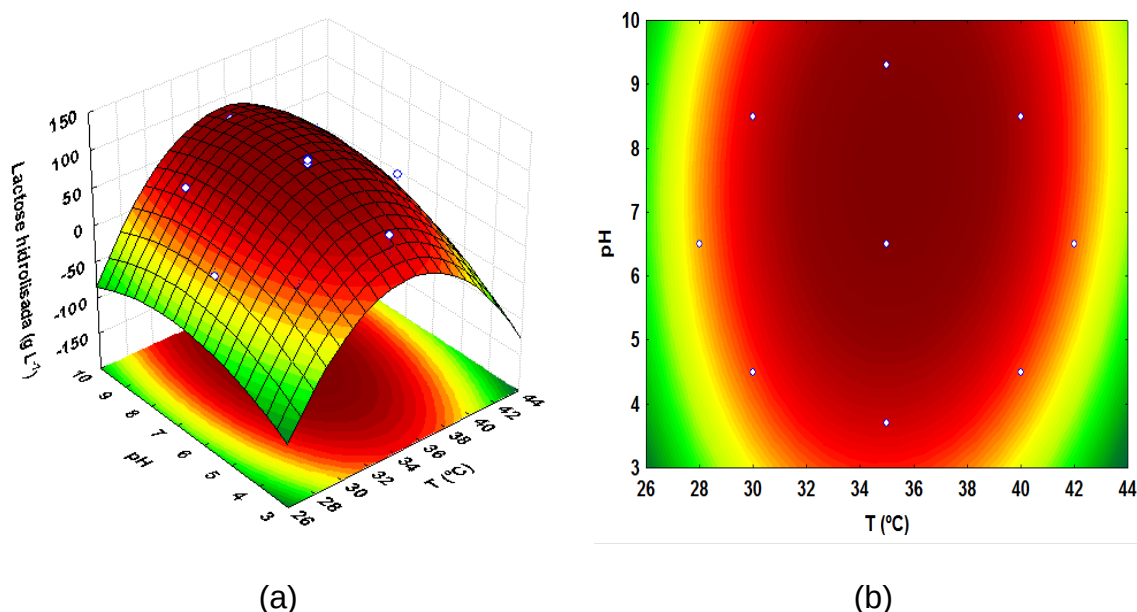


Figura 5 - (a) Superfície de resposta e (b) Curva de nível obtidos no planejamento DCCR para a hidrólise enzimática.

A partir da superfície de resposta e curva de nível, dadas pelas Figuras 5 (a) e (b), determinou-se que o ponto de máximo do processo pode ser obtido com a  $T = 35,35\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $\text{pH} = 7,7$ , estimando-se em  $104,86\text{ g L}^{-1}$  de lactose hidrolisada que resulta em 78% de conversão.

Portanto, mesmo obtendo-se um modelo matemático que prevê resultados satisfatórios, os melhores resultados para a hidrólise enzimática foram obtidos com o teste preliminar, em que a conversão da lactose foi de 93%.

Baseado nesses estudos, as hidrólises feitas para as fermentações foram realizadas utilizando:  $150\text{ g L}^{-1}$  de permeado, 0,1 % de enzima,  $\text{pH} 6,5$  e  $T 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 4.3 Fermentação

#### 4.3.1 Fermentações preliminares com permeado de soro de queijo e meio padrão

Os primeiros ensaios foram realizados com o intuito de comparar o crescimento das leveduras *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, e *K. marxianus* em meio permeado *in natura*, permeado suplementado com sais e meio padrão.

A comparação do crescimento celular das três leveduras em meio padrão, meio permeado e meio permeado suplementado com sais pode ser observado nas Figuras 6 (a), (b) e (c).

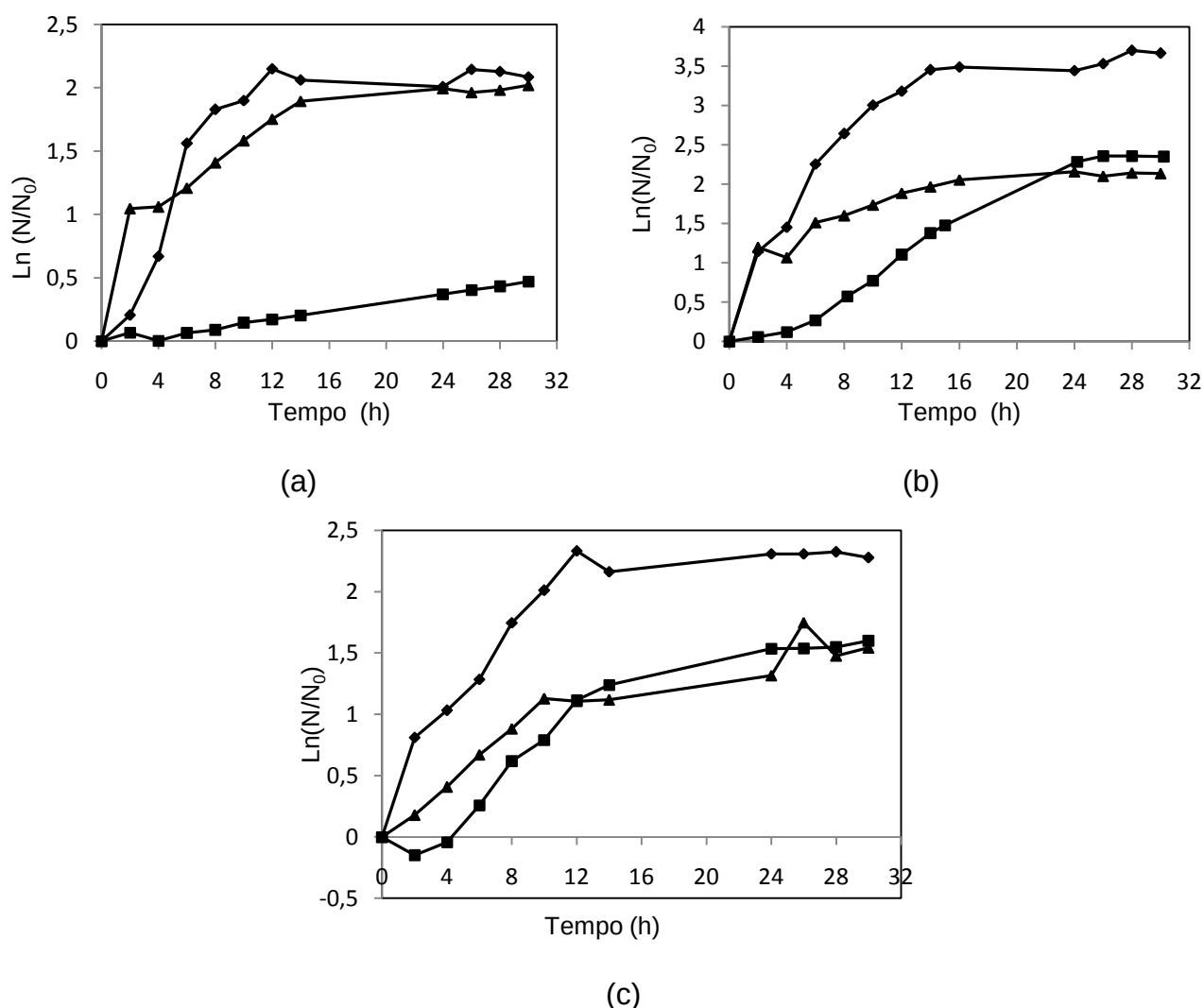


Figura 6 - Acompanhamento do crescimento microbiano por absorbância expresso em  $\ln(N/N_0)$ , para as leveduras (a) *S. cerevisiae*; (b) *S. boulardii* e (c) *K. marxianus*, nos meios (♦) padrão, (■) permeado puro e (▲) permeado suplementado com sais.

O meio permeado suplementado com sais e o meio padrão para a levedura *S. cerevisiae* (Figura 6 (a)) apresentaram os melhores resultados e muito próximos um do outro, o que evidencia que para esta espécie de levedura a suplementação com sais se faz necessária para que ocorra um bom crescimento do micro-organismo. Já o meio permeado puro para esta levedura, apresentou crescimento, porém menor se comparado com os demais meios.

Para as leveduras *S. boulardii* e *K. marxianus* (Figuras 6 (b) e (c)) o meio padrão foi o que apresentou o melhor crescimento. Para elas, os meios permeado puro e permeado suplementado mostraram diferença expressiva ao final do crescimento celular em relação ao meio padrão.

Verifica-se que o resíduo permeado foi bem assimilado como meio de crescimento para as três leveduras, e apresentou-se como uma alternativa viável de uso. Entretanto percebe-se a necessidade de adicionar nutrientes ao permeado, visando obter um melhor crescimento das leveduras em estudo.

#### **4.3.2 Curva de correlação biomassa indireta x biomassa direta**

Com o intuito de minimizar o tempo de análise e obter uma resposta precisa para o crescimento celular durante o desenvolvimento dos ensaios fermentativos foi realizada por regressão linear, uma correlação entre a absorbância e a massa seca.

As duas análises servem para delinear ao longo do tempo a forma de expressão da curva de crescimento celular de um micro-organismo, sendo a medida de absorbância uma análise indireta, onde não é possível quantificar o número de micro-organismo, e sim apenas acompanhar a evolução do crescimento de forma logarítima, já a biomassa celular direta (massa seca) expressa a concentração em  $\text{g L}^{-1}$  de células produzidas ao longo do tempo.

As Figuras 7 (a), (b) e (c) apresentam a correlação obtida para a levedura *S. cerevisiae*, *S. boulardii* e *K. marxianus*, respectivamente.

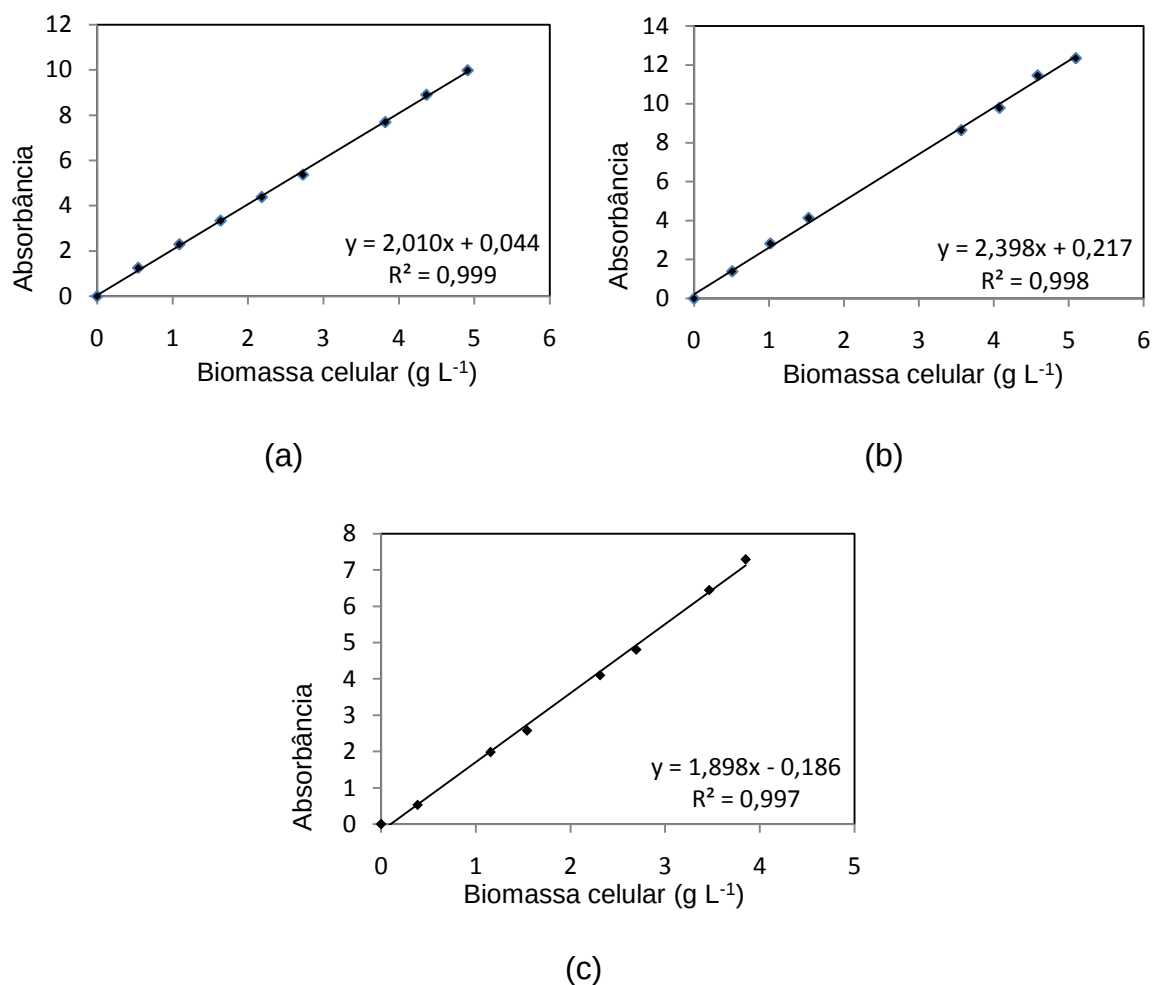


Figura 7 - Correlação entre absorbância e biomassa celular, para as leveduras (a) *S. cerevisiae*, (b) *S. boulardii* e (c) *K. marxianus*.

A partir da correlação, todos os valores de biomassa celular foram obtidos utilizando a equação da reta apresentada nas Figuras 7 (a), (b), e (c).

#### 4.3.3 Avaliação das condições e nutrientes necessários para o crescimento das leveduras *S. cerevisiae*, *S. boulardii* e *K. marxianus* em permeado de soro de queijo

O meio ideal para o crescimento de leveduras deve ter uma relação entre carbono e nitrogênio balanceada, contendo mais carbono do que nitrogênio, caso contrário favorece a formação de etanol e outros metabólitos secundários (SOUZA *et al.*, 2011).

Com os ensaios preliminares, como já citado no item 4.3.1, verificou-se a necessidade de suplementar o meio com os sais: sulfato de amônio, sulfato de magnésio heptahidratado e fosfato monobásico de potássio para que ocorra uma maior produção de biomassa pelas leveduras em estudo utilizando o permeado de soro de queijo como fonte de carbono.

Cabe lembrar que a quantidade de permeado expressa como  $150 \text{ g L}^{-1}$  contém aproximadamente  $135 \text{ g L}^{-1}$  de carbono (lactose), sendo que para todos os ensaios envolvendo as leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* foi realizada a hidrólise da lactose utilizando a melhor condição obtida no item 4.2.

#### **4.3.3.1 *Saccharomyces cerevisiae* – Resultados planejamento experimental**

A análise dos resultados utilizando a levedura *S. cerevisiae* foi realizada utilizando-se o valor obtido no tempo de 26 h de fermentação. Esse tempo foi selecionado, por nele serem obtidos os maiores valores de biomassa para esta levedura em todos os ensaios realizados.

A Tabela 20 apresenta os valores reais da matriz e os resultados de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) obtidos com a aplicação do planejamento Plackett-Burman.

Os resultados obtidos para a biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) e acompanhamento do pH, ao longo do tempo de fermentação, para todos os ensaios realizados com a levedura *S. cerevisiae* estão apresentados no anexo C (Fig. 18 - 34).

Tabela 20- Matriz do planejamento Plackett-Burman para a levedura *S. cerevisiae*.

| Ensaio | T (°C) | [permeado]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | pH  | [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | [MgSO <sub>4</sub> ]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Biomassa<br>(g L <sup>-1</sup> ) |
|--------|--------|------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1      | 45,0   | 20,0                               | 6,0 | 1,0                                                                        | 0,5                                          | 1,0                                                        | 3,10                             |
| 2      | 45,0   | 150,0                              | 4,0 | 4,0                                                                        | 0,5                                          | 1,0                                                        | 6,23                             |
| 3      | 30,0   | 150,0                              | 6,0 | 1,0                                                                        | 1,5                                          | 1,0                                                        | 9,05                             |
| 4      | 45,0   | 20,0                               | 6,0 | 4,0                                                                        | 0,5                                          | 4,0                                                        | 1,74                             |
| 5      | 45,0   | 150,0                              | 4,0 | 4,0                                                                        | 1,5                                          | 1,0                                                        | 1,67                             |
| 6      | 45,0   | 150,0                              | 6,0 | 1,0                                                                        | 1,5                                          | 4,0                                                        | 3,59                             |
| 7      | 30,0   | 150,0                              | 6,0 | 4,0                                                                        | 0,5                                          | 4,0                                                        | 11,38                            |
| 8      | 30,0   | 20,0                               | 6,0 | 4,0                                                                        | 1,5                                          | 1,0                                                        | 4,56                             |
| 9      | 30,0   | 20,0                               | 4,0 | 4,0                                                                        | 1,5                                          | 4,0                                                        | 4,97                             |
| 10     | 45,0   | 20,0                               | 4,0 | 1,0                                                                        | 1,5                                          | 4,0                                                        | 0,66                             |
| 11     | 30,0   | 150,0                              | 4,0 | 1,0                                                                        | 0,5                                          | 4,0                                                        | 14,22                            |
| 12     | 30,0   | 20,0                               | 4,0 | 1,0                                                                        | 0,5                                          | 1,0                                                        | 4,30                             |
| 13     | 37,5   | 85,0                               | 5,0 | 2,5                                                                        | 1,0                                          | 2,5                                                        | 7,47                             |
| 14     | 37,5   | 85,0                               | 5,0 | 2,5                                                                        | 1,0                                          | 2,5                                                        | 7,62                             |
| 15     | 37,5   | 85,0                               | 5,0 | 2,5                                                                        | 1,0                                          | 2,5                                                        | 7,15                             |
| 16     | 37,5   | 85,0                               | 5,0 | 2,5                                                                        | 1,0                                          | 2,5                                                        | 7,78                             |

Na Tabela 20 verifica-se que no tempo de 26 h, o melhor resultado de biomassa obtido foi no ensaio 11 (14,22 g L<sup>-1</sup>), evidenciando que estas condições utilizadas (T 30 °C, [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>, pH 4, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 1 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 0,5 g L<sup>-1</sup> e [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 4 g L<sup>-1</sup>) são favoráveis ao crescimento da levedura *S. cerevisiae*. De acordo com SOUSA & MONTEIRO (2011) a temperatura ideal para o crescimento dessa levedura é 28-30 °C e, segundo NEUMANN *et al.* (2008) o pH ideal é 4,5. Nesse ensaio foi utilizada a maior concentração de fonte de carbono utilizado no planejamento ([permeado] = 150 g L<sup>-1</sup>, equivalente a 135 g L<sup>-1</sup> de fonte de carbono).

Comparando-se os resultados dos ensaios 3, 7 e 11, observa-se que além do valor do pH, a diferença na concentração dos elementos nitrogênio, magnésio e fósforo influencia no aumento ou diminuição da biomassa celular, indicando a importância desses compostos para o metabolismo celular.

BARBOSA *et al.* (2010), utilizando 100 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 10 g L<sup>-1</sup>, T 30 °C e pH 4,6, obtiveram 8,4 g L<sup>-1</sup> de crescimento celular com 12 h de fermentação, valor menor ao obtido no ensaio 11, embora com tempo menor de fermentação.

A Tabela 21 apresenta os valores de p-valor, o coeficiente das variáveis, o erro padrão e o coeficiente de determinação para o planejamento Plackett-Burman.

Tabela 21 - Tabela dos coeficientes de regressão - resposta à biomassa celular para o planejamento Plackett-Burman, ao nível de 95% de confiança, da levedura *S. cerevisiae*.

| Variável                                                                | p-valor  | Coef     | Erro     |
|-------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| Média/Intercepto                                                        | 0,000003 | 6,09096  | 0,068099 |
| T (°C)                                                                  | 0,000072 | -2,46286 | 0,157900 |
| [permeado] (g L <sup>-1</sup> )                                         | 0,000079 | 2,39665  | 0,157900 |
| pH                                                                      | 0,039562 | 0,27610  | 0,157900 |
| [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> ) | 0,006822 | -0,52791 | 0,157900 |
| [MgSO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> )                               | 0,000606 | -1,20851 | 0,157900 |
| [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> )                 | 0,001407 | 0,97222  | 0,169476 |

$$R^2 = 87,91\%$$

Para esse processo, todas as variáveis são significativas, pois apresentam o valor de  $p < 0,05$ .

A Figura 8 apresenta o Gráfico de Pareto, em que é possível visualizar as variáveis significativas.

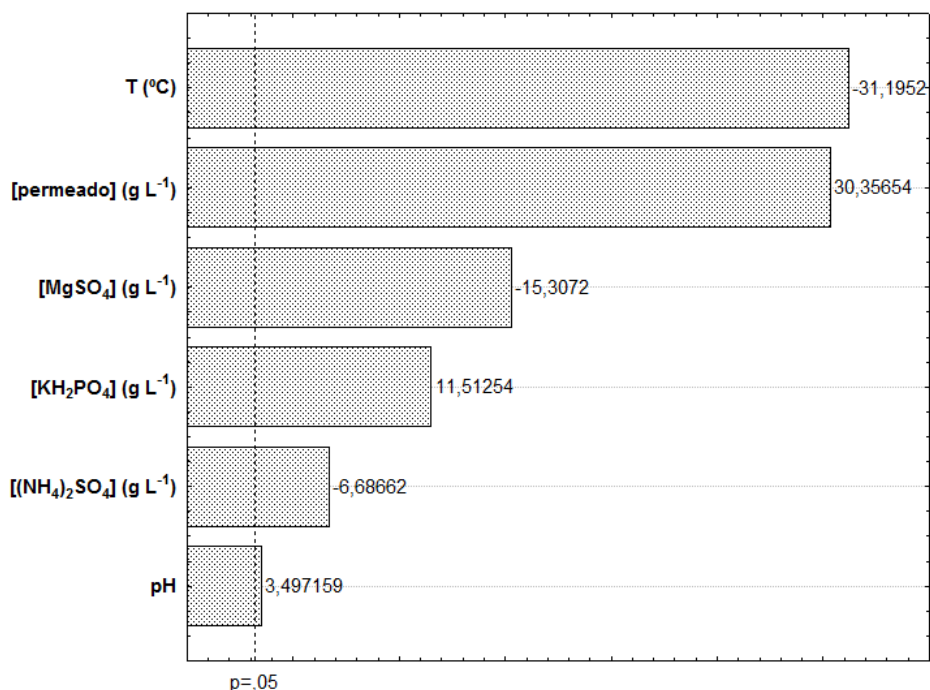


Figura 8- Gráfico de Pareto obtido com execução do planejamento Plackett-Burman para a levedura *S. cerevisiae*.

Tem-se na figura 8, que a temperatura, a concentração de sulfato de magnésio e sulfato de amônio apresentam um efeito negativo, e a concentração de permeado, concentração de fosfato monobásico de potássio e pH um efeito positivo, ou seja, para alcançar maior rendimento de biomassa, deve-se conduzir as fermentações com menores valores de temperatura, sulfato de magnésio e sulfato de amônio e maiores valores da concentração de permeado, fosfato monobásico de potássio e pH, dentro das faixas propostas.

A Tabela 22 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo e o teste F.

Tabela 22- Análise de variância, para o planejamento Plackett-Burman, para a produção de biomassa, utilizando a levedura *S. cerevisiae*.

|                 | <b>SQ</b> | <b>GL</b> | <b>MQ</b> | <b>Fcalc</b> |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| Regressão       | 167,8646  | 6         | 27,977    | 10,37        |
| Resíduo         | 24,2715   | 9         | 2,697     |              |
| Falta de ajuste | 24,0543   | 6         |           |              |
| Erro puro       | 0,2172    | 3         |           |              |
| Total SQ        | 200,7910  | 15        |           |              |

$$R^2 = 87,91\%$$

A Tabela 22 apresenta o valor de  $F(\text{calc}) = 10,37$  maior que o valor de  $F(\text{tab}) (6; 9; 0,05) = 3,37$  (BARROS *et al.*, 2010).

Dentro das faixas propostas, o modelo proposto é válido descrevendo o comportamento da fermentação, utilizando a levedura *S. cerevisiae* para a produção de biomassa celular, para as variáveis temperatura, pH, concentração de permeado, concentração de sulfato de amônio, concentração de sulfato de magnésio e concentração de fosfato monobásico de potássio, ao nível de 95%, e os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais.

A equação do modelo matemático que representa a concentração de biomassa celular em função das variáveis está representada na Equação 5:



$$\begin{aligned}
\text{Biomassa celular } \left(\frac{g}{L}\right) &= 6,09096 - 2,46286 \cdot T + 2,39665 \cdot [\text{permeado}] + 0,27610 \cdot \text{pH} - 0,52791 \cdot [(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] \\
&- 1,20851 \cdot [\text{MgSO}_4] + 0,97555 \cdot [\text{KH}_2\text{PO}_4]
\end{aligned} \quad (5)$$

As Figuras 9 (a) e (b) apresentam o diagrama de dispersão e os valores preditos x resíduos obtidos no planejamento Plackett-Burman, para a fermentação utilizando a levedura *S. cerevisiae*.

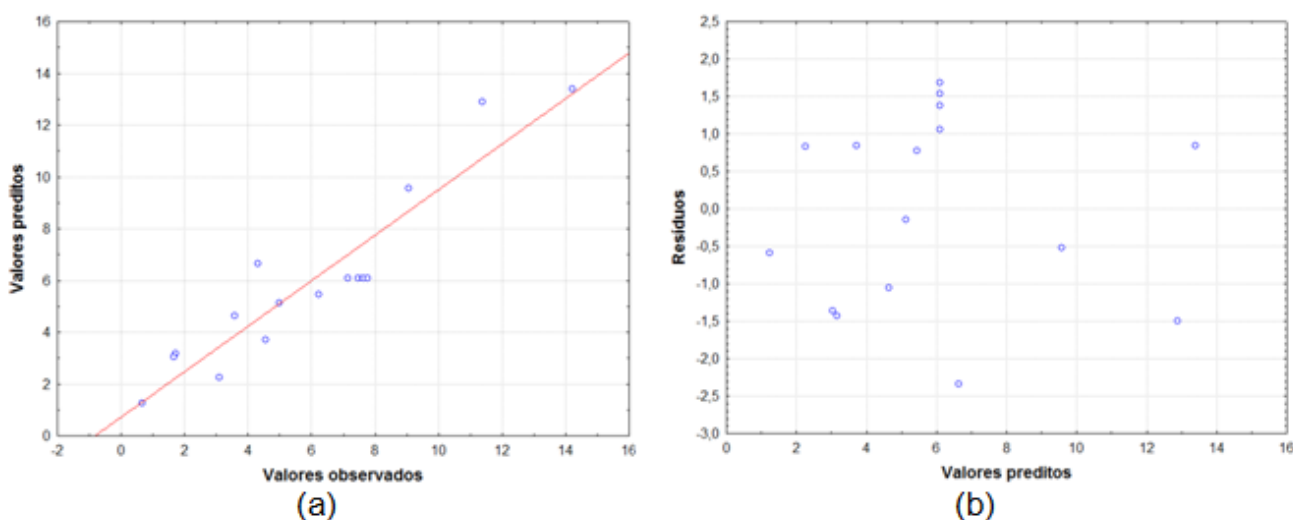
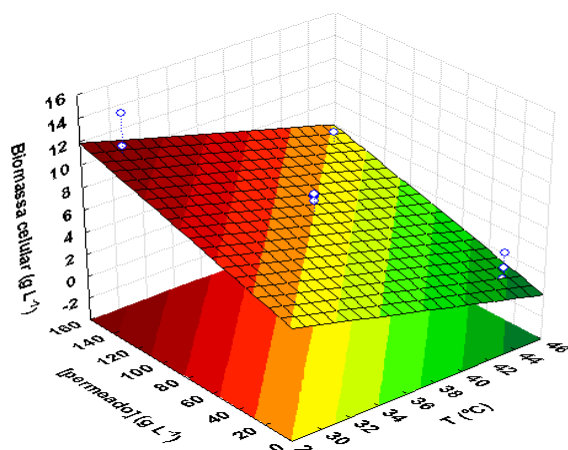


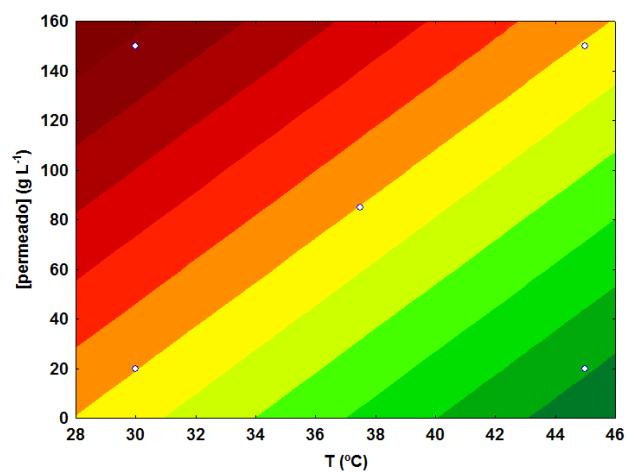
Figura 9 - (a) Diagrama de dispersão e (b) Valores preditos x resíduos obtidos no planejamento Plackett-Burman para a fermentação utilizando a levedura *S. cerevisiae*.

Na Figura 9 (a) os pontos estão dispersos em torno da reta e na Figura 9 (b) os pontos se distribuem aleatoriamente em torno do zero, sem a presença de *outliers* (valores afastados dos demais), indicando que o modelo descreve adequadamente o processo.

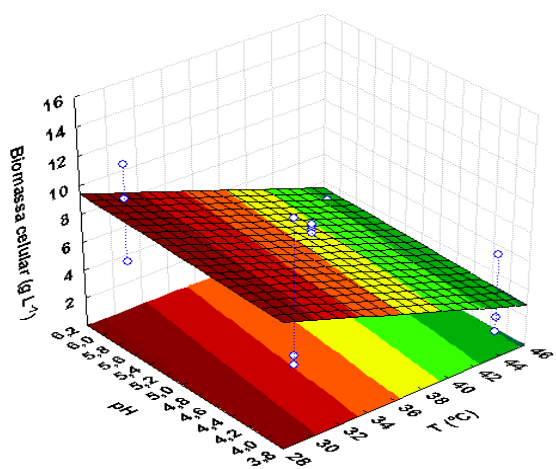
Os gráficos de superfície de resposta e curva de nível, para todas as variáveis, estão apresentados nas Figuras 10 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j), (l) e (m), (n), (o), (p), (q), (r), (s), (t), (u), (v), (x), (z), (a1), (b1), (c1), (d1), (f1) e (g1) nos quais é possível verificar a influência das variáveis.



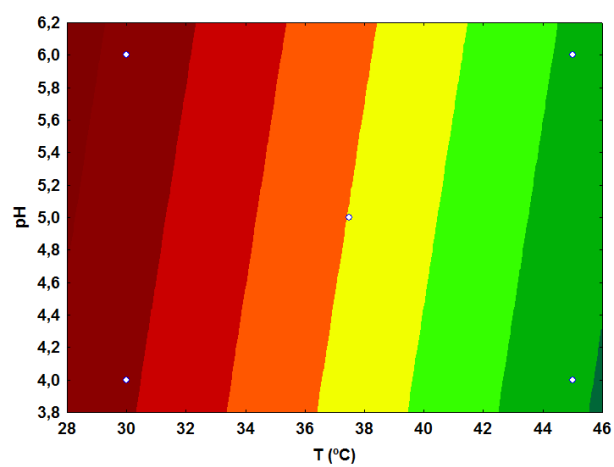
(a)



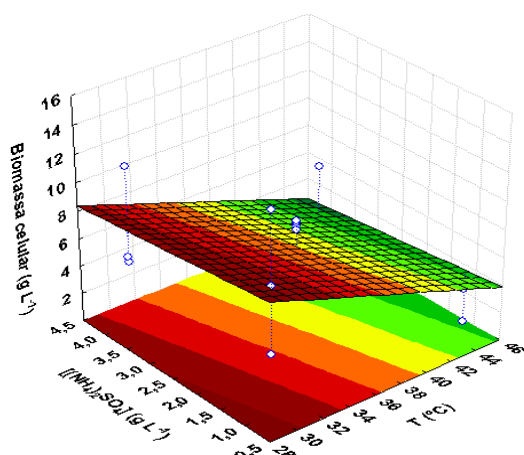
(q)



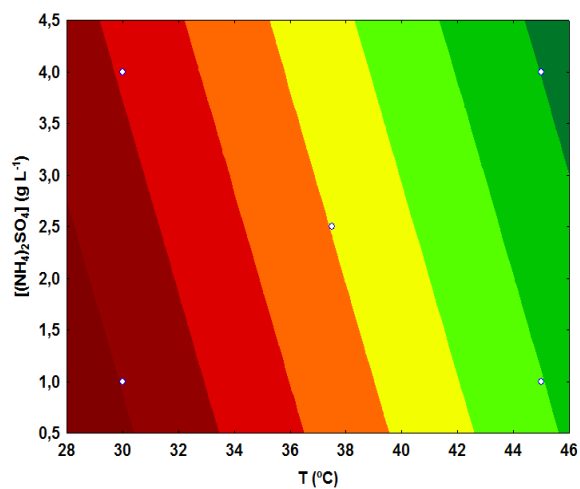
(b)



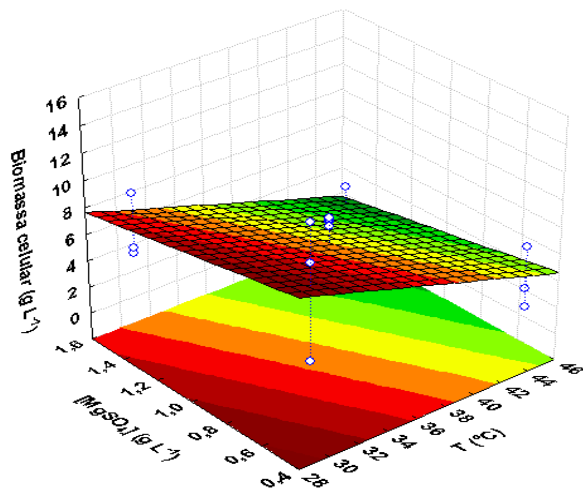
(r)



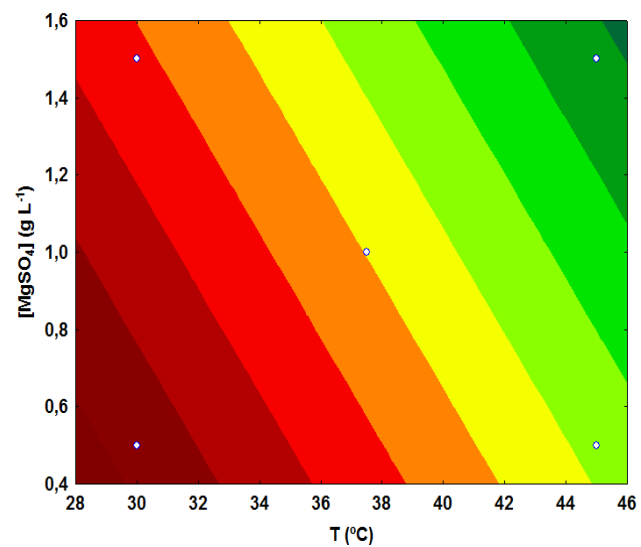
(c)



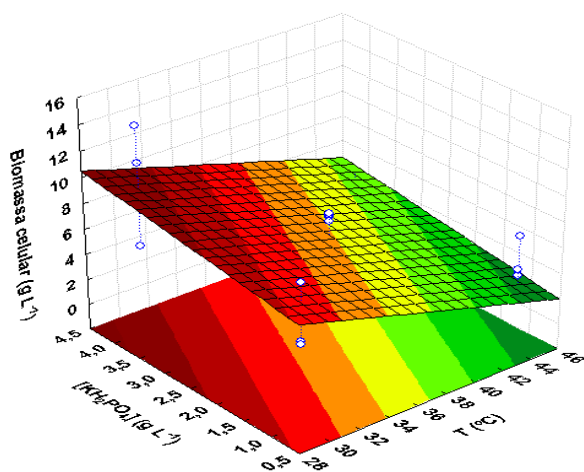
(s)



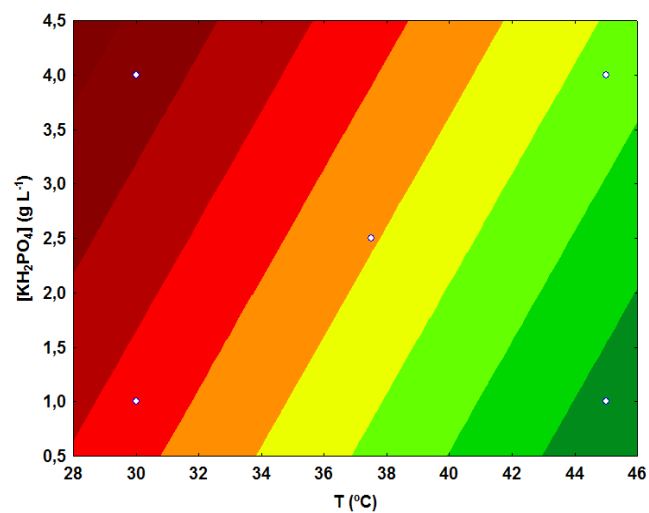
(d)



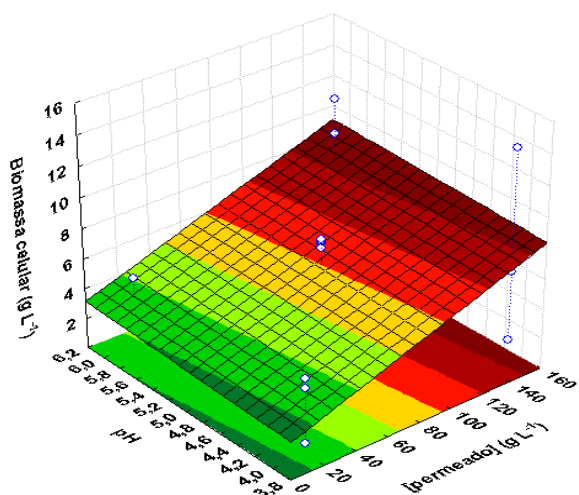
(t)



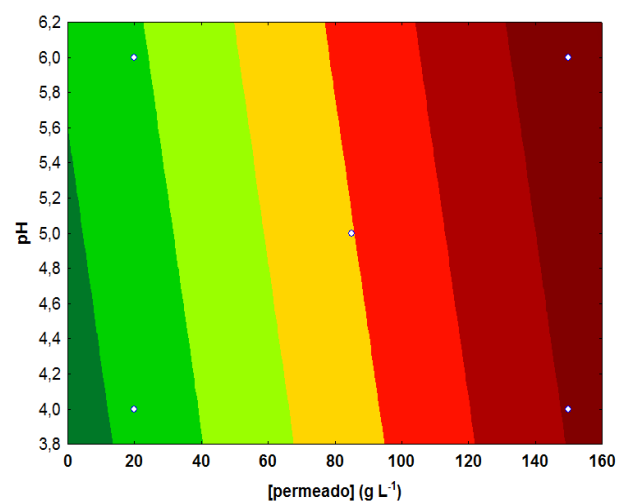
(e)



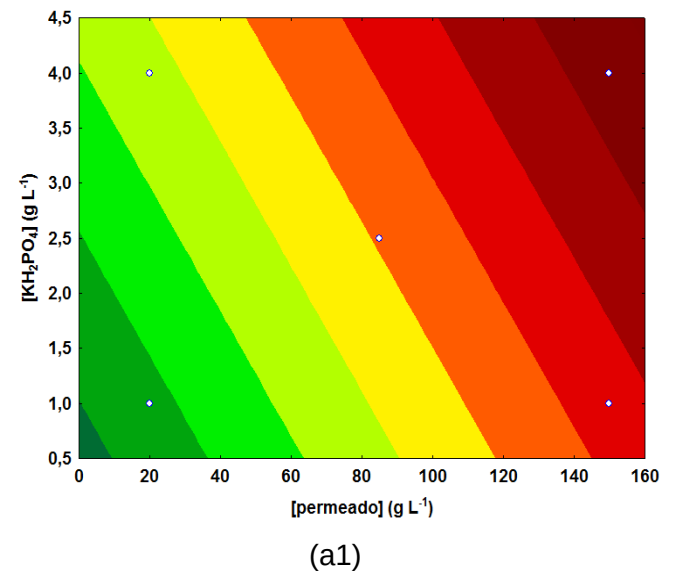
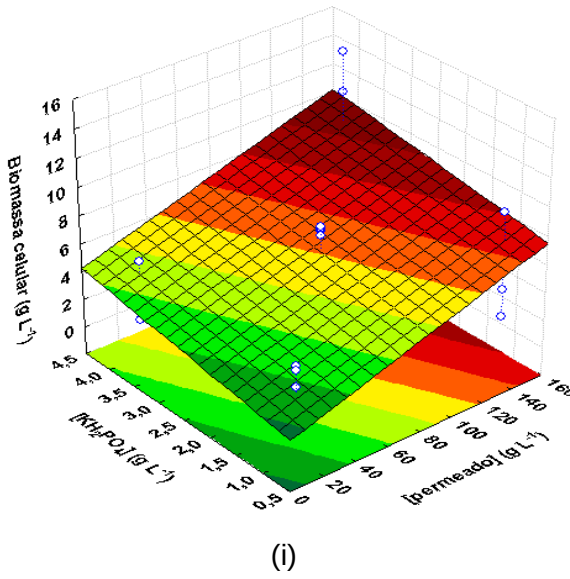
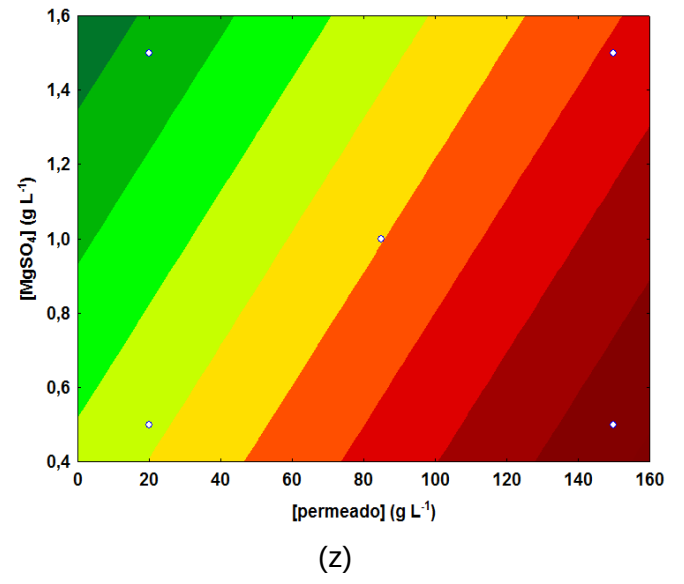
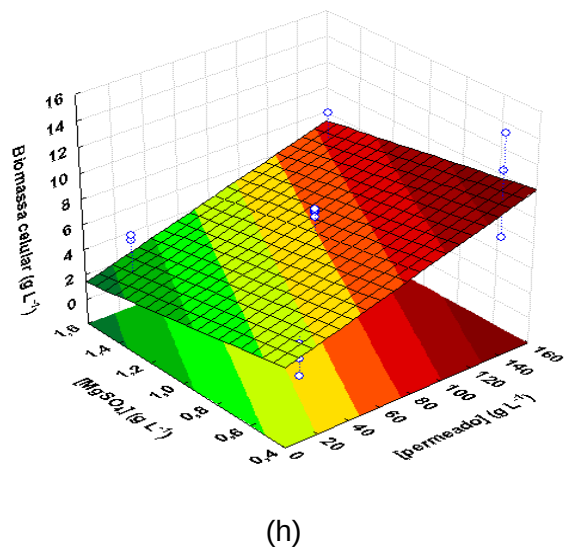
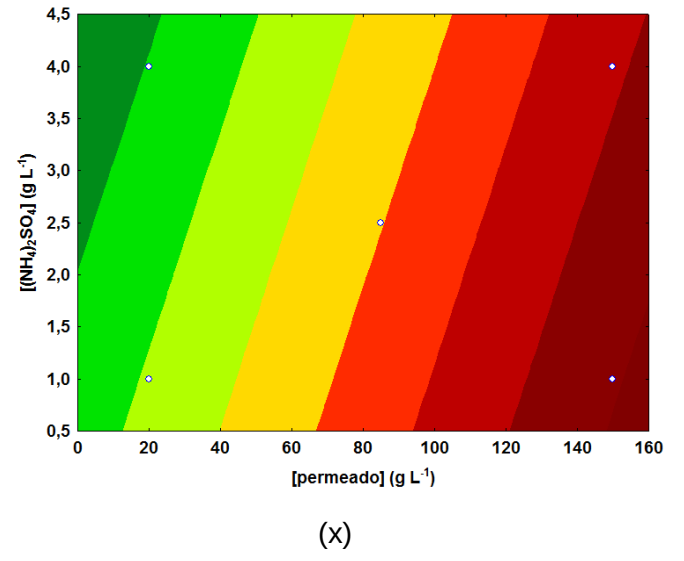
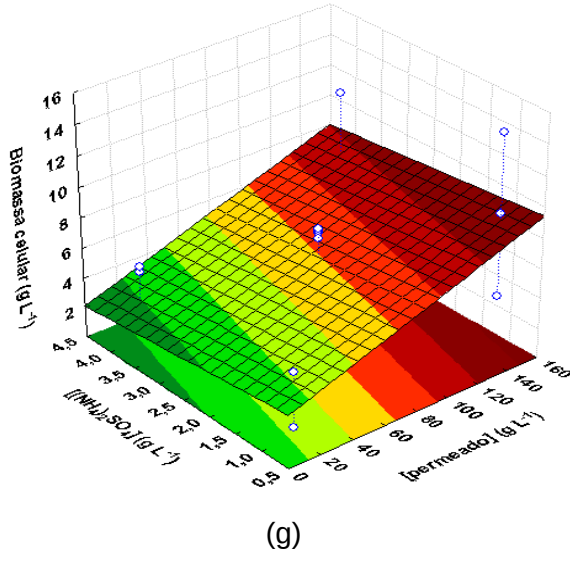
(u)

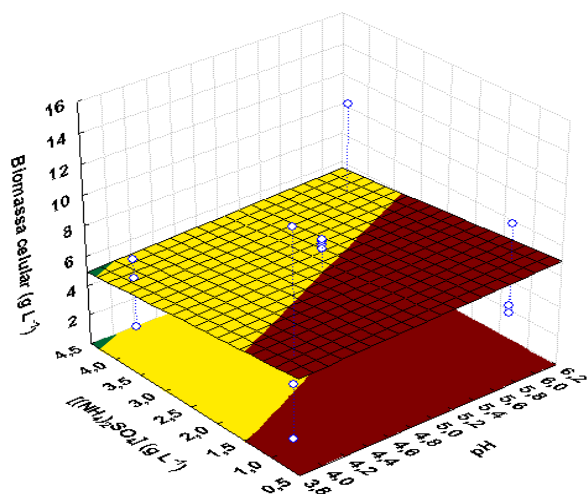


(f)

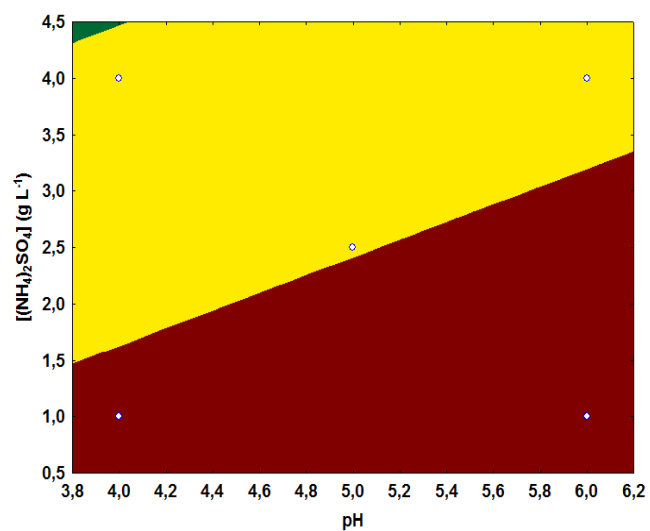


(v)

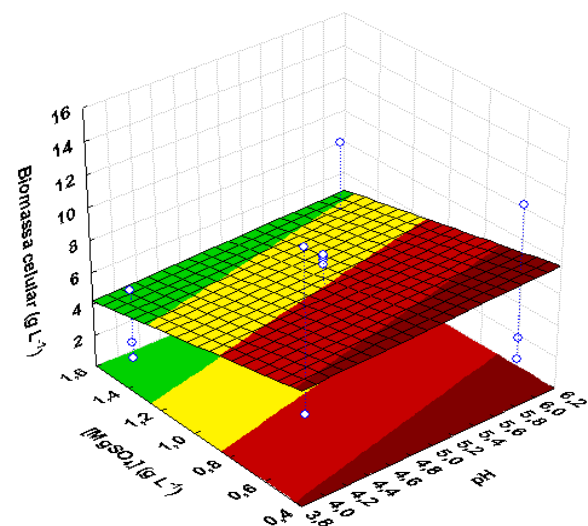




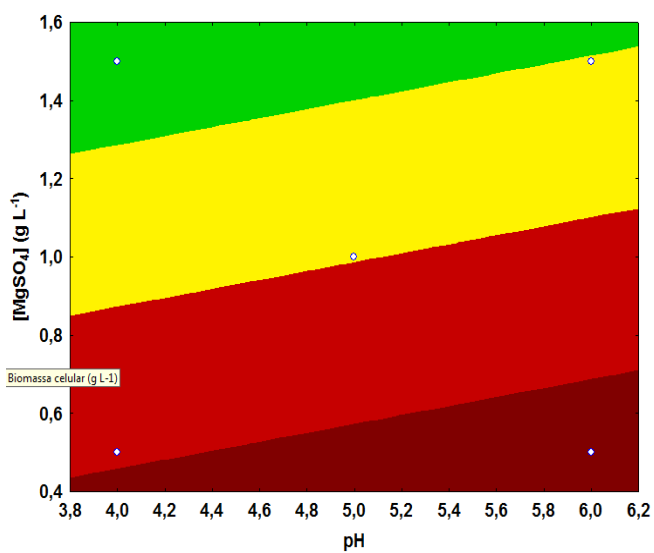
(i)



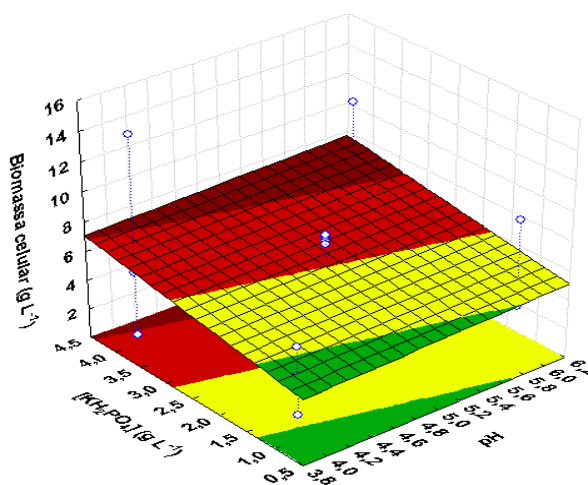
(b1)



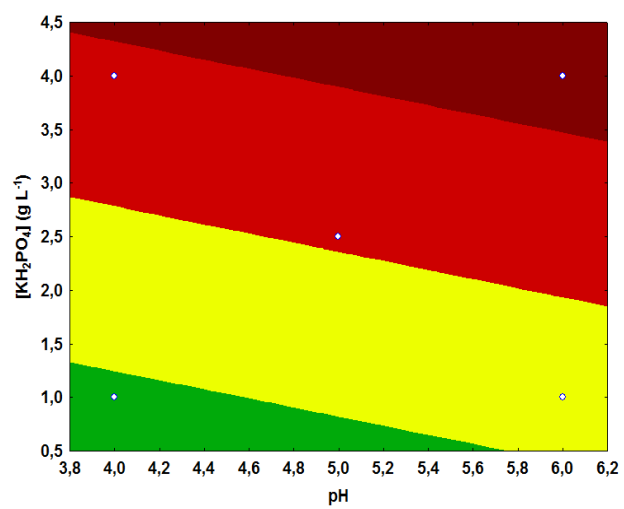
(l)



(c1)



(m)



(d1)

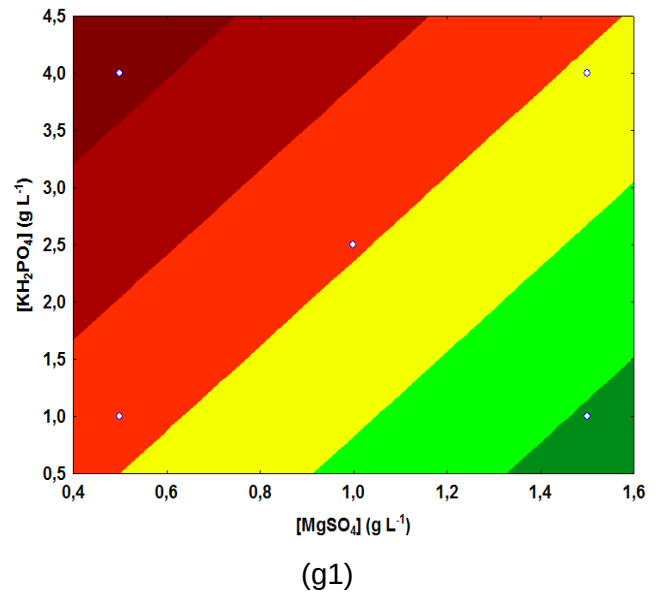
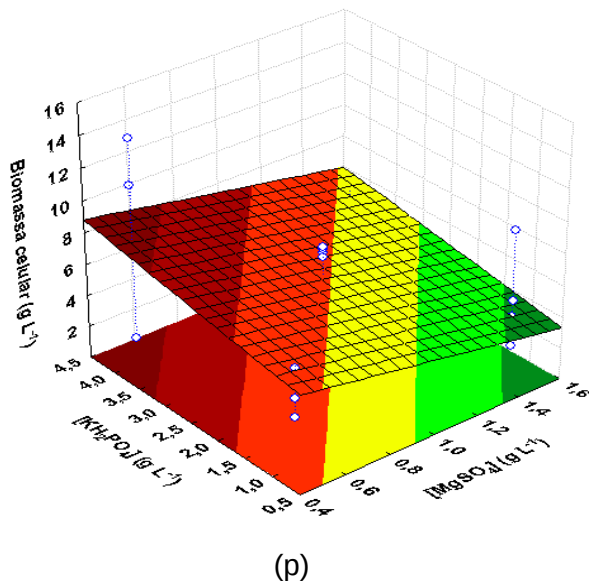
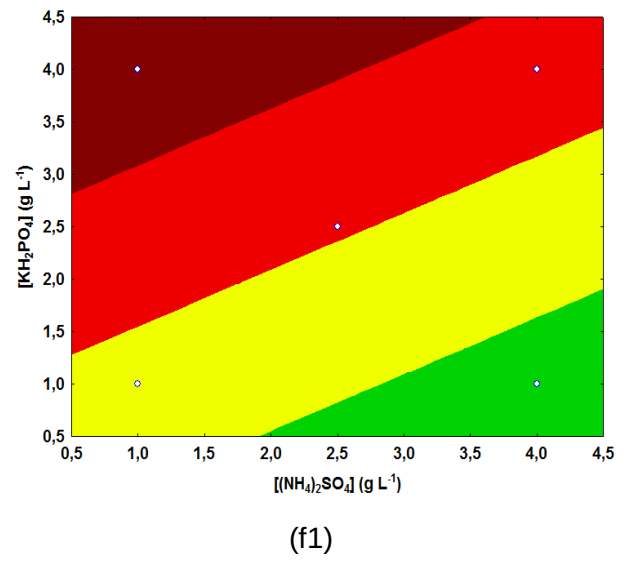
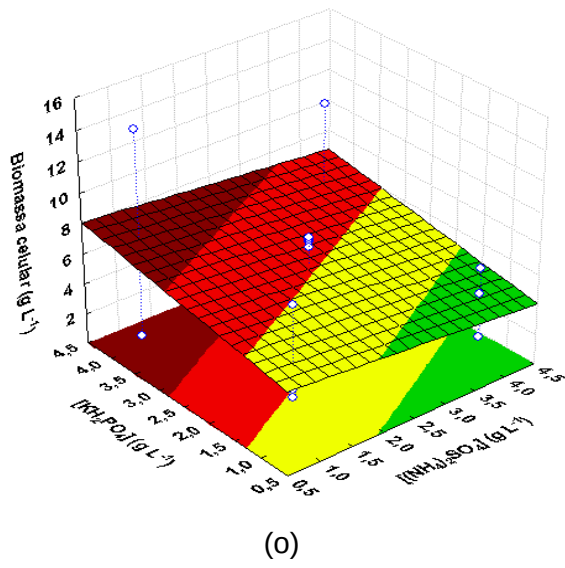
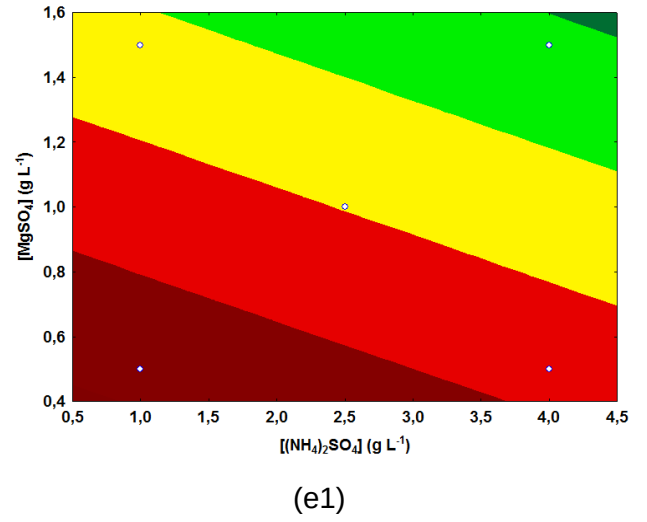
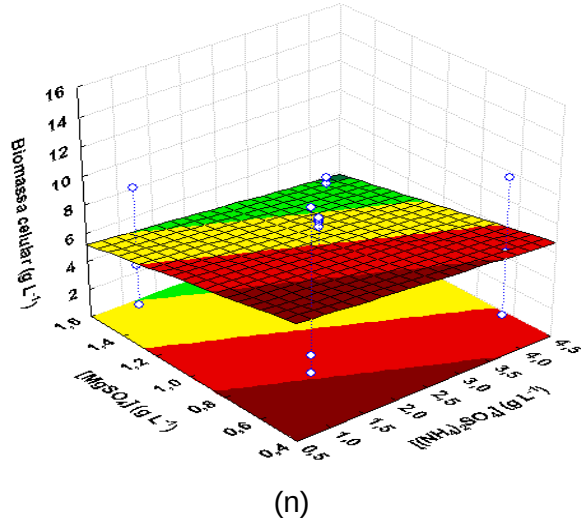


Figura 10 - Superfície de resposta, (a) T x [permeado]; (b) T x pH; (c) T x  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ ; (d) T x  $[\text{MgSO}_4]$ ; (e) T x  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ ; (f) [permeado] x pH; (g) permeado x  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ ; (h) [permeado] x  $[\text{MgSO}_4]$ ; (i) [permeado] x  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ ; (j) pH x  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ ; (l) pH x  $[\text{MgSO}_4]$ ; (m) pH x  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ ; (n)  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  x

[MgSO<sub>4</sub>]; (o) [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] x [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; (p) [MgSO<sub>4</sub>] x [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; Curva de nível, , (q) T x [permeado]; (r) T x pH; (s) T x [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]; (t) T x [MgSO<sub>4</sub>]; (u) T x [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; (v) [permeado] x pH; (x) permeado x [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]; (z) [permeado] x [MgSO<sub>4</sub>]; (a1) [permeado] x [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; (b1) pH x x [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]; (c1) pH x [MgSO<sub>4</sub>]; (d1) pH x [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; (e1) [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] x [MgSO<sub>4</sub>]; (f1) [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] x [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]; (g1) [MgSO<sub>4</sub>] x [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>].

Pelas superfícies de resposta e curvas de nível, observa-se a influência negativa da temperatura, da concentração de sulfato de amônio e de sulfato de magnésio e a influência positiva da concentração de permeado, concentração de fosfato monobásico de potássio e pH.

As Figuras 11 (a) e (b) ilustram o resultado das curvas de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) e acompanhamento do pH, ao longo do tempo de fermentação com a melhor condição (ensaio 11) e com o ensaio preliminar contendo apenas permeado de soro de queijo (item 4.3.1).

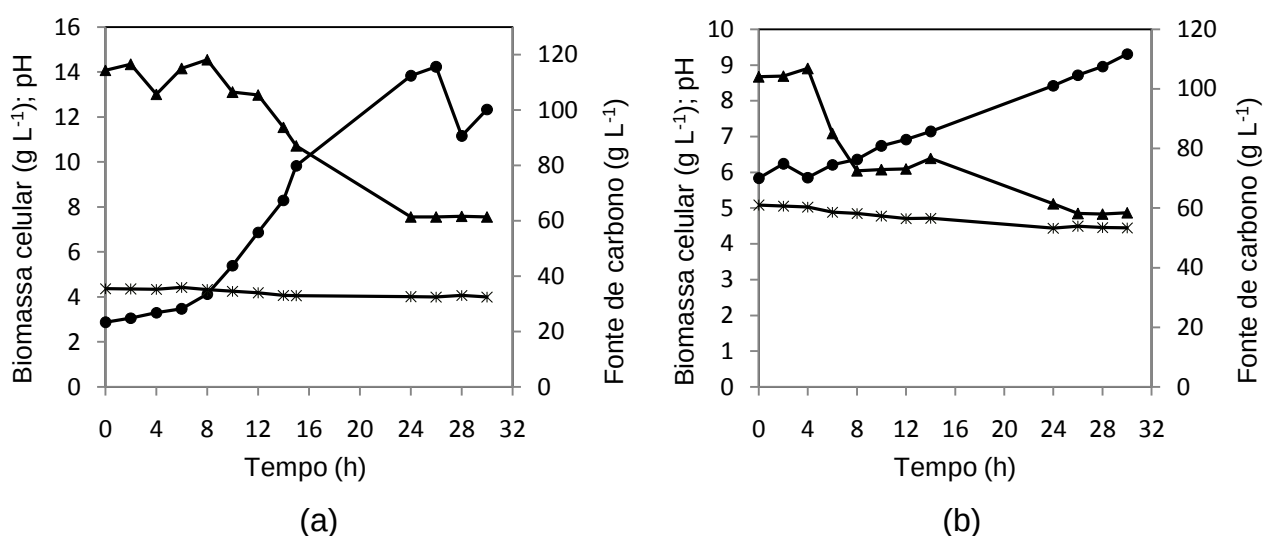


Figura 11 – Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) (●), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) (▲) e pH (\*), ao longo do tempo de fermentação, (a) Ensaio 11 (T 30 °C, [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>, pH 4, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 1 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 0,5 g L<sup>-1</sup> e [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 4 g L<sup>-1</sup>); (b) T 30 °C, pH 5; [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>.

Observa-se nas Figuras 11 (a) e (b) que o decaimento do pH não foi tão acentuado devido a presença de bicarbonato na composição do permeado que atua como tampão para o meio, entretanto, um pequeno decréscimo no valor do pH nos dois

ensaios indicam a assimilação da fonte de carbono pelo micro-organismo e liberação posterior de ácido para o meio.

NORTON *et al.* (1994) e ZEMPULSKI (2012) estudaram a adição de bicarbonato no meio de cultivo e obtiveram uma estabilidade do meio em relação ao pH, favorecendo assim, a formação dos produtos de interesse (ácido láctico e AGVs, respectivamente).

Observa-se também que o consumo de carbono (na forma de glicose e galactose) nos dois ensaios foram próximos, tendo um consumo aproximado de 50%. O consumo não foi completo, possivelmente devido a falta de outros nutrientes relevantes ao metabolismo, os quais podem ter sido consumidos antes do término da fonte de carbono. Isso sugere a necessidade de suplementação dos sais que influenciam positivamente, ao longo do processo, para alcançar maiores valores de biomassa. Outra hipótese para o não consumo total da fonte de carbono seria a liberação de compostos tóxicos ao metabolismo da célula, como o etanol. Entretanto nenhuma das hipóteses pôde ser comprovada, pois não foram realizadas análises destes compostos.

O maior valor de biomassa obtido com a suplementação do meio foi aproximadamente 1,6 vezes maior do que no ensaio contendo apenas o permeado de soro de queijo (14,22 e 8,72 g L<sup>-1</sup>, respectivamente), comprovando novamente a importância da adição dos sais adicionados ao meio de cultivo.

A Tabela 23 apresenta os valores de biomassa (g L<sup>-1</sup>), produtividade (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), conversão de substrato em célula (Y(x/s) (g g<sup>-1</sup>)), velocidade específica de crescimento (h<sup>-1</sup>) e substrato metabolizado (g L<sup>-1</sup>), obtidos em todos os ensaios, no tempo de 26 h.



Tabela 23 - Resultados de produtividade, conversão de substrato em célula, velocidade específica de crescimento e substrato metabolizado para a levedura *S. cerevisiae*.

| Ensaio | Biomassa<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Produtividade<br>(g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | Conversão de<br>substrato em<br>célula (Y(x/s))<br>(g g <sup>-1</sup> ) | μ<br>(h <sup>-1</sup> ) | Substrato<br>metabolizado<br>(g L <sup>-1</sup> ) |
|--------|----------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------|
| 1      | 3,10                             | 0,034                                                 | 0,465                                                                   | 0,031                   | 1,91                                              |
| 2      | 6,23                             | 0,025                                                 | 0,016                                                                   | 0,115                   | 41,76                                             |
| 3      | 9,05                             | 0,259                                                 | 0,078                                                                   | 0,284                   | 86,32                                             |
| 4      | 1,74                             | 0,032                                                 | 0,061                                                                   | 0,007                   | 13,69                                             |
| 5      | 1,67                             | 0,006                                                 | 0,003                                                                   | 0,022                   | 61,23                                             |
| 6      | 3,59                             | 0,074                                                 | 0,050                                                                   | 0,253                   | 38,80                                             |
| 7      | 11,38                            | 0,277                                                 | 0,091                                                                   | 0,349                   | 79,06                                             |
| 8      | 4,56                             | 0,131                                                 | 0,290                                                                   | 0,487                   | 11,72                                             |
| 9      | 4,97                             | 0,138                                                 | 0,298                                                                   | 0,519                   | 12,05                                             |
| 10     | 0,66                             | 0                                                     | 0,001                                                                   | 0,001                   | 8,09                                              |
| 11     | 14,22                            | 0,437                                                 | 0,215                                                                   | 0,566                   | 52,91                                             |
| 12     | 4,30                             | 0,137                                                 | 0,324                                                                   | 0,425                   | 10,99                                             |
| 13     | 7,47                             | 0,219                                                 | 0,221                                                                   | 0,302                   | 25,68                                             |
| 14     | 7,62                             | 0,227                                                 | 0,185                                                                   | 0,295                   | 31,94                                             |
| 15     | 7,15                             | 0,214                                                 | 0,160                                                                   | 0,322                   | 34,76                                             |
| 16     | 7,78                             | 0,234                                                 | 0,165                                                                   | 0,302                   | 36,88                                             |
| 17*    | 8,72                             | 0,111                                                 | 0,063                                                                   | 0,129                   | 45,88                                             |

\* Ensaio contendo apenas permeado de soro de queijo.

De acordo com MULLER (2006), a produtividade indica a quantidade de célula produzida (g) por volume (L) de meio por um determinado período de tempo (h); a conversão de substrato em célula expressa a relação entre a massa de célula produzida (g) e a massa de fonte de carbono consumida (g) e a velocidade específica de crescimento ajudam na formulação das relações cinéticas ocasionadas no processo.

O maior valor de produtividade foi obtido no ensaio 11 (0,437 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), enquanto no ensaio 17 (meio contendo apenas permeado) esse valor foi aproximadamente quatro vezes menor (0,111 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), evidenciando novamente a necessidade de suplementar o meio com sais para aumentar o rendimento.

GONÇALVES (2012) obteve uma produtividade de 0,24 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> com 72 h de fermentação.

O melhor valor de conversão de substrato em célula foi obtido no ensaio 1 ( $0,465 \text{ g g}^{-1}$ ), possivelmente por utilizar a menor concentração de permeado ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) ou seja a fonte de carbono foi consumida por completo, e também por apresentar as melhores condições de concentração de sais de acordo com os resultados obtidos no planejamento experimental.

Observa-se que a levedura *S. cerevisiae* pode ser utilizada para a fermentação do permeado de soro de queijo e consequente produção de biomassa celular, diminuindo assim o impacto ambiental causado pelo resíduo e obtendo-se ao final um produto com valor agregado elevado em relação a comercialização do permeado em pó.

#### **4.3.3.2 *Saccharomyces boulardii* - Resultados planejamento experimental**

Os resultados de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) obtidos para *S. boulardii* com a aplicação do planejamento Plackett-Burman estão apresentados na Tabela 24 juntamente com os níveis reais da matriz. Para esta levedura fixou-se o tempo de 24 h de fermentação, por neste tempo ter-se a obtenção dos maiores valores biomassa, dentro das condições testadas no planejamento.

Os resultados obtidos para a biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) e acompanhamento do pH, ao longo do tempo de fermentação, para todos os ensaios realizados com a levedura *S. boulardii* estão apresentados no anexo C (Fig. 35 - 51).

Tabela 24- Matriz do planejamento Plackett-Burman para a levedura *S.boulardii*.

| Ensaio | T (°C) | [permeado]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | pH  | [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | [MgSO <sub>4</sub> ]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Biomassa<br>(g L <sup>-1</sup> ) |
|--------|--------|------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1      | 45,0   | 20,0                               | 5,5 | 3,0                                                                        | 1,2                                          | 3,0                                                        | 2,12                             |
| 2      | 45,0   | 150,0                              | 1,5 | 9,0                                                                        | 1,2                                          | 3,0                                                        | 3,52                             |
| 3      | 30,0   | 150,0                              | 5,5 | 3,0                                                                        | 3,6                                          | 3,0                                                        | 21,51                            |
| 4      | 45,0   | 20,0                               | 5,5 | 9,0                                                                        | 1,2                                          | 9,0                                                        | 1,78                             |
| 5      | 45,0   | 150,0                              | 1,5 | 9,0                                                                        | 3,6                                          | 3,0                                                        | 1,97                             |
| 6      | 45,0   | 150,0                              | 5,5 | 3,0                                                                        | 3,6                                          | 9,0                                                        | 4,79                             |
| 7      | 30,0   | 150,0                              | 5,5 | 9,0                                                                        | 1,2                                          | 9,0                                                        | 22,85                            |
| 8      | 30,0   | 20,0                               | 5,5 | 9,0                                                                        | 3,6                                          | 3,0                                                        | 8,75                             |
| 9      | 30,0   | 20,0                               | 1,5 | 9,0                                                                        | 3,6                                          | 9,0                                                        | 0,71                             |
| 10     | 45,0   | 20,0                               | 1,5 | 3,0                                                                        | 3,6                                          | 9,0                                                        | 0,93                             |
| 11     | 30,0   | 150,0                              | 1,5 | 3,0                                                                        | 1,2                                          | 9,0                                                        | 2,18                             |
| 12     | 30,0   | 20,0                               | 1,5 | 3,0                                                                        | 1,2                                          | 3,0                                                        | 1,20                             |
| 13     | 37,5   | 85,0                               | 3,5 | 6,0                                                                        | 2,4                                          | 6,0                                                        | 16,21                            |
| 14     | 37,5   | 85,0                               | 3,5 | 6,0                                                                        | 2,4                                          | 6,0                                                        | 15,06                            |
| 15     | 37,5   | 85,0                               | 3,5 | 6,0                                                                        | 2,4                                          | 6,0                                                        | 16,13                            |
| 16     | 37,5   | 85,0                               | 3,5 | 6,0                                                                        | 2,4                                          | 6,0                                                        | 16,57                            |

De acordo com a Tabela 24, o melhor resultado de biomassa obtido foi no ensaio 7 (22,85 g L<sup>-1</sup>). Este valor foi muito próximo do valor obtido no ensaio 3 (21,51 g L<sup>-1</sup>), e em ambos utilizou-se a máxima concentração de permeado, pH 5,5 e temperatura de 30 °C. MULLER (2006) obteve um valor de 3,907 g L<sup>-1</sup> utilizando meio sintético, composto por glicose (10 g L<sup>-1</sup>), peptona de carne (2 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (2 g L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,6 g L<sup>-1</sup>), ureia (0,36 g L<sup>-1</sup>) e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,12 g L<sup>-1</sup>), em temperatura 30 °C, pH 3,0, em agitador incubador.

Tanto nesses ensaios (7 e 3), quanto no realizado por MULLER (2006), a temperatura de 30 °C foi a que obteve os melhores resultados de biomassa celular. Porém segundo LIONG (2011) a temperatura ideal para o crescimento dessa levedura é 37 °C, o que poderia ser o indicativo das elevadas concentrações também obtidas no ponto central, em que os ensaios foram realizados a temperatura de 37,5 °C. Acredita-se que essa temperatura, aliada as demais condições de máxima concentração de permeado (150 g L<sup>-1</sup>) e pH 5,5, poderiam gerar resultados ainda melhores para a produção de biomassa celular utilizando este micro-organismo.

Outras observações podem ser feitas comparando os ensaios entre si, com exceção das análises do ponto central.

Ao se comparar todos os experimentos utilizando a temperatura de 45 °C, observa-se que independente das condições das outras variáveis nenhum ensaio obteve uma alta concentração de biomassa, sendo o maior valor encontrado de 4,79 g L<sup>-1</sup> (ensaio 6) em que a concentração de permeado utilizada foi de 150 g L<sup>-1</sup> e o pH 5,5. E, utilizando a temperatura de 30 °C, os menores valores obtidos foram utilizando o pH 1,5 (ensaios 9, 11 e 12), indicando que baixos valores de pH também não favorecem o crescimento microbiano.

Os ensaios utilizando-se 20 g L<sup>-1</sup> de permeado também obtiveram baixos valores de biomassa, independente da temperatura e pH utilizados (ensaios 1, 4, 8, 9, 10 e 12).

Analisando os ensaios utilizando pH 5,5, observa-se que, com exceção do ensaio 1, todos os outros ensaios obtiveram os melhores resultados de biomassa celular cabe lembrar que não está sendo comparado com as análises do ponto central).

Comparando o ensaio 1 com o ensaio 4 os quais possuem as mesmas condições de temperatura (45 °C), concentração de permeado (20 g L<sup>-1</sup>) e pH (5,5), e possuem variação na concentração dos compostos nitrogênio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e fósforo (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), verifica-se que possivelmente esta variação na concentração de nitrogênio e fósforo tenham ocasionado a diferença nos resultados finais destes ensaios, diminuindo o valor de biomassa em relação aos ensaios do planejamento.

Os ensaios utilizando pH 1,5, com exceção do ensaio 2, foram os que obtiveram o menor valor de biomassa, indicando novamente que o pH influencia no resultado final dos ensaios.

O ensaio 2 obteve um maior valor de biomassa (3,52 g L<sup>-1</sup>) que o ensaio 1 (2,12 g L<sup>-1</sup>), em que foi utilizado pH 5,5. Ao se comparar o ensaio 2 com o ensaio 5, em que foram utilizadas as mesmas condições de temperatura (45 °C), concentração de permeado (150 g L<sup>-1</sup>) e pH (1,5), o ensaio 2 obteve maior valor de biomassa (3,52 g L<sup>-1</sup> para o ensaio 2 e 2,12 g L<sup>-1</sup> para o ensaio 5) e o que diferenciou os ensaios foi a concentração de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), indicando que este composto também pode influenciar no resultado final dos resultados.

E, por fim, comparando os ensaios com os melhores resultados, ensaio 3 e 7, observa-se que a diferença entre os eles está na concentração de nitrogênio, magnésio e fósforo, indicando que a sua variação pode ter ocasionado um aumento ou diminuição no resultado final de biomassa celular.

A Tabela 25 apresenta os valores de p-valor, o coeficiente das variáveis, o erro padrão e o coeficiente de determinação para o planejamento.

Tabela 25- Tabela dos coeficientes de regressão - resposta à biomassa para o planejamento Plackett-Burman, ao nível de 95% de confiança, da levedura *S. boulardii*.

| Variável                                                                | p-valor  | Coef.    | Erro     |
|-------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| Intercepto                                                              | 0,000015 | 8,51880  | 0,162717 |
| T (°C)                                                                  | 0,000335 | -3,50837 | 0,375779 |
| [permeado] (g L <sup>-1</sup> )                                         | 0,000354 | 3,44449  | 0,375779 |
| pH                                                                      | 0,000186 | 4,27374  | 0,375779 |
| [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> ) | 0,56030  | 0,57049  | 0,375779 |
| [MgSO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> )                               | 0,113321 | 0,41662  | 0,375779 |
| [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> )                 | 0,81351  | -0,48589 | 0,375779 |

R<sup>2</sup> = 52,90%

De acordo com a Tabela 25, as variáveis temperatura, concentração de permeado e pH apresentam o valor de p<0,05, sendo estas as variáveis significativas.

O comportamento desse processo pode ser expresso pela equação do modelo, conforme Equação 6:

$$\begin{aligned}
 \text{Biomassa celular} \left( \frac{g}{L} \right) \\
 = 8,51880 - 3,50837 \cdot T + 3,44449 \cdot [\text{permeado}] + 4,27374 \cdot pH
 \end{aligned} \quad (6)$$

A Figura 12 apresenta o Gráfico de Pareto, em que é possível observar que o pH tem maior influência no processo, seguido da temperatura e, por fim, da concentração de permeado. A influência da temperatura é negativa, e da concentração de permeado

e pH é positiva, sendo necessário diminuir a temperatura e aumentar as outras duas variáveis para uma maior obtenção da biomassa celular.

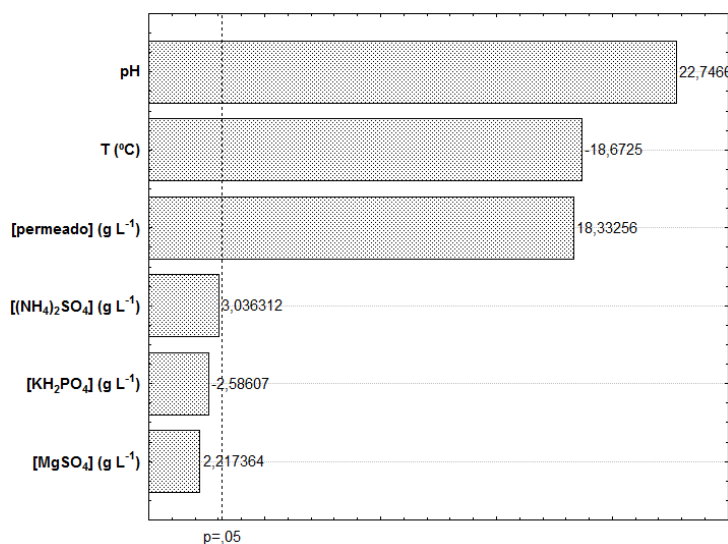
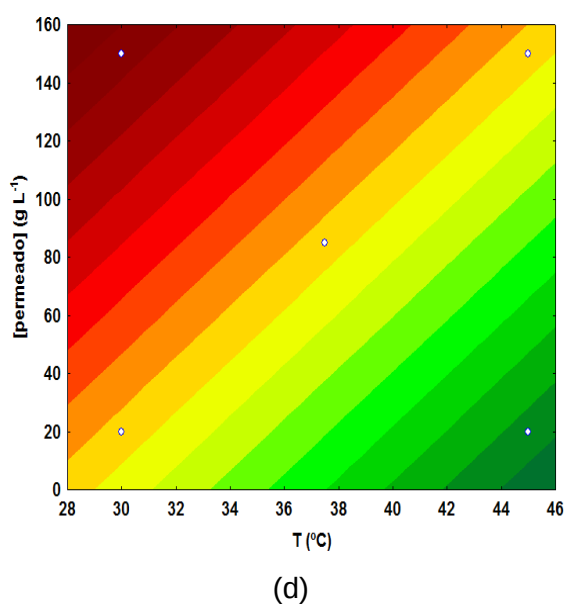
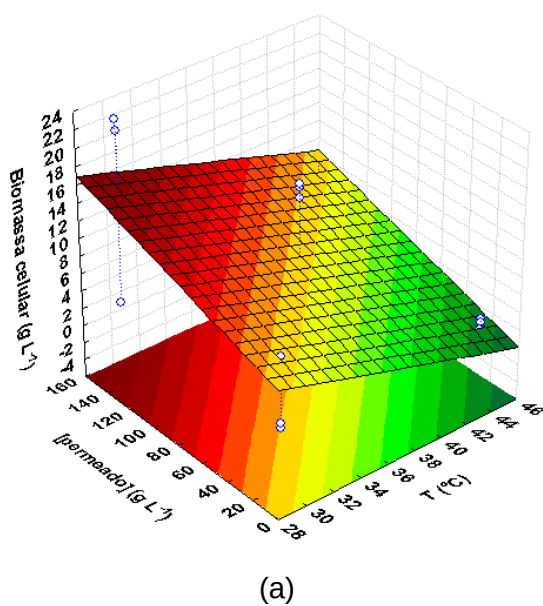


Figura 12 - Gráfico de Pareto obtido no planejamento Plackett-Burman para a fermentação da levedura *S. boulardii*.

As superfícies de resposta para as variáveis significativas estão apresentadas nas Figuras 13 (a), (b) e (c) e curvas de nível estão nas Figuras 13 (d), (e) e (f).



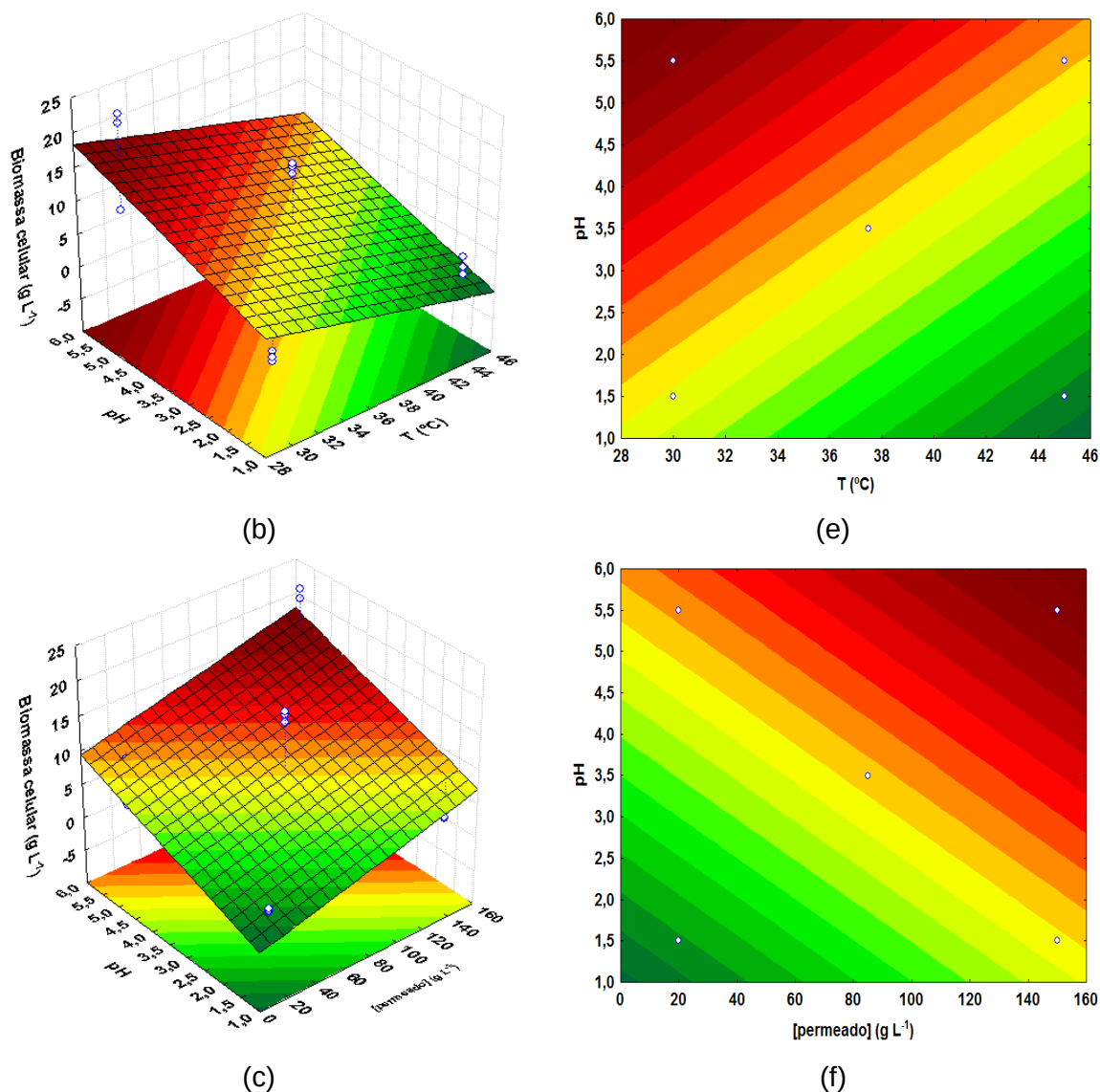


Figura 13 - Superfície de resposta, (a) T x [permeado]; (b) T x pH; (c) [permeado] x pH; Curva de nível, (d) T x [permeado]; (e) T x pH e (f) [permeado] x pH.

Observa-se nas superfícies de respostas (Figura 13 (a), (b) e (c)) que a concentração de biomassa celular é favorecida com o aumento da concentração de permeado e pH e com a diminuição da temperatura.

As Figuras 14 (a) e (b) apresentam o resultado das curvas de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) e, acompanhamento do pH, ao longo do tempo de fermentação, com a melhor condição (ensaio 7) e com o ensaio preliminar contendo apenas permeado de soro de queijo (apresentado no item 4.3.1). Nestes ensaios a fonte de carbono também é proveniente do permeado previamente hidrolisado.

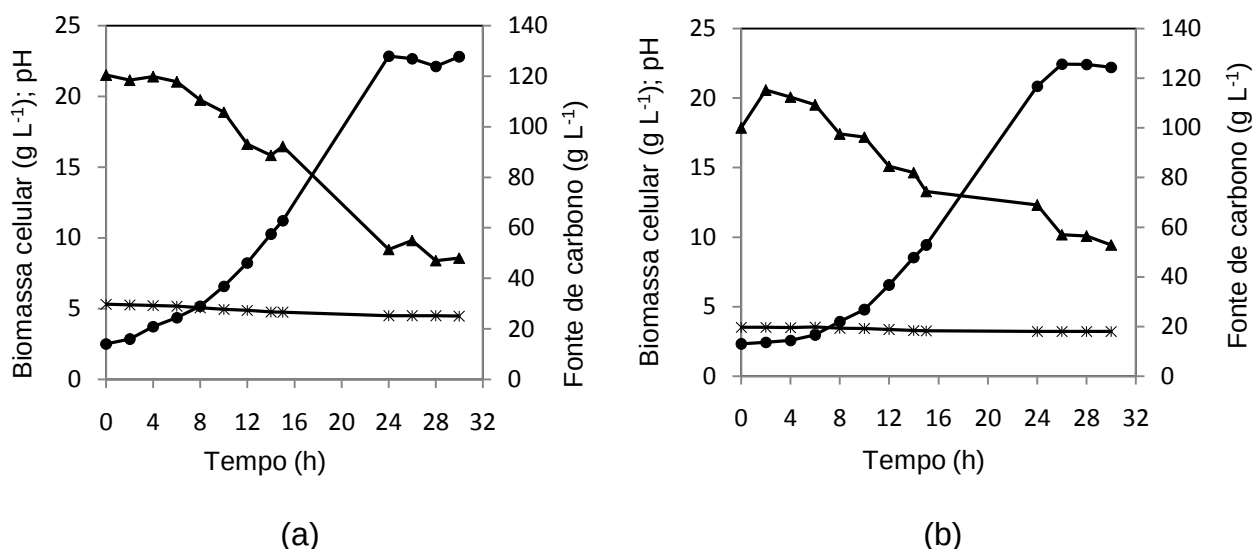


Figura 14 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) (▲), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) (■) e pH (x) ao longo do tempo de fermentação: (a) Ensaio 7 (T 30 °C, [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>, pH 5,5, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 9 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 1,2 g L<sup>-1</sup> e [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 9 g L<sup>-1</sup>); (b) T 30 °C, pH 5; [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>.

De acordo com as Figuras 14 (a) e (b), é possível observar que ocorre o consumo da fonte de carbono de cerca de 70 g L<sup>-1</sup> no ensaio 7 e 30 g L<sup>-1</sup> no ensaio contendo apenas permeado.

Com esses resultados, observa-se que não se obteve o máximo de aproveitamento do resíduo para a levedura *S. bouldarii*. Possivelmente os demais nutrientes adicionados no meio tenham sido consumidos em sua totalidade, não havendo mais nitrogênio, magnésio e fósforo para dar continuidade à síntese celular e, consequentemente, metabolizar a fonte de carbono. Outra hipótese é a produção de etanol e metabólitos secundários, os quais provocam toxicidade à célula, causando inibição do crescimento celular. Assim como na *S. cerevisiae*, não foram realizadas análises de etanol e componentes individuais.

Porém, observando a formação de biomassa celular (Figuras 14 (a) e (b)), a razão entre os dois ensaios foi aproximadamente 1, ou seja, praticamente não houve maior crescimento no meio suplementado com sais, o que possivelmente pode indicar que o crescimento celular tenha cessado devido a produção de etanol ou outros metabólitos secundários, ou a proporção inadequada entre a relação carbono/nitrogênio, tenha desfavorecido o processo.



Os valores de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), produtividade ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), conversão de substrato em célula ( $Y(x/s)$  ( $\text{g g}^{-1}$ )), velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ) e substrato metabolizado ( $\text{g L}^{-1}$ ), para o tempo de 24 h, estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Resultados de biomassa, produtividade, conversão de substrato em célula, velocidade específica de crescimento e substrato metabolizado, para a levedura *S. boulardii*.

| Ensaio | Biomassa<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | Produtividade<br>( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) | Conversão de<br>substrato em<br>célula ( $Y(x/s)$ )<br>( $\text{g g}^{-1}$ ) | $\mu$<br>( $\text{h}^{-1}$ ) | Substrato<br>metabolizado<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) |
|--------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1      | 2,12                              | 0,027                                                | 0,075                                                                        | 0,014                        | 8,59                                               |
| 2      | 3,52                              | 0,019                                                | 0,006                                                                        | 0,029                        | 78,42                                              |
| 3      | 21,51                             | 0,777                                                | 0,226                                                                        | 1,058                        | 82,49                                              |
| 4      | 1,78                              | 0,029                                                | 0,220                                                                        | 0,101                        | 3,21                                               |
| 5      | 1,97                              | 0                                                    | 0,002                                                                        | 0,017                        | 2,37                                               |
| 6      | 4,79                              | 0,111                                                | 0,394                                                                        | 0,192                        | 6,80                                               |
| 7      | 22,85                             | 0,847                                                | 0,295                                                                        | 1,187                        | 68,98                                              |
| 8      | 8,75                              | 0,330                                                | 0,929                                                                        | 0,339                        | 8,52                                               |
| 9      | 0,71                              | 0                                                    | 0                                                                            | 0,045                        | 5,07                                               |
| 10     | 0,93                              | 0                                                    | 0,160                                                                        | 0,007                        | 0                                                  |
| 11     | 2,18                              | 0,001                                                | 0,004                                                                        | 0,009                        | 7,32                                               |
| 12     | 1,20                              | 0                                                    | 0                                                                            | 0,011                        | 0,36                                               |
| 13     | 16,21                             | 0,485                                                | 0,310                                                                        | 1,264                        | 37,58                                              |
| 14     | 15,06                             | 0,439                                                | 0,270                                                                        | 0,643                        | 39,08                                              |
| 15     | 16,13                             | 0,502                                                | 0,346                                                                        | 0,630                        | 34,82                                              |
| 16     | 16,57                             | 0,505                                                | 0,369                                                                        | 0,609                        | 32,81                                              |
| 17*    | 20,86                             | 0,773                                                | 0,597                                                                        | 1,169                        | 31,08                                              |

\* Ensaio contendo apenas permeado de soro de queijo.

O maior valor de produtividade foi obtido no ensaio 7 ( $0,847 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), enquanto o ensaio contendo apenas permeado de soro de queijo como meio de cultivo obteve  $0,773 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  de produtividade.

Ao observar o valor de conversão de substrato em célula verifica-se que o ensaio 8 foi o que obteve a maior conversão ( $0,929 \text{ g g}^{-1}$ ).

Os valores médios de produtividade e conversão de substrato em célula obtidos por MULLER (2006) foram de  $0,303 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  e  $0,382 \text{ g g}^{-1}$ , utilizando biorreator *air-lift* 1,0 vvm, 1,5 vvm e agitador incubador.

#### 4.3.3.3 *Kluyveromyces marxianus* – Resultados Planejamento experimental

Cabe lembrar que o estudo com a levedura *K. marxianus* foi realizado por esta levedura possuir capacidade de metabolizar a lactose presente no substrato (permeado de soro de queijo) sem necessidade de realização da etapa de hidrólise.

Na Tabela 27 estão apresentados os níveis reais do planejamento e os melhores resultados de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) obtidos com a sua aplicação (planejamento Plackett-Burman) para esta levedura. O tempo foi fixado em 26 h de fermentação.

Os resultados obtidos para a biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) e acompanhamento do pH, ao longo do tempo de fermentação, para todos os ensaios realizados com a levedura *K. marxianus* estão apresentados no anexo C (Fig. 52 - 68).

Tabela 27- Matriz do planejamento Plackett-Burman para a levedura *K. marxianus*.

| Ensaio | T (°C) | [permeado]<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | pH  | $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | $[\text{MgSO}_4]$<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | Biomassa<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) |
|--------|--------|-------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------|
| 1      | 45,0   | 20,0                                | 6,5 | 2,0                                                     | 0,9                                        | 1,0                                                 | 2,48                              |
| 2      | 45,0   | 150,0                               | 3,5 | 15,0                                                    | 0,9                                        | 1,0                                                 | 4,14                              |
| 3      | 30,0   | 150,0                               | 6,5 | 2,0                                                     | 2,5                                        | 1,0                                                 | 16,90                             |
| 4      | 45,0   | 20,0                                | 6,5 | 15,0                                                    | 0,9                                        | 4,0                                                 | 4,75                              |
| 5      | 45,0   | 150,0                               | 3,5 | 15,0                                                    | 2,5                                        | 1,0                                                 | 5,03                              |
| 6      | 45,0   | 150,0                               | 6,5 | 2,0                                                     | 2,5                                        | 4,0                                                 | 7,33                              |
| 7      | 30,0   | 150,0                               | 6,5 | 15,0                                                    | 0,9                                        | 4,0                                                 | 15,70                             |
| 8      | 30,0   | 20,0                                | 6,5 | 15,0                                                    | 2,5                                        | 1,0                                                 | 5,65                              |
| 9      | 30,0   | 20,0                                | 3,5 | 15,0                                                    | 2,5                                        | 4,0                                                 | 6,65                              |
| 10     | 45,0   | 20,0                                | 3,5 | 2,0                                                     | 2,5                                        | 4,0                                                 | 3,75                              |
| 11     | 30,0   | 150,0                               | 3,5 | 2,0                                                     | 0,9                                        | 4,0                                                 | 10,97                             |
| 12     | 30,0   | 20,0                                | 3,5 | 2,0                                                     | 0,9                                        | 1,0                                                 | 5,30                              |
| 13     | 37,5   | 85,0                                | 5,0 | 8,5                                                     | 1,7                                        | 2,5                                                 | 16,10                             |
| 14     | 37,5   | 85,0                                | 5,0 | 8,5                                                     | 1,7                                        | 2,5                                                 | 14,90                             |
| 15     | 37,5   | 85,0                                | 5,0 | 8,5                                                     | 1,7                                        | 2,5                                                 | 16,16                             |
| 16     | 37,5   | 85,0                                | 5,0 | 8,5                                                     | 1,7                                        | 2,5                                                 | 15,30                             |

De acordo com a Tabela 27, o ensaio 3 obteve o maior valor de biomassa celular ( $16,90 \text{ g L}^{-1}$ ). Os ensaios realizados na condição estipulada para o ponto central (ensaios 13, 14, 15 e 16) e para a condição proposta para o ensaio 7 também obtiveram resultados de biomassa celular elevados e bem próximos ao obtido no ensaio 3. Nos ensaios 3 e 7 a concentração de permeado, a condição de pH, e a temperatura utilizadas foram as mesmas, diferindo apenas nas concentrações de sais.

SILVEIRA *et al.* (2005) utilizaram permeado de soro de queijo na concentração de  $130 \text{ g L}^{-1}$ , temperatura  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , agitação de  $250 \text{ rpm}$ , e obtiveram uma concentração de  $10,33 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa utilizando a levedura *K. marxianus* UFV-3. Valor este inferior ao obtido neste estudo, possivelmente devido a falta de suplementação de sais no meio. Estes autores utilizando estas mesmas condições de meio e temperatura, porém com redução na agitação para  $40 \text{ rpm}$ , alcançaram  $4,06 \text{ g L}^{-1}$ .

SABRA *et al.* (2003), utilizando *Kluveromyces marxianus* CBS 6556 em meio contento soro de queijo, com aproximadamente  $45 \text{ g L}^{-1}$  de lactose sem suplementação, pH 6,0, temperatura  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e aeração constante de  $0,5 \text{ L min}^{-1}$ , obtiveram  $4,6 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa em 12 h de fermentação. Quando em meio contento soro de queijo suplementado com  $4 \text{ g L}^{-1}$  de uréia,  $5 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $1 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $10 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  de tiamina ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e  $10 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  de biotina ( $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ), pH 6,0, temperatura  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e aeração constante de  $0,5 \text{ L min}^{-1}$ , por 24 h, a produção foi de  $9,6 \text{ g L}^{-1}$ . Em ambos os testes realizados pelos autores a produção de biomassa foi inferior aos resultados obtidos neste estudo com substrato permeado de soro de queijo.

Referente aos resultados obtidos para o ponto central, onde a média de biomassa celular obtida foi de  $15,61 \text{ g L}^{-1}$ , valor este muito próximo aos obtidos nos ensaios 3 e 7, entretanto com condições testadas diferentes em sua totalidade das condições utilizadas nos ensaios 3 e 7. MURARI *et al.* (2013) utilizando *K. marxianus* 229 em soro de queijo com concentração inicial de aproximadamente  $58 \text{ g L}^{-1}$  de lactose, sem suplementação de nutrientes e temperatura  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , obtiveram  $6,45 \text{ g L}^{-1}$  de massa celular, em 10-12 h de fermentação, se compararmos o estudo realizado por SABRA *et al.* (2003) em temperatura de  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  onde conforme citado anteriormente estes autores obtiveram  $4,6 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa em 12 h de fermentação, comprova-se que uma elevação na temperatura possibilita o aumento na produção de biomassa

celular, justificando assim o resultado elevado também obtido neste estudo para a condição proposta no ponto central.

Segundo DINIZ (2009) e RECH (1998), a levedura *K. marxianus* pode crescer em temperaturas mais elevadas (40 - 45 °C), porém em nosso estudo, observa-se que, diferentemente do que é relatado na literatura em termos de temperatura, os ensaios utilizando a temperatura de 45 °C obtiveram os menores resultados de biomassa, ensaios 1, 2, 4, 5, 6 e 10.

A Tabela 28 apresenta os valores de p-valor, o coeficiente das variáveis, o erro padrão e o coeficiente de determinação para o planejamento.

Tabela 28- Tabela dos coeficientes de regressão - resposta à biomassa para o planejamento Plackett-Burman, ao nível de 95% de confiança, da levedura *K. marxianus*.

| Variável                                                                | p-valor  | Coef.    | Erro     |
|-------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| Média/Intercepto                                                        | 0,000009 | 9,44437  | 0,153536 |
| T (°C)                                                                  | 0,000548 | -2,80588 | 0,354576 |
| [permeado] (g L <sup>-1</sup> )                                         | 0,000669 | 2,62451  | 0,354576 |
| pH                                                                      | 0,004117 | 1,41348  | 0,354576 |
| [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> ) | 0,109215 | -0,40016 | 0,354576 |
| [MgSO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> )                               | 0,423254 | 0,16397  | 0,354576 |
| [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] (g L <sup>-1</sup> )                 | 0,020102 | 0,80349  | 0,354576 |

$$R^2 = 47,62\%$$

De acordo com a Tabela 28, as variáveis com valor de  $p < 0,05$  (significativas para este processo) são: temperatura, concentração de permeado, pH e concentração de fosfato de potássio monobásico.

O comportamento desse processo pode ser expresso pela equação do modelo, conforme Equação .

$$\begin{aligned}
 \text{Biomassa celular } \left(\frac{g}{L}\right) &= 9,44437 - 2,80588 \cdot T + 2,62451 \cdot [\text{permeado}] + 1,41348 \cdot \text{pH} \\
 &+ 0,80349 \cdot [\text{KH}_2\text{PO}_4] \quad (7)
 \end{aligned}$$

A Figura 15 apresenta o Gráfico de Pareto com as variáveis significativas.

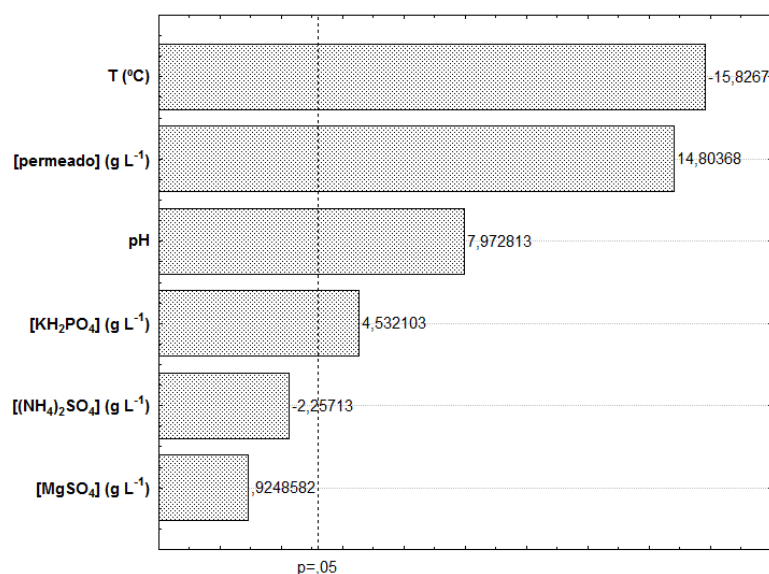
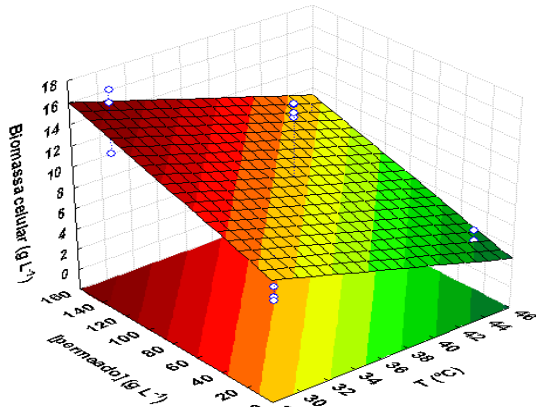


Figura15 - Gráfico de Pareto do planejamento Plackett-Burman para a levedura *K. marxianus*.

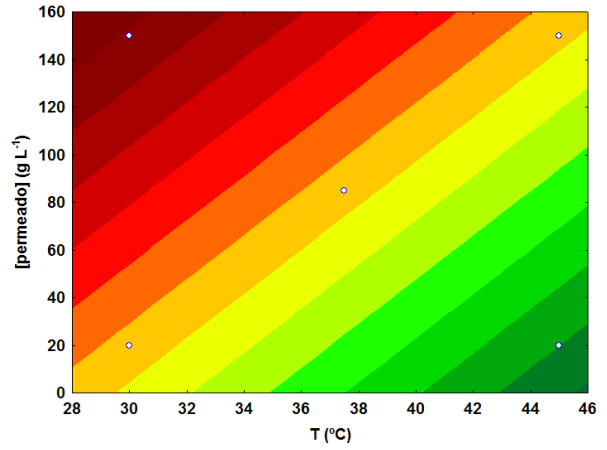
O Gráfico de Pareto (Figura 15) apresenta um resultado que difere da literatura (HUGHES, 1984; WATSON, 1987; BANAT *et al.*, 1992; BELEM & LEE, 1998; RECH, 1998; SILVEIRA, 2006) pois a temperatura exerce um efeito negativo, ou seja para se obter um melhor rendimento deve-se diminuir o valor deste parâmetro, enquanto o valor de pH e concentração de permeado devem ser mantidos mais elevados.

Nos estudos de RECH (1998) foram testadas as temperaturas 30 e 37 °C, utilizando soro de queijo (70 g L<sup>-1</sup>) sem suplementação, com suplementação de ureia (1%) e suplementado com extrato de levedura (1%), pH de 4,5 e 5,5 para duas coleções de *K. marxianus* (CBS 712 e CBS 6556). Observou-se nos resultados que houve influência do meio de cultivo e do pH, entretanto, para as duas cepas testadas, a temperatura não influenciou na produção de biomassa. O resultado obtido com as melhores condições (pH 5,5 e meio suplementado com extrato de levedura 1%, T 30 ou 37 °C) foi de aproximadamente 10 g L<sup>-1</sup>. Comprovando novamente que para as condições testadas nos ensaios 3, 7 e ponto central a temperatura a faixa de temperatura de 30 - 37,5 °C não foi o fator que influenciou de forma significativa na produção de biomassa, e sim os demais parâmetros.

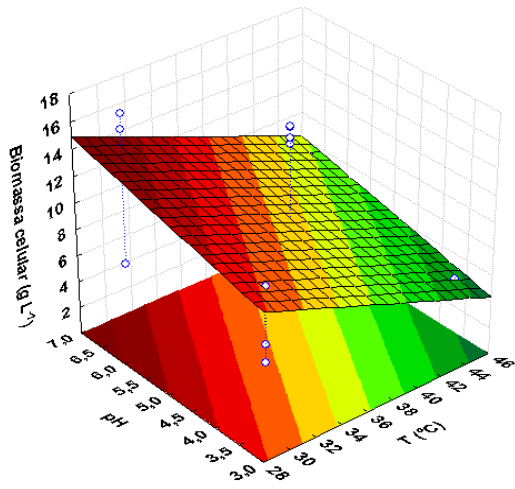
As superfícies de resposta e curvas de nível para as variáveis significativas estão apresentadas nas Figuras 16 (a), (b), (c), (d), (e) e (f), e as curvas de nível estão nas Figuras 16 (g), (h), (i), (j), (l) e (m).



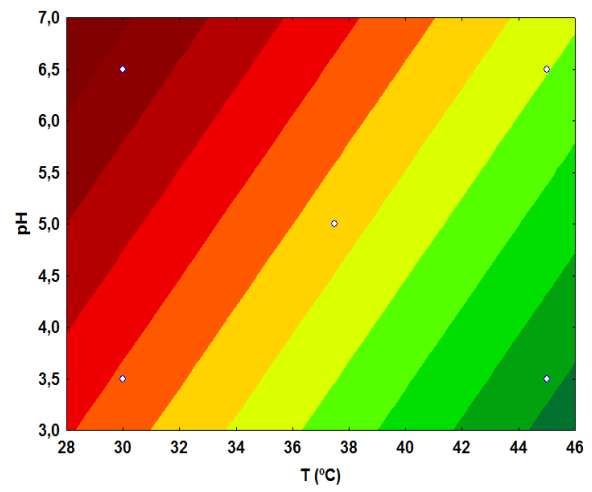
(a)



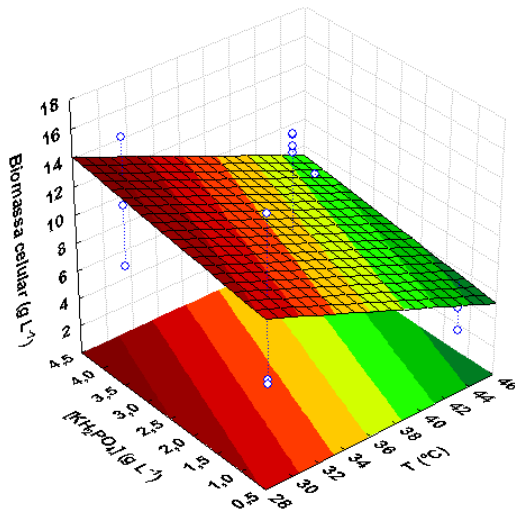
(g)



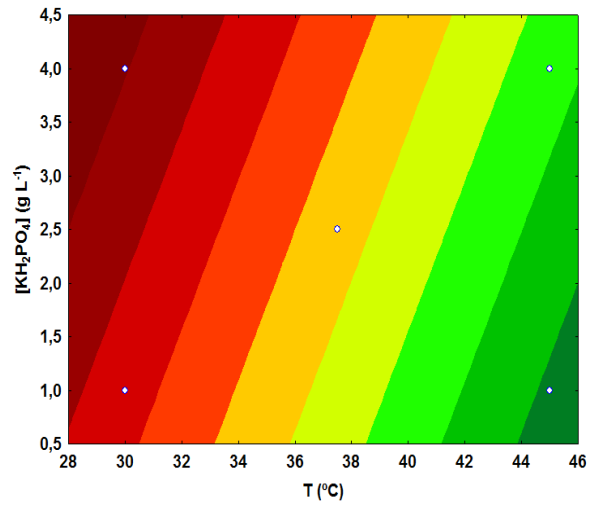
(b)



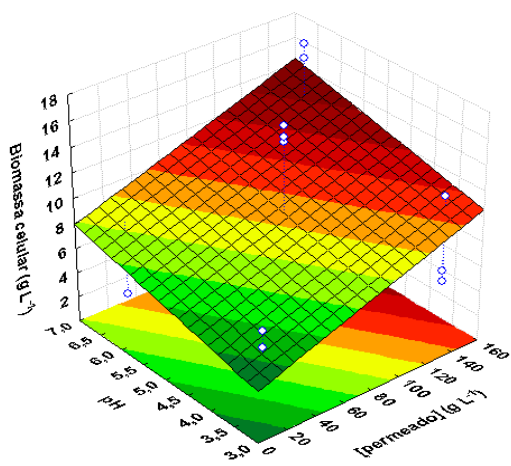
(h)



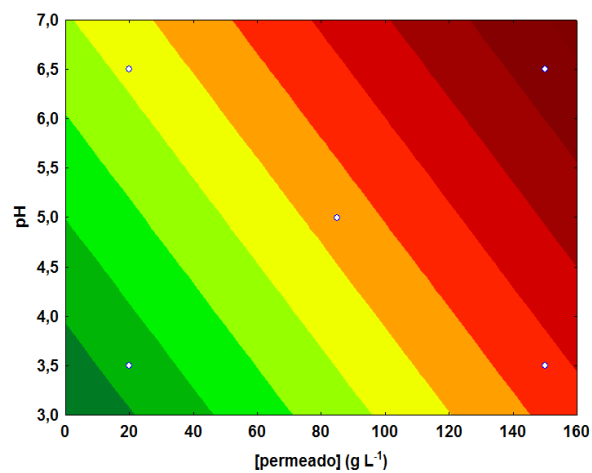
(c)



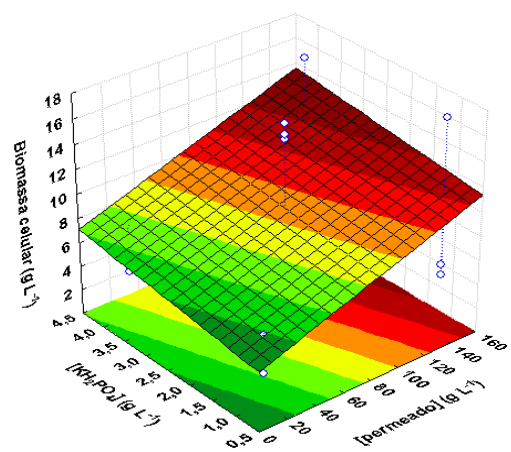
(i)



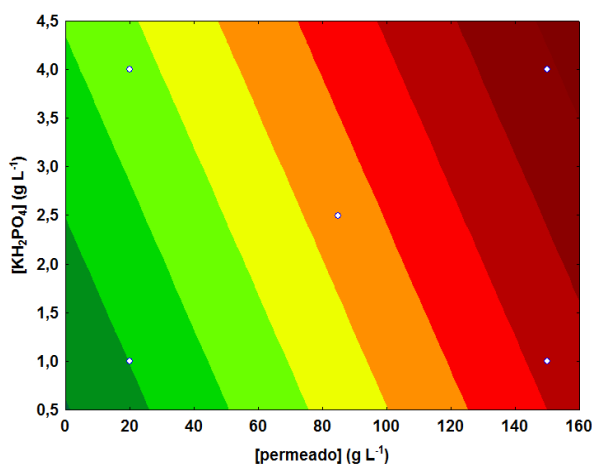
(d)



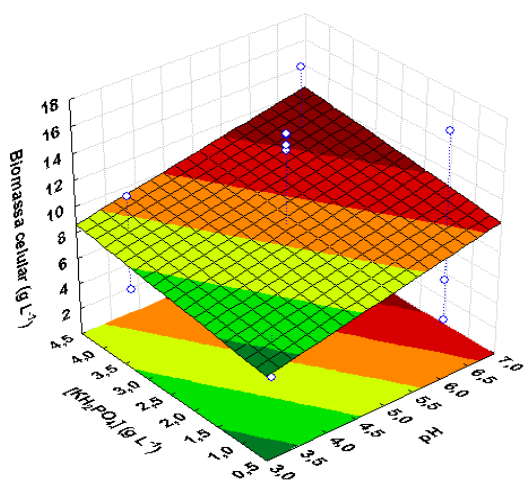
(j)



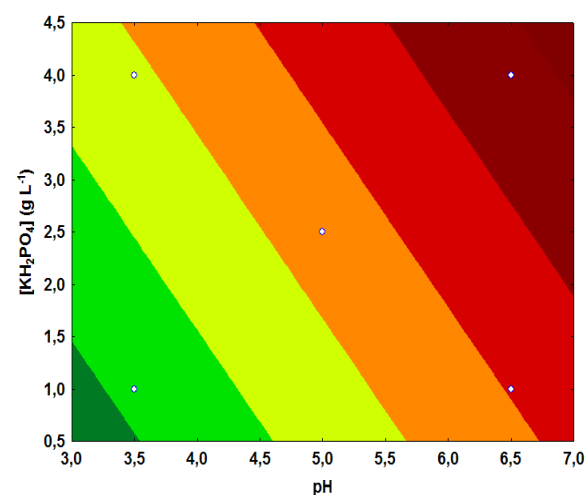
(e)



(l)



(f)



(m)

Figura 16 - Superfície de resposta, (a) T x [permeado]; (b) T x pH; (c) T x  $[KH_2(PO_4)]$ ; (d) [permeado] x pH; (e) [permeado] x  $[KH_2(PO_4)]$ ; (f) pH x  $[KH_2(PO_4)]$ ; Curva de nível, (g) T x [permeado]; (h) T x pH; (i) T x  $[KH_2(PO_4)]$ ; (j) [permeado] x pH; (l) [permeado] x  $[KH_2(PO_4)]$ ; (m) pH x  $[KH_2(PO_4)]$ .

Observa-se pelas Figuras 13 (a), (b), (c), (d), (e) e (f), que aumenta-se o valor da biomassa celular aumentando-se os valores de concentração de permeado e pH e diminuindo-se o valor da temperatura.

As Figuras 17 (a) e (b) apresentam o resultado das curvas de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) e acompanhamento do pH, ao longo do tempo de fermentação, com a melhor condição (ensaio 3) e com o ensaio preliminar contendo apenas permeado de soro de queijo (apresentado no item 4.3.1).

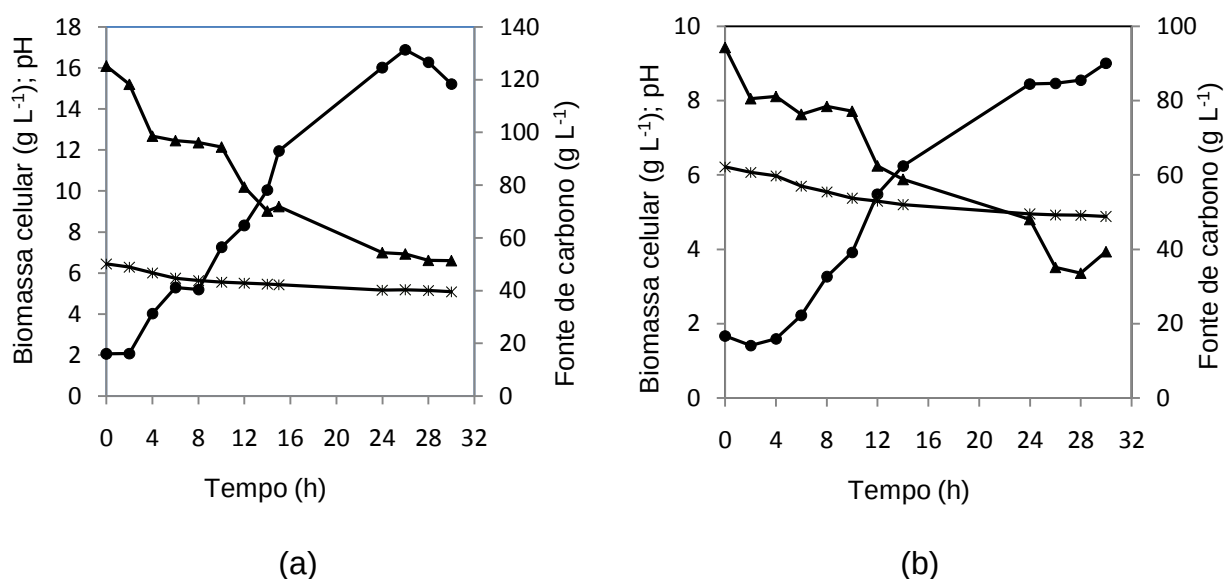


Figura 17 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: (a) Ensaio 3 (T 30 °C, [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ , pH 6,5,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  2,5  $\text{g L}^{-1}$  e  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$ ); (b) T 30 °C, pH 5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ .

De acordo com as Figuras 17 (a) e (b), observa-se um consumo gradativo da lactose ao longo do tempo. O consumo final de carbono obtido para o ensaio 3 foi de aproximadamente 57%, enquanto no ensaio contendo apenas permeado de soro de queijo foi próximo de 64%.

Esse mesmo comportamento, em que tem-se um cessar da produção de biomassa sem ter-se escassez de fonte de carbono já foi observado no crescimento de *S. cerevisiae* e *S. boulardii*, e as mesmas hipóteses são sugeridas, em que acredita-se este comportamento ocorrer em função da escassez dos demais nutrientes, relação inadequada entre carbono e nitrogênio que impossibilitem a continuidade na síntese celular, ou a ocorrência da produção de metabólitos tóxicos, como o etanol e outros ácidos orgânicos. Segundo GABARDO (2011), GOLDEMBERG (2009) e SILVEIRA *et*



al. (2005) em elevadas concentrações de fonte de carbono e limitação da oxigenação do meio favorecem o metabolismo de produção de etanol, e, para todas as leveduras em estudo, esse componente pode tornar-se tóxico.

Ainda analisando as Figuras 14 (a) e (b), tem-se que a biomassa celular obtida no ensaio 3 (16,90 g L<sup>-1</sup>) foi quase duas vezes maior que no ensaio contendo apenas permeado de soro de queijo (8,47 g L<sup>-1</sup>), o que indica que a adição de sais no meio de favorece a produção de biomassa. Apesar de apenas a fonte de nitrogênio ter ficado muito próxima de gerar uma influencia no processo, acredita-se que com novos estudos com outras faixas de concentração, os demais parâmetros poderão vir a apresentar influencia no crescimento desta levedura.

A Tabela 29 apresenta os valores de biomassa (g L<sup>-1</sup>), produtividade (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), conversão de substrato em célula (Y(x/s)) (g g<sup>-1</sup>), velocidade específica de crescimento (h<sup>-1</sup>) e substrato metabolizado (g L<sup>-1</sup>) obtidos para todos os ensaios no tempo de 24 h.

Tabela 29 - Resultados de biomassa, produtividade, conversão de substrato em célula, velocidade específica de crescimento e substrato metabolizado, para a levedura *K. marxianus*.

| Ensaio | Biomassa<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Produtividade<br>(g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | Conversão de<br>substrato em<br>célula (Y(x/s))<br>(g g <sup>-1</sup> ) | μ<br>(h <sup>-1</sup> ) | Substrato<br>metabolizado<br>(g L <sup>-1</sup> ) |
|--------|----------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------|
| 1      | 2,48                             | 0,091                                                 | 0,246                                                                   | 0,102                   | 9,63                                              |
| 2      | 4,14                             | 0,134                                                 | 0,060                                                                   | 0,251                   | 57,91                                             |
| 3      | 16,90                            | 0,571                                                 | 0,208                                                                   | 0,782                   | 71,27                                             |
| 4      | 4,75                             | 0,161                                                 | 0,295                                                                   | 0,526                   | 14,19                                             |
| 5      | 5,03                             | 0,152                                                 | 0,113                                                                   | 0,252                   | 35,10                                             |
| 6      | 7,33                             | 0,111                                                 | 0,067                                                                   | 0,226                   | 43,20                                             |
| 7      | 15,70                            | 0,532                                                 | 0,201                                                                   | 0,746                   | 68,91                                             |
| 8      | 5,65                             | 0,197                                                 | 0,416                                                                   | 0,264                   | 12,33                                             |
| 9      | 6,65                             | 0,221                                                 | 0,487                                                                   | 0,244                   | 11,79                                             |
| 10     | 3,75                             | 0,123                                                 | 0,243                                                                   | 0,342                   | 13,18                                             |
| 11     | 10,97                            | 0,395                                                 | 0,426                                                                   | 0,390                   | 24,11                                             |
| 12     | 5,30                             | 0,193                                                 | 0,406                                                                   | 0,348                   | 12,39                                             |
| 13     | 16,10                            | 0,544                                                 | 0,252                                                                   | 0,841                   | 56,18                                             |
| 14     | 14,90                            | 0,498                                                 | 0,209                                                                   | 0,939                   | 61,92                                             |
| 15     | 16,16                            | 0,541                                                 | 0,246                                                                   | 0,910                   | 57,11                                             |
| 16     | 15,30                            | 0,521                                                 | 0,226                                                                   | 0,916                   | 60,01                                             |
| 17*    | 8,47                             | 0,261                                                 | 0,114                                                                   | 0,400                   | 60,66                                             |

\* Ensaio contendo apenas permeado de soro de queijo.

O maior valor de produtividade foi obtido no ensaio 3. A condição central e ensaio 7 também apresentaram valores próximos ao ensaio 3. O meio contendo apenas permeado de soro de queijo (ensaio 17) mostrou um valor de produtividade cerca de 50% menor que o obtido nos ensaios acima citados, indicando novamente que somente o permeado de soro de queijo não é suficiente para a produção de biomassa e utilização máxima da fonte de carbono.

Considerando que as mesmas proporções de nitrogênio e carbono foram utilizadas nos ensaios 7 e no ponto central, e que em ambos os resultados para os coeficientes de conversão foram baixos (em torno de 0,20), sugere-se que metabólitos secundários e/ou etanol possam ter inibido a continuidade no aumento da biomassa. Essa hipótese pode ser vinculada ao similar valor de conversão alcançado no ensaio 3 (0,208), no qual, apesar de utilizar-se de uma razão C/N 7,5 vezes maior do que aquela utilizada no ensaio 7 não diferiu da concentração de biomassa celular produzida.

MURARI *et al.* (2013) obtiveram  $0,53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de produtividade utilizando soro de queijo como substrato (aproximadamente  $58 \text{ g L}^{-1}$  de lactose), e uma conversão de substrato a massa celular de  $0,12 \text{ g g}^{-1}$ , utilizando a linhagem *K. marxianus* 229.

Concluído esta etapa tem-se que, os resultados obtidos para *K. marxianus* utilizando o permeado como fonte de carbono demonstraram ser possível a produção de biomassa celular a partir do permeado de soro de queijo, tendo como vantagem principal a assimilação da fonte de carbono sem necessidade de hidrólise enzimática.

Assim como no estudo realizado para a *S. boulardii*, as condições ótimas de crescimento da *K. marxianus* obtidas nesse estudo são próximas às condições de geração do permeado industrialmente (T 30 °C, pH 6,5 e concentração de lactose aproximadamente  $135 \text{ g L}^{-1}$ ).

Para todas as leveduras em estudo, na melhor condição obtida não foi verificado o consumo completo da fonte de carbono, assim, optou-se por realizar novos ensaios utilizando as condições alcançadas até este momento, porém fazendo-se a adição de oxigênio ao meio.

#### **4.3.4 Adição de oxigênio**

De acordo com os autores SILVEIRA *et al.* (2005), GOLDEMBERG, (2009) e GABARDO (2011), a adição de oxigênio em um processo fermentativo favorece a produção de biomassa e diminui a formação de metabólitos secundários. Com o intuito de verificar o aumento da biomassa foram realizadas fermentações com a melhor condição obtida no planejamento Plackett-Burman para as três leveduras (condições descritas no item 3.5.6 (Tabela 9)).

Embora os maiores resultados de biomassa celular tenham sido obtidos com tempos diferenciados para cada levedura (*S. cerevisiae* = 26 h, *S. boulardii* = 24 h e *K. marxianus* = 26 h), a comparação entre as concentrações de biomassa celular com adição de oxigênio foi feita utilizando-se 30 h de fermentação para as três leveduras, cujos resultados são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Concentração de biomassa celular obtida para cada levedura com e sem adição de O<sub>2</sub>.

| Leveduras            | Biomassa (g L <sup>-1</sup> ) sem<br>adição de O <sub>2</sub> | Biomassa (g L <sup>-1</sup> ) com<br>adição de O <sub>2</sub> |
|----------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> | 11,99                                                         | 16,54                                                         |
| <i>S. boulardii</i>  | 22,79                                                         | 30,58                                                         |
| <i>K. marxianus</i>  | 15,23                                                         | 21,12                                                         |

Para todas as leveduras observou-se (Tabela 30) um aumento na produção de biomassa com a adição de oxigênio (1 vvm) ao meio, comprovando desta forma as citações observadas por SILVEIRA *et al.* (2005), GOLDEMBERG, (2009) e GABARDO (2011).

MULLER (2006), utilizando a levedura *S. boulardii* e adicionando 1,5 vvm de oxigênio ao meio, obteve 3,969 g L<sup>-1</sup> de concentração de células.

Após a análise dos resultados obtidos, nos ensaios preliminares, planejamentos experimentais, e experimentos envolvendo a adição de oxigênio, é possível concluir que as três leveduras utilizaram de forma satisfatória o permeado de soro de queijo como fonte de carbono para o seu crescimento.

Observa-se que a *S. cerevisiae*, que foi utilizada como micro-organismo padrão neste estudo, por ser uma levedura já amplamente estudada e seu metabolismo conhecido, foi a levedura que apresentou a menor produção de biomassa com permeado de soro de queijo.

A levedura *S. boulardii*, a qual não se tem relatos do seu crescimento em resíduos, apresentou os resultados mais elevados em relação a produção de biomassa celular a partir de permeado.

E a levedura *K. marxianus* também apresentou valores expressivos de produção de biomassa com este resíduo, possibilitando desta forma o seu uso não somente na produção de etanol, mas também na produção de biomassa celular.

#### **4.3.5. Análise da produção de etanol ao final do processo fermentativo para as três leveduras em estudo**

Com o intuito de verificar qual a concentração de etanol produzida, ao final dos ensaios realizados no item 4.3.4 (adição de O<sub>2</sub>), fez-se a quantificação deste parâmetro. Os valores obtidos de etanol para as três leveduras em % e g L<sup>-1</sup> encontram na Tabela 31.

Tabela 31 - Concentração de etanol obtida para cada levedura em % e em g L<sup>-1</sup>

| <b>Leveduras</b>     | <b>Etanol (%)</b> | <b>Etanol (g L<sup>-1</sup>)</b> |
|----------------------|-------------------|----------------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> | 2,88              | 28,8                             |
| <i>S. boulardii</i>  | 2,70              | 27,0                             |
| <i>K. marxianus</i>  | 5,21              | 52,1                             |

Observa-se pela Tabela 31 que a levedura *K. marxianus* produziu mais etanol quando comparada às outras leveduras estudadas.

Analisando os resultados de etanol obtidos para as três leveduras em estudo, observa-se que elas podem ser utilizadas também para a produção de etanol, além de biomassa celular, reforçando a potencialidade de utilização do permeado de soro de queijo como substrato em processo fermentativo.

#### **4.3.6 Análises do potencial de redução da DBO e DQO antes e após o processo fermentativo para as três leveduras**

O permeado de soro de queijo é um potencial poluidor por apresentar alta carga orgânica, identificados pelas análises de DBO e DQO, e se não for transformado em outros produtos, gera elevados custos para as empresas, pois o seu tratamento é oneroso (ALMEIDA, 2004; BALDASSO, 2009).

Com o objetivo de verificar a redução destes índices (DBO e DQO), análises de DBO e DQO foram realizadas antes de iniciar a fermentação e após as 30 h de experimento, para as condições utilizadas no item 3.5.6 (Tabela 9) para cada uma das leveduras, cujos resultados são apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 - Resultados de DBO e DQO antes e após cada fermentação para as leveduras *S. cerevisiae*, *S. boulardii* e *K. marxianus*.

|                                                | <i>S. cerevisiae</i> |         |         | <i>S. boulardii</i> |        |         | <i>K. marxianus</i> |         |         |
|------------------------------------------------|----------------------|---------|---------|---------------------|--------|---------|---------------------|---------|---------|
|                                                | Antes                | Após    | Red (%) | Antes               | Após   | Red (%) | Antes               | Após    | Red (%) |
| DQO<br>(mg L <sup>-1</sup> de O <sub>2</sub> ) | 164550,0             | 50500,0 | 69,31   | 214250,0            | 5000,0 | 97,67   | 125500,0            | 20675,0 | 83,53   |
| DBO<br>(mg L <sup>-1</sup> de O <sub>2</sub> ) | 25534,54             | 717,13  | 97,19   | 210178,8            | 993,01 | 99,53   | 20229,32            | 1391,33 | 93,14   |

Observa-se na Tabela 32 que as menores reduções obtidas foram nas análises de DQO para as leveduras *S. cerevisiae* e *K. marxianus*, com valores de 69,31% e 83,53%, respectivamente, enquanto para todos os demais resultados, houve uma redução de mais de 90% nestes índices, indicando desta forma a eficiência na redução do potencial poluidor deste resíduo quando aplicado em um processo fermentativo.

Com a redução dos valores de DBO e DQO há diminuição dos custos referente ao tratamento de efluente, e, ainda se tem a geração de um novo produto de maior valor agregado e qualidade nutricional, a biomassa de levedura ou também denominada biomassa celular.

## 5. CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

O estudo realizado com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces marxianus* indicou a possibilidade da utilização do permeado de soro de queijo como fonte de carbono em processo fermentativo para a produção de biomassa de leveduras, valorizando biotecnologicamente esse resíduo.

A melhor condição obtida para a hidrólise do permeado de soro de queijo no tempo de 180 min. foi utilizando 0,125% de enzima, temperatura 35 °C e pH 6,5, sendo estas condições favoráveis a sua aplicação na sequência de um processo industrial onde obtém-se o permeado de soro por ultrafiltração, uma vez que o pH é próximo do permeado *in natura*, não necessitando da adição de reagentes para a sua correção e a temperatura não sendo tão elevada em relação a de obtenção do permeado, o que gera uma economia para o processo.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada neste estudo como sendo um micro-organismo padrão para fins de comparação, obteve resultados satisfatórios de biomassa celular, tendo o modelo validado, dentro das faixas propostas, com um coeficiente de determinação de 87,91%.

Analisando os melhores resultados obtidos com as leveduras estudadas, observa-se que a levedura *Saccharomyces boulardii* foi a levedura que proporcionou uma maior produção de biomassa celular, e, destacando-se ainda por apresentar resultados de produção de biomassa elevados mesmo em meio sem suplementação de nutrientes, sendo o permeado de soro de queijo, um subproduto da indústria de laticínio, esta condição torna seu custo de produção extremamente baixo.

O resultado obtido pela levedura *Kluyveromyces marxianus* para a produção de biomassa, foi próximo do resultado encontrado pela levedura *S. cerevisiae*, sendo o maior destaque para esta levedura (*Kluyveromyces marxianus*) a elevada produção etanol a partir do permeado, e ainda a vantagem de metabolizar diretamente a lactose, não sendo necessária a hidrólise prévia do permeado.

Referente a adição de oxigênio ao meio fermentativo, observa que ocorre um aumento na produção de biomassa celular em relação ao processo sem adição, este comportamento foi observado para as três leveduras em estudo, o que comprova que há necessidade de aeração do meio para promover melhores resultados de obtenção de biomassa celular, utilizando o permeado como meio de cultivo.

Além da produção de biomassa celular, as análises de etanol demonstraram que as leveduras em estudo, podem também utilizar o permeado para essa finalidade.

Em relação a redução da carga orgânica, todas as leveduras testadas apresentaram redução de DQO e DBO, sendo a menor redução obtida para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com 69% para a DQO, seguida da *Kluyveromyces marxianus* com uma redução de 83% da DQO. A redução da DQO para a levedura *Saccharomyces boulardii* foi de 98%, e todos os resultados de DBO apresentaram uma redução de mais de 93%, comprovando desta forma que a utilização do permeado de soro em processo fermentativo, é uma maneira eficiente de se obter redução do potencial poluidor deste resíduo, tornando-o menos poluente, e oneroso o seu tratamento de efluente.

Conclui-se que o permeado de soro de queijo pode ser reutilizado em processos fermentativos como fonte de carbono, com o intuito de produzir biomassa celular, dando a este resíduo um destino mais nobre, e consequentemente minimizando o impacto ambiental causado, caso seja descartado inadequadamente.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O processo fermentativo utilizando leveduras tem sido utilizado por ser um processo economicamente viável e apresentar bons resultados em relação aos produtos formados. A utilização do permeado de soro de queijo é uma alternativa para o reaproveitamento desse resíduo altamente poluente, com a formação de produtos com maior valor agregado e alto teor nutricional, e consequente diminuição do seu potencial poluidor. Para isto sugere-se:

- Novos ensaios utilizando a levedura *S. boulardii*, utilizando concentrações menores de sais utilizados a fim de verificar qual a concentração mínima de sais necessária para o seu crescimento, tendo em vista que o crescimento desta levedura somente em permeado foi elevado.

- Utilizar concentrações maiores dos sais utilizando a levedura *S. cerevisiae*, a fim de obter melhores resultados de crescimento desta levedura, tendo assim um melhor reaproveitamento do resíduo, com uma maior assimilação da fonte de carbono;

- Novos ensaios com diferentes concentrações de sais utilizando a levedura *K. marxianus*, com o intuito de utilizar todo o potencial deste resíduo, tendo em vista que nem toda a fonte de carbono foi consumida em alguns ensaios;

- Em todos os novos ensaios analisar o resultado de etanol, pois, além da biomassa tem-se a formação deste produto;

- Realizar fermentações simultâneas com a enzima  $\beta$ -galactosidase, a fim de verificar a real necessidade de hidrolisar previamente o permeado, utilizando as leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii*.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. M.; NOUT, M. J. R. **Fermentation and food safety**. Ed. Aspen, 2001.

ALBUQUERQUE, P. M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã**. 2003. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ALMEIDA, E. dos S. **Tratamento do efluente da indústria de queijos por processos biológicos e químicos**. 2004. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ANDRADE, A. C. de. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

ANVARI, M.; KHAYATI, G. Submerged yeast fermentation of cheese whey for protein production and nutritional profile analysis. **Advance Journal of Food Science and Technology**. Rasht, v. 3, n. 2, p. 122-126, abr. 2011.

ARAÚJO, L. de F.; DIAS, M. V. C.; BRITO, E. A. de; JÚNIOR, S. O. Enriquecimento proteico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. **Tecnol. & Cien. Agropec.** João Pessoa, v. 3, n. 3, p. 47-53, set. 2009.

BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 179 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BALDASSO, C.; TESSARO, I. C. & RUVER, G. S. Desmineralização do soro de leite através da eletrodialise. In: SEMINÁRIO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA, 2009, Porto Alegre. **Anais...** VIII Oktoberforum – PPGEQ, 2009.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R.; SINGH, D.; McHALE, A. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations. Part I: Yeast in general. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 14, p. 809-821, 1998.

BARBOSA, A. dos S.; FLORENTINO, E. R.; FLORÊNCIO, I. M.; ARAÚJO, A. dos S. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Mossoró, v. 5, n. 1, p.07-25, jan - mar. 2010.

BARROS NETO B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos** - Aplicações na ciência e na indústria. 4.ed. Editora Bookman, 2010.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Oligossacharides extracted from cell wall of *Kluyveromyces marxianus lactis* cells. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 29, p. 506-512, 2001.

BELLAVER, L. H.; CARVALHO, N. M. B. de; ABRAHÃO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. Physiology of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 in terms of ethanol production and enzyme activities around Glucose-6-phosphate. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. **Anais...** 2003.

BOSCHI, J. R. **Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração**. 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BRONSTEIN, V.; MONTE ALEGRE, R. Estudo dos parâmetros da ultrafiltração de permeado de soro de queijo fermentado por *Lactococcus lactis subsp. lactis*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 18, n. 1, abr. 1998.

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

CARVALHO, G. B. M. de; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. de A. e. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte - as leveduras. **Revista Analytica**, n. 25, 2006.

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. **Anais...** Disponível em <<http://hdl.handle.net/1822/2241>> Acesso em 18 de dezembro de 2013.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, 2010.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa proteica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. Londrina, v. 26, n. 2, p. 105-112, jul/dez 2005.

COSTA, J. M. G. da. **Eficiência de diferentes encapsuladores e condições operacionais de secagem por atomização na produção e aplicação de micropartículas de biorama de queijo suíço**. 2013. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

COSTA, N. J. S.; MELO, G. F.; HILARIO, M. A. S.; GARCÊS, B. P.; OLIVEIRA, C. A. Inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando azul de metileno e dois sistemas de irradiação. In: 3º Congresso Brasileiro de Química, Recife. **Anais...** Disponível em <<http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/13/871-14260.html>> Acesso em 10 de julho de 2013.

COUTINHO, M. R. V.; SILVA, J. R. da; CUNHA, M. E. T. da; OLIVEIRA, A. N. de; LUVISOTTO, E.; SUGUIMOTO, H. H. Produção de etanol em soro de queijo por *Saccharomyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*. In: XVIII EAIC, 2009, Londrina. **Anais...** Disponível em: <<http://www.eaic.uel.br/artigos/CD/4506.pdf>> Acesso em 31 de julho de 2013.

DALGLEISH, D. G. **Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk**. Blackie Academic & Professional, 2. ed. London, 1997.

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

DOMINGUES, L. M. A. R.; **Estirpes floclulantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para a utilização da lactose: construção e aplicação biotecnológica**. 2011. 345 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química e Biológica, Universidade do Minho, Minho, 2011.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. **Novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo**. In: CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 6, Lisboa, 1999 - "Actas da 6.ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente". Lisboa : Universidade Nova de Lisboa, 1999. vol. 3, p.

271-280. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1822/3671>> Acesso em: 13 de março de 2013.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, Ed. John Wiley & Sons: Braga. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1822/1742>> Acesso em: 21 de março de 2013.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Evolução na produção de leite da Região Sul**. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/grafico02.54.php>>. Acesso em 28 de junho de 2013.

FARRO, P. C. A. **Ultrafiltração do soro de queijo minas frescal pré-tratado e microfiltrado: efeitos da vazão volumétrica e da pressão transmembrana no fluxo de permeado**. 2003. 148 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2003.

FILHO, W. G. V.; NOGUEIRA, A. M. P. **Aguardentes e Cachaças**. Universidade Estadual Paulista. 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.

FREIRE, L. Leveduras pequenas notáveis. **Revista Pet Food Brasil**, ano 3, ed. 15, p. 18-27, 2011.

GABARDO, S. **Otimização da bioconversão de lactose do soro de queijo em etanol em sistemas de biorreatores imobilizados**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Porto Alegre, 2011.

GABARDO, S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Bioconversão de permeado de soro de queijo a etanol em biorreatores contínuos com célula imobilizada. In: XII Oktoberforum - PPGEQ, Porto Alegre. **Anais...** Disponível em <[http://www.oktoberforum.ufrgs.br/sistemas/inscricao/uploads/artigos\\_2013/00542996081.pdf](http://www.oktoberforum.ufrgs.br/sistemas/inscricao/uploads/artigos_2013/00542996081.pdf)> Acesso em 10 de julho de 2013.

GARIB, C. C. **Alimentação balanceada: uma proposta alternativa de merenda escolar**. 2002. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B. da; FRIAS, J. R. G.. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**. Nobel, 2009.512 p.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. H. Hydrolisys of lactose - a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, n. 1, p.2-12, 1985.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009.

GONÇALVES, I. da M. **Influência de campos magnéticos na produção de glutatona por *Saccharomyces cerevisiae* em biorreator "Air lift" pressurizado**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

GOULART, R. C.; BARROTI, G.; AMOROSO, P.; MUSSOLINI, R. C.; SAMPAIO, R. M. Influência de Fontes de Nitrogênio na Produção de Ácido Cítrico por *Aspergillus niger* CCT 1904. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. **Anais...** 2003.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia 1 - Cultura de tecido vegetal**. Lab. Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal. CCA/UFSC.

HENSING, M. C. M.; ROUWENHORST, R. J.; HEIJNEN, J. J.; DIJKEN, J. P. van; PRONK, J. T. **Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts**. Antonio van Leeuwenhoek, Vlaardingen, v. 67, p.261-279, 1995.

HUGHES, D. B.; TUDROSZEN, N. J.; MOYE, C. J. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 6., p. 1-6, 1984.

**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 08 de outubro de 2013.

IMAMURA, J. K. N.; MADRONA, G. S. Reaproveitamento de soro de queijo na fabricação de pão de queijo. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 1, n. 3, p.381-390, 2008.

JEONG, H.; LEE, D.-H.; KIM, S. H.; KIM, H.-J.; LEE, K.; SONG, J. Y.; KIM, B. K.; SUNG, B. H.; PARK, J. C.; SOHN, J. H.; KOO, H. M.; KIM, J. F. Genome Sequence of the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555. **American Society for Microbiology**, Seul, v. 11, n. 12, p.1584-1585, 2012.

KHAN, M.; KHAN, S. S.; AHMED, Z.; TANVEER, A. Production of single cell protein from *Saccharomyces cerevisiae* by utilizing fruit wastes. **Nanobiotechnica Universale**, Bhopal, v. 1, n. 2, p.127-132, 2010.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: A taxonomic study**. 5 ed. Elsevier, 2011.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extraction of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 1, n. 2, p.7-13, 2012.

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, Dezembro, 2012, Concórdia, SC.

LIONG, M. T. **Probiotics: biology, genetics and health aspects**. 2011.

LISBOA, C. R.; COSTA, F. A. de A.; BURKERT, J. F. de M.; BURKERT, C. A. V. Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de lactose usando  $\beta$ -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 30-40, jan/mar 2012.

LIZIEIRE, R. S.; CAMPOS, O. F. de. **Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite**. Instrução Técnica 44 para o Produtor de Leite, ISSN nº 1518-3254, 2006.

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.

MANERA, A. P.; ORES, J. da C.; RIBEIRO, V. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 33, n. 2, p.155-161, 2011.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **IN 51**. Brasília, 2002. Disponível em: <[http://www.leite.pr.gov.br/arquivos/File/legislacao/Instr\\_Normativa\\_51.pdf](http://www.leite.pr.gov.br/arquivos/File/legislacao/Instr_Normativa_51.pdf)> Acesso em 21 de outubro de 2012.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução 065**. Brasília, 2005. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/resol\\_56\\_leite.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/resol_56_leite.pdf)> Acesso em 21 de outubro de 2012.

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.

MARTINS, F. dos S.; BARBOSA, F. H. F.; NICOLI, J. R. O probiótico *Saccharomyces boulardii*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 9, n. 2, p.171-182, 2009.

MAWSON, A. J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technol.**, v. 47, n.3, p. 195-203, 1994.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p.426-8, 1959.

MODESTI, C. de F.; CORRÊA, A. D.; OLVEIRA, E. D. de; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. dos. Caracterização de concentrado protéico de folhas de mandioca obtido por precipitação com calor e ácido. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 3, p.464-469, 2007.

MONACO, M. A. S. L. **Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2007.

MULLER, J. L. **Cultivo de *Saccharomyces boulardii* em biorreator tipo air-lift e em frascos agitados mecanicamente**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. da S.; LACERDA, L. L. V. de; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo airlift e shaker. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 4, p.688-693, 2007.

MURARI, C. S. MORAES, D. C.; BUENO, G. F.; BIANCHI, V. L. D. Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *kluveromyces marxianus* 229. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Torres**, Juiz de Fora, v. 68, n. 393, p. 42-50, jul/ago 2013.

NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J. R. F.; SPADOTI, L. M.; PIZAIA, P.; ROIG, S. M. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23(supl), p. 177-182, dez 2003.

NEUMANN, M.; OST, R.; PELLEGRINI, L. G. de; MELLO, S. E. G. de; SILVA, M. A. A. da; NÖRNBERG, J. L. Utilização de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) visando à produção de cordeiros Ile de France super precoces em sistema de *creep-feeding*. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p.2285-2292, Novembro 2008.

NEVES, L. C. M. das. **Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181**. 2003. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NETO, R. J. **Avaliação tecnológica e físico-química de queijo tipo minas frescal obtido a partir do leite concentrado por ultrafiltração**. 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J. C. Kinetic study oh continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for latic acid production. Canadá: Butterworth-Heinermann. **Enzyme Microb. Technol.** Vol 16, 1994.

OLIVEIRA M. C. L.; MOURA, J. P.; BENEDET H. D. Caracterização química e avaliação sensorial de bebida hidroeletrolítica fermentada obtida a partir de permeado de leite tipo C. **Revista Analytica**, n. 23, 2006.

OLIVEIRA, N. de O.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 1, 2002.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para produção de *A-amilases* por *Penicillium* sp. e caracterização da enzima. **Biociências, Biotecnologia e Saúde**, n. 1, 2011.

PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; FLORES, S. H.; JONG, E. V. de. Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Rev. Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 20, n. 2, p.231-239, 2009.



PAULA, J. C. J. de; CARVALHO, A. F. de; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista Inst. Latic. "Candido Tostes"**, Juiz de Fora, v. 64, n. 367/368, p.19-25, 2009.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**. 2 ed. v. 2, Afiliada, 1996.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspecto químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quím. Nova**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p.293-300, 2004.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. **The design of optimum multifactorial experiments**, Biometrika 33 (1946) 305–325.

PRESCOTT, L. M. **Microbiology**, The McGraw–Hill Companies, 2002.

PRUDÊNCIO, E. S.; BENEDET, H. D. Avaliação do uso de soro de queijo para a obtenção de extrato protéico de soja. **Rev. Alim. Nutr.**, São Paulo, v. 12, p.27-32, 2001.

PULZATTO, M. E. **Fatores que influem na obtenção de biomassa de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) da fermentação alcoólica**. 2000. 131 f. Tese (Doutorado) - Curso Tecnologia em Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus***. 1998. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

RIBEIRO, E. P. **Aplicação de ultrafiltração de leite no processo de fabricação de queijo prato**. 1996. 159 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

RIBEIRO, H. S. **Obtenção e aplicação de concentrado proteico de soro de leite bovino em produtos cárneos**. 2001. 259 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência da Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2001.

RIBEIRO, E. C. B.; RODRIGUES, I.C. Desenvolvimento de produtos diferenciados como estratégia empresarial: um estudo de caso da produção de queijos finos. In: XII SIMPEP, 2005, Bauru. **Anais...** Disponível em <<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:W52cdMpQKAAJ:www.simpe>

p.feb.unesp.br/anais/anais\_12/copiar.php%3Farquivo%3DRibeiro\_ECB\_Desenvolvime  
ntodep.pdf+&cd=15&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br> Acesso em 23 de setembro de 2013.

ROCHA, S. N. **Expressão e secreção de proteínas heterólogas em leveduras do gênero *Kluyveromyces***. 2010. 179 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RODRIGUES, R. C., **Condições de cultura para a produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos**. Florianópolis: 2005, 100 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

ROSA, L. S. da; QUEIROZ, M. I.; AUGUSTO, M. M. M. Estudo da pré-fermentação e ultrafiltração nas características físico-químicas do queijo tipo prato. **Rev. Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 21, n. 1, p.119-128, 2010.

ROSS. R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, Cork, v. 79, p.3-16, 2002.

SABRA. G.; ESPOSITO, E.; SILVA, L. C. P.; ALMEIDA, E.; DURÁN, N. Suplementação de nutrientes para produção de biomassa a partir do soro de queijo. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. **Anais...** 2003.

SANTOS, A. M. dos. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

SANTOS, K. C. dos; SILVA, A.C. da; NASCIMENTO, A. do; FREITAS, A. P. D. de; FREITAS, J. J. R. de; LIMA, R. da S.; MEDEIROS JUNIOR, A. G. de; LIMA, V. A. M.; FREITAS FILHO, J. R. de. Avaliação das condições higiênicas e da qualidade físico-química e microbiológica de queijos comercializados na cidade de Garanhuns/PE. In: 3º Congresso Químico do Brasil, 2008, São Luiz. **Anais...** Disponível em <<http://www.annq.org/congresso2008/resumos/Resumos/T10.pdf>> Acesso em 25 de setembro de 2013.

SANTOS, J. R. A. dos; GUSMÃO, N. B. de; GOUVEIA, E. R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p.75-80, 2010.

SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Cultura - análise da conjuntura agropecuária**. Ano 2012/13. Disponível em <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/leite\\_2012\\_13.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/leite_2012_13.pdf)> Acesso em 28 de junho de 2013.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Queijos Nacionais**. Ano 2008. Disponível em <[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/CE9D867B5588F857832574DC00472D49/\\$File/NT0003909E.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/CE9D867B5588F857832574DC00472D49/$File/NT0003909E.pdf)> Acesso em 28 de junho de 2013.

SILVA, C. A. da; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. **Estudo de um processo fermentativo soro de leite e a levedura *Kluyveromyces fragilis***. Semina: Ci. Agr., Londrina, v. 16, n. 1, p. 13-17, mar 1995.

SILVA, C. A. da; GOMES, J. P.; SILVA, F. L. H. da; MELO, E. S. R. L. de; CALDA, M. C. S. Utilização de soro de leite na elaboração de pães: estudo da qualidade sensorial. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 13, n. especial, p.355-362, 2011.

SILVEIRA, R. F. **Produção de etanol por leveduras em biorreatores com células livres e imobilizadas utilizando soro de queijo**. 2006. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

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.

SMITH, K.. **Dried dairy ingredients**. Madison, 2008. 60 p.

SOUSA, J. L. U. de; MONTEIRO, R. A. B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **Fazu em Revista**, Uberaba, n. 8, p.100-107, 2011.

SOUZA, R. B. de; COSTA, F. G. P.; LIMA, M. R. de; PINHEIRO, S. G. Utilização de leveduras de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) nas rações de aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 8, n. 6, p.1632-1646, 2011.

SOUZA, A. S.; ROCHA-LEÃO, M. H.; BORGES, S. V.; CIRILLO, M. Â.; CORNEJO, F. E. P.; COURI, S. Retention of short chain fatty acids under drying and storage conditions. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 3, p.801-805, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. **Microbiologia**. 10. ed. Artmed, 2012. 964 p.

VALSECHI, O. A. **O leite e seus derivados**. Universidade Federal de São Carlos - Centro de Ciências Agrárias. Araras, SP. 2001.

VIANA, T. M. L. **Caracterização bienergética de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação vinária**. 2009. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

WATSON, K. Temperatura relations in yeasts. **The yeasts**. v. 2, p. 41-69, 1987.

ZARCACHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; SPADOTI, L. M.; GALLINA, D. A.; TRENTO, F. K. H. S.; ALVES, A. T. S. e. Permeado de soro: aplicações que agregam valor aos coprodutos do leite. **Anuário Leite & Derivados**, n. 131, p. 48-55, 2012.

ZEMPULSKI, D. A. **Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação anaeróbia de manipueira e de permeado de soro de queijo**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2012.

## **LISTA DE ANEXOS**

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| ANEXO A – Métodos analíticos. ....         | 87 |
| ANEXO B –Tabela teste F. ....              | 89 |
| ANEXO C - Resultados das fermentações..... | 90 |

## **ANEXO A - MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **Determinação da absorbância**

A absorbância das amostras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (ShimadzuUV-1800), em um comprimento de onda de 600 nm, com a amostra previamente diluída, utilizando água destilada como branco.

### **Determinação de açúcares redutores totais (ART)**

A quantificação de açúcares redutores foi realizada por uma adaptação do método proposto por MILLER (1959), utilizando o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

Em um tubo de ensaio foi adicionado 400µL da amostra previamente diluída e 400µL da solução de DNS. Levou-se ao banho-maria, a 100°C, por 5 minutos e resfriou em banho de gelo. Adicionou-se 4 mL de água destilada e homogeneizou-se.

Foi realizada uma prova em branco, substituindo a amostra por água destilada e uma curva padrão com com glicose, na faixa de 0,5 - 3,0 g L<sup>-1</sup>, nas mesmas condições da amostras, gerando um modelo de regressão linear e o coeficiente de determinação da glicose em função da absorbância medida.

Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (ShimadzuUV-1800), em um comprimento de onda de 575nm.

### **Determinação de açúcares redutores (AR)**

A determinação da quantidade de açúcar redutor (glicose) foi realizada por kit colorimétrico-enzimático da marca Analisa.

Transferiu-se 24 µL da amostra previamente diluída para um tubo de ensaio juntamente com 2400 µL do reagente de cor (reagente 2).

Um padrão foi realizado com a substituição da amostra pelo reagente padrão (reagente 1), e uma prova em branco utilizando água destilada.

Todos os tubos foram homogeneizados e levados ao banho-maria, a 37°C, por 10 minutos.

Em seguida, realizou-se as leituras em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800), em um comprimento de onda de 505 nm.

Para o cálculo, utilizou-se a Equação 8:

$$Glicose \left( \frac{g}{L} \right) = \left\{ \frac{\left[ \left( \frac{100}{Pad} \right) \cdot Am \cdot Dil \right] \cdot 10}{1000} \right\} \quad (8)$$

Em que

Pad =Absorbância do padrão;

Am = Absorbância da amostra;

Dil = Diluição da amostra.

### **Determinação de pH**

O pH foi determinado em pHmetro marca MS Tecnopon, modelo MPA210, mergulhando-se o eletrodo do pHmetro, previamente calibrado com os tampões 4,0 e 7,0, diretamente na amostra, evitando o contato direto do eletrodo com as paredes ou o fundo do frasco.

A leitura é dada diretamente no visor do aparelho, após a estabilização do aparelho.

## ANEXO B - TABELA TESTE F

Tabela B.1 – Teste F (BARROS *et al.*,2010).

|                                                    |          | $f_{0.05, \nu_1, \nu_2}$                         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |          |       |  | <i>Distrib. F (<math>\alpha=0,05</math>)</i> |  |
|----------------------------------------------------|----------|--------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|--|----------------------------------------------|--|
| $\nu_2$                                            | $\nu_1$  | Degrees of freedom for the numerator ( $\nu_1$ ) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |          |       |  |                                              |  |
|                                                    | 1        | 2                                                | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 12    | 15    | 20    | 24    | 30    | 40    | 60    | 120   | $\infty$ |       |  |                                              |  |
| Degrees of freedom for the denominator ( $\nu_2$ ) | 1        | 161.4                                            | 199.5 | 215.7 | 224.6 | 230.2 | 234.0 | 236.8 | 238.9 | 240.5 | 241.9 | 243.9 | 245.9 | 248.0 | 249.1 | 250.1 | 251.1 | 252.2 | 253.3    | 254.3 |  |                                              |  |
|                                                    | 2        | 18.51                                            | 19.00 | 19.16 | 19.25 | 19.30 | 19.33 | 19.35 | 19.37 | 19.38 | 19.40 | 19.41 | 19.43 | 19.45 | 19.45 | 19.46 | 19.47 | 19.48 | 19.49    | 19.50 |  |                                              |  |
|                                                    | 3        | 10.13                                            | 9.55  | 9.28  | 9.12  | 9.01  | 8.94  | 8.89  | 8.85  | 8.81  | 8.79  | 8.74  | 8.70  | 8.66  | 8.64  | 8.62  | 8.59  | 8.57  | 8.55     | 8.53  |  |                                              |  |
|                                                    | 4        | 7.71                                             | 6.94  | 6.59  | 6.39  | 6.26  | 6.16  | 6.09  | 6.04  | 6.00  | 5.96  | 5.91  | 5.86  | 5.80  | 5.77  | 5.75  | 5.72  | 5.69  | 5.66     | 5.63  |  |                                              |  |
|                                                    | 5        | 6.61                                             | 5.79  | 5.41  | 5.19  | 5.05  | 4.95  | 4.88  | 4.82  | 4.77  | 4.74  | 4.68  | 4.62  | 4.56  | 4.53  | 4.50  | 4.46  | 4.43  | 4.40     | 4.36  |  |                                              |  |
|                                                    | 6        | 5.99                                             | 5.14  | 4.76  | 4.53  | 4.39  | 4.28  | 4.21  | 4.15  | 4.10  | 4.06  | 4.00  | 3.94  | 3.87  | 3.84  | 3.81  | 3.77  | 3.74  | 3.70     | 3.67  |  |                                              |  |
|                                                    | 7        | 5.59                                             | 4.74  | 4.35  | 4.12  | 3.97  | 3.87  | 3.79  | 3.73  | 3.68  | 3.64  | 3.57  | 3.51  | 3.44  | 3.41  | 3.38  | 3.34  | 3.30  | 3.27     | 3.23  |  |                                              |  |
|                                                    | 8        | 5.32                                             | 4.46  | 4.07  | 3.84  | 3.69  | 3.58  | 3.50  | 3.44  | 3.39  | 3.35  | 3.28  | 3.22  | 3.15  | 3.12  | 3.08  | 3.04  | 3.01  | 2.97     | 2.93  |  |                                              |  |
|                                                    | 9        | 5.12                                             | 4.26  | 3.86  | 3.63  | 3.48  | 3.37  | 3.29  | 3.23  | 3.18  | 3.14  | 3.07  | 3.01  | 2.94  | 2.90  | 2.86  | 2.83  | 2.79  | 2.75     | 2.71  |  |                                              |  |
|                                                    | 10       | 4.96                                             | 4.10  | 3.71  | 3.48  | 3.33  | 3.22  | 3.14  | 3.07  | 3.02  | 2.98  | 2.91  | 2.85  | 2.77  | 2.74  | 2.70  | 2.66  | 2.62  | 2.58     | 2.54  |  |                                              |  |
|                                                    | 11       | 4.84                                             | 3.98  | 3.59  | 3.36  | 3.20  | 3.09  | 3.01  | 2.95  | 2.90  | 2.85  | 2.79  | 2.72  | 2.65  | 2.61  | 2.57  | 2.53  | 2.49  | 2.45     | 2.40  |  |                                              |  |
|                                                    | 12       | 4.75                                             | 3.89  | 3.49  | 3.26  | 3.11  | 3.00  | 2.91  | 2.85  | 2.80  | 2.75  | 2.69  | 2.62  | 2.54  | 2.51  | 2.47  | 2.43  | 2.38  | 2.34     | 2.30  |  |                                              |  |
|                                                    | 13       | 4.67                                             | 3.81  | 3.41  | 3.18  | 3.03  | 2.92  | 2.83  | 2.77  | 2.71  | 2.67  | 2.60  | 2.53  | 2.46  | 2.42  | 2.38  | 2.34  | 2.30  | 2.25     | 2.21  |  |                                              |  |
|                                                    | 14       | 4.60                                             | 3.74  | 3.34  | 3.11  | 2.96  | 2.85  | 2.76  | 2.70  | 2.65  | 2.60  | 2.53  | 2.46  | 2.39  | 2.35  | 2.31  | 2.27  | 2.22  | 2.18     | 2.13  |  |                                              |  |
|                                                    | 15       | 4.54                                             | 3.68  | 3.29  | 3.06  | 2.90  | 2.79  | 2.71  | 2.64  | 2.59  | 2.54  | 2.48  | 2.40  | 2.33  | 2.29  | 2.25  | 2.20  | 2.16  | 2.11     | 2.07  |  |                                              |  |
|                                                    | 16       | 4.49                                             | 3.63  | 3.24  | 3.01  | 2.85  | 2.74  | 2.66  | 2.59  | 2.54  | 2.49  | 2.42  | 2.35  | 2.28  | 2.24  | 2.19  | 2.15  | 2.11  | 2.06     | 2.01  |  |                                              |  |
|                                                    | 17       | 4.45                                             | 3.59  | 3.20  | 2.96  | 2.81  | 2.70  | 2.61  | 2.55  | 2.49  | 2.45  | 2.38  | 2.31  | 2.23  | 2.19  | 2.15  | 2.10  | 2.06  | 2.01     | 1.96  |  |                                              |  |
|                                                    | 18       | 4.41                                             | 3.55  | 3.16  | 2.93  | 2.77  | 2.66  | 2.58  | 2.51  | 2.46  | 2.41  | 2.34  | 2.27  | 2.19  | 2.15  | 2.11  | 2.06  | 2.02  | 1.97     | 1.92  |  |                                              |  |
|                                                    | 19       | 4.38                                             | 3.52  | 3.13  | 2.90  | 2.74  | 2.63  | 2.54  | 2.48  | 2.42  | 2.38  | 2.31  | 2.23  | 2.16  | 2.11  | 2.07  | 2.03  | 1.98  | 1.93     | 1.88  |  |                                              |  |
|                                                    | 20       | 4.35                                             | 3.49  | 3.10  | 2.87  | 2.71  | 2.60  | 2.51  | 2.45  | 2.39  | 2.35  | 2.28  | 2.20  | 2.12  | 2.08  | 2.04  | 1.99  | 1.95  | 1.90     | 1.84  |  |                                              |  |
|                                                    | 21       | 4.32                                             | 3.47  | 3.07  | 2.84  | 2.68  | 2.57  | 2.49  | 2.42  | 2.37  | 2.32  | 2.25  | 2.18  | 2.10  | 2.05  | 2.01  | 1.96  | 1.92  | 1.87     | 1.81  |  |                                              |  |
|                                                    | 22       | 4.30                                             | 3.44  | 3.05  | 2.82  | 2.66  | 2.55  | 2.46  | 2.40  | 2.34  | 2.30  | 2.23  | 2.15  | 2.07  | 2.03  | 1.98  | 1.94  | 1.89  | 1.84     | 1.78  |  |                                              |  |
|                                                    | 23       | 4.28                                             | 3.42  | 3.03  | 2.80  | 2.64  | 2.53  | 2.44  | 2.37  | 2.32  | 2.27  | 2.20  | 2.13  | 2.05  | 2.01  | 1.96  | 1.91  | 1.86  | 1.81     | 1.76  |  |                                              |  |
|                                                    | 24       | 4.26                                             | 3.40  | 3.01  | 2.78  | 2.62  | 2.51  | 2.42  | 2.36  | 2.30  | 2.25  | 2.18  | 2.11  | 2.03  | 1.98  | 1.94  | 1.89  | 1.84  | 1.79     | 1.73  |  |                                              |  |
|                                                    | 25       | 4.24                                             | 3.39  | 2.99  | 2.76  | 2.60  | 2.49  | 2.40  | 2.34  | 2.28  | 2.24  | 2.16  | 2.09  | 2.01  | 1.96  | 1.92  | 1.87  | 1.82  | 1.77     | 1.71  |  |                                              |  |
|                                                    | 26       | 4.23                                             | 3.37  | 2.98  | 2.74  | 2.59  | 2.47  | 2.39  | 2.32  | 2.27  | 2.22  | 2.15  | 2.07  | 1.99  | 1.95  | 1.90  | 1.85  | 1.80  | 1.75     | 1.69  |  |                                              |  |
|                                                    | 27       | 4.21                                             | 3.35  | 2.96  | 2.73  | 2.57  | 2.46  | 2.37  | 2.31  | 2.25  | 2.20  | 2.13  | 2.06  | 1.97  | 1.93  | 1.88  | 1.84  | 1.79  | 1.73     | 1.67  |  |                                              |  |
|                                                    | 28       | 4.20                                             | 3.34  | 2.95  | 2.71  | 2.56  | 2.45  | 2.36  | 2.29  | 2.24  | 2.19  | 2.12  | 2.04  | 1.96  | 1.91  | 1.87  | 1.82  | 1.77  | 1.71     | 1.65  |  |                                              |  |
|                                                    | 29       | 4.18                                             | 3.33  | 2.93  | 2.70  | 2.55  | 2.43  | 2.35  | 2.28  | 2.22  | 2.18  | 2.10  | 2.03  | 1.94  | 1.90  | 1.85  | 1.81  | 1.75  | 1.70     | 1.64  |  |                                              |  |
|                                                    | 30       | 4.17                                             | 3.32  | 2.92  | 2.69  | 2.53  | 2.42  | 2.33  | 2.27  | 2.21  | 2.16  | 2.09  | 2.01  | 1.93  | 1.89  | 1.84  | 1.79  | 1.74  | 1.68     | 1.62  |  |                                              |  |
|                                                    | 40       | 4.08                                             | 3.23  | 2.84  | 2.61  | 2.45  | 2.34  | 2.25  | 2.18  | 2.12  | 2.08  | 2.00  | 1.92  | 1.84  | 1.79  | 1.74  | 1.69  | 1.64  | 1.58     | 1.51  |  |                                              |  |
|                                                    | 60       | 4.00                                             | 3.15  | 2.76  | 2.53  | 2.37  | 2.25  | 2.17  | 2.10  | 2.04  | 1.99  | 1.92  | 1.84  | 1.75  | 1.70  | 1.65  | 1.59  | 1.53  | 1.47     | 1.39  |  |                                              |  |
|                                                    | 120      | 3.92                                             | 3.07  | 2.68  | 2.45  | 2.29  | 2.17  | 2.09  | 2.02  | 1.96  | 1.91  | 1.83  | 1.75  | 1.66  | 1.61  | 1.55  | 1.50  | 1.43  | 1.35     | 1.25  |  |                                              |  |
|                                                    | $\infty$ | 3.84                                             | 3.00  | 2.60  | 2.37  | 2.21  | 2.10  | 2.01  | 1.94  | 1.88  | 1.83  | 1.75  | 1.67  | 1.57  | 1.52  | 1.46  | 1.39  | 1.32  | 1.22     | 1.00  |  |                                              |  |



## ANEXO C - RESULTADOS DAS FERMENTAÇÕES

Resultados das cinéticas das fermentações realizadas no planejamento experimental Plackett-Burman (1946) utilizando a levedura *S. cerevisiae*; em que: (●) biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ); (▲) fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ); (\*) pH

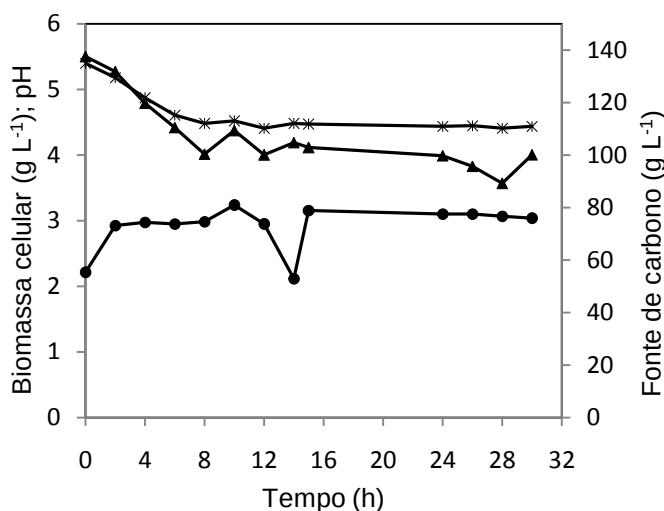


Figura 18 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$

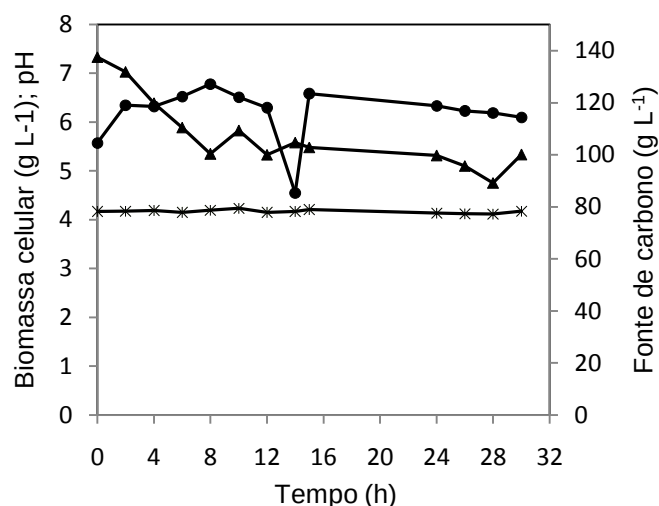


Figura 19 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 4; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$

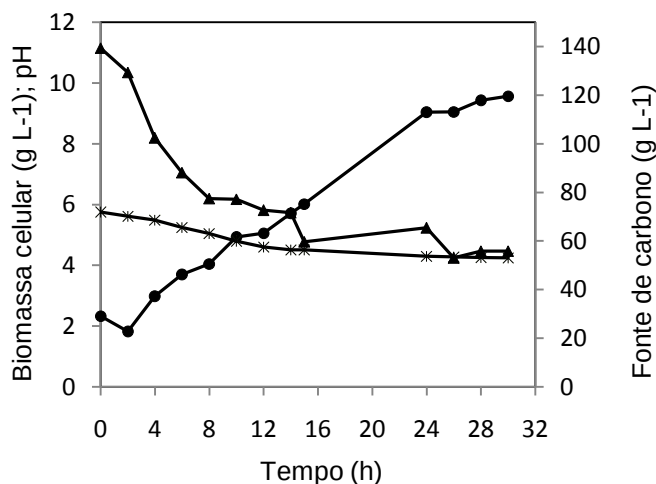


Figura 20 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$

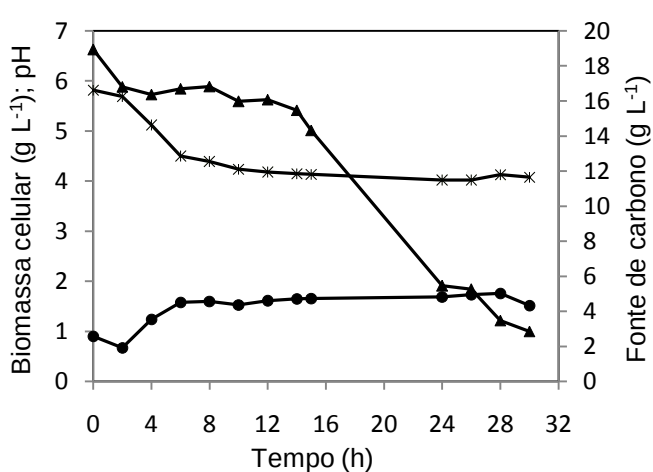


Figura 21 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$

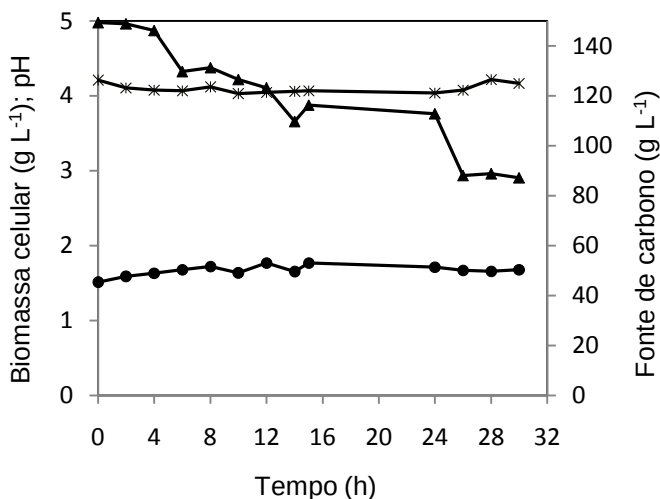


Figura 22 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 4; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$

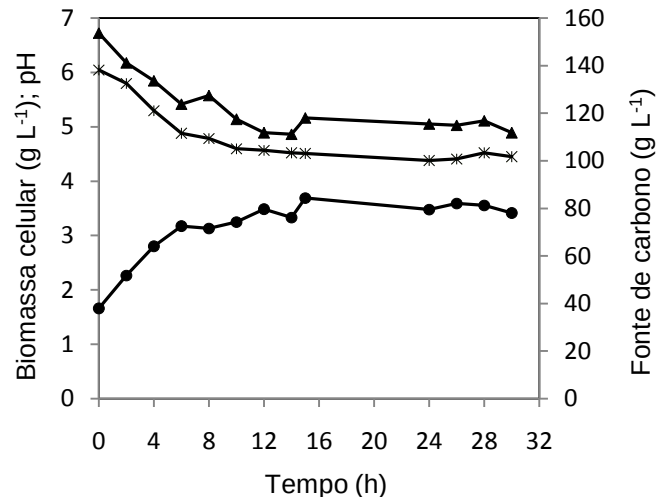


Figura 23 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$

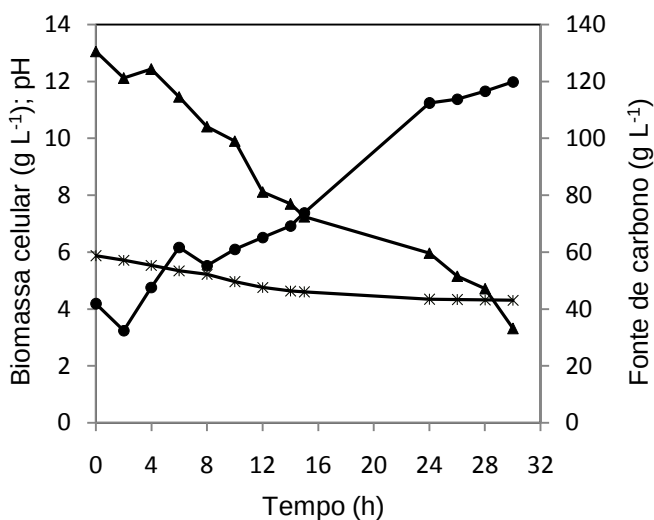


Figura 24 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$

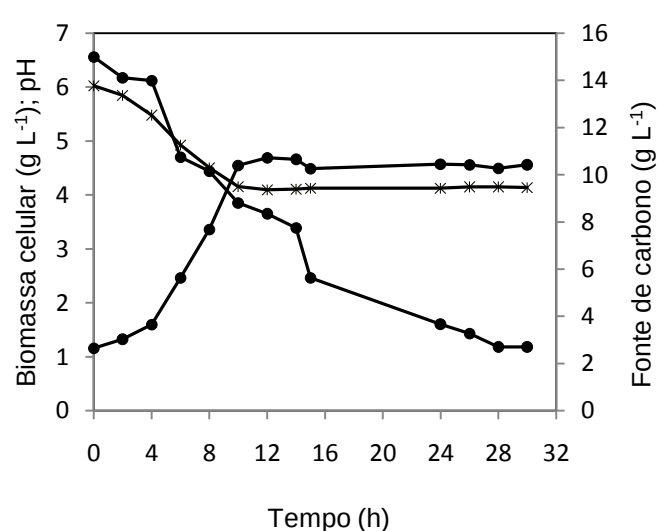


Figura 25 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$

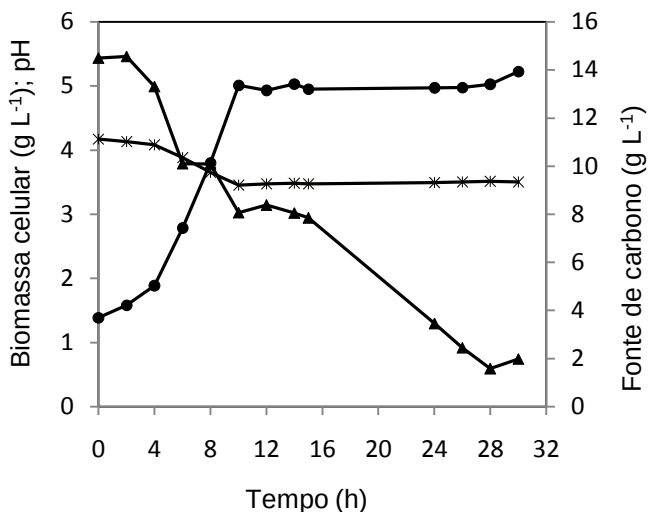


Figura 26 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 4; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$

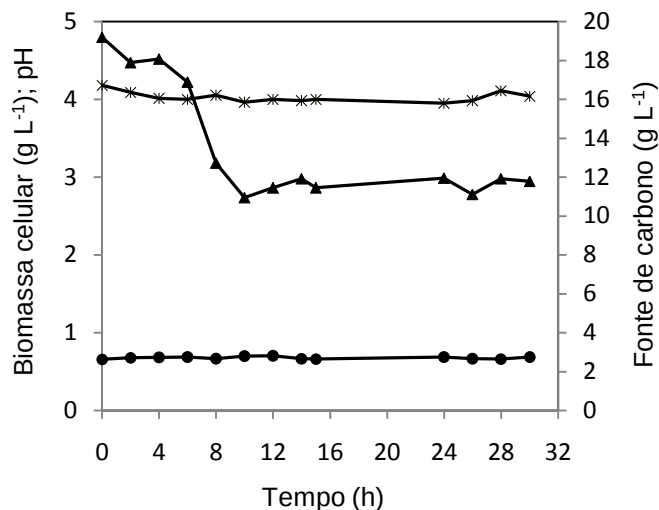


Figura 27 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 4; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$

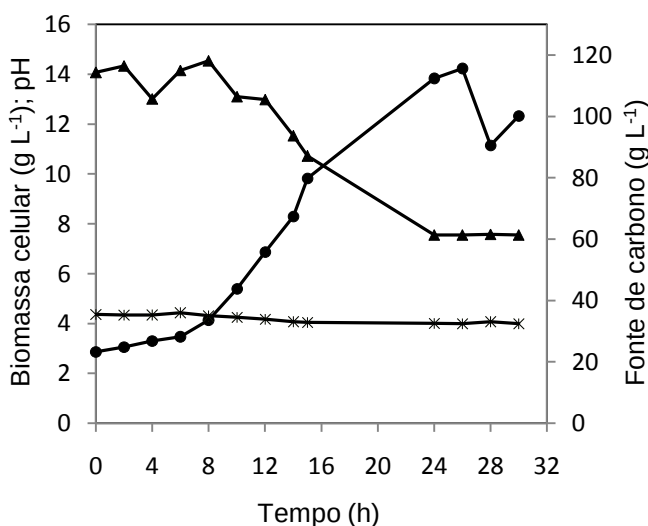


Figura 28 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 4; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$

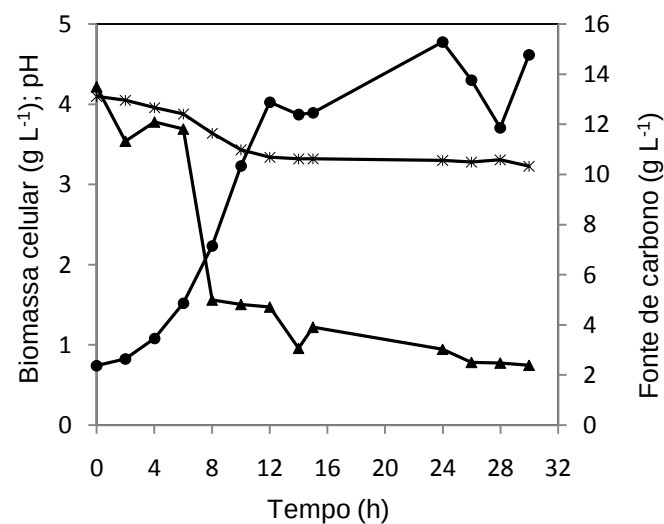


Figura 29 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 4; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$

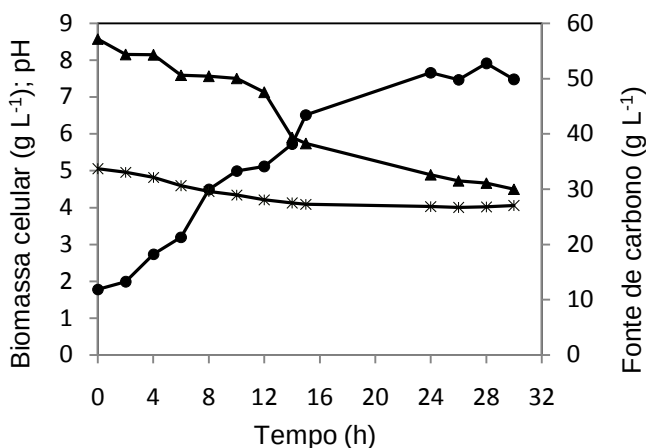


Figura 30 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T  $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 5; [permeado]  $85\text{ g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$   $2,5\text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$   $1\text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$   $2,5\text{ g L}^{-1}$

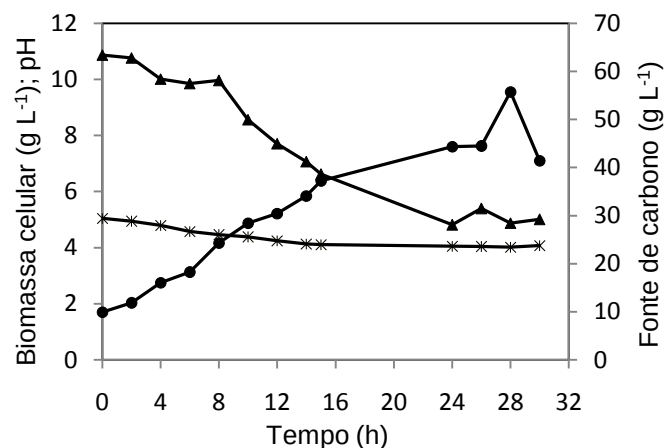


Figura 31 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T  $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 5; [permeado]  $85\text{ g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$   $2,5\text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$   $1\text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$   $2,5\text{ g L}^{-1}$

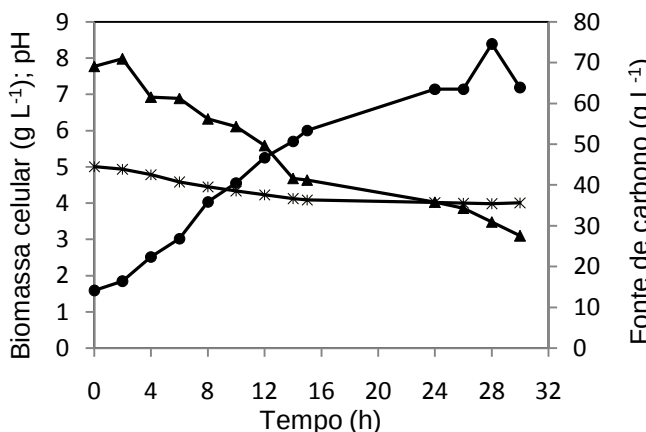


Figura 32 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T  $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 5; [permeado]  $85\text{ g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$   $2,5\text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$   $1\text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$   $2,5\text{ g L}^{-1}$

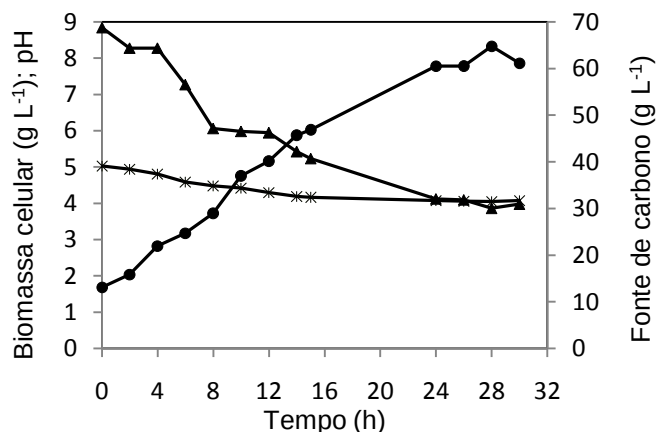


Figura 33 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T  $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 5; [permeado]  $85\text{ g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$   $2,5\text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$   $1\text{ g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$   $2,5\text{ g L}^{-1}$

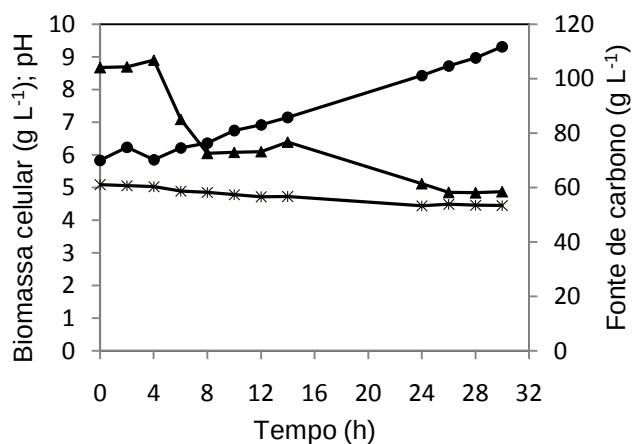


Figura 34 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 5; [permeado]  $150\text{ g L}^{-1}$

Resultados das cinéticas das fermentações realizadas no planejamento experimental Plackett-Burman (1946) utilizando a levedura *S. boulardii*; em que: (●) biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ); (▲) fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ); (\*) pH

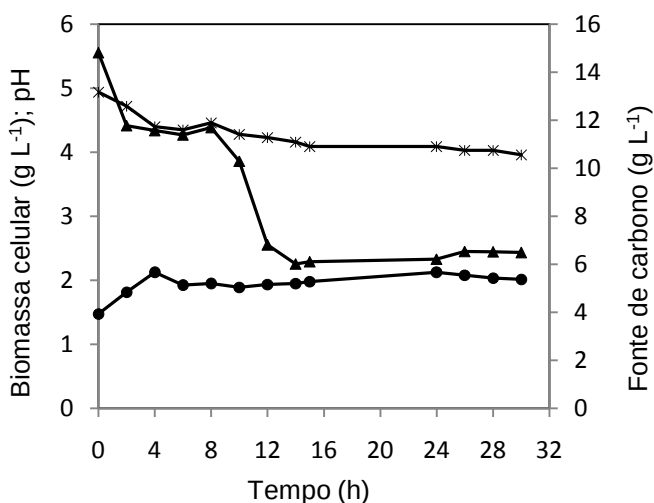


Figura 35 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 5,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$

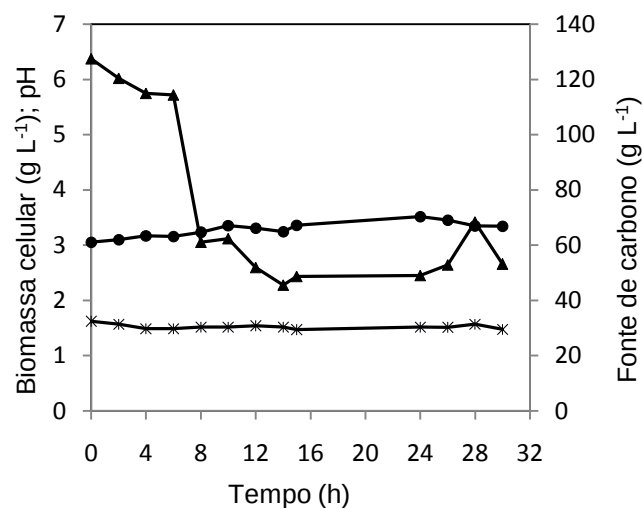


Figura 36 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 1,5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$

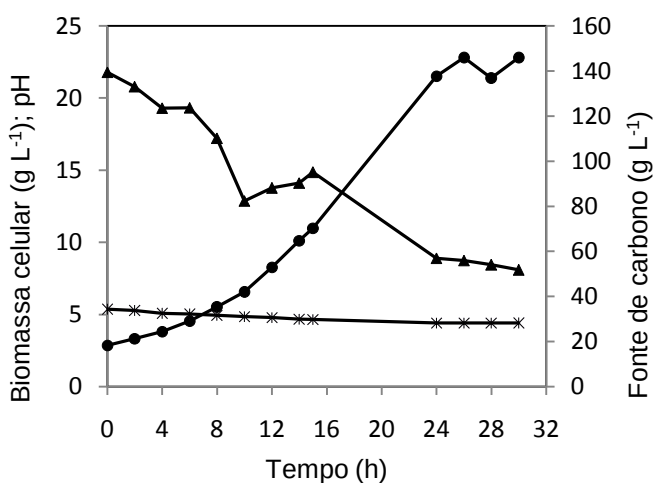


Figura 37 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 5,5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  3,6  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$

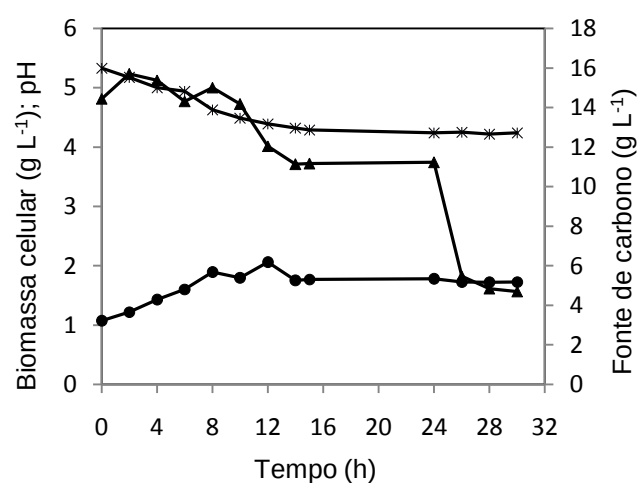


Figura 38 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 5,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$

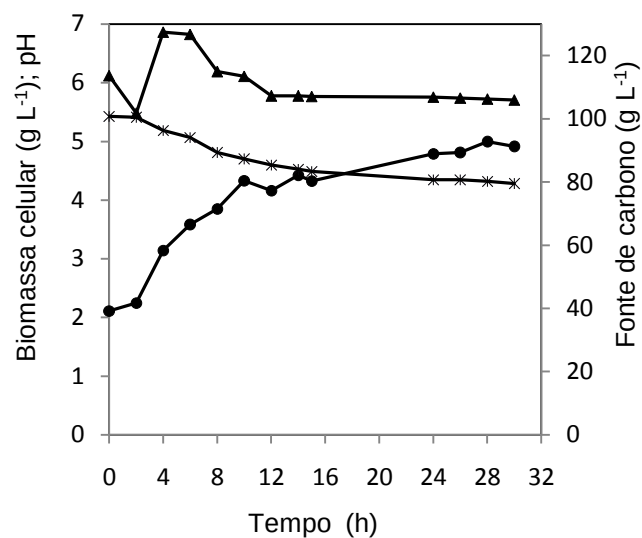
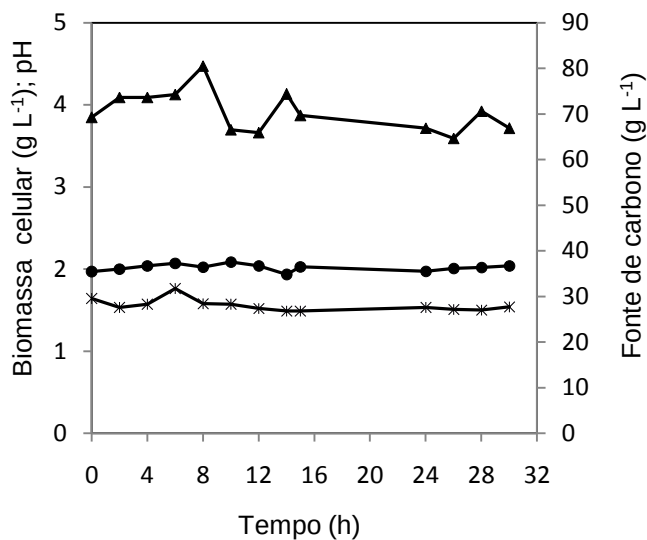


Figura 39 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 1,5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  3,6  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$

Figura 40 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 5,5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  3,6  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$

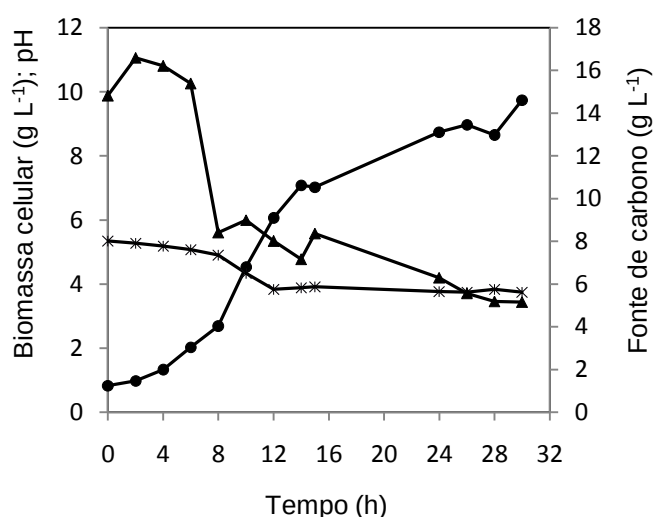
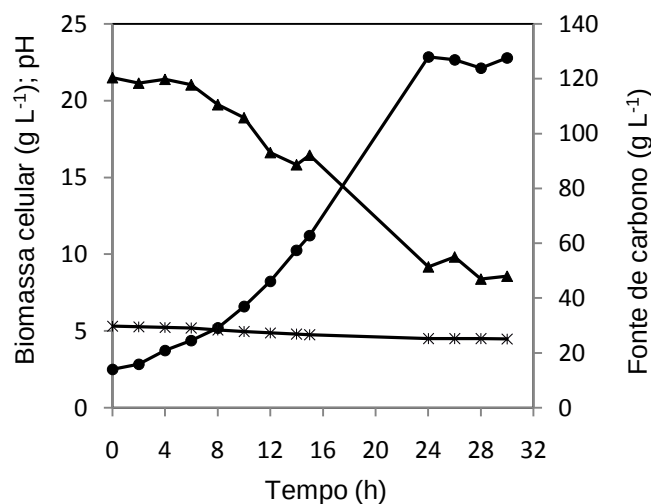


Figura 41 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 5,5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$

Figura 42 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 5,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  3,6  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$

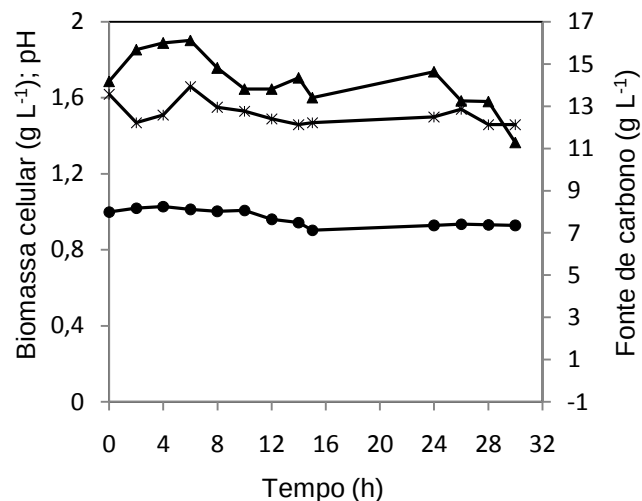
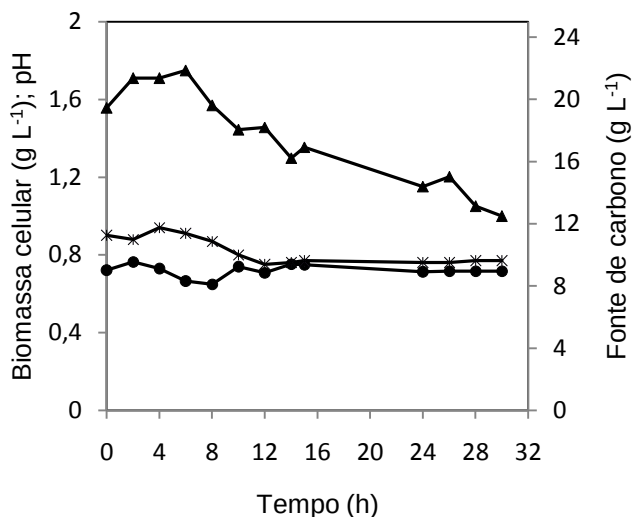


Figura 43 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 1,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  3,6  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$

Figura 44 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 1,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  3,6  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$

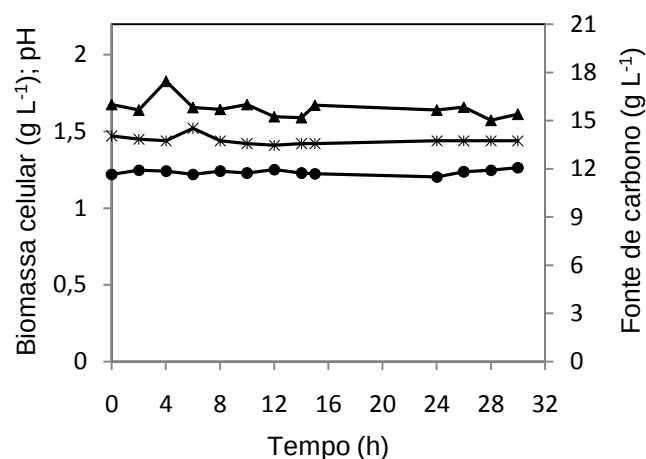
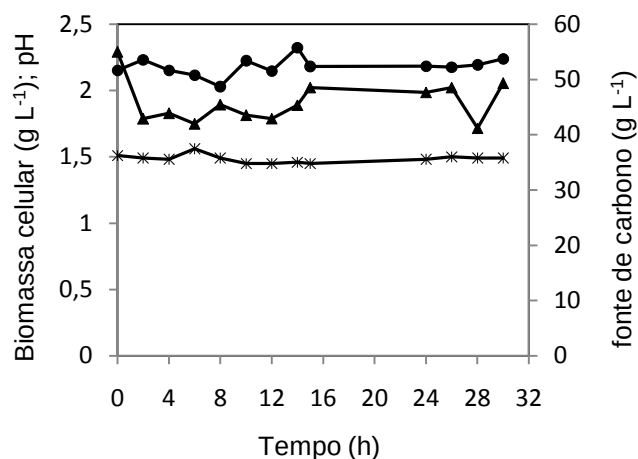


Figura 45 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 1,5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  9  $\text{g L}^{-1}$

Figura 46 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 1,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  3  $\text{g L}^{-1}$

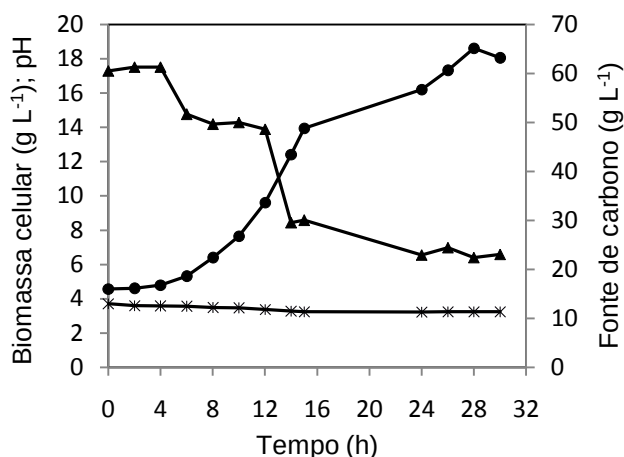


Figura 47 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 3,5; [permeado] 85  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  6  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  2,4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  6  $\text{g L}^{-1}$

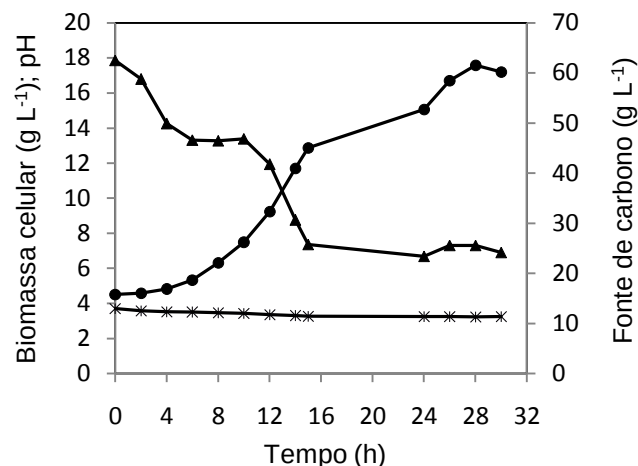


Figura 48 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 3,5; [permeado] 85  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  6  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  2,4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  6  $\text{g L}^{-1}$

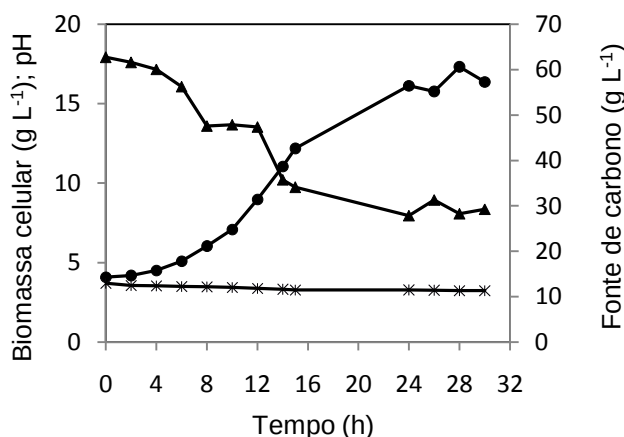


Figura 49 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 3,5; [permeado] 85  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  6  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  2,4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  6  $\text{g L}^{-1}$

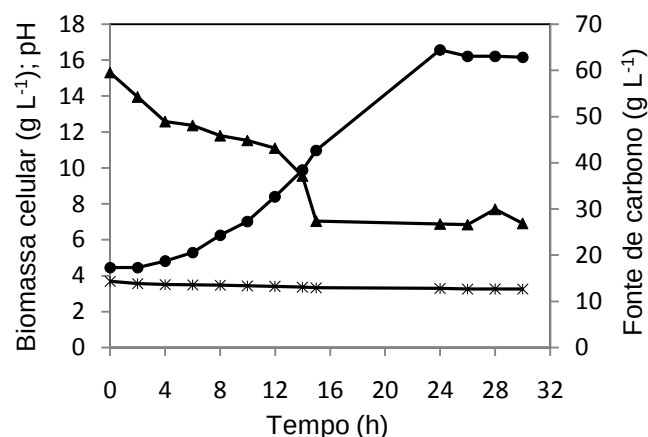


Figura 50 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 3,5; [permeado] 85  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  6  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  2,4  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  6  $\text{g L}^{-1}$

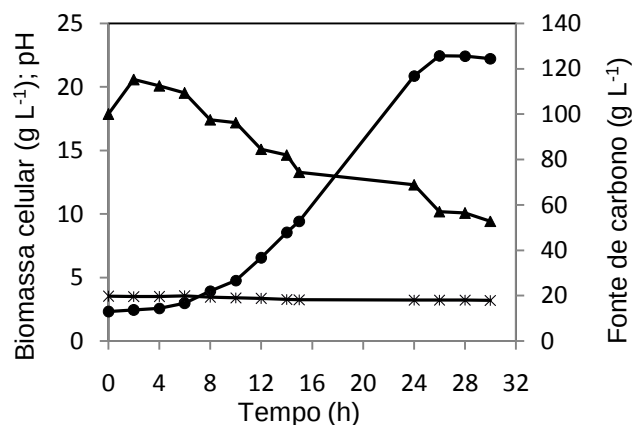


Figura 51 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 3,5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$



Resultados das cinéticas das fermentações realizadas no planejamento experimental Plackett-Burman (1946) utilizando a levedura *K. marxianus*; em que: (●) biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ); (▲) fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ); (\*) pH

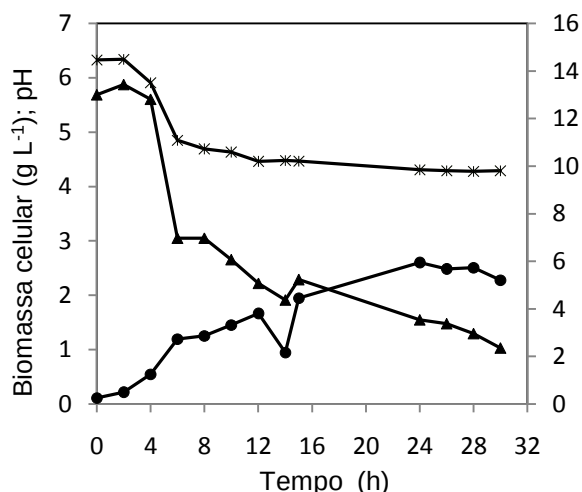


Figura 52 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$

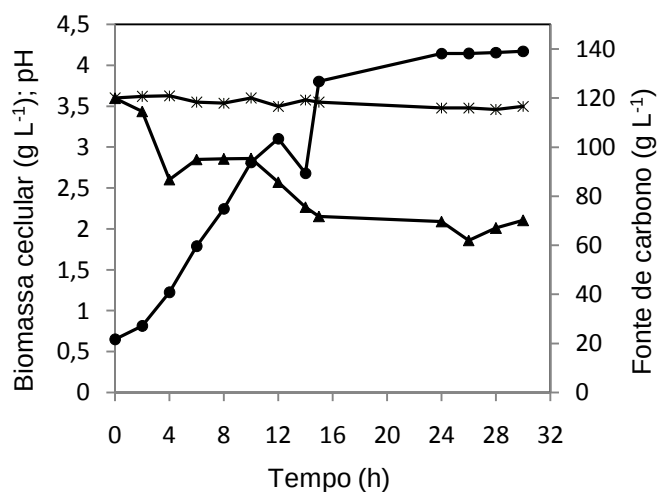


Figura 53 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  15  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$

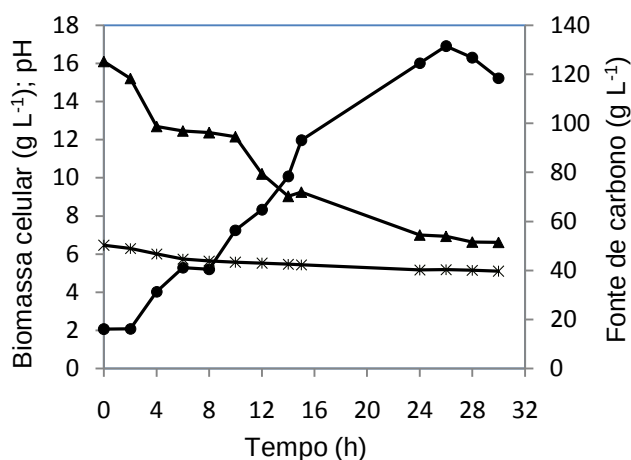


Figura 54 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6,5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  2,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$

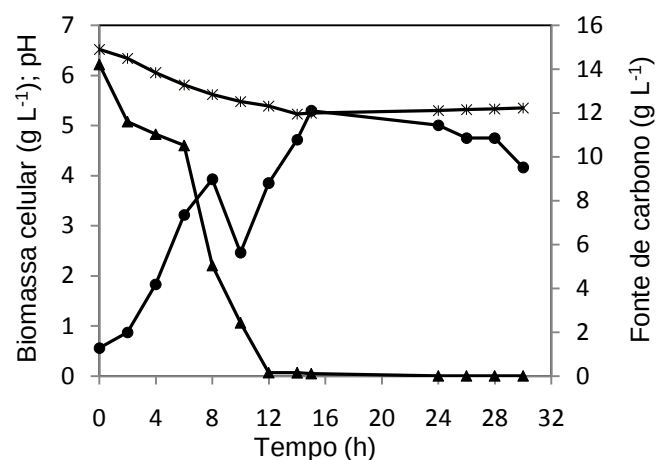


Figura 55 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  15  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$

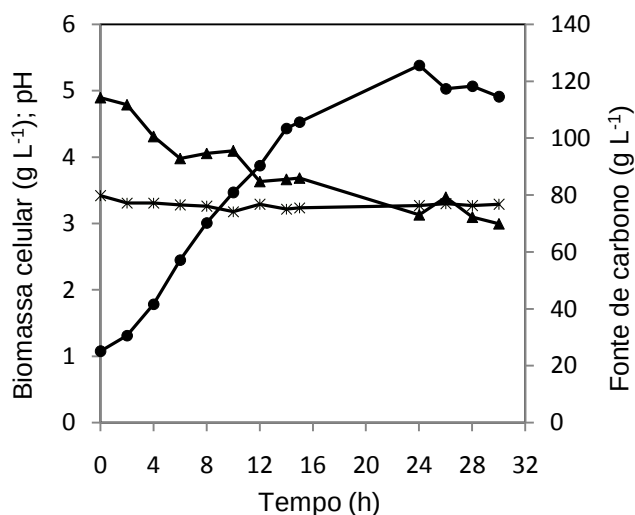


Figura 56 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) (●), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 3,5; [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 15 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 2,5 g L<sup>-1</sup>, [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 1 g L<sup>-1</sup>

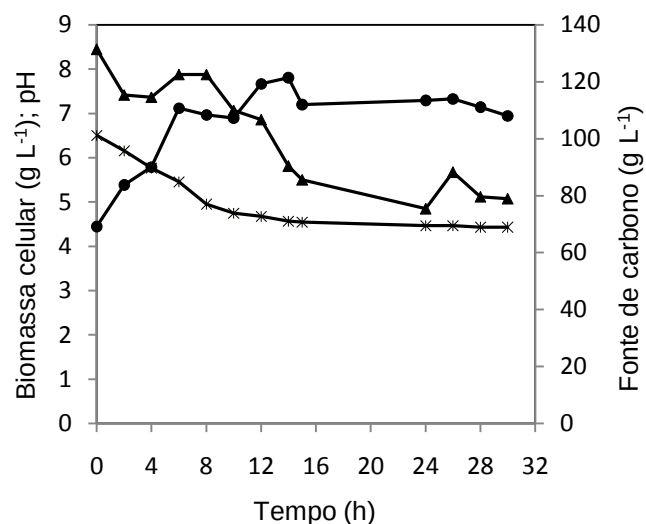


Figura 57 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) (●), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 6,5; [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 2 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 2,5 g L<sup>-1</sup>, [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 1 g L<sup>-1</sup>

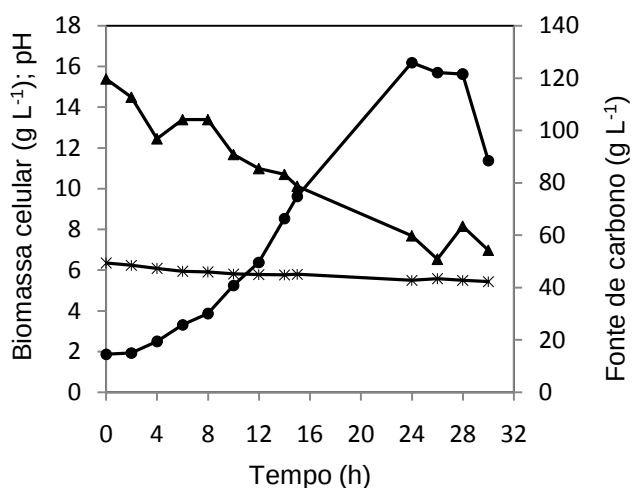


Figura 58 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) (●), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6,5; [permeado] 150 g L<sup>-1</sup>, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 15 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 0,9 g L<sup>-1</sup>, [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 4 g L<sup>-1</sup>

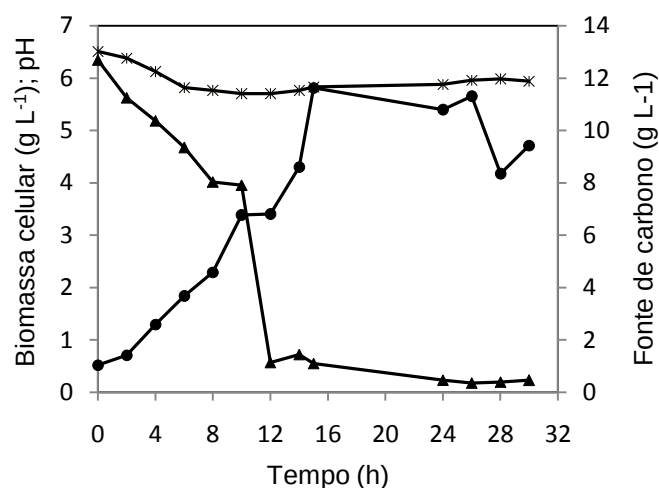


Figura 59 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g L<sup>-1</sup>) (●), consumo da fonte de carbono (g L<sup>-1</sup>) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 6,5; [permeado] 20 g L<sup>-1</sup>, [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 15 g L<sup>-1</sup>, [MgSO<sub>4</sub>] 2,5 g L<sup>-1</sup>, [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] 1 g L<sup>-1</sup>

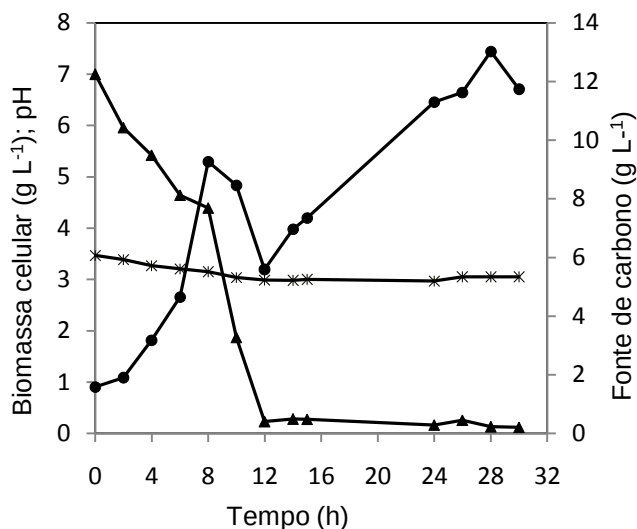


Figura 60 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 3,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  15  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  2,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$

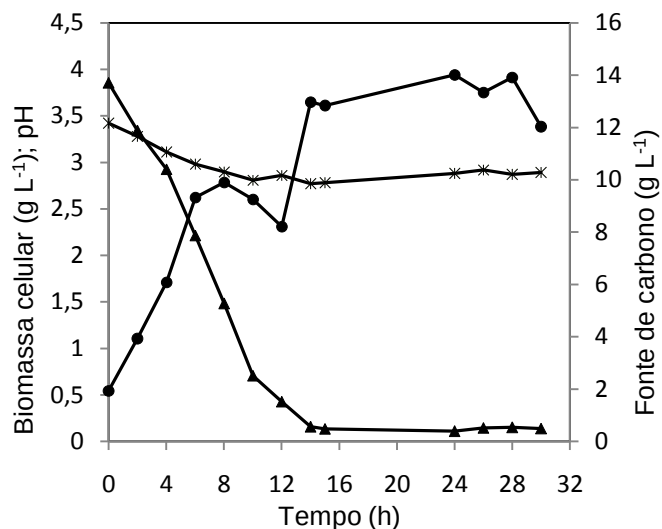


Figura 61 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 45 °C, pH 3,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  2,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$

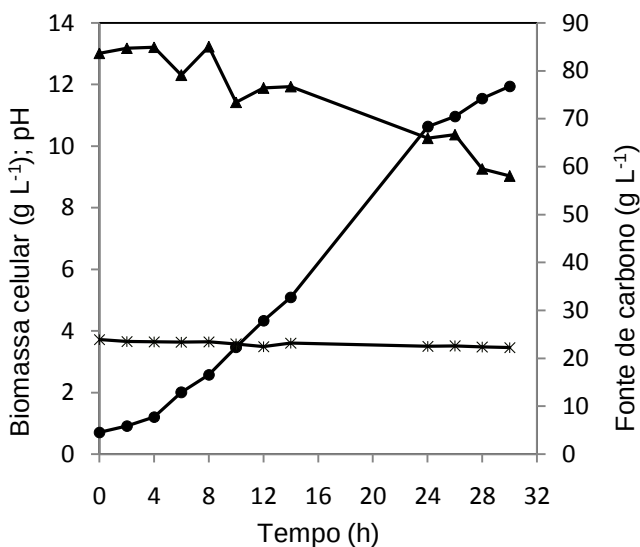


Figura 62 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 3,5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  4  $\text{g L}^{-1}$

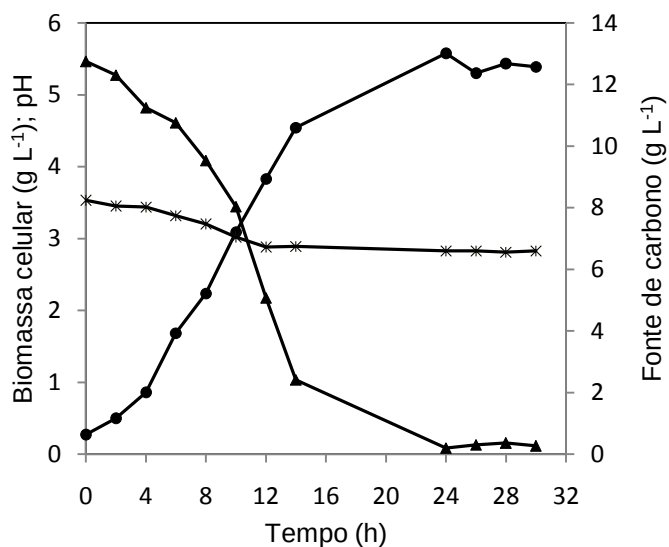


Figura 63 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 3,5; [permeado] 20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  2  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  0,9  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  1  $\text{g L}^{-1}$

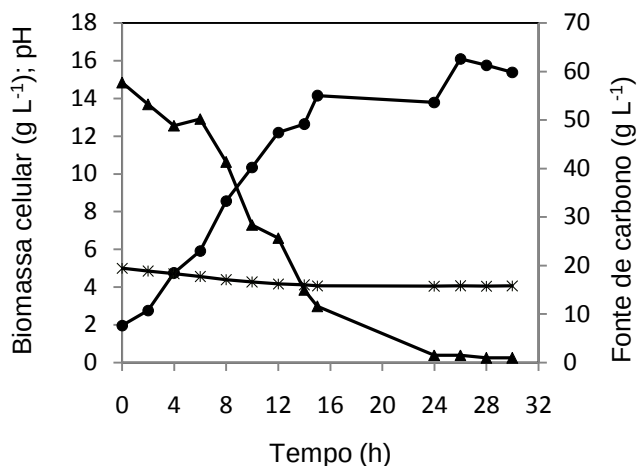


Figura 64 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  8,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,7  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  2,5  $\text{g L}^{-1}$

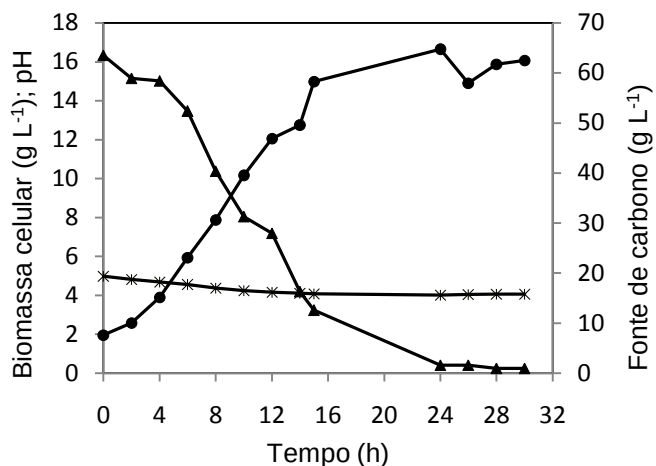


Figura 65 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  8,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,7  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  2,5  $\text{g L}^{-1}$

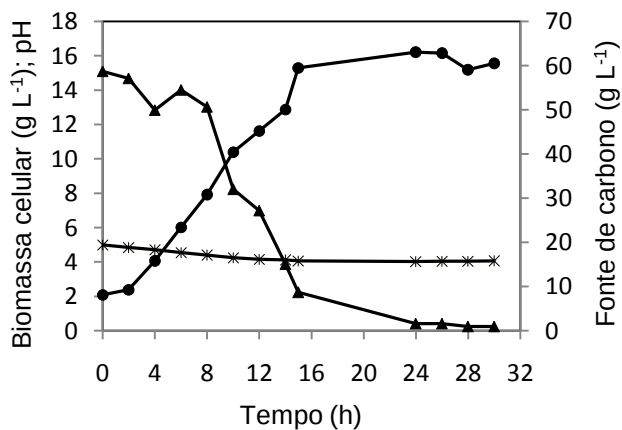


Figura 66 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  8,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,7  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  2,5  $\text{g L}^{-1}$

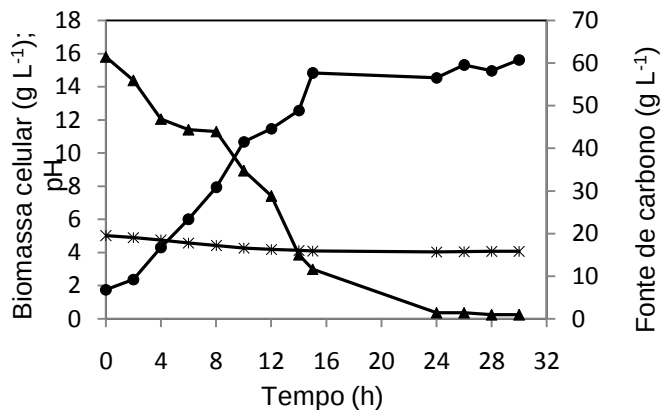


Figura 67 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 37,5 °C, pH 5; [permeado] 85  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  8,5  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{MgSO}_4]$  1,7  $\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  2,5  $\text{g L}^{-1}$

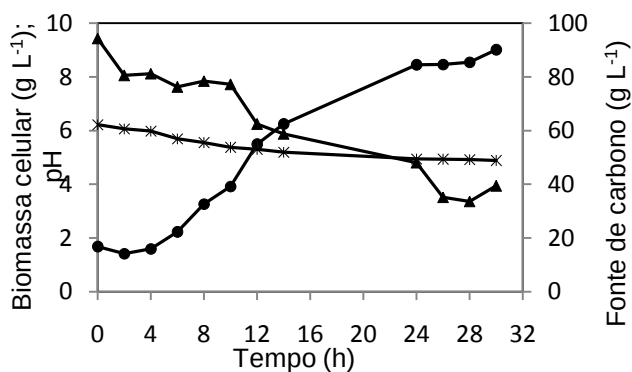


Figura 68 - Acompanhamento da produção de biomassa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) (●), consumo da fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ) (▲) e pH (\*) ao longo do tempo de fermentação: T 30 °C, pH 5; [permeado] 150  $\text{g L}^{-1}$