

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES E DA CONCENTRAÇÃO DE
PERMEADO DE SORO DE LEITE NO CRESCIMENTO DE *SACCHAROMYCES
BOULARDII* EM SISTEMA DESCONTÍNUO**

BARBARA LEPRETTI DE NADAI

TOLEDO - PR - BRASIL

Fevereiro de 2015

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

BARBARA LEPRETTI DE NADAI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES E DA CONCENTRAÇÃO DE
PERMEADO DE SORO DE LEITE NO CRESCIMENTO DE *SACCHAROMYCES
BOULARDII* EM SISTEMA DESCONTÍNUO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Estelita Goes
Trigueros

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Mônica Lady Fiorese

TOLEDO – PR – BRASIL

Fevereiro de 2015

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha família pelo apoio. A minha mãe Nancy Lepretti e minha irmã Sarah L. Nadai por estarem sempre do meu lado, e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis.

Ao meu marido André G. Maletzke pelo carinho, compreensão e incondicional incentivo durante essa jornada. À Marli e Irno Maletzke pelo apoio e incentivo.

A minha orientadora prof^a Daniela Trigueros.

A minha co-orientadora prof^a Mônica L. Fiorese, pela dedicação que me conduziu na realização deste trabalho, pelos ensinamentos, motivação e amizade, muito obrigada!

Aos colegas de laboratório Grettya M. Assunção, Izabella Miotto, Larissa Sita, Huilian Colpo e Maurício Meotti pelo apoio e amizade, e que fizeram os dias passados no laboratório mais alegres.

Ao prof. Salah Din Mahmud Hasan pelas contribuições na elaboração deste trabalho.

À Camila Hinterholz, Diego Manenti e Fabiano Bisinella pela ajuda e sugestões.

Aos meus colegas do mestrado pelas boas conversas e risadas.

Aos servidores da UNIOESTE, pela prestatividade e suporte.

À Amanda Primo e Jorge Mandadori, do SENAI, pelo apoio.

Às empresas SOORO, pelo fornecimento do permeado e da enzima, e CANDON, pelo fornecimento da enzima.

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

SUMÁRIO

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO _____ 11

1.1 Contextualização _____	11
1.2 Objetivos da pesquisa _____	12
1.2.1 Objetivo Geral _____	12
1.2.2 Objetivos específicos _____	12

Capítulo 2 – REVISÃO DA LITERATURA _____ 13

2.1 O soro do leite _____	13
2.2 Caracterização do permeado de soro de leite _____	15
2.3 Aplicações do soro do leite e do permeado _____	16
2.4 Produção de biomassa celular microbiana _____	18
2.5 Condições nutricionais para crescimento de leveduras _____	21
2.6 <i>Saccharomyces boulardii</i> _____	25
2.7 Cinética de Processos Fermentativos _____	26
2.8 Modelagem da cinética de fermentação _____	31
2.9 Balanço de massa em biorreator descontínuo _____	35

Capítulo 3 – MATERIAIS E MÉTODOS _____ 37

3.1 Caracterização do permeado _____	37
3.2. Micro-organismo _____	37
3.3 Condições dos meios de cultura _____	37
3.3.1 Ativação celular _____	37
3.3.2 Manutenção da levedura _____	38
3.4 Hidrólise enzimática do permeado _____	38
3.5 Preparo do inóculo _____	38
3.6 Cultivos de <i>S. boulardii</i> _____	39
3.7 Planejamento experimental _____	39
3.8 Efeito do pH inicial _____	41
3.9 Efeito da relação entre as concentrações de carbono e nitrogênio _____	41
3.10 Efeito da concentração de permeado _____	41
3.11 Efeito da aeração _____	42
3.12 Métodos analíticos _____	42
3.12.1 Determinação do pH _____	42
3.12.2 Determinação da concentração da biomassa _____	43
3.12.3 Determinação de açúcares redutores _____	43
3.13 Análise estatística do planejamento experimental _____	43
3.14 Estimativa preliminar de parâmetros _____	44
3.15 Modelagem matemática e simulação do cultivo de <i>S. boulardii</i> _____	44
3.16 Estimação dos parâmetros do modelo matemático _____	45

Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO _____ 45

4.1 Condições de obtenção de biomassa celular _____	46
4.2 Efeito do pH inicial na obtenção de biomassa celular _____	54
4.3 Efeito da relação C:N na obtenção de biomassa celular _____	56
4.4 Efeito da concentração de permeado na obtenção de biomassa celular _____	58
4.5 Efeito da aeração _____	60
4.6 Estimativa preliminar de parâmetros _____	64
4.7 Modelagem matemática do cultivo da <i>S. boulardii</i> _____	67
4.8 Cinética de crescimento da <i>S. boulardii</i> em cultivo descontínuo _____	68
Capítulo 5 - CONCLUSÕES _____	71
Capítulo 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS _____	73
REFERÊNCIAS _____	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1: COMPOSIÇÃO MÉDIA DO SORO DO LEITE	13
TABELA 2.2: CARACTERÍSTICAS EFLUENTES DO SORO DO LEITE.....	14
TABELA 2.3: COMPOSIÇÃO MÉDIA DO PERMEADO DE SORO DO LEITE.....	16
TABELA 2.4: COMPOSIÇÕES MÉDIAS DE DIFERENTES GÊNEROS DE MICRO-ORGANISMOS	19
TABELA 2.5: COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DAS LEVEDURAS	23
TABELA 3.1: CARACTERIZAÇÃO DO PERMEADO DE SORO DE LEITE EM PÓ.....	37
TABELA 3.2: NÍVEIS E VALORES REAIS DAS VARIÁVEIS ADMITIDAS NO PLANEJAMENTO DCCR.....	40
TABELA 3.3: MATRIZ DO PLANEJAMENTO DCCR COM VALORES CODIFICADOS E REAIS DE CONCENTRAÇÕES DE (NH ₄) ₂ SO ₄ (Q ₁), MgSO ₄ (Q ₂), KH ₂ PO ₄ (Q ₃) E PERMEADO DE SORO DE LEITE (Q ₄).....	40
TABELA 3.4: VALORES DE PH AVALIADOS	41
TABELA 3.5: RELAÇÃO C:N AVALIADA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR	41
TABELA 3.6: CONCENTRAÇÕES DE PERMEADO AVALIADOS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR	42
TABELA 3.7: CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NOS ENSAIOS DE AERAÇÃO	42
TABELA 4.1: MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR – VALORES REAIS DAS VARIÁVEIS INVESTIGADAS ((NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ , KH ₂ PO ₄ E PERMEADO), E RESPOSTA DE BIOMASSA CELULAR NO TEMPO DE 17 HORAS DE CULTIVO	46
TABELA 4.2: ESTIMATIVA DOS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR.....	47
TABELA 4.3: ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO DCCR.....	48
TABELA 4.4: VALORES DE PH INICIAIS AVALIADOS E RESULTADOS OBTIDOS	54
TABELA 4.5: RESULTADO DO EFEITO DA RELAÇÃO C:N NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR.....	56
TABELA 4.6: RELAÇÃO C:N NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR DOS ENSAIOS 9 E 10	56
TABELA 4.7: RESULTADOS DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PERMEADO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR	58
TABELA 4.8: COMPARATIVO ENTRE OS MELHORES ENSAIOS A TEMPERATURA (30°C); PH (5,5); MgSO ₄ (1,25 GL ⁻¹); KH ₂ PO ₄ (1,5 GL ⁻¹), COM E SEM AERAÇÃO	63
TABELA 4.9: BIOMASSA CELULAR PRODUZIDA, VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO (μ), AÇÚCAR CONSUMIDO (ΔS) , CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM CÉLULA (Y _{X/S}) E PRODUTIVIDADE PARA O TEMPO DE 17 HORAS DE FERMENTAÇÃO.....	65
TABELA 4.10: PARÂMETROS AJUSTADOS PELO MODELO DE PHISALAPHONG <i>ET AL.</i> , (2006).....	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: CINÉTICA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS	27
FIGURA 2.2: CURVA DE CRESCIMENTO DE MICRO-ORGANISMO EM CULTIVO DESCONTÍNUO	29
FIGURA 2.3: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CINÉTICA DE (A) LIMITAÇÃO PELO SUBSTRATO E (B) INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO	31
FIGURA 4.1: DIAGRAMA DE PARETO COM EFEITO DAS VARIÁVEIS E INTERAÇÕES ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO DCCR PARA UM NÍVEL DE 5% DE SIGNIFICÂNCIA	49
FIGURA 4.2: RESULTADO ESTATÍSTICO DO PLANEJAMENTO DCCR - (A) RESÍDUOS EM FUNÇÃO DOS VALORES PREDITOS E (B) PROBABILIDADE NORMAL DOS RESÍDUOS	50
FIGURA 4.3: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA AS VARIÁVEIS (A) PERMEADO E SULFATO DE MAGNÉSIO, (B) PERMEADO E SULFATO DE AMÔNIO	50
FIGURA 4.4: CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA BIOMASSA CELULAR ($g\ L^{-1}$), CONSUMO DE SUBSTRATO ($g\ L^{-1}$), GLICOSE E PH DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO (ENSAIO 10)	52
FIGURA 4.5: DADOS EXPERIMENTAIS DO CONSUMO DE SUBSTRATO PELA <i>S. BOULARDII</i> : (●) AÇÚCAR REDUTOR TOTAL E (•) AÇÚCAR REDUTOR	53
FIGURA 4.6: CINÉTICAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR ($g\ L^{-1}$), CONSUMO DE SUBSTRATO ($g\ L^{-1}$), GLICOSE ($g\ L^{-1}$) E PH: (A) ENSAIO 29; (B) ENSAIO 30; (C) ENSAIO 31; (D) ENSAIO 32.....	55
FIGURA 4.7: CINÉTICAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR ($g\ L^{-1}$), CONSUMO DE SUBSTRATO ($g\ L^{-1}$), CONSUMO DE GLICOSE ($g\ L^{-1}$) E PH: (A) ENSAIO 33; (B) ENSAIO 34; (C) ENSAIO 35; (D) ENSAIO 36; (E) ENSAIO 37	58
FIGURA 4.8: CINÉTICAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR ($g\ L^{-1}$), CONSUMO DE SUBSTRATO ($g\ L^{-1}$), GLICOSE ($g\ L^{-1}$) E PH: (A) ENSAIO 38; (B) ENSAIO 39; (C) ENSAIO 40; (D) ENSAIO 41; (E) ENSAIO 42 E (F) ENSAIO 43	60
FIGURA 4.9: ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR, PH, CONSUMO DE SUBSTRATO E GLICOSE DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO, REFERENTE AO (A) ENSAIO 44 E (B) ENSAIO 45....	61
FIGURA 4.10: PERFIS DE VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO E CONSUMO DE CARBONO DO ENSAIO 10.....	67
FIGURA 4.11: SIMULAÇÃO DO MODELO DE PHISALAPHONG <i>ET AL.</i> (2006) APLICADO AOS DADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 10	69

NOMECLATURA

μ_X	Velocidade específica de crescimento celular	(s ⁻¹)
μ_S	Velocidade específica de consumo do substrato	(s ⁻¹)
μ_P	Velocidade específica de formação do produto	(s ⁻¹)
X	Concentração celular	(gL ⁻¹)
X_0	Concentração inicial celular	(gL ⁻¹)
S	Concentração do substrato	(gL ⁻¹)
S_0	Concentração inicial do substrato	(gL ⁻¹)
P	Concentração do produto	(gL ⁻¹)
P_0	Concentração inicial do produto	(gL ⁻¹)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em célula	(gg ⁻¹)
$Y_{X/P}$	Fator de conversão de produto em célula	(gg ⁻¹)
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto	(gg ⁻¹)
μ_X	Velocidade de crescimento celular	(h ⁻¹)
μ_m	Velocidade máxima de crescimento celular	(h ⁻¹)
t_g	Tempo de geração	(h ⁻¹)
K_S	Constante de saturação pelo substrato	(gL ⁻¹)
K_i	Constante de inibição pelo substrato	(gL ⁻¹)
S_i	Concentração do substrato afluente	(gL ⁻¹)
S_e	Concentração do substrato efluente	(gL ⁻¹)
R	Tempo de retenção	(h)
q	Taxa de utilização do substrato	(h ⁻¹)
P_m	Termo de inibição de crescimento pelo etanol	(gL ⁻¹)
P'_m	Termo de inibição de produção pelo etanol	(gL ⁻¹)

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES E DA CONCENTRAÇÃO DE PERMEADO DE SORO DE LEITE NO CRESCIMENTO DE *SACCHAROMYCES BOULARDII* EM SISTEMA DESCONTÍNUO

AUTORA: BARBARA LEPRETTI DE NADAI

ORIENTADORA: PROF^a DR^a DANIELA ESTELITA GOES TRIGUEROS

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

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645, CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brasil. 91 p.

RESUMO

O soro do leite é considerado um dos resíduos mais poluentes da indústria alimentícia, sendo seu tratamento um processo altamente dispendioso. Uma alternativa para a sua reutilização é a aplicação para a obtenção de produtos biotecnológicos. O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de produção de biomassa celular da levedura *S. boulardii* em sistema descontínuo, utilizando permeado de soro de leite. Foi aplicado um planejamento experimental DCCR (delineamento composto central rotacional), tendo como resposta a biomassa celular, com o intuito de avaliar o efeito de quatro variáveis sobre a resposta de biomassa celular. Foram realizadas fermentações com diferentes valores de pH, concentrações de sulfato de amônio e permeado. Foram realizadas dois ensaios com aeração ao meio fermentativo, objetivando o aumento na produção de biomassa celular. O maior valor de biomassa celular obtido no DCCR foi de 40,06 gL⁻¹, sob as seguintes condições: 7,5 gL⁻¹ de sulfato de amônio, 1,25 gL⁻¹ de sulfato de magnésio, 1,5 gL⁻¹ de fosfato monobásico de potássio e 180 gL⁻¹ de permeado, 30°C, agitação de 100 rpm e pH 5,5. O valor de pH investigado que favoreceu a produção de biomassa celular foi 4,5. As concentrações de permeado que favoreceram a produção de biomassa estão compreendidas na faixa de 180 à 220 gL⁻¹. Assim, o estudo demonstrou que o permeado de soro de leite é um resíduo com grande potencial na produção de biomassa celular utilizando a levedura *S. boulardii*, mostrando-se como alternativa ao descarte deste, reduzindo os impactos negativos ao meio ambiente e diminuindo os custos de tratamento deste efluente para as indústrias.

Palavras-chave: *Saccharomyces boulardii*, suplementação, permeado de soro de leite

EFFECT OF NUTRIENT SUPPLEMENTATION AND WHEY PERMEATE CONCENTRATION IN *SACCHAROMYCES BOULARDII* GROWTH IN DISCONTINUOUS SYSTEM

AUTHOR: BARBARA LEPRETTI DE NADAI

SUPERVISOR: PROF^a DR^a DANIELA ESTELITA GOES TRIGUEROS

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

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645, CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brazil. 91 p.

ABSTRACT

Whey is considered one of the most polluting waste from the food industry, and its treatment a highly expensive process. An alternative for its reuse is applied to obtain biotechnological products. The objective of this study was to optimize the cell biomass production conditions of *S. boulardii* yeast in a batch system, using whey permeate. An experimental design was applied DCCR (a central composite design), and in response to cellular biomass, in order to evaluate the effect of four variables on cell biomass response. Fermentations were carried out at different pH, ammonium sulfate concentrations, and permeate. Two experiments with aeration to the fermentation medium were performed, aiming to increase the production of cell biomass. The highest cell biomass obtained in DCCR was 40,06 gL⁻¹, under the following conditions: 7,5 gL⁻¹ of ammonium sulfate, 1,25 gL⁻¹ of magnesium sulfate, 1,5 gL⁻¹ of monobasic potassium phosphate and 180 gL⁻¹ of permeate, 30°C, agitation 100 rpm and pH 5,5. The investigated pH that favored the production of cell biomass was 4,5. The permeate concentrations which favored the production of biomass are included in the range of 180 to 220 gL⁻¹. Thus, the study demonstrated that the whey permeate is a residue having great potential in producing cellular biomass using the yeast *S. boulardii*, showing how to dispose of this alternative, reducing negative impacts on the environment and decreasing costs for wastewater treatment industries.

Keywords: *Saccharomyces boulardii*, supplementation, whey permeate

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

O soro do leite é considerado um dos resíduos mais poluentes da indústria alimentícia, sendo seu tratamento um processo altamente dispendioso. A sua utilização para obtenção de produtos biotecnológicos pode ser uma alternativa ao descarte, reduzindo os impactos negativos ao meio ambiente e diminuindo os custos de tratamento de efluentes. Desse modo, o processo de ultrafiltração surgiu como uma alternativa para a geração de produtos e subprodutos a partir do soro de leite, dentre os quais se encontra o permeado de soro de leite. Ao longo deste trabalho, ele será denominado apenas de permeado.

O permeado resultante do processo de ultrafiltração compõe-se principalmente por lactose e sais minerais, e pode ser utilizado como substrato em processos fermentativos com leveduras objetivando a produção de biomassa microbiana. A biomassa pode ser utilizada na obtenção de proteína microbiana e, portanto, pode ser uma fonte adicional da alimentação humana, uma vez que a escassez de alimentos proteicos tem grande destaque no cenário mundial. A produção de biomassa microbiana apresenta vantagens em comparação às fontes convencionais de proteínas, tais como o alto conteúdo proteico dos microorganismos, a produção contínua e independente das condições climáticas e o seu crescimento em curto espaço de tempo.

Nesse cenário, a levedura *Saccharomyces boulardii* surge como alternativa para a produção de biomassa microbiana por meio de processos fermentativos, utilizando o permeado como substrato para o seu crescimento. Apesar de ser uma levedura probiótica amplamente utilizada na forma de medicamento, poucos estudos relatam a produção de biomassa celular a partir da *S. boulardii*.

Diante do exposto, este estudo apresenta a potencialidade de reaproveitamento do permeado de soro de leite na produção de biomassa microbiana, a partir da otimização das condições de cultivo da levedura *Saccharomyces boulardii* no processo fermentativo em sistema descontínuo.

1.2 Objetivos da pesquisa

1.2.1 Objetivo Geral

Otimizar as condições do processo fermentativo de produção de biomassa de *S. boulardii* em sistema descontínuo utilizando permeado de soro de leite como substrato.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da concentração de permeado e de suplementação de sais por meio de um DCCR;
- Avaliar a influência do pH;
- Avaliar a razão entre fonte de carbono e nitrogênio;
- Avaliar a concentração limitante de permeado no processo fermentativo;
- Avaliar a adição de oxigênio ao processo fermentativo;
- Avaliar a cinética da fermentação obtida nas condições ótimas por meio da estimação dos parâmetros cinéticos e estequiométricos da reação;
- Realizar a modelagem matemática do processo;
- Simular o sistema descontínuo.

Capítulo 2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O soro do leite

O soro do leite é resultante da separação da porção aquosa do coágulo do leite durante a fabricação do queijo e obtenção da caseína, correspondendo a cerca de 90% do volume do leite processado (SISO, 1996; RAJESHWARI *et al.*, 2000). Conforme Prazeres *et al.* (2012), as características do soro dependem da origem animal, do tipo de leite, e , portanto da alimentação, saúde, reprodução e estágio de lactação do animal (DE WIT, 2001).

O soro do leite é constituído por água, lactose, proteínas, sais minerais, ácido láctico e gorduras (MIZUBUTI, 1994; PANESAR & KENNEDY, 2012; PRAZERES *et al.*, 2012). As concentrações médias dos compostos são apresentadas na Tabela 2.1, conforme valores obtidos da literatura (KOSIKOWSKI, 1979; ZALL, 1984; MORR, 1985; GHALY & BEN, 1995; SISO, 1996; FLORENTINO, 2006; FLORÊNCIO *et al.*, 2007; PRAZERES *et al.*, 2012). De acordo com Prazeres *et al.* (2012), também estão presentes ácido cítrico, ureia ou ácido úrico, vitaminas do grupo B, além de outros (KOSIKOWSKI & WIERZBICKI, 1973; KOSIKOWSKI, 1979; GARCÍA BILBAO, 1981; PANESAR *et al.*, 2007). A quantidade de água presente no soro pode alcançar 95%, e de sólidos totais alcança até 7%, dos quais 70-80% correspondem à lactose e 10-14% correspondem a proteínas. Isso mostra o potencial nutricional do soro de leite, impulsionando a sua valorização por meio de tecnologias eficientes na recuperação desses componentes.

Tabela 2.1: Composição média do soro do leite

Componente	% (v/v) ^(a)	% (p/v) ^(b)	% (p/p) ^(c)
Água	90 – 95	-	-
Sólidos Totais	-	5 – 7	-
Lactose	-	4,5 – 6	70 – 80
Proteínas	-	0,6 – 1	10 – 14
Minerais	-	0,5 – 1	8 – 10
Gorduras	-	0,06 – 0,5	2 – 5

^(a) volume por volume; ^(b) peso por volume; ^(c) peso por peso

Fonte: Adaptado de Kosikowski (1979); Zall (1984); Morr (1985); GHALY & BEN (1995); Siso (1996); Florentino (2006); Florêncio *et al.*, (2007); Prazeres *et al.*, (2012)

As características físico-químicas do soro do leite (pH, matéria orgânica, nitrogênio total, dentre outras) o tornam um dos efluentes industriais de maior impacto ambiental. Os seus valores de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e carbono orgânico total (TOC), além do nitrogênio total (TN) estão apresentados na Tabela 2.2, conforme dados obtidos da literatura (MARWAHA & KENNEDY, 1988; BEN-HASSAN & GHALY, 1994; COSTA, 1995; SISO, 1996; FARRO, 2003; GHASEMI *et al.*, 2009).

O teor de matéria orgânica do soro de leite ocorre principalmente pela presença da lactose, seguida das proteínas. Também contribuem com os níveis de contaminação: os sólidos suspensos, as concentrações de fósforo e de gorduras (PRAZERES *et al.*, 2012).

A coagulação do leite pode gerar dois tipos de soro, de acordo com as tecnologias utilizadas na precipitação da caseína: o soro doce, obtido por ação enzimática, cujo pH encontra-se entre 6,0 e 6,8; e o soro ácido, obtido por acidificação, cujo pH está entre 4,4 e 4,6 (MORR, 1990; FLORENTINO, 2006; FLORÊNCIO *et al.*, 2007).

Tabela 2.2: Características efluentes do soro do leite

Parâmetro	Concentração (gL ⁻¹)
Açúcar total	28
DQO total	50 – 100
DQO solúvel	42,26
DBO	27 – 60
TOC	28,85
TOC solúvel	21,6
TN	1,58 – 2
DBO ₅ /DQO	>0,5

Fonte: Adaptado de Marwaha & Kennedy, (1988); Ben-Hassan & Ghaly (1994); Costa, (1995); Siso, (1996); Farro, (2003); Ozmihci & Kargi (2006); Ghasemi *et al.*, (2009); Prazeres *et al.*, (2012)

Quando liberado no meio ambiente, o soro do leite pode causar o esgotamento do oxigênio dos corpos hídricos, afetando a vida aquática (PANESAR & KENNEDY, 2012), além da impermeabilização, toxicidade e eutrofização do solo (PRAZERES *et al.*, 2012). Além do impacto ambiental gerado por seu despejo inadequado (KOSIKOWSKI, 1977; SONG *et al.*, 2007; EL-KHAIR, 2009), algumas indústrias de manufatura de queijo apresentam grandes custos de tratamento dos efluentes de soro de leite.

Nesse contexto, algumas indústrias vêm reutilizando o soro do leite na produção de sorvetes, iogurtes, bebidas carbonatadas e lácteas, ricota, concentrado proteico, sopas, molhos de carne e salsicha, alimentos dietéticos, produtos de panificação e biscoitos (BRANDÃO, 1994; CARMINATTI, 2001; SMITHERS, 2008).

Em virtude da disponibilidade de lactose e nutrientes essenciais para o crescimento de micro-organismos, o uso do soro do leite tem sido promissor na produção de diferentes bioprodutos (YALCIN *et al.*, 2009).

Para que a utilização do soro do leite em processos biotecnológicos seja eficiente, os componentes de interesse são adequadamente separados por meio de tecnologias de separação por membranas. Em geral, o soro passa por processo de ultrafiltração, obtendo-se duas frações: o concentrado ou retentado, que é rico em proteínas e gorduras; e o permeado, rico em lactose e sais minerais.

O concentrado possui valor econômico significativo, já que tem sua aplicação comercial definida na produção de concentrado proteico de soro do leite ou *whey protein concentrate*, que é utilizado como suplemento alimentar para o consumo humano (MORR, 1985; SMITHERS, 2008). O valor nutricional da proteína do soro de leite é considerado elevado, superando em aproximadamente 15% o valor proteico do ovo.

O permeado possui menor aplicação no setor industrial e valor econômico reduzido, devido à sua composição menos interessante do ponto de vista nutricional (MOULIN & GALZY, 1984; MARWAHA & KENNEDY, 1988; SCHEPERS *et al.*, 2006; PANESAR & KENNEDY, 2012). Por outro lado, a utilização do permeado em bioprocessos como a fermentação a etanol tem ganhado destaque (DOMINGUES *et al.*, 1999; DRAGONE *et al.*, 2009; SANSONETTI *et al.*, 2009).

2.2 Caracterização do permeado de soro de leite

Os teores dos elementos nutricionais e parâmetros físico-químicos que caracterizam o permeado variam em função da tecnologia de separação por membrana aplicada para concentrar a proteína do soro do leite – ultrafiltração,

diafiltração ou nanofiltração. Em média as composições dos principais elementos: lactose, sais minerais, proteínas, gorduras e vitaminas dos complexos A, B e C, variam, conforme apresentado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Composição média do permeado de soro do leite

Componente	Quantidade (mg 100 g ⁻¹ matéria seca)	% (p/p)
Lactose	-	70 – 85
Minerais	-	6 – 20
Proteínas	-	0,5 – 3
Gorduras	-	<0,1 – 2
Cálcio	490	-
Sódio	429	-
Fósforo	480	-
Manganês	90	-
Potássio	40	-
Zinco	30 – 33	-
Ferro	3 – 11	-
Cobre	1 – 3	-
Vitamina A	80	-
Riboflavina (B ₂)	15 – 20	-
Piridoxina (B ₆)	5 – 10	-
Tiamina (B ₁)	5 – 6	-
Cobalamina (B ₁₂)	0,02 – 0,05	-
Vitamina C	20 – 40	-
Pantotenato de cálcio (B ₅)	50 – 60	-
Biotina (B ₈)	0,1 – 0,3	-

Fonte: Adaptado de Moulin & Galzi (1984); Sooro LTDA

2.3 Aplicações do soro do leite e do permeado

O soro tem sido amplamente reaproveitado na fabricação de ricota, bebidas lácteas, soro em pó, concentrado proteico e lactose. As aplicações do permeado como reaproveitamento são diversas, tais como na produção de bebidas à base de permeado (VOJNOVIÉ *et al.*, 1993), em produtos de panificação (COSTA, 1995; DIXON, 2008; GERDES, 2011), no isolamento de compostos bioativos (MANNUCCI, 2009) e na obtenção do lactitol e lactulose (ZADOW, 1986; RENNER & EL-SALAM, 1991; YANG & HUANG; 1995).

A valorização do soro do leite e do permeado também tem sido alcançada com aplicações em processos fermentativos, tais como a fermentação para a obtenção de etanol (DOMINGUES *et al.*, 1999; KOURKOUTAS *et al.*, 2002; ZAFAR & OWAIS, 2006; OZMIHCI & KARGI, 2007a; OZMIHCI & KARGI, 2007b;

DRAGONE *et al.*, 2009; SANSONETTI *et al.*, 2009), a fermentação para a obtenção de hidrogênio (YANG *et al.*, 2007; AZBAR *et al.*, 2009; AZBAR & DOKGOZ, 2010) e fermentação para a obtenção de ácido láctico (VASALA *et al.*, 2005; SCHEPERS *et al.*, 2006; GONZÁLEZ *et al.*, 2007). Além dessas fermentações, a disponibilidade de lactose presente no soro e no permeado têm favorecido a produção de butanol, glicerol, enzimas β -galactosidase e poligalactorunase, metano, vitaminas do complexo B, aminoácidos glutâmico, lisina e treonina, polissacarídeos goma xantana, dextrano, manana e pululana, ácidos propiônico, acético, cítrico e butírico, e proteína unicelular (YANG & HUANG; 1995; DOMINGUES *et al.*, 1999; GHALY *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2005; INGLET *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2007; PANESAR & KENNEDY, 2012).

Diversas leveduras têm capacidade de fermentar a lactose, dentre as quais se destacam a *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis* e *Saccharomyces marxianus* (PONSANO & CASTRO-GOMEZ, 1995; GHALY & EL-TAWEEL, 1997; SANTIAGO *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2005; KARGI & OZMIHEI, 2006; ZAFAR & OWAIS, 2006; DRAGONE *et al.*, 2009).

Silveira *et al.*, (2005) investigaram o efeito do nível de oxigênio e da concentração de lactose no metabolismo da *K. marxianus* UFV-3, utilizando o permeado como substrato. Observou-se que o aumento na concentração de lactose aumentou o rendimento de etanol e reduziu a produção de células. Todos os níveis de oxigênio investigados mostraram uma tendência de saturação da taxa de produção de etanol acima de 65 gL⁻¹ de lactose.

Zafar e Owais (2006) utilizaram a *K. marxianus* no estudo da cinética da produção de biomassa e etanol a partir do soro do leite. A levedura metabolizou grande parte da lactose em 22 horas, fornecendo 8,9 gL⁻¹ de biomassa e 0,10 gL⁻¹ de etanol. A taxa de crescimento atingiu o valor máximo de 0,157 h⁻¹ durante a fase exponencial, e diminuiu significativamente após 12 horas de fermentação. Os autores sugeriram um efeito inibidor do etanol sobre a taxa de crescimento devido à relação entre a concentração de etanol e a taxa de crescimento específico.

Inglet *et al.* (2006) utilizaram o permeado como um meio alternativo para o cultivo de micélio do cogumelo comestível *Lentinus edodes*. O objetivo foi otimizar as condições de cultivo em estado sólido, avaliando como resposta a taxa de

crescimento micelial representada pela taxa de extensão radial (mm d^{-1}). Foram estudados diferentes concentrações de substrato (40 a 60 g de lactose L^{-1}), temperatura (20 a 30 °C) e pH (4 a 6). Os resultados mostraram que as melhores condições foram: 40 g L^{-1} de lactose, 23,6 °C e pH 5,0 para o crescimento máximo de $6,41 \pm 0,47 \text{ mm d}^{-1}$.

Song *et al.*, (2007) utilizaram o permeado como substrato para o cultivo do micélio do fungo *Ganoderma lucidum*, que pode ser utilizado na gastronomia e na produção de medicamentos. Foram avaliadas as concentrações de substrato (25 a 45 g de lactose L^{-1}), pH (3,5 a 5,5) e temperaturas (25 a 35 °C). Os resultados mostraram que a temperatura e o pH afetam significativamente o crescimento do micélio, diferentemente da concentração de lactose. As condições previstas para a máxima taxa de extensão radial ($17,6 \pm 0,4 \text{ mm d}^{-1}$) ocorreram a 29,4°C e pH 4,4.

Espinosa-Gonzalez *et al.*, (2014) estudaram a produção de biocombustível por microalgas *Chlorella protothecoides* utilizando o permeado do soro de leite. Os experimentos foram conduzidos em sistema descontínuo e descontínuo alimentado, utilizando-se 182 g L^{-1} de lactose, pH 5,5, e adição de nutrientes como o fósforo, magnésio e cálcio. A produção de biomassa alcançou $9,1 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ em sistema descontínuo, e $17,2 \pm 1,3 \text{ g L}^{-1}$ em descontínuo alimentado.

2.4 Produção de biomassa celular microbiana

Após a Segunda Guerra Mundial, os alemães foram os pioneiros na utilização de micro-organismos de interesse nutricional na alimentação humana e animal. Esses micro-organismos, denominados de biomassa celular microbiana, quando produzidos para o consumo humano ou animal são também conhecidos como proteína de organismo unicelular ou *Single Cell Protein* – SCP, termo que surgiu em 1968 no Instituto de Tecnologia de Massachusetts (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000; ROEPCKE, 2007).

A produção de SCP para o consumo humano é um assunto relevante para a comunidade científica e para as indústrias. Esse fato deve-se especialmente ao acelerado crescimento populacional, a disponibilidade de matérias-primas, bem

como a manutenção da biodiversidade (GILLAND, 2002; WOLF *et al.*, 2003; BEKATOROU *et al.*, 2006).

A produção de SCP por fermentação da lactose tem sido alvo de estudos há muitos anos (MAIORELLA & CASTILLO, 1984; HUANG & KINSELLA, 1986; CHAMPAGNE *et al.*, 1990; GHALY *et al.*, 1992; INCHAURRONDO *et al.*, 1994; KITAMOTO & NAKAHARA, 1994). Segundo Boze *et al.* (1995), diversos gêneros de micro-organismos podem ser utilizados na produção de SCP, como as leveduras, os fungos, as bactérias e as algas. Contudo, é importante ressaltar que a aceitabilidade de um micro-organismo na dieta humana ou animal depende de sua segurança alimentar e de seu valor nutricional (JAY, 1996).

A composição média de proteínas e outros componentes disponibilizados por esses micro-organismos são apresentados na Tabela 2.4, conforme Miller & Litsky (1976). Ressalta-se que a maior dificuldade na consolidação do SCP na alimentação humana está na relevante quantidade de ácidos nucleicos, já que a ingestão excessiva desses elementos pode causar a precipitação de ácido úrico provocando sérios problemas de saúde, como gota ou cálculo renal.

Tabela 2.4: Composições médias de diferentes gêneros de micro-organismos

Componente	% (peso seco)			
	Levedura	Bactéria	Fungo	Alga
Proteínas	45-55	50-65	30-45	40-60
Gorduras	2-6	1-3	2-8	7-20
Ácidos Nucleicos	6-12	8-12	7-10	3-8
Cinzas	5-10	3-7	9-14	8-10

Fonte: Miller & Litsky (1976)

Para um micro-organismo ser considerado ideal na produção de SCP, ele deve apresentar características, tais como: boa digestibilidade e atoxicidade, alto rendimento de biomassa, alta afinidade pelo substrato, habilidade em desenvolver alta densidade celular, baixo teor de ácidos nucleicos, além de pouca demanda nutricional para o seu crescimento (ROEPCKE, 2007).

ANUPAMA & RAVINDRA (2000) ressaltam a utilização de leveduras por suas altas taxas de crescimento, pela facilidade de separação do meio fermentativo, devido as maiores dimensões celulares e capacidade de floculação.

E, por suprirem suas necessidades por carbono e nitrogênio a partir de diversas matérias-primas consideradas resíduos das indústrias alimentícias e agroindústria (SALICETI-PIAZZA *et al.*, 1992; CHANDA & CHAKRABARTI, 1996; RHISHIPAL & PHILIP, 1998; SINGH, 1998; RAJOKA *et al.*, 2006).

As leveduras raramente são tóxicas ou patogênicas, possuem maior aceitação pelos consumidores frente aos demais micro-organismos, e são os mais estudados e utilizados para a produção de proteínas (BOZE *et al.*, 1995). Além de fonte de proteínas e gorduras, as leveduras fornecem quantidades significativas de carboidratos, minerais, vitaminas do complexo B e aminoácidos essenciais. De acordo com ANUPAMA & RAVINDRA (2000), as leveduras contêm tiamina, riboflavina, biotina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, colina, streptogenina, glutathione, ácido fólico e ácido p-aminobenzóico (FRAZIER & WESTHOFF, 1990; BUTOLO, 1996), além de lisina, triptofano, leucina e treonina (HALASZ & LÁSZTITY, 1991; BOZE *et al.*, 1995).

A espécie mais estudada é a *Saccharomyces cerevisiae*, a qual tem sido amplamente utilizada na fabricação de alimentos, bebidas e etanol (BEKATOROU *et al.*, 2006).

Giec e Kosikowski (1982) observaram a eficiência de dez espécies de levedura que fermentam a lactose disponível no permeado do soro de leite, objetivando a produção e o rendimento da biomassa. As leveduras estudadas foram a *Kluyveromyces fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. lactis*, *Bretanomyces anomalus* e a *Candida blankii* e suas diferentes linhagens. Os experimentos foram conduzidos em meio suplementado com 0,5% de sais de sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e fosfato monobásico de potássio - K_2HPO_4 . Os resultados mostraram que altas taxas de aeração aumentaram significativamente o rendimento da biomassa e apontaram a *K. fragilis* ATCC 8582 como sendo a levedura de maior eficiência, alcançando 8 e 11 gL^{-1} de biomassa em 5 e 12% de lactose, respectivamente.

Shay *et al.* (1987) utilizaram o permeado no crescimento da levedura *Kluyveromyces fragilis*, e mostraram elevado rendimento da biomassa microbiana (90 gL^{-1}) nas condições pH 4,5, temperatura de 37 °C e concentração de permeado de 60 gL^{-1} .

Champagne *et al.* (1990) utilizaram o permeado como substrato para o crescimento dos micro-organismos *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae*, de modo que a lactose foi convertida em ácido láctico e galactose por meio da fermentação pela bactéria *Streptococcus thermophilus*. O objetivo do estudo foi avaliar o crescimento dos micro-organismos cultivados sob as seguintes condições: temperatura de 30 °C, agitação de 700 rpm e aeração de 660 cm³ min⁻¹.

Ben-Hassan e Ghaly (1994) avaliaram o rendimento de biomassa a partir de leveduras utilizando o soro do leite como substrato, com o objetivo de reduzir o potencial poluidor do soro do leite. As eficiências de remoção obtidas foram: 58,61% de DQO total, 69,33% de DQO solúvel, 49,90% de sólidos totais, 51,77% de sólidos voláteis, 10,06% de nitrogênio total e 72,22% de nitrogênio amoniacal.

Grba *et al.*, (2002), estudaram cinco diferentes cepas de *Kluyveromyces marxianus* na produção de biomassa e etanol em soro do leite concentrado e desproteínizado. Avaliou-se a temperatura (30, 34 e 37°C) e a concentração de lactose (5, 10 e 15%) durante os processos fermentativos, as quais ocorreram em condições aeróbicas em pH 4,5 e 5,0. Os resultados apontaram que as cepas *K. marxianus* VST44 e ZIM 75 obtiveram o melhor resultado, alcançando 10 gL⁻¹ de biomassa e uma fração de etanol de 7,31%.

Rajoka *et al.* (2006) produziram SCP a partir do farelo de arroz desengordurado utilizando *Candida utilis*, com objetivo de otimizar as variáveis do processo. Os valores máximos de taxa específica de crescimento, de rendimento da biomassa e de produtividade foram: 0,31 h⁻¹, 0,65 gg⁻¹ e 1,24 gL⁻¹h⁻¹, respectivamente, sob condições otimizadas: 1 vv⁻¹m⁻¹ aeração, 50% de oxigênio dissolvido, 5% de licor de infusão de milho, 35 °C, pH 6,0 e 90 gL⁻¹ do substrato. O SCP apresentou 23,6; 32,75; 11,50; 12,95; 10,5 e 0,275% de proteína verdadeira, proteína bruta, fibra bruta, cinzas, celulose e ácidos nucleicos, respectivamente. Esses resultados mostraram que a fermentação poderia ser conduzida para a fabricação de ração animal. O teor de energia metabolizável foi de 29.711 kcal kg⁻¹, indicando que a SCP pode servir tanto como energia, bem como uma fonte de proteína.

2.5 Condições nutricionais para crescimento de leveduras

A utilização de leveduras para a produção de biomassa microbiana requer o conhecimento das exigências nutricionais para o seu crescimento, além de outras condições que envolvem seu metabolismo.

As suas necessidades nutricionais estão associadas à produção de energia para os processos de biossíntese e às substâncias fundamentais para a sua síntese celular (BOZE *et al.*, 1995). Isto significa que o seu crescimento depende da maneira como sintetizam os seus constituintes celulares, e como assimilam as fontes de energia a partir do catabolismo de substratos orgânicos.

As leveduras assimilam fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais em quantidades variadas, de acordo com o seu sistema enzimático de transporte. Portanto, visando o crescimento ótimo para o cultivo de levedura, é crucial o conhecimento de suas exigências nutricionais, das vias metabólicas envolvidas e das condições físico-químicas, condições as quais devem ser controladas adequadamente para maximizar a eficiência no rendimento e produção (FANG e ZHONG, 2002).

O carbono é o elemento essencial para a biossíntese de constituintes celulares como os ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos e proteínas. Além dele, o nitrogênio é fundamental na formação de ácidos nucleicos e aminoácidos. Adicionalmente, os compostos inorgânicos (fósforo, enxofre, potássio, cálcio, sódio, ferro e magnésio) são responsáveis por suprir as funções fisiológicas e estruturais das leveduras. E, na constituição de enzimas e coenzimas são importantes os elementos-traço como manganês, níquel, boro, cobalto, zinco, cobre, cromo e molibdênio (BAILEY & OLLIS, 1986; HALASZ & LASZTITY, 1991; QUINTERO, 1993; WANG *et al.*, 2001). Portanto, o crescimento de leveduras depende de fontes de nitrogênio e carbono, além de inorgânicos e algumas vitaminas.

O percentual dos principais elementos na constituição das leveduras é apresentado na Tabela 2.5, na qual se observa que o carbono e nitrogênio equivalem a cerca de 50 e 9% de sua massa seca, respectivamente.

Geralmente, os elementos nutricionais são adicionados diretamente ao meio de cultivo das leveduras. As fontes de nitrogênio podem ser utilizadas na forma orgânica ou inorgânica – amônio, aminoácidos, proteínas, ureia, nitrogênio

molecular ou nitratos –, sendo o sulfato de amônio o sal mais utilizado devido ao seu baixo custo (CARVALHO & SATO, 2001; PEREIRA *et al.*, 2008). Poucas leveduras têm a capacidade de utilizar os nitratos, e a maioria das espécies assimilam diretamente os íons de amônio e ureia. O fósforo e enxofre são geralmente assimilados sob a forma de fosfatos inorgânicos e sulfatos, respectivamente (BOZE *et al.*, 1995; BEKATOROU *et al.*, 2006).

Tabela 2.5: Composição elementar das leveduras

Elemento	Quantidade (%)
Carbono	46-52
Oxigênio	18-24
Hidrogênio	8-12
Nitrogênio	5-9
Potássio	1,0-4,0
Fósforo	0,8-2,5
Magnésio	0,1-0,5
Cálcio	0,1-0,3
Ferro	0,01-0,5
Enxofre	0,01-0,25
Outros	<0,01

Fonte: Bailey & Ollis, 1986

A principal fonte de carbono e energia para a maioria das leveduras é a glicose, que é convertida por meio da via glicolítica em piruvato e pelo ciclo de Krebs em anabolitos e energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Em anaerobiose as leveduras não se desenvolvem de forma eficiente e os açúcares são convertidos em produtos intermediários, como o etanol, glicerol e dióxido de carbono. Já em condições aeróbias, as leveduras convertem os açúcares em biomassa, CO₂ (dióxido de carbono) e energia (BEKATOROU *et al.*, 2006).

De acordo com Lambert e Meers (1983), a escolha da fonte de carbono é fundamental, pois a síntese de diversas biomoléculas está sujeita à repressão catabólica. Os autores relatam que a glicose é uma excelente fonte de carbono para o crescimento celular e destacam também outras fontes como a lactose, galactose e manose.

Uma desvantagem do uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de biomassa com substratos como o soro de leite e o permeado, está em sua incapacidade de utilizar diretamente a lactose como fonte de carbono (CHEN & CHIGER, 1985). Para que essa levedura possa ser utilizada, faz-se

necessária a conversão da lactose em glicose e galactose via enzimas livres ou mobilizadas ou por meio da hidrólise química, conforme descrição de Siso, (1996). Alternativas viáveis também são: a conversão da lactose em ácido láctico, e a manipulação genética da *S. cerevisiae*, com o intuito da utilização direta da lactose como substrato de carbono (MOULIN & GALZY, 1984; CHAMPAGNE *et al.*, 1990).

A hidrólise química caracteriza-se por condições ácidas (pH menores que 1,5) e elevadas temperaturas (maiores que 150 °C) (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Conforme Siso (1996), a hidrólise química apresenta algumas desvantagens: a desnaturação da proteína, o aparecimento de coloração marrom decorrente da reação de Maillard, a necessidade de pré-desmineralização e a formação de produtos indesejáveis. Por outro lado, a hidrólise enzimática é realizada por meio da adição de enzimas da lactose – encontradas em plantas, animais, bactérias, fungos e leveduras –, responsáveis pela conversão da lactose em glicose e galactose. De acordo com Prazeres *et al.*, (2012), as desvantagens apresentadas por esta técnica são: a polimerização da lactose ou galactose com a formação de oligossacarídeos (GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985), as limitações de transferência de massa de lactose para as células (JOSHI *et al.*, 1987), e o elevado custo quando utilizadas enzimas livres, devido à impossibilidade de reutilização da lactose (SISO, 1996).

Portanto, para a utilização da lactose como substrato em processos fermentativos empregando a levedura *S. cerevisiae*, recomenda-se a hidrólise enzimática, a qual tem sido realizada com enzimas derivadas de espécies *Aspergillus* e a *Kluyveromyces* (ZADOW, 1986; YANG & HUANG, 1995; HOLSINGER, 1997; GRBA *et al.*, 2002; BEKATOROU *et al.*, 2006).

O número de micro-organismos, disponíveis comercialmente, capazes de metabolizar a glicose e a galactose é maior que o número de micro-organismos capazes de utilizar a lactose diretamente como fonte de carbono (SISO, 1996). Apenas algumas espécies das leveduras *Kluyveromyces* e *Candida* são capazes de metabolizar a lactose.

O gênero *Saccharomyces* é o mais utilizado para a produção de biomassa, por apresentar a segurança alimentar para o consumo humano e animal, e um

metabolismo amplamente conhecido, por ser de fácil manipulação e crescimento, além de se desenvolver em altas concentrações de substrato (KOEPCKE, 2007). De acordo com McFarland (1996), a espécie *S. boulardii* não utiliza a lactose como fonte de carbono, sendo necessária a quebra da lactose em glicose e galactose. O termo *S. boulardii* ainda é inválido devido ao reduzido número de pesquisas publicadas e reconhecidas internacionalmente, conforme o *International Code of Botanical Nomenclature* (ICBN) (1994). Porém, alguns manuais taxonômicos consideram *S. boulardii* sinônimo de *S. cerevisiae*. Portanto, para fins de comparação, este estudo utilizar-se-á, quando necessário, de dados sobre a levedura *S. cerevisiae*.

2.6 *Saccharomyces boulardii*

Em 1950, estudiosos da Indochina isolaram da lichia a levedura *Saccharomyces boulardii*. Estudos preliminares demonstraram que a *S. boulardii* era uma levedura não patogênica, e, desde então ela tem sido cada vez mais estudada, consolidando-se como agente preventivo e terapêutico no tratamento de indivíduos com distúrbios gastrointestinais (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993; LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; KÜHLE *et al.*, 2005; SAZAWAL *et al.*, 2006; CZERUCKA *et al.*, 2007; VANHEE *et al.*, 2010).

Segundo Czerucka e Rampal (2002), a *S. boulardii* pode atuar benéficamente contra patógenos entéricos como *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli*, a partir de dois mecanismos principais: (i) a produção de elementos que neutralizaram as toxinas bacterianas e, (ii) a modulação da via de sinalização da célula hospedeira implicado na resposta pró-inflamatória durante a infecção bacteriana.

O potencial probiótico da *S. boulardii* possui as seguintes vantagens: capacidade de sobreviver no trato gastrointestinal; resistência a antibióticos antibacterianos; capacidade de atingir rapidamente elevadas concentrações no organismo; não coloniza permanentemente o intestino; e rápida eliminação pelo organismo (CZERUCKA *et al.*, 2007). Além disso, a *S. boulardii* tem sido cada vez mais incorporada na dieta alimentar humana com o intuito de manter equilibrada a flora microbiana gastrointestinal (SURAWICZ *et al.*, 2000; CANONICI *et al.*, 2011).

Do ponto de vista bioquímico, a *S. boulardii* é uma levedura aeróbia facultativa, isto é, dependendo das condições ambientais em que se encontra, ela possui a capacidade de adaptar-se metabolicamente às condições de aerobiose ou anaerobiose. No processo fermentativo em aerobiose, há a conversão do açúcar em biomassa, dióxido de carbono e água e seu produto de excreção pode ser oxidado metabolicamente produzindo mais biomassa e gerando mais ATP (adenosina trifosfato). Por outro lado, em condições anaeróbicas, a maior parte do açúcar é convertida em etanol e dióxido de carbono, gerando um produto de excreção sem utilidade para a célula (LIMA *et al.*, 2001; BEKATOROU *et al.*; 2006).

São escassos os trabalhos sobre a utilização da *S. boulardii* na produção de biomassa celular. Müller (2006) analisou a cinética do crescimento da *S. boulardii* em biorreator tipo *air lift* com aeração de 1,0 e 1,5 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto), comparando seu crescimento com frascos agitados mecanicamente (agitador incubador). Em todos os processos descontínuos houve a redução do pH e a fase de crescimento exponencial teve duração de 5 h (horas) e 6 h para o agitador incubador e o biorreator *air lift*, respectivamente. Os experimentos foram realizados à temperatura de 30°C e agitação de 200 rpm. Verificou-se que durante a fase exponencial, as velocidades específicas de crescimento foram semelhantes para o agitador incubador e o biorreator *air lift* com 1,0 vvm (0,350 h⁻¹ e 0,351 h⁻¹, respectivamente).

2.7 Cinética de Processos Fermentativos

Durante o processo fermentativo as amostras do material fermentado são coletadas para análise das concentrações do substrato (ou nutrientes) que está sendo utilizado pelo micro-organismo, do produto do metabolismo (ou metabólitos) e do micro-organismo (ou biomassa). Desse modo, os valores experimentais de concentração de biomassa, de produto e de substrato (X, P e S respectivamente), quando representados em função do tempo, possibilitam traçar curvas de ajuste, as quais são indicadas por $X=X(t)$, $P=P(t)$ e $S=S(t)$, conforme as clássicas curvas cinéticas apresentadas na Figura 2.1.

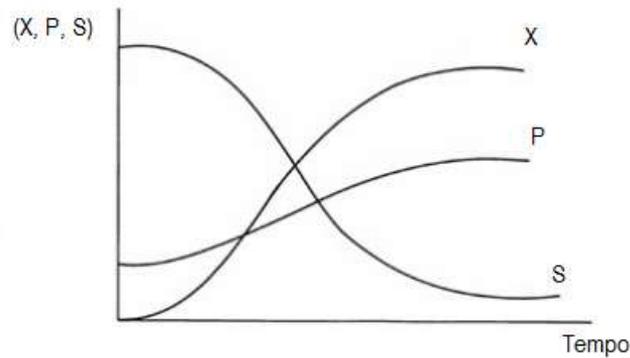


Figura 2.1: Cinética de processos fermentativos

Fonte: Adaptado de Hiss (2001)

A desvantagem principal da fermentação descontínua está nos baixos rendimento e produtividade, quando o substrato adicionado em uma única vez no início da fermentação exerce efeitos de inibição, de repressão ou de formação de produtos indesejados do metabolismo celular.

O conhecimento da cinética de processos fermentativos possibilita compreender e prever esses efeitos, comparar quantitativamente processos em diferentes condições de cultivo, avaliando-se efeitos do pH, da temperatura, da concentração de substrato, além de outros, por meio de variáveis respostas, tais como a velocidade de transformação e os fatores de conversão. O estudo da cinética baseia-se na análise da evolução temporal dos valores de concentração da biomassa e dos substratos que compõem o meio de cultura, e de metabólitos e produtos formados ao longo da fermentação (HISS, 2001). Para que uma adequada modelagem matemática seja realizada para descrever o processo, é fundamental o conhecimento de valores dos pontos iniciais desses componentes. Além disso, valores iniciais, intermediários e finais do processo fermentativo coletados com precisão e exatidão, são importantes para definir adequadamente as curvas cinéticas, possibilitando a posterior análise de simulação e otimização do processo sob o ponto de vista cinético.

Durante um cultivo descontínuo, a concentração microbiana (X) aumenta e, como consequência, aumenta também a concentração das enzimas responsáveis pela transformação do substrato (S) em produto (P). Desse modo, torna-se mais razoável a análise dos valores das velocidades instantâneas com relação à referida concentração microbiana, ou seja, relacionando-as com respeito ao valor

de X em um determinado instante. A seguir encontram-se as equações das velocidades específicas de crescimento (Eq. 2.1), consumo de substrato (Eq. 2.2) e formação de produto (Eq. 2.3), propostas por Gaden (1955).

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2.1)$$

$$\mu_S = \frac{1}{X} \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad (2.2)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (2.3)$$

Supondo um tempo t de fermentação, os valores equivalentes a X, S e P podem ser relacionados entre si, por meio dos fatores de conversão apresentados nas Equações 2.4, 2.5 e 2.6 (HISS, 2001).

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (2.4)$$

$$Y_{X/P} = \frac{X - X_0}{P - P_0} \quad (2.5)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (2.6)$$

Ao inocular um meio de cultura apropriado ao crescimento de um micro-organismo, sob condições controladas de temperatura, pH e agitação, observa-se um comportamento nos valores da concentração celular, o qual expressa o crescimento microbiano. O crescimento microbiano ocorre em quatro fases distintas bem definidas conforme apresentadas na Figura 2.2: (i) fase *lag*, (ii) fase *log*, (iii) fase estacionária e (iv) fase de declínio.

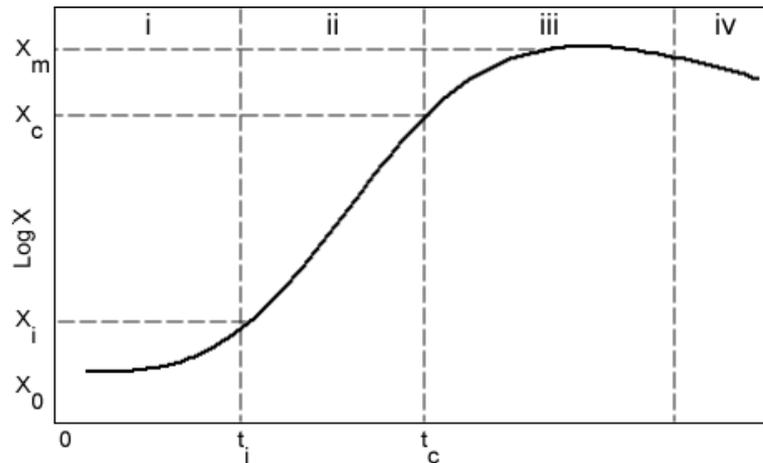


Figura 2.2: Curva de crescimento de micro-organismo em cultivo descontínuo

Fonte: Adaptado de Hiss (2001)

Na fase *lag* ocorre a adaptação das células microbianas ao novo ambiente, sendo que não ocorrem divisões celulares ($X = X_0 = \text{constante}$). A sua duração varia com a concentração do inóculo (valor de X_0) e com a idade do micro-organismo (tempo de pré-cultivo), além do seu estado fisiológico.

A fase *log* ou de crescimento exponencial é a etapa ativa de crescimento, na qual se duplica o número de células ao longo do tempo de geração (t_g), que depende das espécies utilizadas e das condições ambientais. Nessa etapa a velocidade específica de crescimento é máxima e constante ($\mu_x = \mu_m$), e o crescimento celular descrito pela Eq. 2.7, cuja integração entre t_i (tempo inicial) e t_c (tempo crítico) fornece a expressão analítica dada pela Eq. 2.8. Aplicando a definição do tempo de geração (t_g) na Equação 2.8, tem-se a expressão que o relaciona com μ_m , conforme a Eq. 2.9.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \quad (2.7)$$

$$X = X_0 \exp[\mu_m(t - t_0)] \quad (2.8)$$

$$\mu_m = \frac{0,693}{t_g} \quad (2.9)$$

Na fase estacionária as taxas de reprodução e de morte celular se igualam, pois os nutrientes disponíveis tornam-se escassos, além de haver o acúmulo de metabolitos tóxicos. Além disso, o oxigênio pode tornar-se escasso. E, por fim, na fase de declínio o valor da concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de produção de células novas, provocando uma queda acentuada da curva de crescimento celular.

Diversos modelos matemáticos têm sido utilizados para prever a influência dos parâmetros operacionais, cinéticos e estequiométricos da fermentação sobre a velocidade de crescimento específico de células, velocidades de utilização dos substratos e formação dos produtos. Dentre eles, os clássicos são o modelo de Monod (1949) e o modelo de Andrews (1968).

Para esclarecer a relação entre a concentração do substrato limitante (S) no meio, com a velocidade específica μ_x de reprodução do micro-organismo, Monod (1949), propôs a Eq. 2.10 (HISS, 2001). Esse modelo é amplamente aplicado, apesar de não ser capaz de prever a fase *lag*. Portanto, o modelo de Monod considera μ_x elevado e próximo do valor máximo (μ_m), já que o micro-organismo é colocado em um meio com concentração inicial de substrato relativamente elevada. Nessas circunstâncias, o micro-organismo é considerado adaptado.

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (2.10)$$

O parâmetro de saturação K_s representa a concentração do substrato na qual a velocidade específica de crescimento é a metade de seu valor máximo ($\mu_x = \mu_m/2$) (Figura 2.3-a). Isso mostra que quanto menor o seu valor, maior é a afinidade do micro-organismo pelo substrato, resultando em maior duração da fase exponencial, o que implica maior velocidade de crescimento celular.

O modelo de Monod não leva em conta o efeito inibidor, tanto pelo substrato quanto pelo produto formado. Assim, Andrews (1968) propôs um modelo matemático que considera a inibição pelo substrato, conforme a Eq. 2.11. Esse modelo presume que não há a ocorrência da fase *lag*, a morte celular, a respiração endógena, a manutenção de energia e a inibição pelo produto.

$$\mu_x = \mu_m \frac{S}{S + K_s + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2.11)$$

O efeito do substrato se manifesta quando um valor alto da concentração inicial de S pode, ao invés de aproximar μ_x de μ_m , provocar um efeito contrário, ocasionando uma inibição no crescimento celular (SCHMIDELL *et al.*, 2001), conforme a curva de crescimento apresentada na Figura 2.3 (b). Assim, o parâmetro K_i do modelo de Andrews é a constante de inibição pelo substrato, que ocorrerá para valores altos de S.

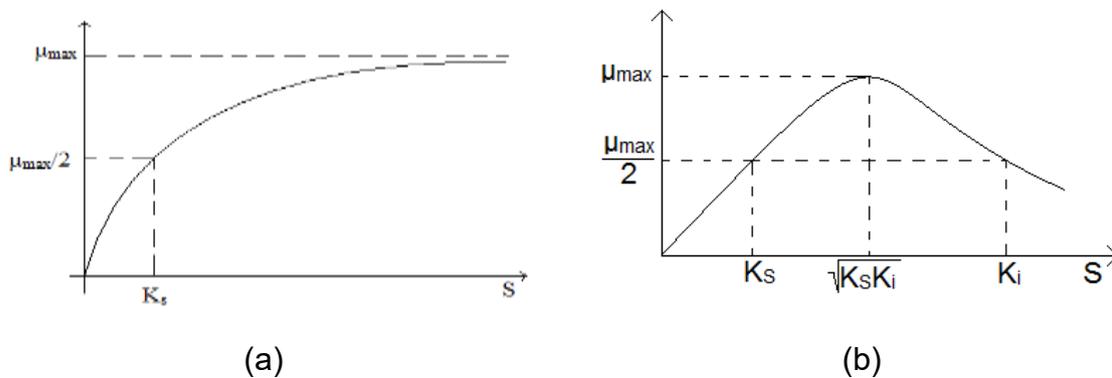


Figura 2.3: Representação gráfica da cinética de (a) limitação pelo substrato e (b) inibição pelo substrato

Fonte: Adaptado de Schmidell *et al.* (2001)

2.8 Modelagem da cinética de fermentação

Para auxiliar nas etapas de otimização de processos biotecnológicos, são fundamentais a utilização de ferramentas como a modelagem e a simulação de processos, conforme mostram alguns estudos teóricos e experimentais de processos fermentativos.

Ghaly *et al.*, (2005) desenvolveram um modelo matemático para a produção de biomassa celular microbiana a partir da levedura *Kluyveromyces fragilis*, utilizando o soro do leite como substrato, capaz de prever as concentrações de células e de substrato, a velocidade específica de crescimento e o rendimento celular em fermentação submersa aeróbica em sistema contínuo. O modelo levou em consideração a limitação e a inibição pelo substrato, a morte e a manutenção celular. Para simular a concentração do substrato (S) e a

concentração celular (X) durante o processo fermentativo foram propostas as expressões apresentadas nas Equações 2.12 e 2.13, respectivamente.

O modelo foi testado utilizando os dados experimentais obtidos ao longo das fermentações, e foi capaz de prever as concentrações de biomassa e substratos de forma satisfatória, com valores de r^2 variando entre 0,95 e 0,99. Os autores também relataram que concentrações de lactose abaixo de $1,91 \text{ gL}^{-1}$ limitaram o crescimento celular, e concentrações de lactose acima de 75 gL^{-1} inibiram o crescimento celular.

$$X = \frac{S_i - S_e}{R_q} \quad (2.12)$$

$$S_i - S_e = RX \left[\frac{1}{Y_{X/S}} \left(\frac{\mu_m S}{K_S + S} \frac{K_i}{K_i + S} \right) + m_S \right] \quad (2.13)$$

Phisalaphong *et al.*, (2006) desenvolveram um modelo matemático para descrever a produção de etanol por *S. cerevisiae* M30 em sistema descontínuo, utilizando o melaço de cana-de-açúcar como substrato. O modelo proposto pelos autores descreve o crescimento da biomassa (Eq. 2.14) e a formação de etanol (Eq. 2.15), considerando a limitação pelo substrato e inibição tanto pelo substrato quanto pelo produto.

$$\mu_X = \mu_m \left(\frac{S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_i}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \quad (2.14)$$

$$\mu_P = \mu_{m^P} \left(\frac{S}{S + K_{S^P} + \frac{S^2}{K_{i^P}}} \right) \left(1 - \frac{P}{P'_m} \right) \quad (2.15)$$

Os parâmetros do modelo foram estimados pelo método da taxa inicial, e em seguida foram ajustados utilizando uma técnica de regressão não-linear para minimizar o desvio dos mínimos quadrados entre as previsões do modelo e os dados experimentais. O efeito da temperatura foi avaliado, mostrando que valores elevados aceleram o efeito de inibição pelo substrato e pelo etanol sobre a

atividade celular, e por consequência diminuem o rendimento de biomassa e a produção de etanol.

Leite (2006) estudou a fermentação do soro do leite utilizando a bactéria *Lactobacillus helveticus* em fermentador em batelada, por um período de 32 horas, objetivando a produção de ácido lático. Os estudos cinéticos mostraram que o crescimento celular foi inibido pela concentração do substrato e do produto. Assim, o autor propôs descrever o crescimento microbiano, o consumo de substrato e a formação de produto a partir das seguintes expressões (Eq. 2.16 - 2.18).

$$X(t) = \frac{X_0 K e^{\mu_m t}}{K + X_0 (e^{\mu_m t} - 1)} \quad (2.16)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + m_S X \right) \quad (2.17)$$

$$P(t) = \frac{K_P}{K_p^{-rt} + 1} \quad (2.18)$$

O parâmetro m_S representa o coeficiente de consumo específico para manutenção de energia (h^{-1}); K_P corresponde à concentração teórica máxima do produto e r representa o valor máximo de $\left(\frac{1}{P}\right) \left(\frac{dP}{dt}\right)$.

Zafar e Owais (2006) estudaram a cinética de produção de biomassa e etanol por *K. marxianus* em processo descontínuo, utilizando o soro do leite como substrato. A levedura foi capaz de metabolizar a maior parte da lactose em 22 horas de fermentação, produzindo $8,9 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa e $2,10 \text{ gL}^{-1}$ de etanol. Os autores desenvolveram um modelo matemático que descreve o consumo de lactose, conforme a Eq. 2.19. Os autores concluíram que houve um efeito inibidor do etanol sobre a velocidade específica de crescimento de *K. marxianus*.

$$\frac{dS}{dt} = k_1 SX + k_2 \frac{S}{K_S + S} X \quad (2.19)$$

Vega *et al.*, (2007) construíram modelos, fenomenológico e empírico, não-lineares para descrever os dados experimentais da produção de biomassa celular e etanol a partir de *K. cicerisporus* em fermentação contínua, utilizando o soro de leite como substrato. Os autores avaliaram os efeitos do pH e da temperatura. O modelo fenomenológico leva em consideração o crescimento, a manutenção e a morte celular, o consumo de substrato devido à formação do produto, a inibição pelo substrato e pelo produto e a formação de produto. A expressão que descreve o crescimento celular é apresentada pela Eq. 2.20. Para a cinética de formação do produto, foi considerada uma parcela associada ao crescimento (α), e outra não associada (β), cuja expressão apresenta-se na Eq. 2.21.

$$\mu_x = \mu_{max} \left(\frac{S_C}{S_C + K_{S_C}} \right) \left(\frac{K_{i_C}}{S_C + K_{i_C}} \right) \left(\frac{K_{i_P}}{P + K_{i_P}} \right) \quad (2.20)$$

$$\mu_P = \frac{Y_{P/S_C}}{Y_{X/S_C}} (\alpha(\mu_x - kd) + \beta) \quad (2.21)$$

Alvarez *et al.*, (2010) estudaram a cinética da produção do ácido láctico, o crescimento da biomassa microbiana e o consumo de lactose durante o processo de fermentação descontínua da bactéria *Lactobacillus casei* utilizando o permeado de soro de leite. Utilizando o modelo de crescimento celular definido pela Eq. 2.22, os autores propuseram simular as cinéticas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto a partir dos balanços de massa (Eq. 2.23 - 2.25).

$$\mu = \mu_0 \exp(-\lambda[P]) \quad (2.22)$$

$$r_X = \frac{d[X]}{dt} = \mu[X] \quad (2.23)$$

$$r_P = \frac{d[P]}{dt} = \alpha r_X + \beta [X] \quad (2.24)$$

$$r_S = \frac{-d[S]}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \right) r_X + \left(\frac{1}{Y_{P/S}} \right) r_P \quad (2.25)$$

Onde r_x representa a taxa de crescimento de biomassa, t representa o tempo, r_p representa a taxa de produção de ácido láctico, α e β são parâmetros e λ é definida como um parâmetro de inibição pelo produto.

2.9 Balanço de massa em biorreator descontínuo

Um sistema descontínuo é caracterizado pela operação em que em um instante inicial a solução nutriente esterilizada no biorreator é inoculada com micro-organismos e incubada sob determinadas condições de temperatura, pH e agitação. No decorrer desse processo nada é adicionado, exceto o oxigênio em processos aeróbicos, e antiespumante e ácido ou base para o controle do pH.

Dessa forma, o balanço de massa em sistema descontínuo, sobre o micro-organismo (Eq. 2.26), o substrato (Eq. 3.29) e o produto (Eq. 3.31), é dado pelo sistema de equações diferenciais ordinárias conforme Fogler (1999) e Schmidell *et al.*, (2001).

O balanço de massa para o micro-organismo (Eq. 3.26) resulta da taxa de crescimento celular r_g (Eq. 3.27) subtraído da taxa de morte celular r_d (Eq. 3.28). A velocidade específica de crescimento μ_x é uma função descrita pelo modelo cinético de crescimento, e k_d é um parâmetro ajustável que representa a constante de decaimento celular.

$$\frac{dX}{dt} = r_g - r_d \quad (2.26)$$

$$r_g = \mu_x X \quad (3.27)$$

$$r_d = k_d X \quad (3.28)$$

O balanço de massa para o substrato (Eq. 3.29) é resultado da utilização do substrato para o crescimento celular ($Y_{s/x}$), para a manutenção das células (m_s) e para a formação do produto ($Y_{s/p}$). A taxa de consumo do substrato r_s é função da velocidade específica de consumo do substrato μ_s , conforme a Eq. 3.30.

$$\frac{dS}{dt} = r_s = Y_{s/x}(-r_g) - m_s X + Y_{s/p}(-r_p) \quad (3.29)$$

$$r_s = \mu_s X \quad (3.30)$$

O balanço para o produto (Eq. 3.31) pode ser associado à taxa de consumo do substrato r_s e do coeficiente de rendimento de substrato em produto ($Y_{p/s}$). A taxa de formação de produto r_p é função do modelo cinético de formação de produto μ_p , conforme a Eq. 3.32.

$$\frac{dP}{dt} = r_p = Y_{p/s}(-r_s) \quad (3.31)$$

$$r_p = \mu_p X \quad (3.32)$$

Capítulo 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização do permeado

O permeado de soro de leite em pó utilizado como substrato neste trabalho foi disponibilizado pela empresa SOORO LTDA. A caracterização do permeado (Tabela 3.1) foi realizada pela empresa, conforme a especificação detalhada apresentada no Anexo A.

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

Componente	Concentração (%)
Lactose	>88
Fósforo	0,48
Potássio	0,04
Magnésio	0,09
Sódio	0,42
Cálcio	0,49

Fonte: SOORO LTDA

3.2. Micro-organismo

A levedura *S. boulardii* foi obtida na forma liofilizada a partir do medicamento comercial Floratil® (Merck), onde cada cápsula de 200 mg contém aproximadamente 1×10^9 células da levedura.

3.3 Condições dos meios de cultura

3.3.1 Ativação celular

As células de *S. boulardii* foram ativadas em 250 mL do meio de cultura YEPD (*yeast extract peptone dextrose*) na composição de 5 gL^{-1} de extrato de levedura, 10 gL^{-1} de peptona de carne e 20 gL^{-1} de glicose, conforme Casal *et al.*, (2004). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. A levedura (cápsula de 200 mg de Floratil®) foi inoculada no meio de cultura, e transferida para uma incubadora tipo *shaker* (Solab Científica SL 222/CFR) com agitação de

100 rpm e temperatura controlada em 30°C por 24 horas. Após, 25 mL do meio contendo a levedura foram transferidos para outro *erlenmeyer* contendo meio YEPD esterilizado, seguido de incubação sob as mesmas condições.

3.3.2 Manutenção da levedura

A levedura foi mantida em meio YEPD acrescido de 20 gL⁻¹ de ágar-ágar, em tubos mantidos em estufa a 30°C por 48 horas. Após, os tubos foram armazenados em refrigerador a temperatura de 4° C.

3.4 Hidrólise enzimática do permeado

Foi preparada uma solução de permeado em diferentes concentrações, seguido pela adição de 0,1% (p/v) da enzima β -galactosidase (marca Lactozym Pure® 6500 L, da empresa Novozymes) obtida da espécie *Kluyveromyces lactis*, e posterior incubação em *shaker* sob 100 rpm e temperatura controlada em 30°C durante 3 horas. Após, a enzima foi desativada aquecendo a solução em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Todas as condições experimentais foram seguidas conforme Assunção (2014).

3.5 Preparo do inóculo

Primeiramente foi preparado o pré-inóculo, transferindo-se duas alçadas da levedura *S. boulardii* crescidas em meio ágar para frasco *erlenmeyer* contendo 250 mL de meio YEPD esterilizado. O frasco foi mantido em *shaker* sob agitação de 100 rpm, a 30°C por 24 horas (ASSUNÇÃO, 2014).

Para o preparo do inóculo, adicionaram-se os sais: sulfato de amônio - (NH₄)₂SO₄, sulfato de magnésio - MgSO₄ e fosfato monobásico de potássio - KH₂PO₄ (condições definidas pelo planejamento experimental) ao permeado hidrolisado. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,5 utilizando soluções de NaOH (hidróxido de sódio) e HCl (ácido clorídrico). Em seguida, o meio foi pasteurizado a 65°C por 30 minutos.

Foram transferidos 30 mL do pré-inóculo para frasco *erlenmeyer* contendo 270 mL do inóculo. O inóculo foi mantido em *shaker* sob agitação de 100 rpm, a 30°C por 12 horas (ASSUNÇÃO, 2014).

3.6 Cultivos de *S. boulardii*

Os cultivos foram realizados em recipientes de vidro (3 L de volume útil), que apresentam dois orifícios na parte superior, um para a coleta de amostras realizada a partir de uma seringa acoplada, e outro para o alívio da pressão interior exercida. Em cada recipiente foram preparados 1820 mL de meio de cultivo (sais e permeado), conforme planejamento experimental. Foram preservados 20 mL do meio de cultivo para análises posteriores. Após, 200 mL do inóculo foram adicionados à 1800 mL de meio de cultivo, sendo mantidos em incubadora *shaker* (Solab Científica SL 222/CFR) a 100 rpm e 30°C por 30 horas. O inóculo transferido passou por diluições adequadas para manter o número inicial de células de *S. boulardii* constante. A densidade óptica da suspensão celular foi medida a 600 nm, sendo o valor inicial de células fixado entre 0,500 e 0,600 unidades de absorbância (ASSUNÇÃO, 2014).

O acompanhamento do processo fermentativo foi realizado pelas medidas da concentração da biomassa, consumo de substrato e pH no período de 0 à 30 horas, com retiradas de amostras de 2 em 2 horas. Foram retiradas amostras de 15 mL, dos quais 3 mL foram utilizados para leitura da absorbância em espectrofotômetro (600 nm), e 12 mL foram armazenados em microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram centrifugados a 14000 rpm por 7 min. Após, o sobrenadante e o precipitado foram separados e o sobrenadante armazenado em freezer à temperatura de -10°C para posterior análise de açúcares redutores totais e glicose.

3.7 Planejamento experimental

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi aplicado para avaliar a influência de quatro variáveis: concentração do permeado hidrolisado, do sulfato de amônio, do sulfato de magnésio e do fosfato monobásico de potássio durante o cultivo de *S. boulardii* em sistema descontínuo, tendo como resposta a concentração de biomassa celular. O DCCR resultou em 24 ensaios, acrescidos de 4 pontos centrais, totalizando 28 ensaios. As condições utilizadas para a realização destes ensaios foram: pH 5,5, 30°C, 100 rpm e 30 h de fermentação. As variáveis e intervalos de concentração foram definidos a partir de estudos de Assunção (2004). Os níveis e valores reais das variáveis são apresentados na

Tabela 3.2. A Tabela 3.3 apresenta os ensaios do planejamento DCCR juntamente com os valores codificados e reais de suas variáveis.

Tabela 3.2: Níveis e valores reais das variáveis admitidas no planejamento DCCR

Variáveis (q)	Unidades	Níveis				
		-2	-1	0	+1	+2
q ₁ : (NH ₄) ₂ SO ₄	(gL ⁻¹)	3	4,5	6	7,5	9
q ₂ : MgSO ₄	(gL ⁻¹)	0	1,25	2,5	3,75	5
q ₃ : KH ₂ PO ₄	(gL ⁻¹)	0	1,5	3	4,5	6
q ₄ : permeado	(gL ⁻¹)	60	100	140	180	220

Tabela 3.3: Matriz do planejamento DCCR com valores codificados e reais de concentrações de (NH₄)₂SO₄ (q₁), MgSO₄ (q₂), KH₂PO₄ (q₃) e permeado de soro de leite (q₄)

Ensaio	q ₁ (gL ⁻¹)		q ₂ (gL ⁻¹)		q ₃ (gL ⁻¹)		q ₄ (gL ⁻¹)	
	Codificados	Reais	Codificados	Reais	Codificados	Reais	Codificados	Reais
1	-1	4,5	-1	1,25	-1	1,5	-1	100
2	+1	7,5	-1	1,25	-1	1,5	-1	100
3	-1	4,5	+1	3,75	-1	1,5	-1	100
4	+1	7,5	+1	3,75	-1	1,5	-1	100
5	-1	4,5	-1	1,25	+1	4,5	-1	100
6	+1	7,5	-1	1,25	+1	4,5	-1	100
7	-1	4,5	+1	3,75	+1	4,5	-1	100
8	+1	7,5	+1	3,75	+1	4,5	-1	100
9	-1	4,5	-1	1,25	-1	1,5	+1	180
10	+1	7,5	-1	1,25	-1	1,5	+1	180
11	-1	4,5	+1	3,75	-1	1,5	+1	180
12	+1	7,5	+1	3,75	-1	1,5	+1	180
13	-1	4,5	-1	1,25	+1	4,5	+1	180
14	+1	7,5	-1	1,25	+1	4,5	+1	180
15	-1	4,5	+1	3,75	+1	4,5	+1	180
16	+1	7,5	+1	3,75	+1	4,5	+1	180
17	-2	3	0	2,5	0	3	0	140
18	+2	9	0	2,5	0	3	0	140
19	0	6	-2	0	0	3	0	140
20	0	6	+2	5	0	3	0	140
21	0	6	0	2,5	-2	0	0	140
22	0	6	0	2,5	+2	6	0	140
23	0	6	0	2,5	0	3	-2	60
24	0	6	0	2,5	0	3	+2	220
25	0	6	0	2,5	0	3	0	140
26	0	6	0	2,5	0	3	0	140
27	0	6	0	2,5	0	3	0	140
28	0	6	0	2,5	0	3	0	140

3.8 Efeito do pH inicial

Após verificado o ensaio que obteve maior quantidade de produção de biomassa no planejamento DCCR, as condições deste ensaio foram mantidas em quatro outros ensaios, conforme a Tabela 3.4, para avaliação do efeito do pH inicial na produção de biomassa celular. Ajustou-se o pH com soluções de hidróxido de sódio e ácido clorídrico em concentração de 2N (normal).

Tabela 3.4: Valores de pH avaliados

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Permeado (gL ⁻¹)	Suplementação (gL ⁻¹)
29	3,5	30	100	Ensaio que obteve maior produção de biomassa no DCCR	Ensaio que obteve maior produção de biomassa no DCCR
30	4,5				
31	6,5				
32	7,5				

3.9 Efeito da relação entre as concentrações de carbono e nitrogênio

A influência da concentração de nitrogênio sobre a produção de biomassa celular foi analisada a partir de cinco ensaios, considerando-se a relação entre as fontes de carbono e nitrogênio (C:N).

As concentrações de nitrogênio sob a forma de sulfato de amônio foram utilizadas a 0; 1,25; 2,5; 5 e 10% da concentração da fonte de carbono considerando-se que o permeado possui 90% de lactose.

Todos os ensaios foram realizados a 30°C e 100 rpm, mantendo-se fixas as condições do ensaio que obteve maior quantidade de biomassa no planejamento DCCR e pH 5,5, conforme a Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Relação C:N avaliada na produção de biomassa celular

Ensaio	Relação C:N	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Permeado (gL ⁻¹) ¹	Suplementação (gL ⁻¹)	pH
33	10:1	30	100	Ensaio que obteve maior produção de biomassa no DCCR	Ensaio que obteve maior produção de biomassa no DCCR	5,5
34	10:0,5					
35	10:0,25					
36	10:0,125					
37	0					

3.10 Efeito da concentração de permeado

A concentração de permeado foi avaliada por seis ensaios (38 ao 43) com diferentes concentrações de permeado (60 a 300 gL⁻¹), conforme os valores apresentados na Tabela 3.6. Os parâmetros foram fixados conforme o ensaio que obteve a maior quantidade de biomassa celular no planejamento DCCR e com pH 5,5.

Tabela 3.6: Concentrações de permeado avaliados na produção de biomassa celular

Ensaio	Permeado (gL ⁻¹)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Suplementação (gL ⁻¹)	pH
38	60	30	100	Ensaio que obteve maior produção de biomassa no DCCR	5,5
39	100				
40	140				
41	220				
42	260				
43	300				

3.11 Efeito da aeração

Dois experimentos com aeração foram realizados em biorreator Tec-Bio-Flex de 4,5 L (marca TECNAL), cedido pelo SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial) de Toledo-PR.

Os ensaios 44 e 45 foram realizados com os parâmetros fixos: 30°C; 150 rpm; 1,5 vvm; o pH 5,5; as condições do ensaio que obteve maior quantidade de biomassa no planejamento DCCR, e duas concentrações de permeado conforme apresenta-se na Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Condições experimentais nos ensaios de aeração

Ensaio	Permeado (gL ⁻¹)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Suplementação (gL ⁻¹)	pH
44	200	30	150	1,5	Melhor condição do DCCR	5,5
45	220					

3.12 Métodos analíticos

3.12.1 Determinação do pH

Os valores de pH foram medidos em pHmetro de bancada da marca MS Tecnopon, modelo MPA 210, devidamente calibrado.

3.12.2 Determinação da concentração da biomassa

A concentração da biomassa microbiana foi obtida por curva de correlação entre os métodos de espectrofotometria e massa seca (Apêndice A). A densidade óptica de suspensão celular foi medida em triplicata em espectrofotômetro UV-Vis (marca Shimadzu, modelo UV-1800) a 600 nm. Adequadas diluições da amostra foram realizadas para manter a linearidade da absorção abaixo de 0,800 unidades. O valor de absorbância foi expresso na forma logarítmica $\ln(\text{Abs}/\text{Abs}_0)$, em que Abs_0 é a absorbância no tempo zero e Abs é a absorbância no tempo t .

A massa seca foi determinada em triplicata a partir de 20 mL da amostra coletada ao final da fermentação (30 horas). A amostra foi filtrada em membrana de acetato de celulose – 0,22 μm de tamanho de poro e 25 mm de diâmetro –, previamente seca em estufa a 90°C até a massa constante. Após a filtração, a membrana contendo a biomassa novamente foi seca em estufa a 90°C até a massa constante. O peso seco foi estimado pela relação entre a massa da membrana seca e o volume de amostra filtrada.

A concentração de biomassa foi estimada pela curva analítica construída a partir de gráficos com as médias dos valores de absorbância em função da concentração celular.

3.12.3 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores totais foram quantificados em triplicata pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), conforme a descrição apresentada no Anexo B. A concentração de glicose foi determinada em triplicata por método enzimático-colorimétrico a partir do kit de glicose PP (marca Gold Analisa), conforme descrição dada no Anexo C.

3.13 Análise estatística do planejamento experimental

A metodologia de superfície de resposta, a análise de resíduos e a análise de variância (ANOVA) foram utilizadas para avaliar os resultados obtidos pelo planejamento estatístico DCCR, a partir do *software* STATISTICA™, versão 8.0 (Statsoft, Inc.). O programa gerou uma tabela de efeitos mostrando a influência de cada variável e de suas interações sobre a resposta, considerando o nível de

significância de 5%. A viabilidade do modelo foi determinada pela análise de variância (ANOVA) a partir do Teste F e do valor do coeficiente de determinação (r^2)

3.14 Estimativa preliminar de parâmetros

Os parâmetros velocidade específica de crescimento (Eq. 3.1), conversão de substrato em célula (Eq. 3.2) e produtividade (Eq. 3.3) foram calculados para ajudar na estimativa dos parâmetros cinéticos e estequiométricos do modelo matemático utilizado para descrever o processo de produção de biomassa celular.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.1)$$

$$Y_{X/S} = \frac{(\text{massa de células formadas})}{(\text{massa de substrato consumido})} \quad (3.2)$$

$$\text{Produtividade} = \frac{(\text{massa de células formadas})}{(\text{tempo final})} \quad (3.3)$$

Os valores de velocidade específica de crescimento foram obtidos na fase exponencial. Já os valores de conversão de substrato em célula e de produtividade foram obtidos no tempo de 17 horas de fermentação.

3.15 Modelagem matemática e simulação do cultivo de *S. boulardii*

O desenvolvimento da modelagem matemática para o cultivo de *S. boulardii* foi realizado a partir do balanço de massa para biorreator descontínuo (FOGLER, 1999; SCHMIDELL *et al.*, 2001). As Equações 3.4 e 3.5 (PHISALAPHONG *et al.*, 2006) foram utilizadas para descrever a velocidade específica de crescimento celular e a velocidade específica de produção de produto, respectivamente. O modelo matemático foi ajustado aos dados experimentais obtidos durante o cultivo de *S. boulardii* a partir do procedimento de simulação realizado no *software* Maple®.

$$\mu_x = \mu_m \left(\frac{S_c}{S_c + K_{S_c} + \frac{S_c^2}{K_{i_c}}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \quad (3.4)$$

$$\mu_p = \mu_m^p \left(\frac{S_c}{S_c + K_{sc}^p + \frac{S_c^2}{K_{ic}^p}} \right) \left(1 - \frac{P}{P'_m} \right) \quad (3.5)$$

3.16 Estimação dos parâmetros do modelo matemático

Os parâmetros do modelo foram estimados pelo método de otimização baseado em Algoritmo Genético - AG (HOLLAND, 1975) implementado no *software* Maple®. A resolução do sistema de equações diferenciais ordinárias foi realizada pelo método de *Rosenbrock*. A função dos mínimos quadrados (Eq. 3.6) foi utilizada como critério de minimização, admitindo-se distribuição normal das variações experimentais e erros constantes em todas as condições experimentais.

$$FO = \sum_{i=1}^{NV} \sum_{j=1}^{NP} \left(\frac{\tilde{y}_{ij} - y_{ij}}{y_i^{max}} \right)^2 \quad (3.6)$$

A diferença entre os pontos experimentais e simulados pelo modelo foi dividida pelo ponto experimental de maior valor, a fim de minimizar tendências nas simulações devido à diferença de ordem das variáveis. Todas as execuções foram realizadas em microcomputador Intel Core i5, 5 GB de memória RAM.

Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições de obtenção de biomassa celular

As variáveis utilizadas no DCCR: sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sulfato de magnésio - MgSO_4 , fosfato monobásico de potássio - KH_2PO_4 e permeado, e a resposta a partir da concentração de biomassa celular são apresentadas na Tabela 4.1, conforme os valores reais investigados.

O DCCR ajustou um modelo teórico não linear às respostas obtidas nos experimentos mantidos em pH 5,5, 30°C e 100 rpm de agitação (ASSUNÇÃO, 2014). Para a análise estatística dos dados, fixou-se o tempo em 17 h de fermentação para todos os ensaios, pois neste intervalo de tempo foram obtidas as maiores concentrações de biomassa celular. As figuras que ilustram os perfis cinéticos para todos os ensaios realizados no planejamento DCCR encontram-se no Apêndice B.

A análise estatística dos resultados obtidos apresenta-se a partir da estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis (Tabela 4.2), o diagrama de Pareto (Figura 4.1), a análise de variância (Tabela 4.3), o modelo de regressão (Eq. 4.1), o gráfico dos resíduos em função dos valores preditos e o gráfico da probabilidade normal dos resíduos (Figura 4.2) e as superfícies de resposta (Figura 4.3).

De acordo com a Tabela 4.1, verifica-se que, para o ensaio 10 foi alcançada a maior concentração de biomassa celular (40 gL^{-1}), sendo utilizadas concentrações de $7,5 \text{ gL}^{-1}$ de sulfato de amônio, $1,25 \text{ gL}^{-1}$ de sulfato de magnésio, $1,5 \text{ gL}^{-1}$ de fosfato monobásico de potássio e 180 gL^{-1} de permeado.

Na Tabela 4.2 encontra-se a estimativa dos efeitos das variáveis e de suas interações sobre a resposta analisada, considerando o nível de significância de 5%. Os valores destacados em negrito indicam que a variável é significativa para o intervalo de confiança de 95% ($p\text{-valor} < 0,05$).

Tabela 4.1: Matriz do planejamento experimental DCCR – valores reais das variáveis investigadas ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 e permeado), e resposta de biomassa celular no tempo de 17 horas de cultivo

Ensaio	Variáveis independentes	Resposta
--------	-------------------------	----------

	[(NH ₄) ₂ SO ₄] (gL ⁻¹)	[MgSO ₄] (gL ⁻¹)	[KH ₂ PO ₄] (gL ⁻¹)	[Permeado] (gL ⁻¹)	Biomassa celular (gL ⁻¹)	Erro- padrão
1	4,5	1,25	1,5	100	24,34	± 0,12
2	7,5	1,25	1,5	100	22,12	± 0,25
3	4,5	3,75	1,5	100	26,43	± 0,06
4	7,5	3,75	1,5	100	22,22	± 0,09
5	4,5	1,25	4,5	100	24,02	± 0,17
6	7,5	1,25	4,5	100	20,51	± 0,27
7	4,5	3,75	4,5	100	24,04	± 0,32
8	7,5	3,75	4,5	100	25,13	± 0,10
9	4,5	1,25	1,5	180	33,85	± 0,21
10	7,5	1,25	1,5	180	40,06	± 0,10
11	4,5	3,75	1,5	180	35,45	± 0,39
12	7,5	3,75	1,5	180	32,08	± 0,26
13	4,5	1,25	4,5	180	32,41	± 0,39
14	7,5	1,25	4,5	180	36,31	± 0,31
15	4,5	3,75	4,5	180	35,21	± 0,22
16	7,5	3,75	4,5	180	36,75	± 0,39
17	3	2,5	3	140	31,82	± 0,25
18	9	2,5	3	140	30,33	± 0,20
19	6	0	3	140	31,03	± 0,24
20	6	5	3	140	32,57	± 0,24
21	6	2,5	0	140	24,98	± 0,17
22	6	2,5	6	140	28,21	± 0,21
23	6	2,5	3	60	17,75	± 0,14
24	6	2,5	3	220	33,69	± 0,32
25	6	2,5	3	140	28,98	± 0,22
26	6	2,5	3	140	27,23	± 0,31
27	6	2,5	3	140	27,14	± 0,19
28	6	2,5	3	140	27,42	± 0,22

De acordo com a Tabela 4.2, verifica-se que, entre as variáveis estudadas, a concentração de sulfato de amônio, sulfato de magnésio e permeado são significativas, ou seja, possuem influência na produção de biomassa celular por *S. bouldarii*, dentro do intervalo de confiança de 95% (p-valor<0,05).

Pelo diagrama de Pareto (Figura 4.1), bem como a partir do p-valor (Tabela 4.2), verifica-se que a concentração do permeado apresentou maior influência na concentração de biomassa celular. Além disso, o diagrama de Pareto mostra que a interação entre as variáveis não teve efeito significativo.

Tabela 4.2: Estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis utilizadas no planejamento experimental DCCR

Variáveis	Efeito	t(13) ^a	p-valor	Coefficiente	Erro-padrão do coeficiente
Intercepto	27,69610	26,56248	0,000000	27,69610	1,042677
[(NH ₄) ₂ SO ₄] (L)	-0,29413	-0,34549	0,735253	-0,14706	0,425671
[(NH₄)₂SO₄] (Q)^b	1,90538	2,23809	0,043350	0,95269	0,425671
[MgSO ₄] (L) ^c	0,56361	0,66203	0,519519	0,28181	0,425671
[MgSO₄] (Q)	2,26764	2,66361	0,019500	1,13382	0,425671
[KH ₂ PO ₄] (L)	0,35866	0,42129	0,680426	0,17933	0,425671
[KH ₂ PO ₄] (Q)	-0,33798	-0,39700	0,697810	-0,16899	0,425671
[permeado] (L)	10,43025	12,25153	0,000000	5,21513	0,425671
[permeado] (Q)	-0,77253	-0,90742	0,380696	-0,38626	0,425671
[(NH ₄) ₂ SO ₄] (L) x [MgSO ₄] (L)	-1,16447	-1,11681	0,284293	-0,58224	0,521339
[(NH ₄) ₂ SO ₄] (L) x [KH ₂ PO ₄] (L)	0,82631	0,79248	0,442301	0,41315	0,521339
[(NH ₄) ₂ SO ₄] (L) x [permeado] (L)	2,14116	2,05353	0,060709	1,07058	0,521339
[MgSO ₄] (L) x [KH ₂ PO ₄] (L)	1,50970	1,44791	0,171328	0,75485	0,521339
[MgSO ₄] (L) x [permeado] (L)	-1,24756	-1,19650	0,252869	-0,62378	0,521339
[KH ₂ PO ₄] (L)x [permeado] (L)	0,08350	0,80009	0,937389	0,04175	0,521339

^(a) Distribuição (estatística) “t” para 13 graus de liberdade do resíduo; ^(b) (Q) = termo quadrático; ^(c) (L) = termo linear

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a qual foi utilizada na regressão dos dados experimentais e das superfícies de resposta, conforme os valores apresentados na Tabela 4.3. A partir do teste F, comparou-se o valor de F calculado (F_{calc}) com F tabelado (F_{tab}). O valor de F tabelado para um intervalo de confiança de 95% é de $F_{\text{tab}(0,05;14;13)} = 2,55$.

Tabela 4.3: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento DCCR

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F(calc)	Coefficiente de determinação (r^2)
Modelo de regressão	762,9522	14	54,4966	12,5317	0,931
Resíduo	56,5332	13	4,3487	-	
Total	819,4854	27	-	-	

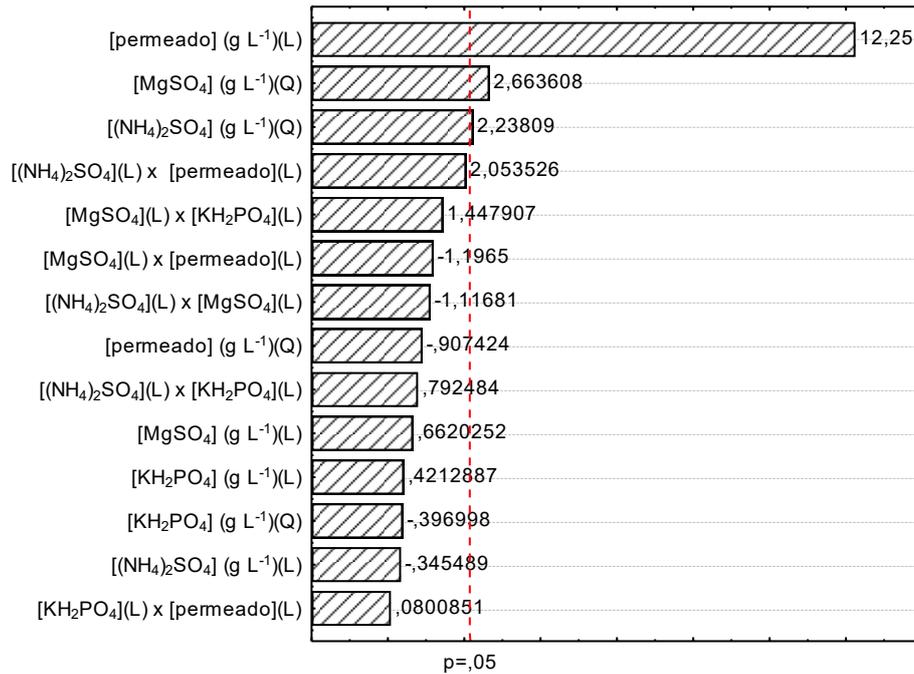


Figura 4.1: Diagrama de Pareto com efeito das variáveis e interações estudadas no planejamento DCCR para um nível de 5% de significância

Verifica-se que F_{cal} é cerca de 5 vezes maior que F_{tab} , mostrando que, pelo teste F, o modelo de regressão resultante da análise estatística descreve adequadamente a concentração celular como resposta à influência das variáveis significativas, conforme a Equação 4.1.

$$\begin{aligned}
 & \text{Concentração celular (g L}^{-1}\text{)} \\
 & = 27,69 - 0,14. [(NH_4)_2SO_4] + 0,95. [(NH_4)_2SO_4]^2 \\
 & + 0,28. [MgSO_4] + 1,13. [MgSO_4]^2 + 0,17. [KH_2PO_4] \\
 & - 1,16. [KH_2PO_4]^2 + 5,21. [permeado] - 0,38. [permeado]^2 \\
 & - 0,58. [(NH_4)_2SO_4]. [MgSO_4] + 0,41. [(NH_4)_2SO_4]. [KH_2PO_4] \\
 & + 1,07. [(NH_4)_2SO_4]. [permeado] + 0,75. [MgSO_4]. [KH_2PO_4] \\
 & - 0,62. [MgSO_4]. [permeado] + 0,04. [KH_2PO_4]. [permeado]
 \end{aligned} \tag{4.1}$$

Portanto, o coeficiente do modelo de regressão com maior relevância para concentração de biomassa é o termo linear da variável permeado, seguido do termo quadrático da variável sulfato de magnésio, e termo quadrático da variável sulfato de amônio.

A validação do modelo por meio da ANOVA pode ser corroborada pelo comportamento observado no gráfico dos resíduos em função dos valores

preditos pelo modelo de regressão e no gráfico da probabilidade normal dos resíduos, os quais podem ser observados na Figura 4.2.

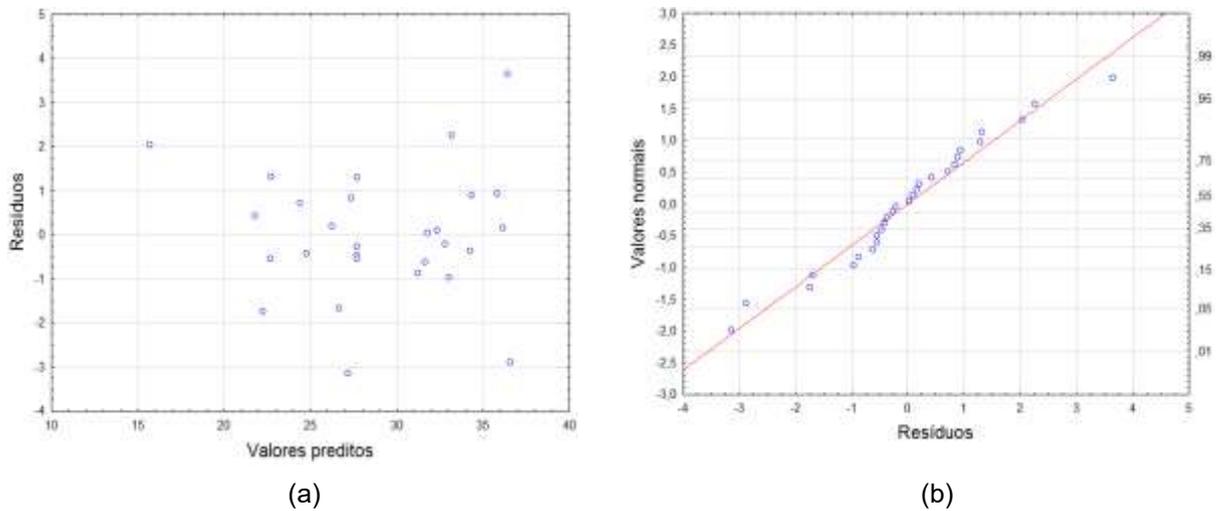


Figura 4.2: Resultado estatístico do planejamento DCCR - (a) resíduos em função dos valores preditos e (b) probabilidade normal dos resíduos

Observa-se na Figura 4.2 (a) a distribuição dos resíduos de forma aleatória em torno do zero para os valores preditos, o que confirma um ajuste adequado do modelo de regressão e sem tendências durante a predição dos valores calculados. Pela Figura 4.2 (b) verifica-se a ausência de valores discrepantes ou *outliers*. As superfícies de resposta geradas a partir da análise estatística dos resultados são apresentadas na Figura 4.3.

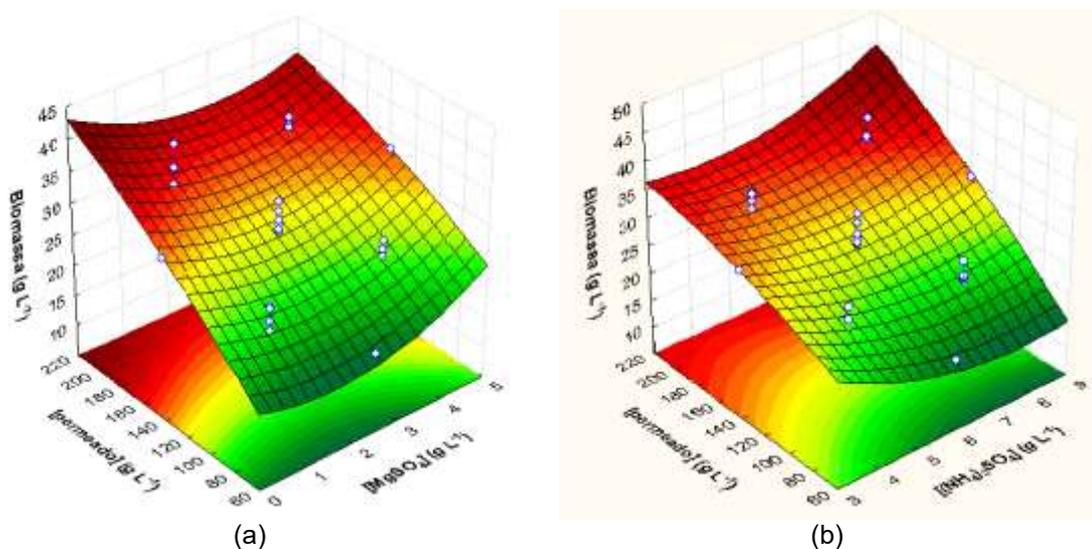


Figura 4.3: Superfícies de resposta para as variáveis (a) permeado e sulfato de magnésio, (b) permeado e sulfato de amônio

A avaliação das relações existentes entre as variáveis significativas sobre a concentração de biomassa mostra que a variável concentração de permeado mostrou maior influência sobre a mesma, em comparação com as demais variáveis estudadas. Portanto, pela Figura 4.3 (a) a suplementação com sulfato de magnésio em 6 gL^{-1} fornece a mesma concentração de biomassa (cerca de 45 gL^{-1}) sem o nutriente, no caso de utilizar-se elevadas concentrações de permeado (cerca de 240 gL^{-1}). Conclui-se que, dentro das faixas de concentração avaliadas no planejamento DCCR, caso o permeado apresente-se em concentrações mais elevadas, não há necessidade de suplementação com sulfato de magnésio.

A importância da variável sulfato de amônio mostrou-se menor frente à concentração de permeado, conforme apresentado pela Figura 4.3 (b). No entanto, analisando essa superfície, observa-se que a suplementação em altas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (em torno de 10 gL^{-1}), favorece a influência da concentração de permeado na resposta microbiana. Isso é observado pela relação linear de aumento de concentração de biomassa em função da concentração de permeado ser mais acentuada quando a concentração de sulfato de amônio aproxima-se de 10 gL^{-1} , e menos acentuada quando não há suplementação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Conclui-se que, dentro da faixa de concentração investigada pelo planejamento DCCR, a suplementação com elevadas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é tão importante quanto a não suplementação, quando elevadas concentrações de permeado são utilizadas.

A Figura 4.4 apresenta a cinética do crescimento celular (gL^{-1}), do consumo de substrato (gL^{-1}), da glicose (gL^{-1}) e pH durante o processo fermentativo na condição que obteve maior quantidade de biomassa celular no planejamento experimental DCCR (ensaio 10: 180 gL^{-1} de permeado; $7,5 \text{ gL}^{-1}$ de sulfato de amônio; $1,25 \text{ gL}^{-1}$ de sulfato de magnésio e $1,5 \text{ gL}^{-1}$ de fosfato monobásico de potássio). A linha pontilhada indica o tempo de 17 horas de fermentação, o qual foi utilizado para a análise estatística.

De acordo com a Figura 4.4 pode-se observar que o crescimento celular é menor nas primeiras 3 horas de fermentação, o que indica que esse processo apresentou a fase *lag*, ou fase de latência. Isto pode ter ocorrido pelo fato da célula ainda estar se adaptando às condições de cultivo intrínsecas e extrínsecas, como meio de cultivo e temperatura.

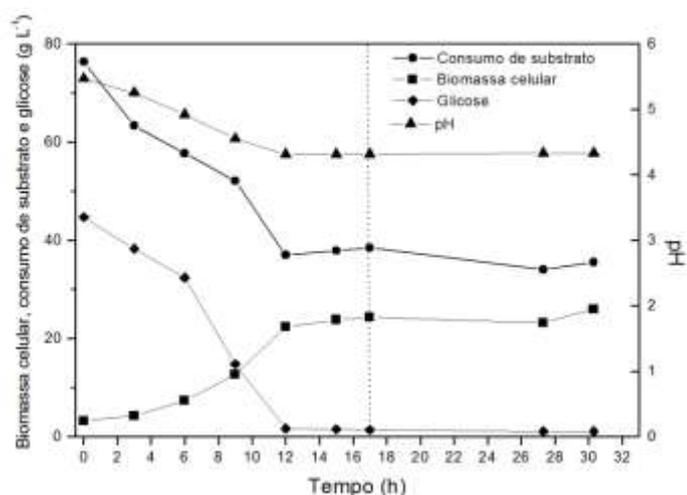


Figura 4.4: Cinética de crescimento da biomassa celular (g L⁻¹), consumo de substrato (g L⁻¹), glicose e pH durante o processo fermentativo (ensaio 10)

No período compreendido entre 3 e 17 horas de fermentação pode-se observar uma fase *log*, ou exponencial bem definida, na qual a curva de crescimento celular indicou que as condições foram favoráveis ao metabolismo celular. Müller (2006), obteve um comportamento semelhante em seus estudos utilizando a *S. boulardii*, em condições de temperatura 30°C, pH 5,5, agitação de 100 rpm, meio definido (20 g L⁻¹), sulfato de amônio (9,0 g L⁻¹), sulfato de magnésio (3,6 g L⁻¹) e fosfato monobásico de potássio (3,0 g L⁻¹). Os resultados obtidos pelo autor mostram que após 4 horas de fase *log* obteve-se 8,75 g L⁻¹ de biomassa celular, valor inferior ao alcançado no presente estudo (40 g L⁻¹).

Na Figura 4.4 verifica-se um decréscimo do pH até 17 horas de fermentação, indicando um aumento na acidez do meio fermentativo, conseqüente de uma provável produção de ácidos orgânicos, como os ácidos acético, láctico e succínico. Após 17 horas, observa-se a estabilização do pH.

Conforme a Figura 5.5, o consumo do substrato (fonte de carbono) foi de aproximadamente 70 g L⁻¹ em cerca de 17 horas de fermentação, fato que vinculado a estabilização do pH indica o patamar máximo de biomassa celular alcançado (40 g L⁻¹). A não metabolização total da fonte de carbono (180 g L⁻¹) pode ser explicada pelas seguintes hipóteses isoladas ou combinadas:

- 1) Consumo total dos nutrientes adicionados ao meio fermentativo (nitrogênio, magnésio e fósforo), o que impossibilitaria a síntese de enzimas, e conseqüentemente a metabolização da fonte de carbono;
- 2) Inibição pela concentração do substrato, a qual se mostra elevada (162 gL^{-1} de lactose, levando-se em consideração que o permeado apresenta 90% de lactose) podendo provocar a repressão catabólica por glicose;
- 3) Inibição do crescimento celular decorrente da toxicidade provocada pela produção de etanol e metabólitos secundários;
- 4) A levedura *S. boulardii* não consome a galactose presente no meio.

Avaliando-se a última hipótese, comparou-se o consumo de açúcar redutor total (glicose + galactose) com o consumo de açúcar redutor (glicose), a partir dos dados experimentais obtidos no ensaio 10, conforme a Figura 4.5. Ressalta-se que a hidrólise enzimática foi utilizada para a quebra da lactose em glicose e galactose.

Assim, durante o processo fermentativo, a *S. boulardii* consumiu somente a glicose presente no meio, e, conforme os dados experimentais apresentados na Figura 4.5, o decréscimo de galactose permaneceu inalterado, apontando que *S. boulardii* não consome a galactose, já que no mesmo período, o crescimento celular cessou (ver Figura 4.4).

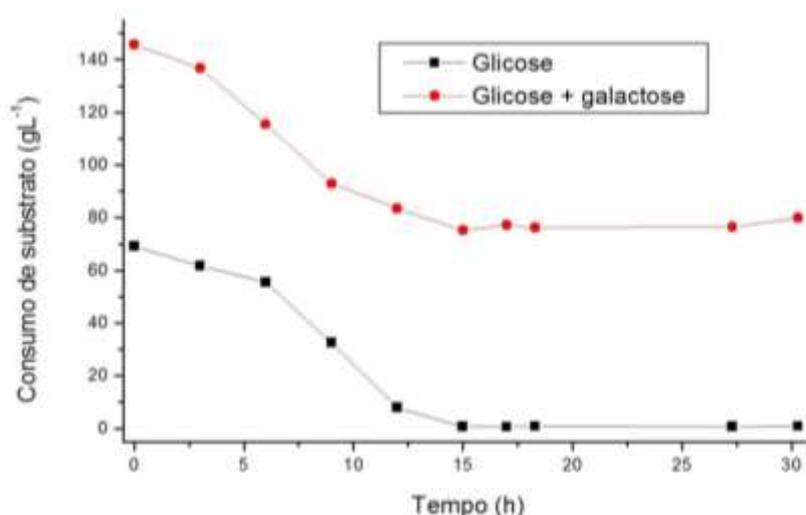


Figura 4.5: Dados experimentais do consumo de substrato pela *S. boulardii*: (●) açúcar redutor total e (■) açúcar redutor

A partir da Figura 4.5 observa-se que após 15 horas de fermentação o consumo da glicose pela *S. boulardii* foi totalmente alcançado, ao passo que o açúcar redutor total mantém-se em torno de 80 gL⁻¹, indicando que a galactose não foi consumida até 30 h de fermentação.

Esse resultado coincide com os resultados obtidos por Assunção (2014), onde, em seus estudos utilizando o permeado de soro de leite como substrato para o crescimento de *S. boulardii*, obteve 22,85 gL⁻¹ de biomassa celular e um consumo de substrato de 70 gL⁻¹ em sua melhor condição: temperatura (30°C), pH (5,5), agitação (100 rpm), permeado (150 gL⁻¹), sulfato de amônio (9,0 gL⁻¹), sulfato de magnésio (1,2 gL⁻¹) e fosfato monobásico de potássio (9,0 gL⁻¹).

4.2 Efeito do pH inicial na obtenção de biomassa celular

A influência do pH inicial na produção de biomassa celular utilizando o permeado como substrato foi avaliada a partir de quatro ensaios, mantendo-se fixos os seguintes parâmetros: temperatura (30°C), agitação (100 rpm), concentração de permeado (180 gL⁻¹), sulfato de amônio (7,5 gL⁻¹), sulfato de magnésio (1,25 gL⁻¹) e fosfato monobásico de potássio (1,5 gL⁻¹), que conforme o ensaio 10 do planejamento DCCR resultou na produção de maior quantidade de biomassa celular (40 gL⁻¹).

Os valores de pH iniciais avaliados são apresentados na Tabela 4.4, juntamente com os resultados de biomassa celular obtidos no tempo de 17 horas de fermentação. A numeração referente aos ensaios segue a numeração do planejamento DCCR, para facilitar a compreensão da análise dos experimentos.

Tabela 4.4: Valores de pH iniciais avaliados e resultados obtidos

Ensaio	pH	Biomassa celular (gL ⁻¹)	Erro-padrão
29	3,5	30,48	± 0,19
30	4,5	41,76	± 0,06
31	6,5	28,32	± 0,35
32	7,5	34,39	± 0,09

De acordo com a Tabela 4.4 é possível notar que no ensaio 30 foi alcançada a maior concentração de biomassa celular, o qual foi realizado utilizando pH 4,5. A concentração de biomassa obtida no ensaio 30 foi maior (4%)

que a concentração alcançada no ensaio 10, o qual foi realizado utilizando pH 5,5. Como o permeado utilizado neste trabalho, quando hidratado, apresenta valores de pH de aproximadamente 5,5, pode-se considerar que, para sua aplicação em processo industrial, é favorável sua utilização com pH 5,5, uma vez que não há a necessidade da adição de reagentes para a correção do pH, gerando assim uma economia para o processo.

As cinéticas de produção de biomassa celular (g L^{-1}), consumo de substrato (g L^{-1}), glicose e pH durante os processos fermentativos referente aos ensaios 29, 30, 31 e 32 encontram-se na Figura 4.6.

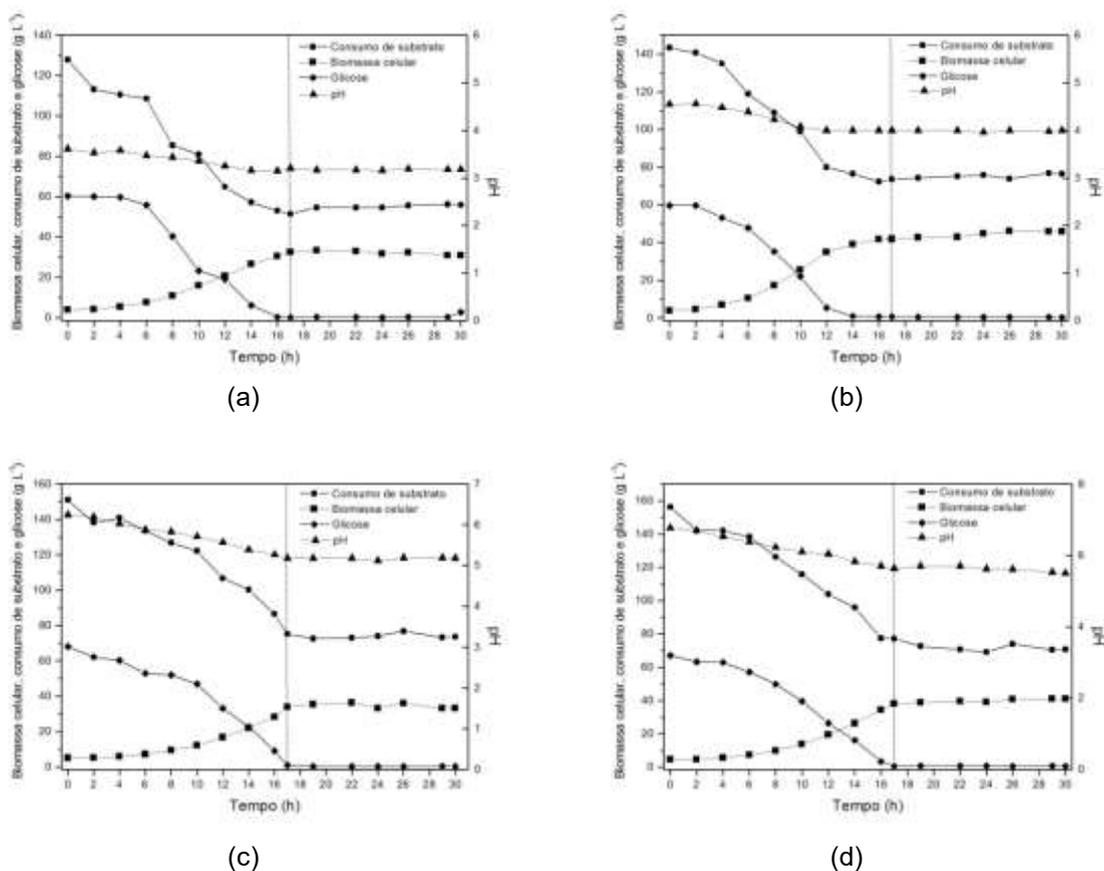


Figura 4.6: Cinéticas de produção de biomassa celular (g L^{-1}), consumo de substrato (g L^{-1}), glicose (g L^{-1}) e pH: (a) ensaio 29; (b) ensaio 30; (c) ensaio 31; (d) ensaio 32

Champagne *et al.*, (1990) utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em permeado de soro de leite e relataram que a faixa de pH entre 5,5 e 6,0 beneficiou a produção de biomassa celular. Assunção (2014), em seus estudos utilizando a *S. boulardii* e o permeado como substrato para a produção de

biomassa celular, realizou ensaios com diferentes pHs (1,5; 3,5 e 5,5) e obteve o maior valor de biomassa celular (22,85 gL⁻¹) empregando o pH 5,5.

4.3 Efeito da relação C:N na obtenção de biomassa celular

A influência da relação C:N sobre a produção de biomassa celular foi analisada a partir de cinco ensaios. As concentrações de nitrogênio sob a forma de sulfato de amônio foram utilizadas a 0; 1,25; 2,5; 5 e 10 % da concentração da fonte de carbono considerando-se que o permeado possui 90% de lactose.

Os ensaios, 33 a 37, foram realizados mantendo-se fixos os seguintes parâmetros: pH (5,5), temperatura (30°C), agitação (100 rpm), sulfato de magnésio (1,25 gL⁻¹), fosfato monobásico de potássio (1,5 gL⁻¹), e permeado (180 gL⁻¹), que conforme o ensaio 10 do planejamento DCCR resultou na maior concentração de biomassa celular (40 gL⁻¹). Os resultados dos ensaios realizados com diferentes concentrações de sulfato de amônio para 17 horas de fermentação são apresentados na Tabela 4.5.

Para essa análise também se considera a relação C:N apresentada nos ensaios 9 e 10, realizados pelo planejamento DCCR, conforme a Tabela 4.6.

Tabela 4.5: Resultado do efeito da relação C:N na produção de biomassa celular

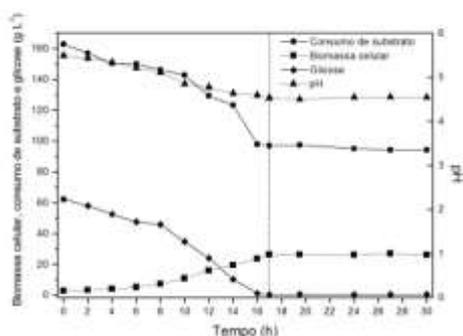
Ensaio	Relação C:N	[(NH ₄) ₂ SO ₄] (gL ⁻¹)	Nitrogênio (gL ⁻¹)	Biomassa celular (gL ⁻¹)	Erro-padrão
33	10:1	77,14	16	23,77	± 0,25
34	10:0,5	38,5	8	29,95	± 0,27
35	10:0,25	19,25	4	33,99	± 0,32
36	10:0,125	9,62	2	36,68	± 0,12
37	0	0	0	25,55	± 0,19

Tabela 4.6: Relação C:N na produção de biomassa celular dos ensaios 9 e 10

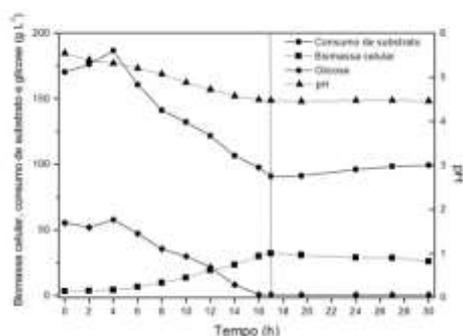
Ensaio	Relação C:N	[(NH ₄) ₂ SO ₄] (gL ⁻¹)	Nitrogênio (g)	Biomassa celular (gL ⁻¹)	Erro-padrão
9	10:0,058	4,5	0,94	33,85	± 0,21
10	10:0,093	7,5	1,5	40,06	± 0,10

Dentre os resultados nos novos ensaios e aqueles obtidos no planejamento DCCR, o ensaio 10 apresentou a maior concentração de biomassa celular (40 gL^{-1}), sendo a concentração de nitrogênio menor que 1% da concentração de carbono ($10:0,093$). A segunda maior concentração de biomassa ($36,68 \text{ gL}^{-1}$) foi alcançada no ensaio 36, o qual utilizou a concentração de nitrogênio igual a 1,25% da concentração de carbono.

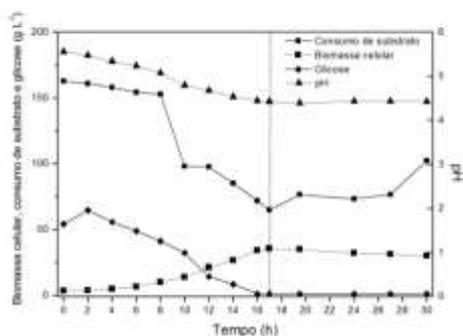
Conclui-se que, para as condições experimentais: pH 5,5, 30°C , 100 rpm, $1,25 \text{ gL}^{-1}$ de sulfato de magnésio, $1,5 \text{ gL}^{-1}$ de fosfato monobásico de potássio e 180 gL^{-1} de permeado (162 g de carbono), as concentrações de sulfato de amônio que favorecem a produção de biomassa celular estão na faixa de 7,5 a $9,62 \text{ gL}^{-1}$, o que corresponde a valores entre 0,93 a 1,25 % da concentração de carbono. As cinéticas de produção de biomassa celular (gL^{-1}), consumo de substrato (gL^{-1}), glicose e pH durante os processos fermentativos referente aos ensaios 33, 34, 35, 36 e 37 encontram-se na Figura 4.7.



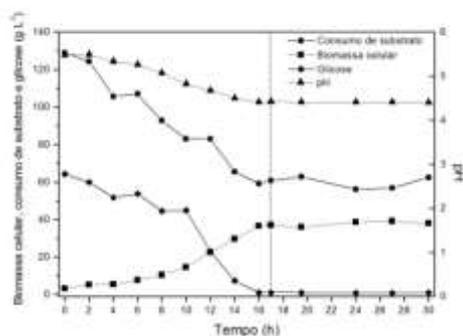
(a)



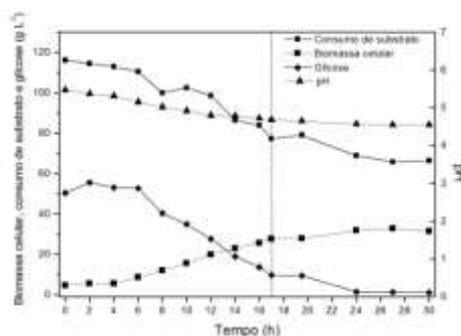
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 4.7: Cinéticas de produção de biomassa celular (gL^{-1}), consumo de substrato (gL^{-1}), consumo de glicose (gL^{-1}) e pH: (a) ensaio 33; (b) ensaio 34; (c) ensaio 35; (d) ensaio 36; (e) ensaio 37

Oliveira (2006) utilizou a *S. cerevisiae* e mostrou que um meio balanceado deve conter dez vezes mais carbono do que nitrogênio (10:1). Contudo, a avaliação da relação de C:N realizada neste trabalho mostrou que a utilização de uma quantidade superior de carbono garantiu um alto conteúdo proteico quando utiliza-se a levedura *S. boulardii*.

4.4 Efeito da concentração de permeado na obtenção de biomassa celular

Os resultados dos ensaios realizados em concentrações de permeado variando entre 60 a 300 gL^{-1} são apresentados na Tabela 4.7. Os ensaios foram realizados com os seguintes parâmetros da condição que obteve maior concentração de biomassa pelo planejamento DCCR: temperatura (30°C), agitação (100 rpm), pH (5,5), sulfato de amônio ($7,5 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de magnésio ($1,25 \text{ gL}^{-1}$) e fosfato monobásico de potássio ($1,5 \text{ gL}^{-1}$).

Tabela 4.7: Resultados do efeito da concentração de permeado na produção de biomassa celular

Ensaio	Permeado (gL^{-1})	Biomassa celular (gL^{-1})	Erro-padrão
38	60	14,63	$\pm 0,05$
39	100	23,24	$\pm 0,31$
40	140	31,78	$\pm 0,13$
41	220	39,78	$\pm 0,14$
42	260	33,82	$\pm 0,31$
43	300	4,9	$\pm 0,02$

De acordo com a Tabela 4.7, o ensaio 41 (220 gL⁻¹ de permeado) forneceu a maior concentração de biomassa celular (39,78 gL⁻¹); valor próximo do alcançado no ensaio 10, (40 gL⁻¹) com 180 gL⁻¹ de permeado.

Verificou-se que acima de 220 gL⁻¹ de permeado, a concentração de biomassa decresceu para 33,8 gL⁻¹ (260 gL⁻¹ de permeado) e atingiu um valor demasiadamente pequeno (4,9 gL⁻¹) quando a concentração de permeado foi elevada a 300 gL⁻¹. Esses valores sugerem a inibição do crescimento da levedura *S. boulardii*, considerando-se três hipóteses:

- 1) Inibição pelo substrato, já que altas concentrações de permeado intensificam a repressão catabólica por glicose;
- 2) Inibição pelo produto, causada pela produção de etanol ou outros produtos metabólicos em concentrações prejudiciais ao crescimento celular;
- 3) Aumento do número de íons amônio devido a relação C:N indesejável ao metabolismo celular.

Para os ensaios 42 e 43 a relação C:N foi 10:0,064 e 10:0,055, respectivamente; valores abaixo do considerado ideal pela avaliação da relação entre as fontes de nitrogênio e carbono realizada neste trabalho.

Frisa-se que as avaliações do efeito da relação C:N mostraram que valores ideais da concentração de (NH₄)₂SO₄ estão no intervalo 0,93 a 1,25% da concentração de permeado, nas condições experimentais: temperatura (30°C), agitação (100 rpm), pH (5,5), sulfato de amônio (7,5 gL⁻¹), sulfato de magnésio (1,25 gL⁻¹) e fosfato monobásico de potássio (1,5 gL⁻¹).

Portanto, pelos ensaios 38 a 43 conclui-se que as concentrações de permeado que favorecem a produção de biomassa celular estão compreendidas na faixa que varia de 180 a 220 gL⁻¹. Os valores correspondem a relação C:N igual a 10:0,093 e 10:0,075, respectivamente. Isso indica a utilização da concentração de nitrogênio em 0,93 e 0,75% da concentração de carbono.

Na Figura 4.8 encontram-se as cinéticas de produção de biomassa celular (gL⁻¹), consumo de substrato (gL⁻¹), consumo de glicose e perfil de pH durante os processos fermentativos referente aos ensaios 38 a 43.

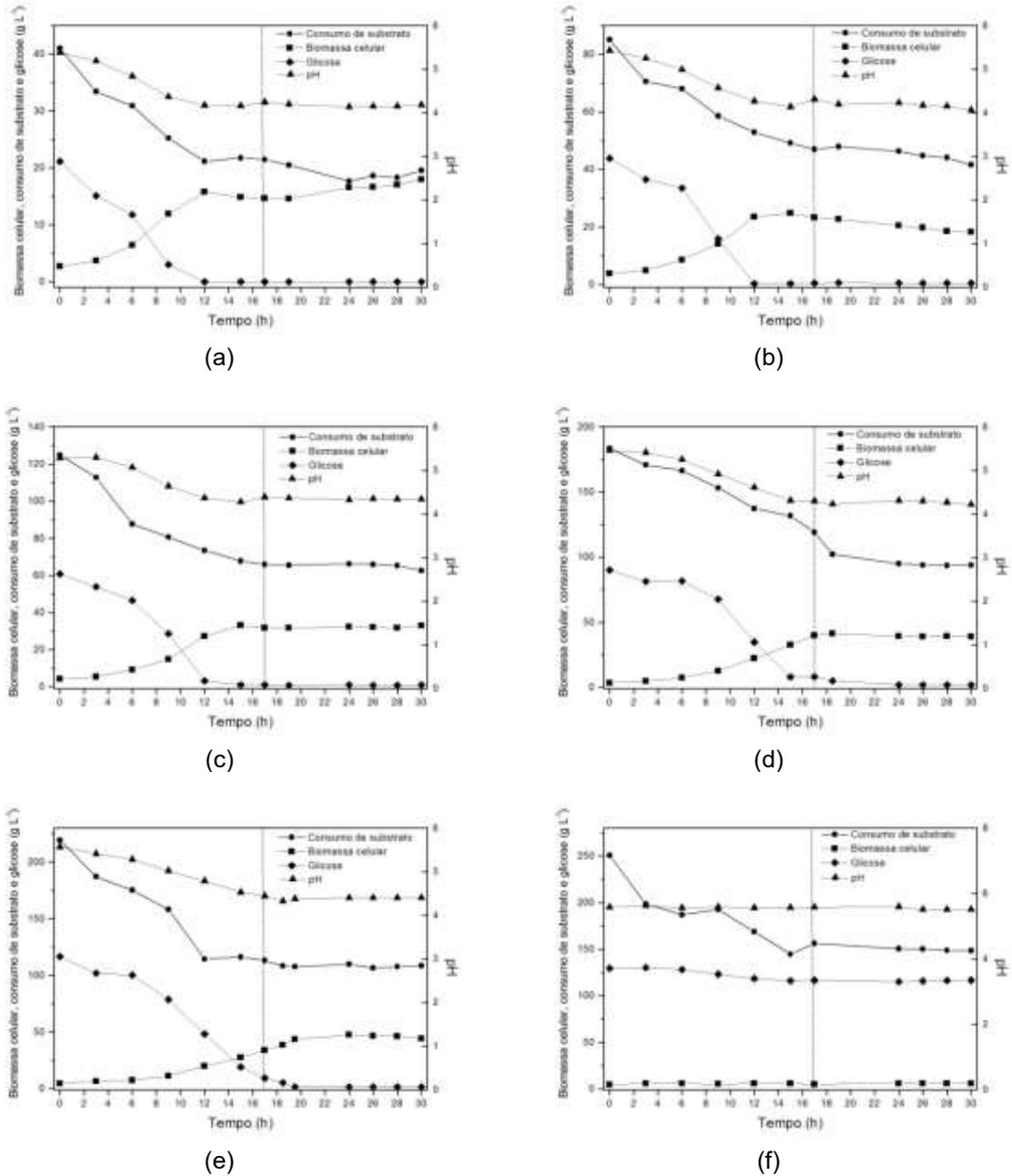


Figura 4.8: Cinéticas de produção de biomassa celular (g L^{-1}), consumo de substrato (g L^{-1}), glicose (g L^{-1}) e pH: (a) ensaio 38; (b) ensaio 39; (c) ensaio 40; (d) ensaio 41; (e) ensaio 42 e (f) ensaio 43

4.5 Efeito da aeração

As cinéticas de fermentação dos ensaios 44 e 45 são apresentadas na Figura 4.9, nos quais as concentrações de permeado foram 200 e 220 g L^{-1} , respectivamente. Em ambos, as condições experimentais foram: pH (5,5), temperatura (30 °C), sulfato de amônio (7,5 g L^{-1}), sulfato de magnésio (1,25 g L^{-1}), fosfato monobásico de potássio (1,5 g L^{-1}). O ensaio 44 foi realizado com aeração

de 1,5 vvm e agitação de 150 rpm, já o ensaio 45 foi realizado com aeração de 1,5 à 3,0 vvm e agitação de 150 à 600 rpm.

Em ambos os ensaios foi possível verificar que a adição de oxigênio no processo fermentativo favorece a produção de biomassa. A produção de biomassa celular atingiu $57,92 \text{ gL}^{-1}$ (ensaio 44) e $67,61 \text{ gL}^{-1}$ (ensaio 45) no tempo de 17 horas de fermentação; valores superiores ao valor alcançado no ensaio que obteve maior concentração de biomassa pelo DCCR (40 gL^{-1}), cujo ensaio foi realizado sem aeração.

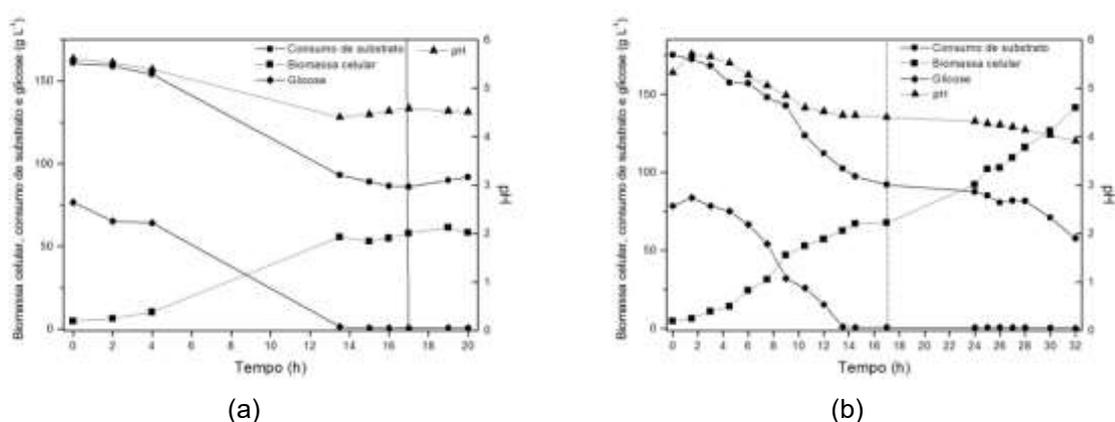


Figura 4.9: Acompanhamento da produção de biomassa celular, pH, consumo de substrato e glicose durante o processo fermentativo, referente ao (a) ensaio 44 e (B) ensaio 45.

De acordo com a Figura 4.9, em ambos os ensaios com aeração o consumo de cerca de 70 gL^{-1} de açúcar foi atingido. Ao longo de 14h de fermentação ocorreu o decréscimo acentuado da fonte de carbono, aumento da biomassa celular, acompanhados da redução nos valores do pH. Após, uma desaceleração no consumo do açúcar e estabilização da concentração de biomassa celular foram observadas até 20 horas no ensaio 44, e até 17 horas no ensaio 45.

Verificou-se que em 17 horas de fermentação a produção de biomassa celular atingiu valor superior no ensaio 45 ($67,6 \text{ gL}^{-1}$) em relação ao ensaio 44 ($57,9 \text{ gL}^{-1}$), o que não pode ser explicado pela maior concentração de permeado utilizada (220 gL^{-1}), já que o consumo de glicose em ambos os ensaios foi similar em torno de 70 gL^{-1} .

O ensaio 45 mostrou que após 17 horas o crescimento celular continuou ocorrendo, e o açúcar redutor total (glicose+galactose) decresceu, apesar de totalmente consumida a glicose presente no meio. Assim, duas hipóteses são consideradas:

- 1) A repressão catabólica por glicose, ou seja, enquanto presente no meio ocorreu o seu consumo preferencial em relação à galactose. Após a glicose totalmente consumida, as enzimas antes reprimidas pela presença da glicose atuaram no catabolismo da galactose favorecendo a produção da biomassa;
- 2) A aeração promoveu maior quantidade de energia que está vinculada a formação de enzimas e moléculas necessárias para a produção de biomassa.

Portanto, apesar do aumento da produção de biomassa celular mostrar valores satisfatórios pelos experimentos com aeração, os ensaios são inconclusivos sobre o quanto a aeração afeta a síntese celular. Sugere-se que trabalhos posteriores sejam realizados a partir de um adequado planejamento de experimentos, investigando-se as variáveis: aeração, agitação e concentração de permeado, tendo como resposta a produção de biomassa celular.

Os valores da concentração de permeado e da suplementação em sulfato de amônio dos ensaios 44 e 45 correspondem a relação C:N de 10:0,083 e 10:0,075, respectivamente. Isso indica a utilização da concentração de nitrogênio em 0,83 e 0,75% da concentração de carbono. Essas percentagens são menores que os valores mostrados ideais durante a avaliação do efeito da relação C:N em ensaios realizados sem aeração (0,93 e 1,25%).

Uma análise comparativa apresentada na Tabela 4.8, mostra a importância de um adequado e eficiente sistema de agitação e aeração durante o processo fermentativo, minimizando os efeitos de mecanismos tais como a repressão de enzimas responsáveis pela produção de biomassa celular.

A partir da Tabela 4.8 verifica-se que os maiores valores para a biomassa microbiana foram obtidos para o percentual de fonte de nitrogênio igual a 0,75; 0,83 e 0,93 % da fonte de carbono, independente da adição de oxigênio. Portanto,

isso indica o intervalo ideal (0,75 – 0,93%) de fonte de nitrogênio em cultivos de *S.boulardii* a 30°C e pH 5,5.

Tabela 4.8: Comparativo entre os melhores ensaios a Temperatura (30°C); pH (5,5); MgSO₄ (1,25 gL⁻¹); KH₂PO₄ (1,5 gL⁻¹), com e sem aeração

	Sem aeração e 100 rpm				Aeração (1,5 vvm) e 150 rpm	
	Ensaio 42	Ensaio 41	Ensaio 10	Ensaio 36	Ensaio 44	Ensaio 45
Permeado (gL ⁻¹)	260	220	180	180	200	220
[(NH ₄) ₂ SO ₄] (gL ⁻¹)	7,5	7,5	7,5	9,6	7,5	7,5
% nitrogênio	0,64	0,75	0,93	1,25	0,83	0,75
Biomassa celular (gL ⁻¹)	33,8	39,8	40,06	36,7	57,9	67,6

Esse intervalo fornece os valores para a suplementação com (NH₄)₂SO₄ e a concentração de permeado, que podem ser investigados em estudos posteriores, juntamente com as variáveis: agitação e aeração.

A metodologia de superfície de resposta realizada com o planejamento DCCR, juntamente com os efeitos avaliados – pH, concentração de permeado, relação C:N e adição de oxigênio, podem nortear estudos posteriores do cultivo de *S.boulardii* utilizando-se o permeado de soro de leite como substrato.

A partir das avaliações realizadas, não há necessidade de suplementação com minerais, embora esses sejam essenciais para o crescimento de leveduras, uma vez que alguns íons inorgânicos tais como: potássio, magnésio, sódio, cálcio e fósforo, estão presentes no permeado do soro de leite, conforme caracterização da SOORO LTDA (ver Tabela 3.1).

Por outro lado, a suplementação com sulfato de amônio é fundamental, já que as leveduras preferem utilizar os sais de amônia que qualquer outra fonte de nitrogênio presente no meio de cultivo, tais como aminoácidos e peptídeos.

Assim, sugerem-se novos experimentos, conforme as hipóteses:

- Maximização da fonte de nitrogênio e da fonte de carbono mantendo-se a relação C:N (10:0,075 a 10:0,093);
- Minimização da fonte de magnésio;

- Minimização da fonte de fosfato monobásico de potássio;
- Investigação da agitação no intervalo entre 150 a 300 rpm;
- Investigação da aeração no intervalo entre 1,5 a 3 vvm.

4.6 Estimativa preliminar de parâmetros

Os valores referentes à velocidade específica de crescimento (μ), conversão do substrato em célula (S) e produtividade ($Y_{X/S}$) encontram-se na Tabela 4.9, juntamente com os valores de biomassa celular produzida e de açúcar consumido.

De acordo com a Tabela 4.9, o maior valor do fator de conversão do substrato em célula foi de $0,75 \text{ gg}^{-1}$, obtido no ensaio 45, o qual produziu $67,61 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa celular e cujo ensaio foi realizado com adição de oxigênio.

O segundo maior valor do fator de conversão foi obtido no ensaio 23 ($0,73 \text{ gg}^{-1}$), o qual foi realizado sem adição de oxigênio e resultou em $17,75 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa celular.

Müller (2006) obteve um fator de conversão de $0,41 \text{ gg}^{-1}$, no tempo de 12 horas de fermentação, em agitador incubador utilizando a *S. boulardii*, sob as seguintes condições: temperatura (30°C), pH (3,0), agitação (200 rpm), e meio definido composto por glicose (10 gL^{-1}), peptona de carne (2 gL^{-1}), extrato de levedura (2 gL^{-1}), fosfato monobásico de potássio ($0,6 \text{ gL}^{-1}$), ureia ($0,36 \text{ gL}^{-1}$) e sulfato de amônio ($0,12 \text{ gL}^{-1}$).

Já Assunção (2014) obteve um fator de conversão de $0,92 \text{ gg}^{-1}$, no tempo de 24 horas de fermentação e $8,75 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa celular. As condições empregadas pelo autor foram: temperatura (30°C), pH (5,5), agitação (100 rpm), permeado de soro de leite (20 gL^{-1}), sulfato de amônio ($9,0 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de magnésio ($3,6 \text{ gL}^{-1}$) e fosfato monobásico de potássio ($3,0 \text{ gL}^{-1}$), utilizando a levedura *S. boulardii*.

O maior valor de produtividade alcançado nesse estudo para o tempo de 17 horas de fermentação foi de $3,70 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ no ensaio 45, seguido do valor de $3,12 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ no ensaio 44 (Tabela 4.9), ambos realizados com adição de oxigênio.

Tabela 4.9: Biomassa celular produzida, velocidade específica de crescimento (μ), açúcar consumido (ΔS), conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) e produtividade para o tempo de 17 horas de fermentação

Ensaio	ΔX (gL ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	ΔS (gL ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gg ⁻¹)	Produtividade (gL ⁻¹ h ⁻¹)
1	21,12	0,1674	37,87	0,55	1,24
2	19,14	0,1731	51,48	0,37	1,12
3	23,26	0,1670	37,23	0,62	1,36
4	19,21	0,1715	44,31	0,43	1,13
5	20,56	0,1648	42,36	0,48	1,20
6	17,20	0,1663	37,37	0,46	1,01
7	20,88	0,1724	30,97	0,67	1,22
8	21,50	0,1895	47,08	0,45	1,26
9	30,78	0,1824	76,26	0,40	1,81
10	35,92	0,2054	68,62	0,52	2,11
11	35,89	0,1641	80,52	0,38	1,81
12	28,01	0,1715	71,38	0,39	1,64
13	27,87	0,1755	78,43	0,35	1,63
14	32,78	0,1800	76,47	0,42	1,92
15	31,88	0,1877	72,55	0,43	1,87
16	33,23	0,2102	77,60	0,42	1,95
17	28,55	0,2093	75,47	0,37	1,67
18	27,29	0,2136	70,29	0,38	1,60
19	29,13	0,1791	60,98	0,47	1,71
20	29,65	0,1763	54,46	0,54	1,74
21	21,35	0,1669	56,42	0,37	1,25
22	24,80	0,1648	51,19	0,48	1,45
23	15,49	0,2041	21,19	0,73	0,91
24	30,63	0,1688	82,18	0,37	1,80
25	26,04	0,1990	51,52	0,50	1,53
26	24,27	0,1699	45,98	0,52	1,42
27	24,50	0,1762	44,02	0,55	1,44
28	21,68	0,1667	52,17	0,41	1,27
29	26,56	0,1609	74,88	0,35	1,56
30	37,75	0,2078	71,02	0,53	2,22
31	23,20	0,1236	64,60	0,35	1,36
32	29,80	0,1493	78,73	0,37	1,75
33	20,80	0,1581	64,74	0,32	1,22
34	26,72	0,1681	72,83	0,36	1,57
35	30,67	0,1765	127,10	0,24	1,80
36	33,36	0,1649	69,75	0,47	1,96
37	20,88	0,1033	32,16	0,64	1,22
38	11,92	0,1687	19,53	0,61	0,70
39	19,45	0,1752	40,96	0,47	1,14
40	27,59	0,1801	51,67	0,53	1,62
41	36,37	0,1654	81,60	0,44	2,13
42	29,09	0,1300	137,68	0,21	1,71
43	0,6	0,1065	94,52	0,0006	0,03
44	53,10	0,1841	74,87	0,70	3,12
45	63,06	0,1921	83,17	0,75	3,70

Assunção (2014) obteve um valor de $0,84 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ de produtividade utilizando a *S. boulardii* na condição de temperatura (30°C), pH (5,5), agitação (100 rpm), e concentrações de permeado de soro de leite (150 gL^{-1}), sulfato de amônio ($9,0 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de magnésio ($1,2 \text{ gL}^{-1}$) e fosfato monobásico de potássio ($9,0 \text{ gL}^{-1}$).

Já os maiores valores de velocidade específica de crescimento foram alcançados nos ensaios 18 ($0,2136 \text{ h}^{-1}$) e 16 ($0,2102 \text{ h}^{-1}$) durante a fase exponencial.

A velocidade específica de crescimento alcançada por Assunção (2014) para o tempo de 24 horas de fermentação foi de $1,264 \text{ h}^{-1}$. As condições utilizadas pelo autor foram: temperatura ($37,5^{\circ}\text{C}$), pH (3,5), agitação (100 rpm), permeado de soro de leite (85 gL^{-1}), sulfato de amônio ($6,0 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de magnésio ($2,5 \text{ gL}^{-1}$) e fosfato monobásico de potássio ($6,0 \text{ gL}^{-1}$) e a levedura *S. boulardii*.

Müller (2006) obteve uma velocidade específica de crescimento celular de $0,3818 \text{ h}^{-1}$ na fase exponencial utilizando biorreator *Air-lift*. Zafar e Owais (2006) utilizaram a *K. marxianus* no processo fermentativo e soro do leite como substrato, em agitação (500 rpm), temperatura (30°C) e pH (4,5), obtendo-se uma velocidade de crescimento exponencial de $0,157 \text{ h}^{-1}$.

As velocidades específicas de crescimento celular (μ_x) e de consumo de substrato (μ_{sc}) para o ensaio 10 (ensaio que obteve maior produção de biomassa celular) foram estimadas pelo método do ajuste polinomial apresentado por Schmidell (2001) e estão apresentadas na Figura 4.10. Verifica-se que a velocidade específica de consumo de açúcar está diretamente relacionada à de crescimento celular. O perfil ascendente de μ_x indica a fase *lag* e de transição até cerca de 5 h. Após um valor máximo (μ_x^{max}), ambos os perfis se correlacionam adequadamente até 30 h de fermentação.

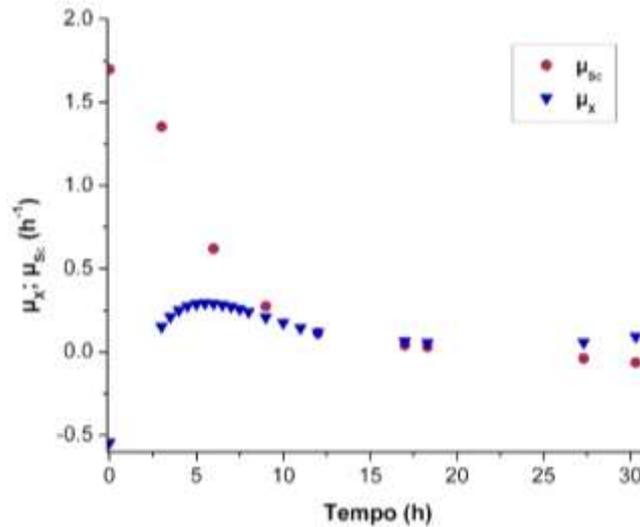


Figura 4.10: Perfis de velocidade específica de crescimento e consumo de carbono do ensaio 10

4.7 Modelagem matemática do cultivo da *S. boulardii*

Admitiu-se que o cultivo de *S. boulardii*, sem e com adição de oxigênio, ocorreu via processo oxido-redutivo, com formação de produtos tais como etanol, glicerol, ácidos e/ou outros.

Sendo a fonte de carbono essencial para a produção de biomassa celular, e vinculada à formação de produtos e subprodutos da fermentação, partiu-se das reações cinéticas simplificadas (Eq. 4.2 e 4.3) para definir a modelagem matemática do processo, conforme Schmidell *et al.*, (2001).



O modelo matemático proposto neste trabalho descreve o crescimento celular (X), o consumo de substrato (S) e a formação do produto (P) conforme as Equações 4.4, 4.5 e 4.6, respectivamente.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_X X \quad (4.4)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} \quad (4.5)$$

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/S} \frac{dS}{dt} \quad (4.6)$$

4.8 Cinética de crescimento da *S. bouldardii* em cultivo descontínuo

Rearranjando o sistema de equações diferenciais (Eq. 4.4 a 4.6) em função da taxa de crescimento celular (μ_x), da taxa de produção de produto (μ_p), da taxa de manutenção celular pelo substrato carbono (m_s) e da taxa de morte celular (k_d) obteve-se as Equações 4.7 a 4.9.

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_x - k_d)X \quad (4.7)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{\mu_x}{Y_{X/S}} + \frac{\mu_p}{Y_{P/S}} + m_s\right)X \quad (4.8)$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_p X \quad (4.9)$$

O sistema de equações diferenciais resultou em quatro parâmetros estequiométricos ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, m_s , k_d), os quais foram estimados pelo algoritmo de otimização baseado em algoritmos genéticos.

O modelo de Phisalaphong *et al.*, (2006), o qual descreve a cinética de crescimento celular (Eq. 4.10), bem como de formação de produto (Eq. 4.11), foi utilizado para descrever os dados experimentais obtidos no ensaio 10.

Esse modelo considera que ocorre inibição pelo substrato e pelo produto.

$$\mu_x = \mu_m \left(\frac{S}{S + K_s + \frac{S^2}{K_i}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \quad (4.10)$$

$$\mu_p = \mu_m^P \left(\frac{S}{S + K_{S^P} + \frac{S^2}{K_{i^P}}} \right) \left(1 - \frac{P}{P'_m} \right) \quad (4.11)$$

Sendo μ_m a taxa máxima de crescimento celular; K_s a constante de saturação; K_i a constante de inibição pelo substrato e P_m a constante de inibição pelo produto.

Oito parâmetros cinéticos ($\mu_m, K_s, K_i, P_m, \mu_m^P, K_{S^P}, K_{i^P}, P'_m$) foram ajustados pelo algoritmo de otimização AG (Tabela 4.10).

Assim, a modelagem matemática definiu-se pelo conjunto de equações diferenciais (Eq. 4.7 a 4.9), que foi correlacionado às equações do modelo cinético de Phisalaphong *et al.*, (2006), levando-se em conta o sistema de reações metabólicas simplificado (Eq. 4.2 e 4.3), conforme metodologia de Schmidell *et al.*, (2001).

Tabela 4.10: Parâmetros ajustados pelo modelo de Phisalaphong *et al.*, (2006)

Parâmetro Estequiométrico		
$Y_{X/S}$	$(gXgS^{-1})$	0,58
$Y_{P/S}$	$(gPgS^{-1})$	1,07
m_s	$(gXgP^{-1})$	3.10^{-3}
k_d	(h^{-1})	0,06
Parâmetro Cinético		
μ_m	(h^{-1})	0,32
K_S	(gL^{-1})	120
K_i	(gL^{-1})	180
P_m	(gL^{-1})	64
μ_m^P	(h^{-1})	0,62
K_S^P	(gL^{-1})	110
K_i^P	(gL^{-1})	320
$P'm$	(gL^{-1})	55
FO		0,15
r^2		0,97

Na Figura 4.11 apresenta-se a simulação do modelo de Phisalaphong *et al.* (2006), bem como os dados experimentais do ensaio 10.

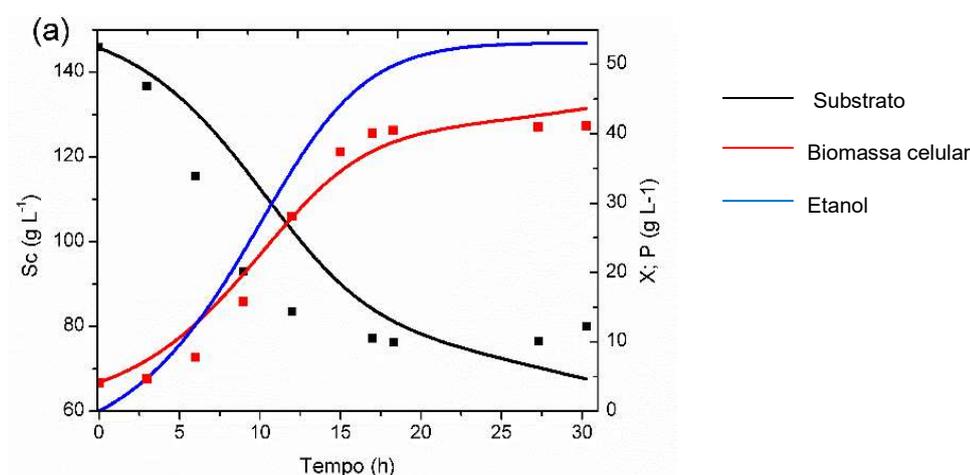


Figura 4.11: Simulação do modelo de Phisalaphong *et al.* (2006) aplicado aos dados experimentais do ensaio 10

Verifica-se que o modelo de Phisalaphong *et al.*, (2006) se ajustou bem aos dados experimentais do cultivo de *S. boulardii* obtidos no ensaio 10, cujas condições experimentais foram: pH (5,5), temperatura (30°C), agitação (100 rpm), sulfato de magnésio (1,25 gL⁻¹), fosfato monobásico de potássio (1,5 gL⁻¹), e permeado (180 gL⁻¹). Pela simulação, a concentração máxima de etanol está em torno de 50 gL⁻¹.

Todos os parâmetros cinéticos e estequiométricos foram estimados por um método de otimização baseado em algoritmos genéticos implementado no *software* Maple[®]. A resolução do sistema de equações diferenciais foi realizada pelo método de *Rosenbroch*, tendo como critério de otimização a função objetivo mínimos quadrados. Todas as execuções foram realizadas em microcomputador Intel Core i5, 5GB de memória RAM.

Capítulo 5 - CONCLUSÕES

Com a realização deste estudo pode-se concluir:

- Para concentrações de permeado abaixo de 100 gL^{-1} , a suplementação com sulfato de magnésio mostrou-se importante para o aumento da biomassa celular;
- Para concentrações elevadas de permeado (cerca de 240 gL^{-1}), não há a necessidade de suplementação com sulfato de magnésio;
- A suplementação em elevadas concentrações de sulfato de amônio (em torno de 10 gL^{-1}) favoreceu a influência da concentração de permeado na resposta microbiana;
- A suplementação com o sulfato de amônio favoreceu a produção de biomassa em concentração de permeado acima de 160 gL^{-1} ;
- O pH que favoreceu a produção de biomassa celular foi 4,5;
- As concentrações de sulfato de amônio que favorecem a produção de biomassa celular estão na faixa de 7,5 à $9,62 \text{ gL}^{-1}$, o que corresponde a valores entre 0,93 à 1,25% da concentração de carbono para as seguintes condições experimentais: pH 5,5, 30°C , 100 rpm, $1,25 \text{ gL}^{-1}$ de sulfato de magnésio, $1,5 \text{ gL}^{-1}$ de fosfato monobásico de potássio e 180 gL^{-1} de permeado (162 gL^{-1} de carbono);
- As concentrações de permeado que favorecem a produção de biomassa celular estão compreendidas na faixa de 180 à 220 gL^{-1} . Esses valores correspondem à relação C:N igual a 10:0,093 e 10:0,075, respectivamente, indicando a utilização da concentração de nitrogênio em 0,93% e 0,75% da concentração de carbono;
- A aeração no processo fermentativo favoreceu a produção de biomassa celular;
- O modelo de Phisalaphong *et al.* (2006) se ajustou bem aos dados experimentais do cultivo da *S. bouldarii* obtidos no ensaio 10;

- O permeado pode ser reutilizado como fonte de carbono em processos fermentativos com o objetivo de produzir biomassa celular microbiana utilizando a levedura *S. boulardii*.

Capítulo 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se investigações das variáveis aeração (no intervalo entre 1,5 a 3 vvm), agitação (no intervalo entre 150 a 300 rpm) e concentração de permeado, tendo como resposta a produção de biomassa celular, por meio de planejamento experimental, além da realização de análises de etanol das amostras, uma vez que o etanol pode inibir o crescimento microbiano.

Recomenda-se também a realização de ensaios que visem:

- Maximizar a fonte de nitrogênio e a fonte de carbono mantendo-se a relação C:N (10:0,075 a 10:0,093);
- Minimizar a fonte de magnésio;
- Minimizar a fonte de fosfato monobásico de potássio.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, M.M.; AGUIRRE-EZKAURIATZA, E.J.; RAMÍREZ-MEDRANO, A.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, Á. **Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey.** *Journal of Dairy Science*, v. 93, n.12, 2010.
- ANDRADE, A.C. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2005. 110 p. Dissertação (Mestrado).
- ANDREWS, J.F. **A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates.** *Biotechnol. Bioeng.*, v. 10, p. 707-723, 1968.
- ANUPAMA; RAVINDRA, P. **Value-added food: Single cell protein.** *Biotechnol. Adv.* v. 18, p. 459–479, 2000.
- ASSUNÇÃO, G.M. **Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de queijo.** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2014. 130 p. Dissertação (Mestrado).
- AZBAR, N.; DOKGOZ, F.T.Ç. **The effect of dilution and L-malic acid addition on bio-hydrogen production with *Rhodopseudomonas palustris* from effluent of an acidogenic anaerobic reactor.** *Int. J. Hydrogen Energy*, v.35, n.10, p.5028-5033. 2010.
- AZBAR, N.; DOKGOZ, F.T.Ç.; KESKIN, T.; KORKMAZ, K.S.; SYED, H.M. **Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions.** *Int. J. Hydrogen Energy*, v.34, n.17, p.7441-7447. 2009.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals.** McGraw-Hill, 1986.
- BARROS, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos.** 3ª ed., editora Unicamp, 2007.
- BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. **Production of food grade yeasts.** *Food Technology Biotechnology*, v. 44, n. 3, p. 407-415, 2006.
- BEN-HASSAN, R.M.; GHALY, A.E. **Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 47, p. 89-104, 1994.

- BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. **Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos**. In: *Biotecnologia Industrial*. Willibaldo Schmidell (coord.). Edgard Blucher, 1ª ed., 2001.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for Experimenters – An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. John Wiley & Sons, N.Y. 1978.
- BOZE, H., MOULIN, G., GALZY, P. **Production of microbial biomass**. In: Rehm HJ, Reed G, eds. *Biotechnology*. Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaft mbH, n. 9, p. 167–220. 1995.
- BRANDÃO, S.C.C. **Soro: um desafio para as fábricas de queijos**. *Leite & Derivados*, n. 15, p. 13-19. 1994.
- BUTOLO, J.E. **Uso da biomassa de levedura em alimentação animal: Propriedades, custo relativo e outras formas de nutrientes**. In: ITAL. Instituto Tecnológico de Alimentos. *Produção de biomassa de levedura: Utilização na alimentação animal*. Workshop...Campinas, São Paulo, p.70-89, 1996.
- CANONICI, A.; SIRET, C.; PELLEGRINO, E.; PONTIER-BRES, R.; POUYET, L.; MONTERO, M.P.; COLIN, C.; CZERUCKA, D.; RIGOT, V.; ANDRÉ, F. ***Saccharomyces boulardii* improves intestinal cell restitution through activation of the $\alpha 2\beta 1$ integrin collagen receptor**. *PLoS ONE*, v.6,n.3, p.1-12, 2011.
- CARMINATTI, C.A. **Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2001. 79 p. Dissertação (Mestrado).
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. **Fermentação descontínua**. In: *Biotecnologia Industrial*. Willibaldo Schmidell (coord.). Edgard Blucher, 1ª ed., 2001.
- CASAL, M.; SCHULLER, D.; RODRIGUES, G. M. M.; PAIS, C. **Métodos convencionais em microbiologia**. In: *Microbiologia e genética molecular microbiana: manual de laboratório*. Margarida Casal (coord.), 2004. **Anais...**
- CHAMPAGNE, C.P.; GOULET, J.; LACHANCE, R.A. **Production of bakers' yeast in cheese whey ultrafiltrate**. *Appl Environ Microbiol*, n. 56: p. 425–430, 1990.
- CHANDA S.; CHAKRABARTI S. **Plant origin liquid waste, a source for single cell protein production by yeast**. *Biores Technol*, v.57, p.51-54. 1996.

- CHEN, S.L.; CHIGER, M. **Production of baker's yeast.** In M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive biotechnology*, vol. 3, p. 429-461. Pergamon Press, Oxford. 1985.
- COSTA, R.C. **Obtenção de lactose a partir de permeado de soro de queijo e permeado de leite.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1995. Dissertação (Mestrado).
- CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. **Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*.** *Aliment Pharmacol Ther*, n. 26, p. 767–778, 2007.
- CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. **Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens.** *Microbes and Infection*, n. 4, p. 733–739, 2002.
- DEMAIN, A.L.; DAVIES, J.E. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.** 2nd ed. AMS Press: Washington, 830 p., 1999.
- DE WIT, J.N. **Lecturer's Handbook on Whey and Whey Products,** 1st ed. European Whey Products Association, Brussels: Belgium. 2001.
- DIXON, E.M. **Whey Permeate, Delactosed Permeate, and Delactosed Whey as Ingredients to lower Sodium Content of Cream Based Soups.** Raleigh: North Carolina State University, 2008. Dissertação (Mestrado).
- DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. **Novas Metodologias para a Fermentação Alcoólica do Soro de Queijo.** In: Actas da 6^a Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, vol. 3. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, p.271-280. 1999.
- DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A. **Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation.** *Food Chem.* n.112, v.4, p.929-935, 2009.
- EI-KHAIR, A.A.A. **Formulation of milk permeate for utilization as electrolyte beverages.** *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 3, n. 2, p. 572-578. 2009.
- ESPINOSA-GONZALEZ, I.E.; PARASHAR, A.; BRESSLER, D.C. **Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production.** *Bioresource Technology*, n. 155, p. 170–176, 2014.

- FANG, Q.; ZHONG, J. **Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*.** *Process Biochem.*, v. 37, p. 769-774. 2002.
- FARRO, P.C.A. **Utilização do soro de queijo Minas Frescal pré-tratado e microfiltrado: efeitos da vazão volumétrica e da pressão transmembrana no fluxo de permeado.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2003. Dissertação (Mestrado).
- FLORENCIO, I.M.; ALVES, R.M.; RIBEIRO FILHO, N.M.; ARAÚJO, M.S.; SILVA, R.A.S.; ARAÚJO, A.S.; FLORENTINO, E.R. **Caracterização do soro de queijo “Tipo Coalho” proveniente de queijeiras artesanais da zona rural da cidade de Montadas – PB.** In: I Congresso Norte-Nordeste de Química. **Anais...** Natal, RN. 2007.
- FLORENTINO, E.R. **Aproveitamento do soro de queijo de coagulação enzimática.** Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006. 150 p. Tese (Doutorado).
- FOGLER, H.S. **Elements of Chemical Reaction Engineering.** 3rd ed., Prentice Hall, 1999.
- FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Food microbiology.** New Delhi: Tata McGraw Hill Publishing Company Limited, p. 398–415. 1990.
- GADEN, E.L. **Fermentation kinetics and productivity.** *Chemistry and Industry*, p. 154-159, 1955.
- GARCÍA BILBAO, J.L. **Aprovechamiento de suero de leche desproteínizado y de materiales nitrogenados de desecho por algunas levaduras.** *Alimentaria*, n.119, p.65-69, 1981.
- GEKAS, V., LÓPEZ-LEIVA, M. **Hydrolysis of lactose: a literature review.** *Process Biochem.*, v.20, n.1, p.2-12. 1985.
- GERDES, S. **Food makers turn to whey permeate.** *Dairy Foods*, v. 112, n. 3, p. 42. 2011.
- GHALY, A.E.; BEN-HASSAN, R.M.; BEN-ABDALLAH, N. **Effect of ambient temperature on the heating/cooling requirement of a single cell protein batch reactor operating on cheese whey.** *Biomass Bioenergy*, n. 3, p. 335–344, 1992.
- GHALY, A.E.; EL-TAWEEL, A.A. **Kinetic modeling of continuous production of ethanol from cheese whey.** *Biomass and Bioenergy*, v. 12, n. 6, p. 461-72, 1997.

- GHALY, A.E.; KAMAL, M.; CORREIA, L.R. **Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production.** *Bioresource Technol.*, v. 96, p. 1143-1152, 2005.
- GHASEMI, M.; NAJAFPOUR, G.; RAHIMNEJAD, M.; BEIGI, P.A.; SEDIGHI, M.; HASHEMIYED, B. **Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*.** *African Journal of Biotechnology*, v. 8 (1), p. 081-084, 2009.
- GIEC, A.; KOSIKOWSKI, F. V. **Activity of lactose fermenting yeasts in producing biomass from concentrated whey permeates.** *Journal of Food Science*, v. 47, p. 1892-1907, 1982.
- GILLAND, B. **World population and food supply: Can food production keep pace with population growth in the next half-century?** *Food Policy*, n. 27, p. 47-63, 2002.
- GONZÁLEZ, M.I.; ÁLVAREZ, S.; RIERA, F.; ÁLVAREZ, R. **Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey.** *J. Food Eng.*, v.80, n.2, p.553-561. 2007.
- GRBA, S.; STEHLIK-TOMAS, V.; STANZER, D.; VAHEIÉ, N.; SKRLIN, A. **Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey.** *Chemistry Biochemistry Engeneering*, v. 16, n. 1, p. 13-16, 2002.
- GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. **Research review paper: fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey.** *Biotechnol. Adv.*, v.28, n.3, p.375-384. 2010.
- HALASZ, A., LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production.** Boca Raton: CRC Press, 1991.
- HAYES, S. **New ways with whey.** *Nutrition & Food Science*, vol. 85, n. 6, p. 5-7, 1985.
- HISS, H. **Cinética de processos fermentativos.** In: *Biotecnologia Industrial*. Willibaldo Schmidell (coord.). Edgard Blucher, 1ª ed., 2001.
- HOLLAND, J. H. **Adaptation in Natural and Artificial Systems**, University of Michigan Press, 1975.
- HOLSINGER, V.H. **Physical and chemical properties of lactose.** In: *Lactose, water, salts and vitamins.* *Advanced Dairy Chemistry*, v. 3, p. 1-38, 1997.

- HUANG, Y.T.; KINSELLA, J.E. **Functional properties of phosphorylated yeast proteins: Solubility, water-holding capacity, and viscosity.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.34, p.670-674, 1986.
- INCHAURRONDO, V.A.; YANTORNO, O.M.; VOGET, C. E. **Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium.** *Process Biochemistry*, v. 29, p. 47-54, 1994.
- INGLET, B.S.; SONG, M.; HANSEN, C.L.; HWANG, S. **Short communication: Cultivation of *Lentinus edodes* mycelia using whey permeate as an alternative growth substrate.** *Journal of dairy science*, v. 89, n. 3, p. 1113–5, 2006.
- INTERNATIONAL CODE OF BOTANICAL NOMENCLATURE (Tokyo Code). Koeltz Scientific Books, Konigstein, Germany, 1994.
- JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**, Chapman and Hall, New York, USA, 1996.
- JOSHI, M.S.; GOWDA, L.R.; BHAT, S.G. **Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by cetyltrimethylammonium bromide.** *Biotechnol.Lett.*, v.9, n.8, p.549-554. 1987.
- KARGI, F.; OZMIHCI, S. **Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 711–718, 2006.
- KITAMOTO, H.K.; NAKAHARA, T. **Isolation of L-methionine-enriched mutant of *Kluyveromyces lactis* grown on whey permeate.** *Process Biochem*, n. 29, p. 127–131, 1994.
- KOSIKOWSKI, F.V. **Whey Utilization and Whey Products.** *Journal of Dairy Science*, v. 62, n. 7, p. 1149–1160, 1979.
- KOSIKOWSKI, F.V.; WIERZBICKI, L.E. **Research-article: lactose hydrolysis of raw and pasteurized milks by *Saccharomyces lactis* lactase.** *J. Dairy Sci.*, v.56, n.1, p.146-148, 1973.
- KOSIKOWSKI, F.V.; WZOREK, W. **Whey Wine from Concentrates of Reconstituted Acid Whey Powder.** *Journal of Dairy Science*, v. 60, n. 12, p.1982-1986, 1977.
- KOURKOUTAS, Y.; DIMITROPOULOU, S.; KANELLAKI, M.; MARCHANT, R.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; KOUTINAS, A.A. **High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material.** *Bioresour. Technol.*, v.82, n.2, p.177-181. 2002.

- KÜHLE, A.; SKOVGAARD, K.; JESPERSEN, L. **In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains.** *International Journal of Food Microbiology*, Turin, v.101, p.29-39, 2005.
- LAMBERT, P.W.; MEERS, J.L. **The production of industrial enzymes.** *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* n.300, p.263-282, 1983.
- LEITE, M.T. **Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus*.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2006. 96 p. Tese (Doutorado).
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Processos fermentativos e enzimáticos.** In: *Biotecnologia Industrial*. Willibaldo Schmidell (coord.). Edgard Blucher, 1ª ed., v. 3, 2001.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. **Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products.** *Food Res. Int.*, n. 34, p. 791–796, 2001.
- LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. **Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 21, n. 1, Campinas, 2001.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J.B. **Biology of Microorganisms.** Prentice-Hall International Editions, Upper Saddle River, 2000.
- MAIORELLA, B.L.; CASTILLO, F.J. **Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste treatment.** *Process Biochemistry*, p. 157-161, 1984.
- MANNUCCI, F. **Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides from whey Permeate.** Dublin: Dublin Institute of Technology, 2009. Tese (Doutorado).
- MARQUES, T.A.; SERRA, G.E. **Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 24, n. 4, p. 532-535, Campinas, 2004.
- MARWAHA, S.S.; KENNEDY, J.F. **Review : Whey-pollution utilization problem and potential.** *International Journal of Food Science and Technology*, v. 23, p. 323–336, 1988.
- MAWSON, A.J. **Bioconversions for whey utilization and waste abatement.** *Bioresource Technology*, n. 47, p. 195-203, 1994.
- MCFARLAND, L.V. ***Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*.** *Clinical Infectious Diseases*, v.22, 1996.

- MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. **Saccharomyces boulardii: a Review of an innovative biotherapeutic agent.** *Microbial Ecology in Health and Disease*, n. 6, p. 157–171, 1993.
- MILLER, B.M.; LITSKY, W. **Industrial Microbiology.** 2nd edition, McGraw-Hill, Inc., USA, 1976.
- MILLER, G.L., **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Anal. Chem.*, n. 31, p. 426, 1959.
- MIZUBUTI, I.Y. **Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação.** *Semina: Ci. Agr.*, v. 15, n. 1, p. 80-94, Londrina, 1994.
- MOEINI, H.; NAHVI, I.; TAVASSOLI, M. **Improvement of SCP and BOD removal of whey with mixed yeast culture.** *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 3, 2004.
- MORR, C.V. **Effect of heating and elevated temperature storage on cheese whey.** *Journal of Food Science*, v. 55, n. 4, p. 1177-1179. 1990.
- MORR, C.V. **Functionality of heated milk proteins in dairy and related foods.** *Journal Dairy Science*, n. 68, p. 2773-2781, 1985.
- MOULIN, G.; GALZY, P. **Whey, a potential substrate for biotechnology.** *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 1, n. 1, p. 347–374, 1984.
- MÜLLER, J.L. **Cultivo de Saccharomyces boulardii em biorreator tipo air lift e em frascos agitados mecanicamente.** Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2006. 92 p. Dissertação (Mestrado).
- OGRODOWSKI, R. **Produção de biomassa a partir do soro de queijo para obtenção de ribonucleotídeos.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. 122 p. Tese (Doutorado).
- OLIVEIRA, C.G.R. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de biomassa de levedura (Saccharomyces cerevisiae) rica em organoselênio.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006. 77 p. Dissertação (Mestrado).
- OZMIHCI, S.; KARGI, F. **Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP).** *Enzyme Microb. Technol.*, v.41, n.6-7, p.876-880. 2007a.

- OZMIHCI, S.; KARGI, F. **Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation.** *Enzyme Microb. Technol.*, v.41, n.1-2, p.169-174. 2007b.
- PANESAR, P.S.; KENNEDY, J.F. **Biotechnological approaches for the value addition of whey.** *Critical reviews in biotechnology*, v. 32, n. 4, p. 327–48, 2012.
- PANESAR, P.S.; KENNEDY, J.F.; GANDHI, D.N.; BUNKO, K. **Bioutilisation of whey for lactic acid production.** *Food Chem.*, n.105, v.1, p.1-14. 2007.
- PEREIRA, N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Séries em Biotecnologia.** v.1, Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.
- PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. **Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation.** *Biochemical Engineering Journal*, n. 28, p. 36-43, 2006.
- POMMERVILLE, J.C. **Alcamo's fundamentals of microbiology.** Pommerville. — 9th ed., 2011.
- PONSANO, E.H.G.; CASTRO GOMES, R.J.H. **Fermentação do soro de queijo por *Kuyveromyces fragilis* como alternativa para redução de sua capacidade poluente.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 15, n. 1, p. 170-173, 1995.
- PRAZERES, A.R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. **Cheese whey management: A review.** *Journal of Environmental Management*, n. 110, p. 48-68, 2012.
- QUINTERO, R. **Ingenieria Bioquímica, teoría y aplicaciones.** Alhambra Mexicana, México, 1993.
- RAJESHWARI, K.V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V.V.N. **State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment.** *Renewable Sustainable Energy Rev.*, v.4, n.2, p.135-156. 2000.
- RAJOKA, M.I.; KHAN, S.H.; JABBAR, M.A.; AWAN, M.S.; HASHMI, A.S. **Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors.** *Bioresource Technology*, v.97, n.15, p.1934-1941, 2006.
- RASIC, J.L. **The role of dairy foods containing bifido and acidophilus bacteria in nutrition and health.** *North European Dairy Journal*, n. 4, p. 1–10, 1983.

- RENNER, E.; EL-SALAM, M.H. **Application of ultrafiltration in the dairy industry.** Elsevier, New York, 1991.
- RHISHIPAL, R.; PHILIP, R. **Selection of marine yeast for generation of single cell protein from prawn shell wastes.** *Biores Technol*, v.65, p.255–6. 1998.
- ROEPCKE, C.B.S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007, 148 p. Dissertação (Mestrado).
- SABAA- SRUR, A.U.O.; KOBLITZ, M.G.; FREIMAN, L.O.; OLIVEIRA, V.; GONÇALVES, E.B. **Uso integral do soro de queijo minas frescal na elaboração de bebida láctea fermentada e sua aceitabilidade.** *Rev. Univ. Rural, Sér. Ciênc. Exatas e da Terra*, vol. 17(1/2), p. 57-62, 1995.
- SALICETI-PIAZZA, L.; DALE, M.C.; MOELHMAN, M.; OOKS, M.R.; WANKAT, P.C. **Free and immobilized yeasts for BOD reduction in dairy wastes: growth on low levels of lactose, lactic acid and glycerol.** Miami, FL: AIChE, Annual Meeting, Paper nº 165k, 1992.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE Y.K. **Probiotics: How should they be defined?** *Trends Food Sci. Technol.* n. 10, p. 107–110, 1999.
- SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V.; IORIO, G. **Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source.** *Biomass Bioenerg.*, v.33, n.12, p.1687-1692. 2009.
- SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L.D. CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. **Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kuyveromyces marxianus*.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 24, n. 4, p. 567-572, out.-dez. 2004.
- SAZAWAL, S.; HIREMATH, G.; DHINGRA, U.; MALIK, P.; DEB, S.; BLACK, R.E. **Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomized, placebo-controlled trials.** *Lancet Infect Dis.*, n. 6, v. 6, p. 374-82, 2006.
- SCHEPERS, A.W.; THIBAUT, J.; LACROIX, C. **Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and experiments.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 324–337, 2006.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial.** Edgard Blucher, 1ª ed., v. 3, 2001.

- SHAY, L.K.; HUNT, H.R.; WEGNER, G.H. **High productivity fermentation process for cultivating industrial microorganisms.** *Journal of Industrial Microbiology*, v. 2, p. 79-85, 1987.
- 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*, v. 36, n. 7, p. 930–936, 2005.
- SINGH, B.D. **Biotechnology.** New Delhi: Kalyani Publishers, p.498–510. 1998.
- SISO, M.I.G. **The biotechnological utilization of cheese whey: A review.** *Bioresource Technology*, v. 57, n. 1, p. 1–11, 1996.
- SMITHERS, G.W. **Whey and whey proteins: from ‘gutter-to-gold’.** *International Dairy Journal*, v. 18, p. 695- 704. 2008.
- SONG, M.; KIM, N.; LEE, S.; HWANG, S. **Use of whey permeate for cultivating *Ganoderma lucidum* mycelia.** *Journal of dairy science*, v. 90, n. 5, p. 2141–6, 2007.
- SURAWICZ, C.M.; ELMER, G. W.; SPEELMAN, P.; MCFARLAND, L. V.; CHINN, J.; VAN BELLE, G. **Prevention of antibiotic associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study.** *Gastroenterology*, n. 96, p. 981–988, 1989.
- SURAWICZ, C.M.; MCFARLAND, L.V.; GREENBERG, R. N.; RUBIN, M.; FEKETY, R.; MULLIGAN, M.E.; GARCIA, R.J.; BRANDMARKER, S.; BOWEN, K.; BORJAL, D.; ELMER, G.W. **The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*.** *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 31, n. 4, p.1012–7, out. 2000.
- VASALA, A.; PANULA, J.; NEUBAUER, P. **Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp. *Salicinius* with pre-treatment by proteolytic microorganisms.** *J. Biotechnol.*, v.117, n.4, p.421-431. 2005.
- VEGA, M.P.; LEITE, R.S.; OLIVEIRA, M.A.C.L. **Mathematical modeling of Single Cell Protein and ethanol production by *Kluyveromyces cicerisporus* fermentation on whey.** 17th European Symposium on Computer Aided Process Engineering – ESCAPE17, 2007.

- VOJNOVIĆ, D.D.V.; RITZ, M; VAHCIĆ, N. **Sensory evaluation of whey-based fruit beverages.** *Food / Nahrung*, v. 73, n. 3, p. 246-251. 1993.
- WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAIN, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A.E.; LILLY, M.D. **Fermentação descontínua.** In: *Biotecnologia Industrial*. Willibaldo Schmidell (coord.). Edgard Blucher, 1ª ed., 2001.
- WOLF, J; BINDRABAN, P.S.; LUIJTEN, J.C.; VLEESHOUWERS, L.M. **Exploratory study on the land area required for global food supply and the potential global production of bioenergy,** *Agr. Syst.* n. 76, p. 841–861, 2003.
- YALCIN, S.K.; BOZDEMIR, M.T.; OZBAS, Z.Y. **Utilization of Whey and Grape Must for Citric Acid Production by Two *Yarrowia lipolytica* Strains.** *Food Biotechnology*, v. 23, n. 3, p. 266–283, 2009.
- YANG, P.; ZHANG, R.; MCGARVEY, J.A.; BENEMANN, J.R. **Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities.** *Int. J. Hydrogen Energy*, v.32, n.18, p.4761-4771. 2007.
- YANG, S.T.; HUANG, Y. **A Novel Recycle Batch Immobilized Cell Bioreactor for Propionate Production from Whey Lactose.** *Biotechnology and Bioengineering*, n. 45, p. 379-386. 1995.
- ZADOW, J.G. **Utilization of Milk Components: Whey.** *Advances in milk processing.* v. 1, 1986.
- ZAFAR, S.; OWAIS, M. **Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, n. 3, p. 295–298, 2006.
- ZALL, R.R. **Trends in Whey Fractionation and Utilization, a Global Perspective.** *J Dairy Sci*, n. 67, p. 2621-2629, 1984.

ANEXOS

ANEXO A – FICHA DE ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA DO PERMEADO DE SORO DO LEITE EM PÓ

Especificação Técnica



Permeado de Soro de Leite em Pó

Produto

Produto obtido pela remoção das proteínas, alguns minerais e da lactose do soro de leite.

Ingredientes

Permeado de Soro de Leite Resfriado.

NÃO CONTÉM GLÚTEN

Características Sensoriais

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

Parâmetros Físico Químicos

Umidade	Máximo 4%
Acidez (ácido láctico)	Máximo 2% ¹
Gordura	Máximo 1,5%
pH (solução 10%)	6,0 – 6,7
Cinzas (sais minerais)	Máximo 6%
Lactose	Mínimo 88%
Proteína	Máximo 3,0%
1- Método C -	IN 68/2006 MAPA

Parâmetros Microbiológicos

Aeróbios Mesófilos	Máx 5x10 ⁴ UFC/g
Coliformes Totais	Máx 1x10 ² UFC/g
Coliformes Fecais	Máx 1x10 ² UFC/g
St. aureus	Máx 1x10 ² UFC/g
Bolores e Leveduras	Máx 5x10 ³ UFC/g
Salmonella (25g)	Ausente**
Bacillus cereus	Máx 1 x 10 ¹¹ **

** Análise semestral

Registro no Ministério da Agricultura nº 011/1328

Informações Nutricionais

	Porção de 100g
Calorias	370 kcal
Carboidratos	90 g
Proteínas	2,0 g
Gorduras Totais	0,16 g
Gorduras Saturadas	0,13 g
Gorduras Trans	0,0 g
Fibras Alimentares	<0,10g
Fósforo	480 mg
Potássio	40 mg
Magnésio	90 mg
Sódio	429 mg
Cálcio	490 mg

Aplicação

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

Embalagem

Sacos de papel multifolhados com saco de polietileno interno, contendo 25 kg.

Condições de Armazenamento e Transporte

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

Validade

Armazenado nas condições recomendadas, 6 meses a partir da data de fabricação.



Fone +55 (45) 3254-9669
www.sooro.com.br

Concentrado Ind. de Prod. Lácteos Ltda - SOORO
Caixa Postal 1066 - CEP 85960-000
Rodovia BR 163 km 277 - Mal. Cândido Rondon - Paraná

ANEXO B – MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (DNS)

A amostra deve ser diluída de acordo com a quantidade de açúcar (glicose) contida na amostra. Para os pontos iniciais da fermentação deve-se diluir 1:10 e os próximos pontos devem ser diluídos conforme as leituras anteriores (entre 0 e 0,800 nm).

Em um tubo de ensaio, adicionar 400 μ L da amostra previamente diluída e 400 μ L da solução de DNS. Levar ao banho-maria, a 100°C, por 5 minutos e, em seguida, resfriar em banho de gelo. Logo após, adicionar 4 mL de água destilada e homogeneizar.

Realizar uma prova em branco, substituindo a amostra por água destilada e uma curva padrão com uma solução padrão de glicose (3 gL⁻¹), na faixa de 0,5 à 3,0 gL⁻¹, nas mesmas condições da amostras.

Esperar 10 minutos e realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro em 575nm, zerando o aparelho com o branco preparado, de acordo com o procedimento de cada equipamento.

ANEXO C - MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR (GLICOSE) – KIT COLORIMÉTRICO

Este procedimento deve ser utilizado para as amostras de permeado hidrolisado.

A amostra deve ser diluída de acordo com a quantidade de açúcar (glicose) contida na amostra. Para os pontos iniciais da fermentação deve-se diluir 1:40 e os próximos pontos devem ser diluídos conforme as leituras anteriores (entre 0 e 0,800 nm).

Com o auxílio de micropipeta, pipetar 24 μ L da amostra já diluída em tubo de ensaio seco e devidamente identificado.

Em outro tubo, adicionar 24 μ L do reagente 1 (padrão).

Nos dois tubos, adicionar 2400 μ L do reagente 2 (reagente de cor) e 4800 μ L em outro tubo que será utilizado como branco.

Homogeneizar bem e incubar em banho-maria a 37°C por 10 min. O nível da água deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos.

Retirar do banho-maria e realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro em 505nm, zerando o equipamento com o branco preparado de acordo com o procedimento do equipamento.

A cor é estável por 30 minutos.

APÊNDICES

APÊNDICE A – CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

Os resultados das leituras de absorvância do meio de cultivo em concentração conhecida (a partir da massa seca) e diluições adequadas são apresentados da Tabela A.1, conforme valores médios de triplicatas. Na tabela, também se apresenta os valores do desvio padrão e do coeficiente de variação resultantes dos ensaios analíticos. Os valores médios da absorvância (leitura da absorvância multiplicados pela diluição) em função da concentração celular foram correlacionados conforme o perfil de regressão linear apresentado na Figura A.1, onde verifica-se a linearidade no intervalo de 0 a 6,54 gL⁻¹, conforme a equação da reta ($y = 1,9941x + 0,0948$), utilizada para obtenção da biomassa celular em todos os ensaios realizados nesse estudo.

Tabela A1: Resultados da curva de correlação

Concentração celular (gL ⁻¹)	Absorbância (600 nm)	Fator de diluição do equipamento	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
6,54	0,436	30	0,97	7,4
5,88	0,390	30	0,68	5,9
5,23	0,355	30	0,09	0,8
4,58	0,464	20	0,08	0,9
3,92	0,397	20	0,02	0,3
3,27	0,332	20	0,15	2,3
2,61	0,352	15	0,16	3,1
1,96	0,268	15	0,04	1,1
1,30	0,274	10	0,07	2,8
0,65	0,139	10	0,01	1,1

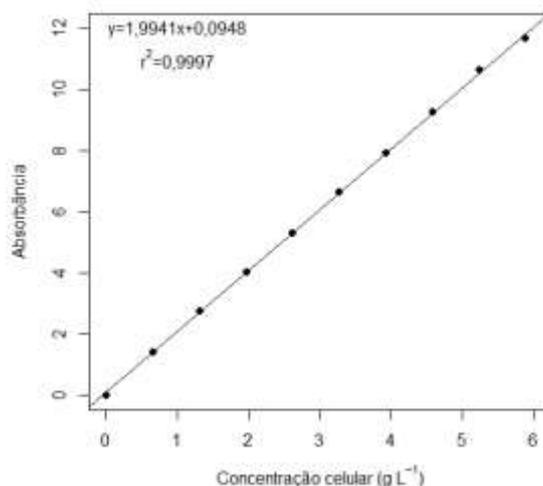


Figura A1: Curva de correlação entre absorvância (valores de leitura multiplicados pelo fator de diluição do equipamento) e concentração celular da *S. boulardii*

APÊNDICE B – ACOMPANHAMENTO DO PH, PRODUÇÃO DE BIOMASSA, CONSUMO DE SUBSTRATO E GLICOSE DAS FERMENTAÇÕES REALIZADAS (PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR)

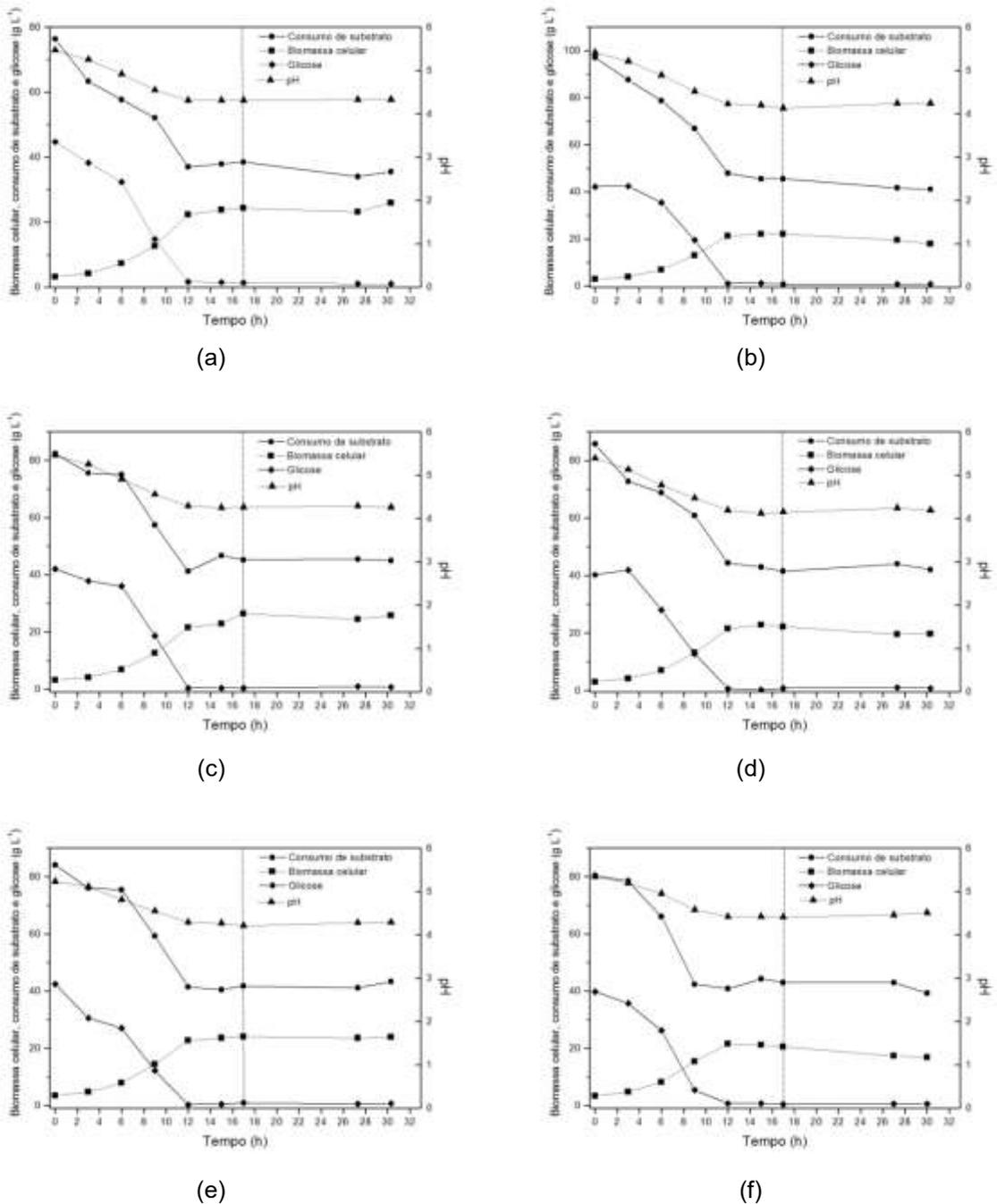
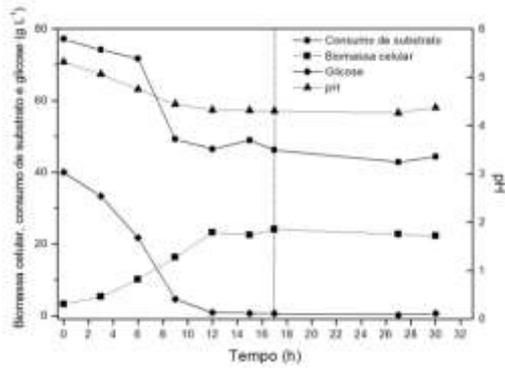
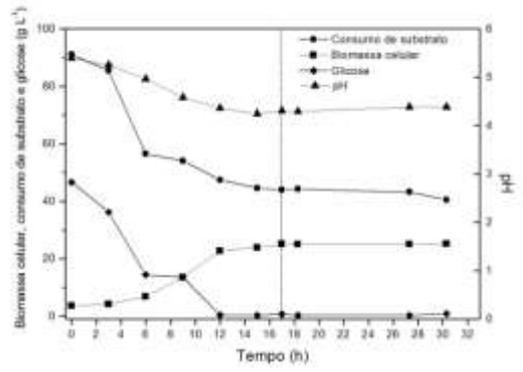


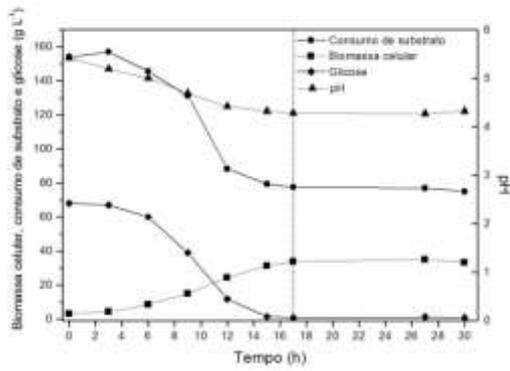
Figura A2 – Cinéticas de produção de biomassa celular (g L⁻¹), consumo de substrato (g L⁻¹), glicose (g L⁻¹) e pH: (a) ensaio 1; (b) ensaio 2; (c) ensaio 3; (d) ensaio 4; (e) ensaio 5 e (f) ensaio 6



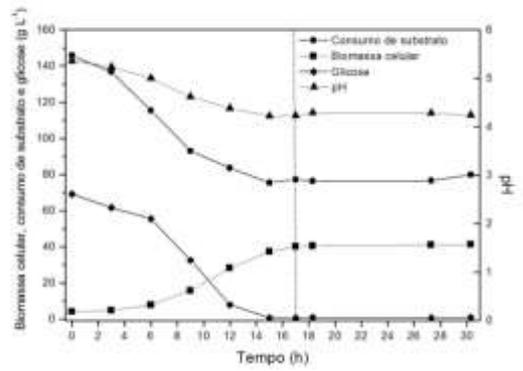
(a)



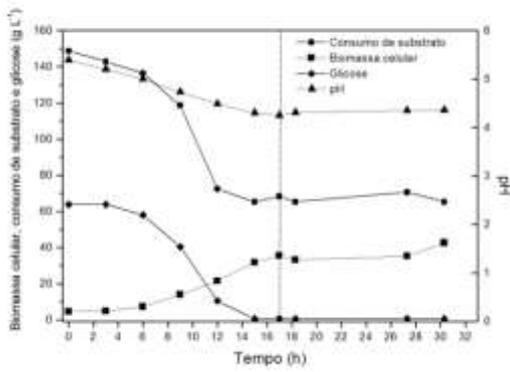
(b)



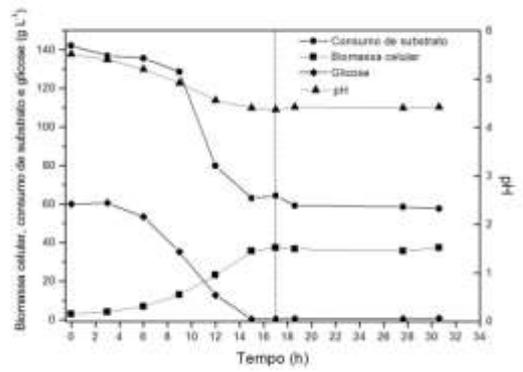
(c)



(d)

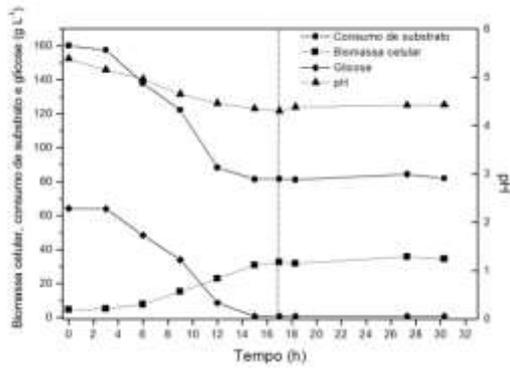


(e)

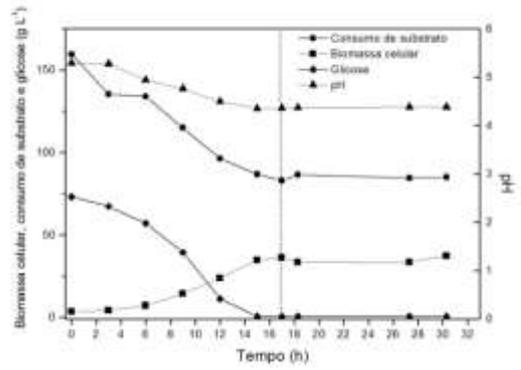


(f)

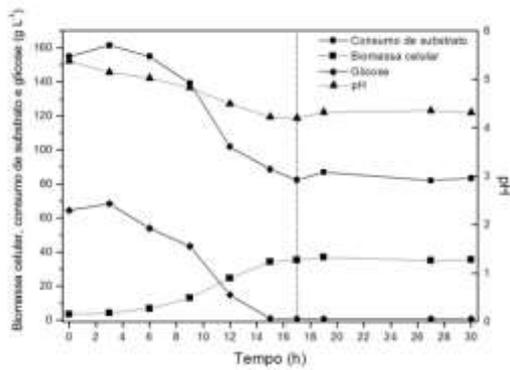
Figura A3 – Cinéticas de produção de biomassa celular (g L^{-1}), consumo de substrato (g L^{-1}), glicose (g L^{-1}) e pH: (a) ensaio 7; (b) ensaio 8; (c) ensaio 9; (d) ensaio 10; (e) ensaio 11 e (f) ensaio 12



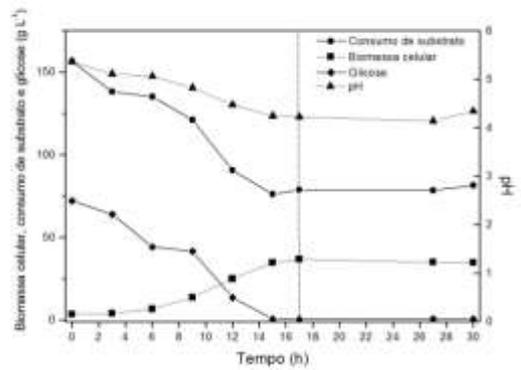
(a)



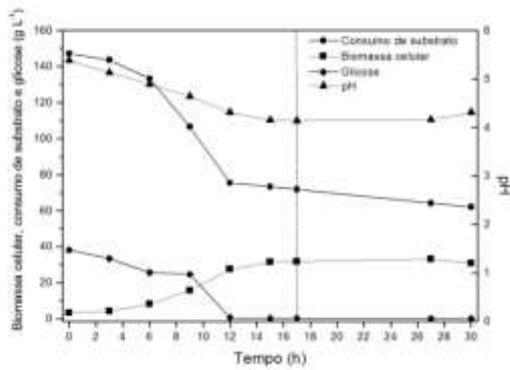
(b)



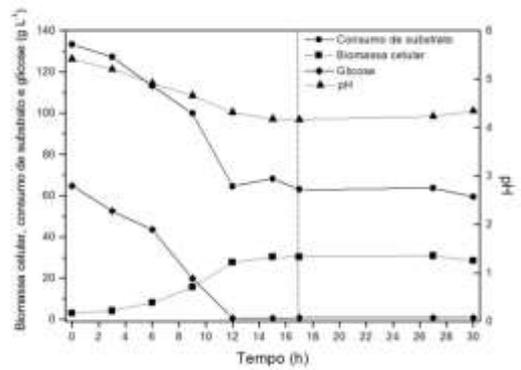
(c)



(d)

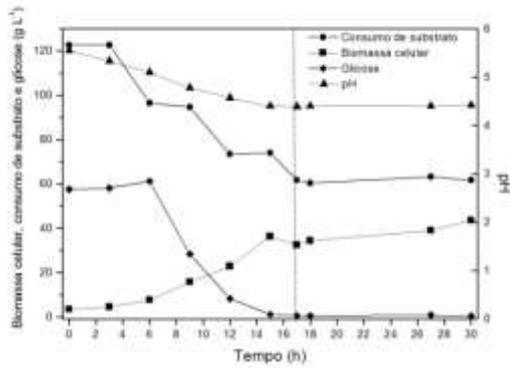


(e)

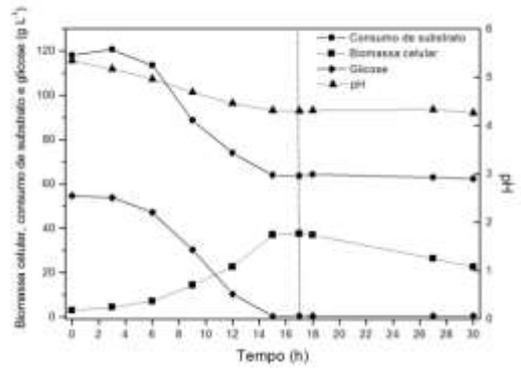


(f)

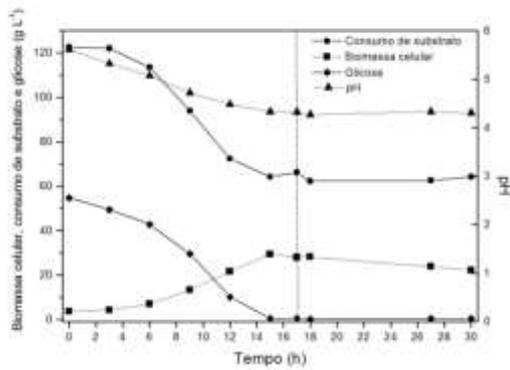
Figura A4 – Cinéticas de produção de biomassa celular (g L^{-1}), consumo de substrato (g L^{-1}), glicose (g L^{-1}) e pH: (a) ensaio 13; (b) ensaio 14; (c) ensaio 15; (d) ensaio 16; (e) ensaio 17 e (f) ensaio 18



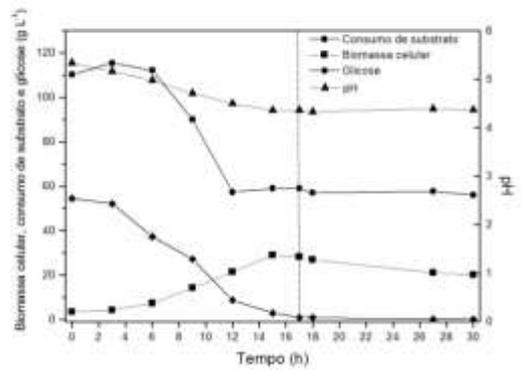
(a)



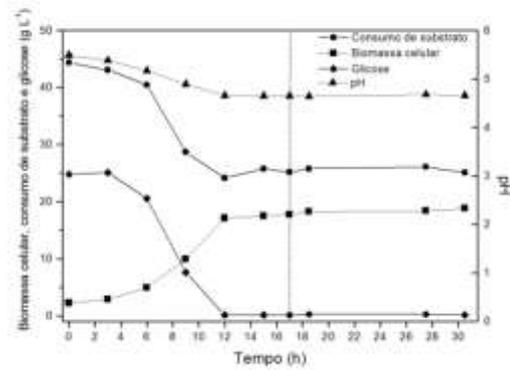
(b)



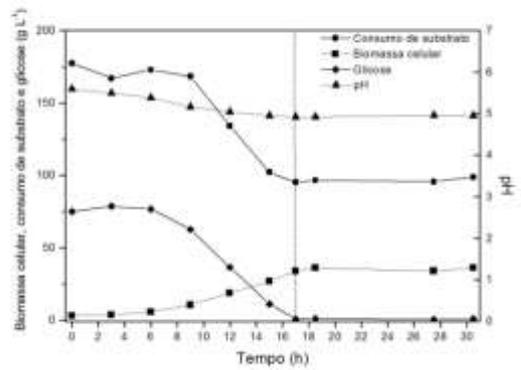
(c)



(d)

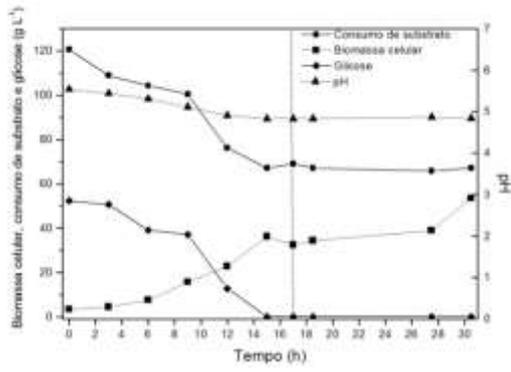


(e)

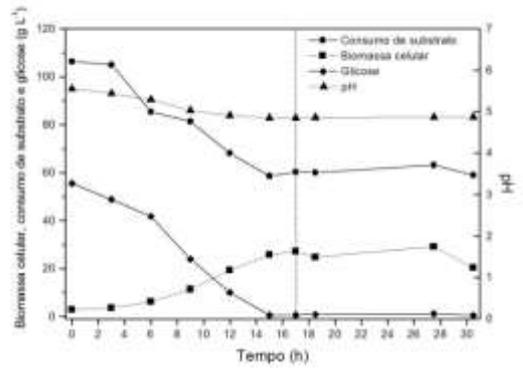


(f)

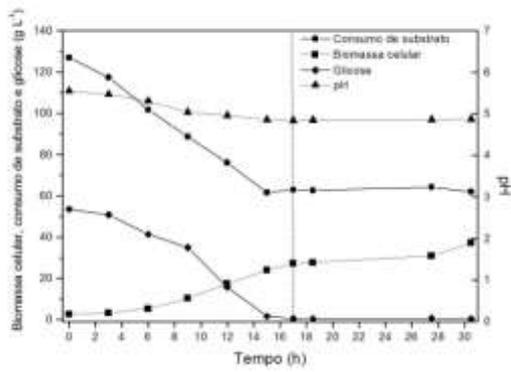
Figura A5 – Cinéticas de produção de biomassa celular (g L^{-1}), consumo de substrato (g L^{-1}), glicose (g L^{-1}) e pH: (a) ensaio 19; (b) ensaio 20; (c) ensaio 21; (d) ensaio 22; (e) ensaio 23 e (f) ensaio 24



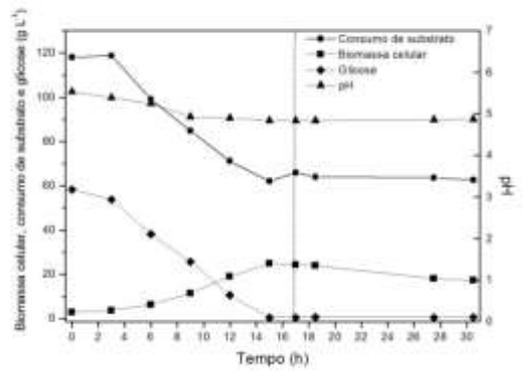
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura A6 – Cinéticas de produção de biomassa celular (gL⁻¹), consumo de substrato (gL⁻¹), glicose (gL⁻¹) e pH: (a) ensaio 25; (b) ensaio 26; (c) ensaio 27; (d) ensaio 28