

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

**BIOPROCESSO, MODELAGEM MATEMÁTICA E POTENCIAIS DE
APLICAÇÕES DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO
DESPROTEINIZADO E LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus*
CCT 4086**

KEITI LOPES MAESTRE

TOLEDO – PR - BRASIL
Junho de 2020

KEITI LOPES MAESTRE

**BIOPROCESSO, MODELAGEM MATEMÁTICA E POTENCIAIS DE
APLICAÇÕES DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO
DESPROTEINIZADO E LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus*
CCT 4086**

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Mônica Lady Fiorese

TOLEDO – PR - BRASIL
Junho de 2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

MAESTRE, KEITI LOPES
BIOPROCESSO, MODELAGEM MATEMÁTICA E POTENCIAIS DE
APLICAÇÕES DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO DESPROTEINIZADO E
LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 / KEITI LOPES
MAESTRE; orientador(a), EDSON ANTONIO DA SILVA;
coorientador(a), MÔNICA LADY FIORESE, 2020.
197 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências
Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2020.

1. Bioproduto.. 2. Bioetanol.. 3. Processo integrado..
4. Levedura.. I. SILVA, EDSON ANTONIO DA. II. FIORESE,
MÔNICA LADY. III. Título.

“Faça tudo com amor.”

1 Coríntios 16:14

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela minha vida, pelas oportunidades, bênçãos, proteção e livramentos ao percorrer 60 km em cada viagem até a Uniãoeste. A minha Fé foi essencial em cada etapa desta formação.

À minha mãe Aparecida, mulher de fibra, a minha fortaleza, a quem eu sou grata por todos os ensinamentos e dedico cada conquista e realização, se não fosse todo seu esforço, comprometimento e dedicação a nossa família eu não teria chegado até aqui.

Aos meus amáveis irmãos Kathia e Renan, que sempre me apoiam, me consolam, me compreendem e me fazem ter a certeza de que estou no caminho certo. Sem vocês, minha vida não teria o valor que têm.

Ao Rafael, meu primeiro sobrinho, que chegou no início do Doutorado e trouxe consigo um amor incalculável e indescritível. Obrigada por aquecer meu coração de tanto amor.

Ao E. Hermes por ser a calma em minha vida.

Ao Professor orientador Dr. Edson Antônio pela orientação, compreensão, atenção, apoio e oportunidade.

À Professora co-orientadora Dra. Mônica Fiorese, por acreditar em mim, por sempre me animar e estar disposta a contribuir para a construção dos meus sonhos. Sou grata pela orientação, compreensão, zelo, apoio, paciência, dedicação, atenção e amizade.

As companheiras de laboratório e pós, Fernanda R. e Carina T. obrigada pelo apoio e incentivo. Sem vocês esta etapa teria sido mais difícil.

Aos alunos de iniciação científica William C., Emanuely S., Matheus B., Jessica J. e Sandy H. por toda contribuição em todas as fases do projeto.

Aos professores Dra. Veronice S., Dr. Plínio C., Dr. Fabiano S., e Dra. Katia S. que participaram das bancas de qualificação e defesa. Obrigada por todas as contribuições.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À empresa Sooro Renner Nutrição S.A. pelo fornecimento da matéria-prima permeado de soro de queijo desproteínizado.

À Unioeste do Campus Toledo e a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

À Unioeste do Campus Cascavel por todo auxílio com o HPLC.

Ao NIT da Unioeste do Campus Cascavel pelo suporte quanto aos processos de patente de invenção.

Ao concluir esta etapa fundamental para minha formação de Doutora, agradeço a todos que contribuíram para a realização e concretização desta pesquisa e torceram por mim.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| SIGLAS | xiv |
| RESUMO | 16 |
| 1.2 Objetivos da pesquisa..... | 22 |
| 1.2.1 Objetivo Geral | 22 |
| 1.2.2 Objetivos específicos | 23 |
| CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 24 |
| SEÇÃO I - CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA | 24 |
| 2.1 Segmento Leiteiro no Brasil..... | 24 |
| 2.2 Leite | 25 |
| 2.3 Queijo | 28 |
| 2.4 Soro de queijo | 30 |
| 2.5 Permeado de soro de queijo desproteínizado | 33 |
| 2.6 Aplicações das matérias-primas lácteas em processos biotecnológicos | 35 |
| SEÇÃO II – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 38 |
| 2.7 Processos fermentativos..... | 38 |
| 2.8 Fermentação alcoólica..... | 38 |
| 2.8.1 Fatores que interferem na fermentação alcoólica | 39 |
| 2.8.1.1 Temperatura..... | 39 |
| 2.8.1.2 pH | 40 |
| 2.8.1.3 Matéria-prima | 40 |
| 2.8.1.4 Nutrientes | 41 |
| 2.8.1.5 Concentração de inóculo | 42 |
| 2.8.1.6 Inibidores | 42 |
| 2.9 Curva de crescimento microbiano | 42 |
| 2.10 Comportamento cinético dos processos fermentativos | 44 |
| 2.10.1 Velocidades específicas (μ)..... | 46 |

| | |
|--|----|
| 2.10.2 Fatores de conversão (Y) | 46 |
| 2.11 Modelagem matemática de processos fermentativos | 47 |
| 2.11.1 Modelos mais comumente utilizados em bioprocessos | 48 |
| SEÇÃO III – Leveduras produtoras de etanol | 52 |
| 2.12 <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 53 |
| 2.12.1 Ação prebiótica | 59 |
| SEÇÃO IV – BIOPRODUTOS FERMENTATIVOS | 60 |
| 2.13 Bioprodutos formados pelos processos fermentativos | 60 |
| 2.13.1 Bioetanol..... | 60 |
| 2.13.1.1 Pesquisas relacionadas à obtenção de bioetanol | 62 |
| 2.14 Subprodutos fermentativos | 63 |
| 2.14.1 Biomassa microbiana..... | 63 |
| 2.14.1.1 Pesquisas relacionadas à produção de biomassa microbiana | 65 |
| 2.14.2 Ácidos orgânicos | 67 |
| 2.14.2.1 Pesquisas relacionadas à aplicação e formação de ácidos orgânicos.... | 68 |
| 2.14.3 Galacto-oligosacarídeo | 70 |
| 2.14.3.1 Pesquisas relacionadas à obtenção de galacto-oligossacarídeo | 71 |
| SEÇÃO V - ESTADO DA ARTE | 72 |
| 2.15 Biorrefinaria - Motivação e concepção | 72 |
| 2.16 Justificativa da pesquisa | 76 |
| CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS | 77 |
| SEÇÃO I – PROCESSOS FERMENTATIVOS | 77 |
| 3.1 Substrato | 77 |
| 3.1.1 Caracterização elementar do permeado de soro de queijo desproteínizado em pó | 78 |
| 3.1.2 Caracterização do permeado de soro de queijo desproteínizado em pó quanto à demanda química e bioquímica de oxigênio | 78 |
| 3.2 Microrganismo fermentativo | 79 |
| 3.3 Produção de bioetanol e demais produtos de interesse | 79 |
| 3.3.1 Ativação celular | 79 |
| 3.3.1.1 Manutenção celular..... | 79 |

| | |
|---|----|
| 3.3.2 Preparo do pré-inóculo | 80 |
| 3.3.3 Preparo do inóculo | 80 |
| 3.3.3.1 Composição nutricional do inóculo - Planejamento experimental fatorial 2^3 | 81 |
| 3.3.3.2 Composição nutricional do inóculo – Delineamento composto central rotacional | 81 |
| 3.3.4 Cultivos nas condições processuais | 81 |
| 3.3.4.1 Planejamento experimental fatorial 2^3 | 82 |
| 3.3.4.2 Delineamento composto central rotacional | 82 |
| SEÇÃO II – DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS | 82 |
| 3.4 Planejamento experimental fatorial 2^3 | 82 |
| 3.5 Delineamento composto central rotacional | 83 |
| 3.6 Análise estatística | 85 |
| SEÇÃO III – METODOLOGIAS ANALÍTICAS | 85 |
| 3.7 Amostragem | 85 |
| 3.8 Determinações analíticas | 86 |
| 3.8.1 Bioetanol e ácidos orgânicos | 86 |
| 3.8.2 Consumo de substrato | 86 |
| 3.8.2.1 Consumo de glicose | 87 |
| 3.8.3 Biomassa microbiana | 87 |
| 3.8.4 Concentração de GOS total | 88 |
| 3.8.5 Número de células viáveis | 88 |
| 3.8.6 Consumo de elementos químicos por TXRF | 89 |
| 3.8.7 Determinação do pH | 89 |
| 3.8.8 Monitoramento do oxigênio dissolvido | 89 |
| 3.8.9 Proteína microbiana | 89 |
| SEÇÃO IV – MODELAGEM MATEMÁTICA | 89 |
| 3.9 Tratamento de dados | 89 |
| 3.9.1 Velocidade específica de crescimento celular | 89 |
| 3.9.2 Fatores de conversão | 90 |
| 3.9.2.1 Conversão de substrato em célula | 90 |

| | |
|--|-----|
| 3.9.2.2 Conversão de produto em célula | 90 |
| 3.9.2.3 Conversão de substrato em produto | 91 |
| 3.9.2.4 Produtividade de bioetanol | 91 |
| 3.9.2.5 Conversão teórica | 91 |
| 3.10 Modelagem matemática dos processos fermentativos | 92 |
| 3.10.1 Análise e avaliação dos modelos | 95 |
| CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 98 |
| 4.1 Caracterização do permeado de soro de queijo desproteínizado em pó | 98 |
| 4.2 Produção de bioetanol e biomassa microbiana: planejamento experimental fatorial 2 ³ | 100 |
| 4.3 Modelagem matemática para o planejamento experimental fatorial 2 ³ | 113 |
| 4.4 Produção de bioetanol: delineamento composto central rotacional..... | 121 |
| 4.6 Bioprodutos | 130 |
| 4.7 Biorrefinaria | 135 |
| CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES..... | 138 |
| CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 139 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 140 |
| APÊNDICES..... | 176 |
| APÊNDICE A | 177 |
| APÊNDICE B..... | 178 |
| APÊNDICE C..... | 179 |
| APÊNDICE D..... | 180 |
| APÊNDICE E | 181 |
| APÊNDICE F | 188 |
| ANEXOS | 189 |
| ANEXO A | 190 |
| ANEXO B..... | 192 |
| ANEXO C..... | 193 |
| ANEXO D..... | 194 |
| ANEXO E | 195 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 2.1 - Maiores regiões produtoras de Leite no mundo..... | 27 |
| Figura 2.2 - Maiores regiões produtoras de Leite no Brasil..... | 27 |
| Figura 2.3 - Maiores Laticínios no Brasil em número de produtores..... | 28 |
| Figura 2.4 - Os seis tipos de queijos mais produzidos no Brasil..... | 29 |
| Figura 2.5 - Produção global de bioetanol por país..... | 37 |
| Figura 2.6 - Curva típica de um crescimento microbiano..... | 43 |
| Figura 2.7 - Curva de cinética de processos fermentativos..... | 45 |
| Figura 2.8 - Morfologia da levedura <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 por microscopia óptica e eletrônica | 53 |
| Figura 4.1 - Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações verificadas no planejamento experimental fatorial 2 ³ ao nível de confiança de 90% para as variáveis bioetanol (a) e biomassa celular (b) para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086..... | 102 |
| Figura 4.2 - Resultado estatístico do planejamento experimental fatorial 2 ³ para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 em relação as variáveis respostas bioetanol (a) e biomassa celular (b) , para os valores preditos pelos valores observados..... | 104 |
| Figura 4.3 - Superfície de contorno para o planejamento experimental fatorial 2 ³ para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 em relação a variável bioetanol – (a) temperatura por pH, (b) lactose por temperatura e (c) pH por lactose..... | 105 |
| Figura 4.4 - Superfície de contorno para o planejamento experimental fatorial 2 ³ para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 em relação a variável biomassa celular – (a) temperatura por pH, (b) temperatura por lactose e (c) pH por lactose..... | 105 |
| Figura 4.5 - Perfil cinético da levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 para produção de bioetanol, biomassa celular, proteína microbiana (g L ⁻¹), consumo de substrato lactose, glicose e galactose (g L ⁻¹) e pH dos ensaios do planejamento experimental fatorial 2 ³ | 108 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.6 - Dados cinéticos dos Ensaios 1 e 5 do planejamento experimental fatorial 2^3 da levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 em relação à (a) biomassa celular, (b) consumo do substrato e (c) bioetanol..... | 114 |
| Figura 4.7 - Simulação dos dados dos Ensaios 1 e 5 do planejamento experimental fatorial 2^3 da levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 pelo modelo de Edwards em termos de: (a) biomassa celular, (b) consumo do substrato e (c) bioetanol..... | 116 |
| Figura 4.8 - Simulação dos dados dos Ensaios 1 e 5 do planejamento experimental fatorial 2^3 da levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 pelo modelo de Phisalaphong em termos de: (a) biomassa celular, (b) consumo do substrato e (c) bioetanol..... | 117 |
| Figura 4.9 - Simulação dos dados experimentais com o novo modelo proposto (cenário 4) em termos de: (a) biomassa celular, (b) consumo do substrato e (c) bioetanol..... | 119 |
| Figura 4.10 - Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações averiguadas no delineamento composto central rotacional ao nível de confiança de 95% para a variável bioetanol para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 em 40 h..... | 122 |
| Figura 4.11 - Resultado estatístico do delineamento composto central rotacional para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 para os valores preditos pelos valores observados para a variável bioetanol em 40 h..... | 124 |
| Figura 4.12 - Superfície de contorno (a) e de resposta (b) do delineamento composto central rotacional para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 para a variável bioetanol em 40 h..... | 124 |
| Figura 4.13 - Perfil cinético da levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 para produção de bioetanol (g L^{-1}), células viáveis ($\ln(N/N_0)$), consumo de substrato lactose (g L^{-1}) e pH dos ensaios do delineamento composto central rotacional..... | 127 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 2.1 - Composição média do leite | 25 |
| Tabela 2.2 - Composição média do permeado de soro de leite desproteínizado | 34 |
| Tabela 2.3 - Estudos que empregaram a levedura <i>K. marxianus</i> em processos biotecnológicos com substratos diversos..... | 56 |
| Tabela 2.4 - Estudos que empregaram a levedura <i>K. marxianus</i> em processos biotecnológicos com substrato soro..... | 57 |
| Tabela 2.5 - Estudos que empregaram a levedura <i>K. marxianus</i> em processos biotecnológicos com substrato permeado (PSQD)..... | 58 |
| Tabela 3.1 - Especificação dos níveis e valores reais das variáveis empregadas no planejamento experimental fatorial 2 ³ para a levedura <i>K marxianus</i> CCT 4086..... | 83 |
| Tabela 3.2 - Matriz do planejamento fatorial 2 ³ para a levedura <i>K marxianus</i> CCT 4086, com valores reais e codificados para suas variáveis..... | 83 |
| Tabela 3.3: Especificação dos níveis e valores reais das variáveis empregadas no delineamento composto central rotacional para a levedura <i>K marxianus</i> CCT 4086..... | 84 |
| Tabela 3.4 - Matriz do delineamento composto central rotacional com valores reais e codificados para suas variáveis para a levedura <i>K marxianus</i> CCT 4086..... | 84 |
| Tabela 4.1 - Caracterização da composição química elementar do permeado de soro de queijo desproteínizado em pó..... | 98 |
| Tabela 4.2 - Caracterização do permeado de soro de queijo desproteínizado em pó..... | 99 |
| Tabela 4.3 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2 ³ com os valores reais das variáveis averiguadas e a resposta para o bioetanol (g L ⁻¹) para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 em 45 h..... | 101 |
| Tabela 4.4 - Estimativa de efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas no planejamento experimental fatorial 2 ³ em 45 h de fermentação para as variáveis bioetanol e biomassa celular para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086..... | 102 |
| Tabela 4.5 - Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento experimental fatorial 2 ³ para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086..... | 103 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 4.6 - Parâmetros cinéticos para os ensaios do planejamento experimental fatorial 2 ³ a partir da levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086..... | 110 |
| Tabela 4.7 - Parâmetros de Critério de Akaike para os ajustes dos modelos..... | 117 |
| Tabela 4.8 - Parâmetros de Critério de Akaike dos testes realizados para validação do modelo proposto..... | 120 |
| Tabela 4.9 - Valores dos parâmetros cinéticos estimados no modelo proposto.... | 120 |
| Tabela 4.10 - Matriz do delineamento composto central rotacional com os valores reais das variáveis averiguadas e a resposta para o bioetanol (g L ⁻¹) para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 em 40 h..... | 121 |
| Tabela 4.11 - Estimativa de efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas no delineamento composto central rotacional em 58 h de fermentação para a variável bioetanol para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 em 40 h..... | 123 |
| Tabela 4.12 - Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento delineamento composto central rotacional para a levedura <i>K. marxianus</i> CCT 4086 em 40 h..... | 123 |
| Tabela 4.13 - Parâmetros cinéticos para os ensaios do delineamento composto central rotacional a partir da levedura <i>K. marxianus</i> e CCT 4086..... | 125 |
| Tabela 4.14 - Caracterização da composição química elementar e proteica da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 (seca) em 45 h..... | 131 |
| Tabela 4.15 - Formação de GOS pela <i>K. marxianus</i> CCT 4086 nos bioprocessos..... | 133 |
| Tabela 4.16 - Formação dos ácidos orgânicos pela <i>K. marxianus</i> CCT 4086 nos bioprocessos..... | 134 |

SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| AIC | Critério de Akaike |
| ASBC | Sociedade Americana de de Químicos Cervejeiros (<i>American Society of Brewing Chemists</i>) |
| BSG | Bioetanol de segunda geração |
| C | Carbono |
| CP | Concentrados proteicos |
| DBO | Demanda bioquímica de oxigênio |
| DCCR | Delineamento composto central rotacional |
| DNS | Açúcares redutores totais |
| DQO | Demanda química de oxigênio |
| FAO | Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura |
| GOS | Galacto-oligossacarídeos |
| GRAS | <i>Generally Regarded As Safe</i> |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| ICP | Plasma Acoplado por Indução |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| N | Nitrogênio |
| ODS | Objetivos de Desenvolvimento Sustentável |
| ONU | Organização das Nações Unidas |
| PC | Ponto crítico |
| PHB | Polihidroxibutirato |
| PLU | Produtos lácteos ultrafiltrados |
| PSQD | Permeado de soro de queijo desproteinizado |
| QPS | <i>Qualified Presumption of Safety</i> |
| R ² | Coeficiente de determinação |
| SL | Soro de leite |
| USDA | Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (<i>United States Department of Agriculture</i>) |
| TXRF | Fluorescência de Raios X por Reflexão Total |
| WPC | Concentrado proteico de soro (<i>whey protein concentrate</i>) |

YMA Extrato de malte de levedura (*yeast malt extract agar*)

**BIOPROCESSO, MODELAGEM MATEMÁTICA E POTENCIAIS DE
APLICAÇÕES DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO
DESPROTEINIZADO E LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus*
CCT 4086**

AUTORA: KEITI LOPES MAESTRE

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTÔNIO DA SILVA

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

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903 - 000 - Toledo - PR, Brasil, defendida em 08 de junho de 2020. 197 p.

RESUMO

Um dos subprodutos gerados pelas indústrias lácteas é o permeado de soro de queijo desproteínizado (PSQD), o qual apresenta elevada carga orgânica, devido ao seu alto teor de lactose e sais minerais. No intuito de transformar os resíduos lácteos e minimizar os impactos ambientais que estes podem provocar se descartados de forma incorreta no meio ambiente, busca-se, por meio da aplicação da biotecnologia, desenvolver novos produtos empregando resíduos lácteos como matéria-prima. Assim sendo, quando se visa a produção em escala industrial, é essencial a compreensão dos efeitos das condições experimentais de fermentação, principalmente se tratando da formação de bioetanol e/ou bioproductos. Deste modo, a construção de modelos matemáticos que descrevem a bioconversão e auxiliam na otimização de processos é fundamental para o aumento do rendimento das reações. Nessa perspectiva, o objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o potencial do desenvolvimento de bioprocessos otimizados e modelados de produção de bioetanol a partir de permeado de soro de queijo desproteínizado (PSQD) e *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 englobando o conceito de biorrefinaria.

Ademais, realizar o desenvolvimento e validação de um novo modelo matemático para descrever o processo de fermentação desta levedura. Para tanto, avaliou-se um planejamento experimental fatorial 2^3 e um delineamento composto central rotacional para a biotransformação do PSQD em bioetanol e demais bioprodutos. Dentre os ensaios experimentais, as maiores bioconversões se deram com 88 g L^{-1} de lactose, em que o ensaio 1 ($29 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 4,5) foi a melhor condição, obtendo $50,65 \text{ g L}^{-1}$ de bioetanol ao final de 45 h de reação, seguido dos ensaios 20, 21 e 22 ($30 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 3,5) com concentração média de etanol de $47,83 \text{ g L}^{-1}$ em 40 h. Em todos os ensaios, também houve a produção de galacto-oligossacarídeos ou ácidos orgânicos. Visando a elaboração de um modelo que representasse este processo de fermentação, foram analisados e testados dois modelos fenomenológicos da literatura e proposto um novo modelo. Os parâmetros cinéticos dos modelos foram ajustados a partir de um conjunto de dados experimentais dos ensaios (1 e 5) sob mesmas condições de pH e temperatura ($29 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 4,5). O modelo que melhor representou o processo da bioconversão foi o modelo matemático proposto, pois considera os efeitos de inibição de crescimento pelo substrato e a fase de morte celular, incorporando os efeitos de liberação de bioetanol residual durante a fase de crescimento celular. Deste modo, comprova-se o potencial do PSQD como matéria-prima para biotransformações e a constituição de um processo integrado e sustentável de uma biorrefinaria a partir da indústria láctea.

Palavras-chaves: bioproduto; bioetanol; processo integrado; levedura.

**BIOPROCESS, MATHEMATICAL MODELING AND APPLICATION
POTENTIALS IN WHEY PERMEATE AND YEAST *Kluyveromyces
marxianus* CCT 4086**

AUTHOR: KEITI LOPES MAESTRE

SUPERVISOR: PROF. DR. EDSON ANTÔNIO DA SILVA

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

Doctoral Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on June, 08th 2020. 197 p.

One of the by-products generated by the dairy industries is the deproteinized cheese whey permeate (DCWP), which has a high organic load, due to its high content of lactose and mineral salts. In order to transform dairy residues and minimize the environmental impacts that they can cause if incorrectly discarded in the environment, it is sought, through the application of biotechnology, to develop new products using dairy residues as raw materials. Therefore, when aiming at industrial scale production, it is essential the comprehension of the effects of experimental fermentation conditions, especially when it comes to the formation of bioethanol and/or bioproducts. Thus, the construction of mathematical models that describe bioconversion and assist in the optimization of processes is fundamental for increasing the yield of reactions. In this perspective, the general aim of this research was to evaluate the potential of the development of optimized and modeled bioprocess of the production of bioethanol from cheese whey permeate (DCWP) and *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 covering the concept of biorefinery. In addition, to perform the development and validation of a new mathematical model to describe the fermentation process of this yeast. For that, a 2³ factorial experimental design and a central rotational composite design for the biotransformation of the DCWP into bioethanol and other bioproducts were evaluated. Among the experimental assays, the largest bioconversions occurred

with 88 g L⁻¹ of lactose, in which the assay 1 (29 °C and pH 4.5) was the best condition, obtaining 50.65 g L⁻¹ of bioethanol after 45 h of reaction, followed by the assays 20, 21 and 22 (30 °C and pH 3.5) with an average ethanol concentration of 47.83 g L⁻¹ in 40 h. In all assays, there were also galactooligosaccharides or organic acids production. Aiming at a model development that represented this fermentation process, two phenomenological models of the literature were analyzed and tested, and a new model was proposed. The kinetic parameters of the models were adjusted from a set of experimental data from the assays (1 and 5) under the same pH and temperature conditions (29 °C, pH 4.5). The model which better represented the bioconversion process was the proposed mathematical model, because it considers the effects of growth inhibition by the substrate and the cell death phase, incorporating the effects of releasing residual bioethanol during the cell growth phase. Thus, it is proven the potential of DCWP as a raw material for biotransformations and the formation of an integrated and sustainable process of a biorefinery from the dairy industry.

Keywords: bioproduct; bioethanol; integrated process; yeast.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Um dos elementos determinantes para a competitividade, lucratividade e responsabilidade ambiental das indústrias consiste no gerenciamento de resíduos e subprodutos. As indústrias lácteas são geradoras de volumes expressivos de subprodutos lácteos, os quais são constantemente objeto de pesquisa que visam uma aplicação direta ou o desenvolvimento de novos produtos, à exemplo a suplementação alimentar em dietas de suínos (BERTOL *et al.*, 1996; HAUPTLI *et al.*, 2005) e bezerras (FONTES *et al.*, 2006), enriquecimento de bebidas (PELEGRINE & CARRASQUEIRA, 2008), produção de butanol, hidrogênio e lipídios (ZACARCHENCO *et al.*, 2012; HADIYANTO *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2014; PESCUA *et al.*, 2015; WOYENGO *et al.*, 2015), biomassa microbiana (TRIGUEROS *et al.*, 2016), galacto-oligossacarídeos (PADILLA *et al.*, 2015), transgalactosilação de lactose (WAWRZYNIAK *et al.*, 2019), bioetanol (MAWSON, 1994; SISO, 1996, SANSONETTI *et al.*, 2009; BACH *et al.*, 2014; GABARDO *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015, GABARDO *et al.*, 2016; MAESTRE, 2017), entre outras aplicações.

O bioetanol é um dos principais combustíveis do mercado mundial, comumente, é obtido a partir de matérias-primas como cana-de-açúcar, milho e beterraba. No entanto, nas últimas décadas, alguns países têm buscado utilizar resíduos agroindustriais, como palha da cana-de-açúcar, o bagaço de cana, palha de trigo, palha de arroz, pseudocaule da bananeira para o fabrico de bioetanol de segunda geração (LIMA *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2015; EL-IMAM *et al.*, 2019; GUILHERME *et al.*, 2019; DU *et al.*, 2020).

Um subproduto lácteo que tem grande potencial para a produção de bioetanol de segunda geração é o permeado de soro de queijo desproteínizado (PSQD), subproduto este, gerado em indústrias de processamento de concentrados proteicos (CP) e produtos lácteos ultrafiltrados (PLU).

O PSQD apresenta características em termos de composição muito semelhantes às do soro de leite (SL), que é composto por 55 % dos nutrientes do leite *in natura*, incluindo as proteínas do soro (20 % da proteína total), sais minerais (potássio, cálcio, fósforo, magnésio, zinco), vitaminas hidrossolúveis (complexo B)

e quase toda a lactose do leite, representando cerca de 70 %. Já o PSQD contém os mesmos nutrientes do soro, excluindo-se apenas a proteína, e, portanto, isso o torna fonte de matéria-prima atrativa, barata e nutricionalmente rica para biotransformação em bioetanol (GONZÁLEZ-SISO, 1996; DINIZ *et al.*, 2014; HU & DICKSON, 2015; MURARI *et al.*, 2018).

Uma alternativa viável de aplicação do permeado de soro de queijo desproteínizado é biotransformá-lo em bioetanol, por via metabólica, utilizando a leveduras, dentre elas a *Kluyveromyces marxianus*. Esta levedura tem sido amplamente estudada em virtude da sua capacidade de consumir substratos lácteos, além de outros açúcares, de maneira direta no seu metabolismo, evitando assim a necessidade prévia da hidrólise desses componentes, além de apresentar taxa mais elevada de crescimento e termotolerância (FONSECA *et al.*, 2008, LANE & MORRISEY, 2010; LANE *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2015; NACHAIWIENG *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016).

Durante o desenvolvimento de um bioprocesso, a grande vantagem que se tem é o consumo dos nutrientes presentes no PSQD pelas leveduras e a formação de diversos produtos, como bioetanol, biomassa microbiana, ácidos orgânicos e galacto-oligosacarídeos, por processos únicos ou pelo uso de tecnologias integradas e sustentáveis, as chamadas biorrefinarias.

A utilização de modelos matemáticos para descrever e prever o comportamento de sistemas biológicos tem sido objeto de estudos contínuos, pois seu uso permite reduzir o número de experimentos necessários e ainda possibilitam atuar com maior previsão e controle do sistema (GHALY *et al.*, 2007; AGUSTRIYANTO & FATMAWATI, 2009).

A demanda crescente pela produção de biocombustíveis tem impulsionado o mercado de produção de bioetanol, o que, por consequente, faz com que modelos matemáticos fenomenológicos passem, cada vez mais, a serem empregados no intuito de eliminar possibilidades extremas de inibição, seja por substrato/nutrientes, produtos, metabólitos secundários, mortalidade de celular, toxicidade, entre outros, de forma a fornecer expressões matemáticas que descrevam quantitativamente o mecanismo do processo fermentativo, e prevejam essas limitações, sem comprometer a atividade celular da levedura, e afetar a produtividade do bioetanol (PARRONDO *et al.*, 2000; GABARDO *et al.*, 2015; ZLATEVA *et al.*, 2015). Além disso, os modelos matemáticos também são

empregados para prever condições que expressem as melhores taxas de crescimento celular, concentração de substrato e produção de produto (GHALY *et al.*, 2007; PHISAPHONG *et al.*, 2006; SANSONETTI *et al.*, 2011; GABARDO *et al.*, 2015).

Diante do exposto, esta pesquisa busca fortalecer um novo conceito que vem surgindo timidamente sobre biorrefinarias para a produção de bioetanol de segunda geração (BSG), e assim, eliminar conceitos antigos referentes à produção de BSG que envolvem apenas biomassas, como os exemplos já citados anteriormente. Com isso, é possível tornar o conceito atual mais amplo quanto sua dimensão, englobando qualquer tipo de subproduto agroindustrial, seja este, sólido ou líquido, desde que contenha nutrientes essenciais, como carbono e sais minerais, passíveis de serem convertidos em bioetanol e suprodutos secundários de valor agregado. Portanto, esta pesquisa visa produzir, com o permeado de soro de queijo desproteínizado e a levedura *K. marxianus*, bioetanol e produtos secundários de interesse industrial, conferindo assim, valor comercial ao processo e fornecendo uma alternativa para a indústria láctea, quanto à redução do impacto ambiental que pode causar o PSQD. Por fim, ao associar um processo envolvendo otimização e modelagem, promove-se segurança e rentabilidade, justificando assim, a sua exploração e implantação por indústrias que almejam produzir bioetanol a partir de permeado de soro de queijo desproteínizado.

1.2 Objetivos da pesquisa

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de desenvolvimento do bioprocesso otimizado e modelado de produção de bioetanol a partir de permeado de soro de queijo desproteínizado e *Kluyveromyces marxianus* englobando o conceito de biorrefinaria.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as bioconversões empregando a matéria-prima láctea permeado de soro de queijo desproteínizado (PSQD) e *K. marxianus* CCT 4086 a partir de planejamento experimental fatorial 2^3 ;
- Estudar a modelagem matemática do melhor resultado obtido pelo planejamento fatorial 2^3 como ferramenta para viabilizar a otimização do processo;
- Aplicar um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) para fins de otimização das variáveis pH e temperatura;
- Quantificar os subprodutos gerados conjuntamente durante o processo de produção de bioetanol para os dois planejamentos avaliados;
- Avaliar se as condições encontradas nesta pesquisa caracterizam um processo do tipo biorrefinaria.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, é apresentada a revisão bibliográfica dividida em cinco seções para melhor explicar a relevância da pesquisa. Na primeira seção (I), denominada de contextualização do tema, são expostas características e informações sobre a indústria láctea, leite, queijo, soro, permeado de soro de queijo desproteínizado e produção de bioetanol.

Na segunda seção (II), nomeada de fundamentação teórica, são abordados os assuntos que caracterizam diretamente o objetivo desta pesquisa, como cinética dos processos fermentativos, parâmetros de biotransformação, curva de crescimento microbiano, modelos cinéticos e a modelagem matemática, fermentação alcoólica; fatores que interferem na fermentação alcoólica, como temperatura, pH, matéria-prima (substrato), nutrientes, concentração de inóculo, inibidores e leveduras produtoras de bioetanol.

Enquanto na terceira seção (III), são abordadas as características, aplicações e ação prebiótica para a levedura *Kluyveromyces marxianus*.

Ademais, na seção (IV), são relatados os bioprodutos gerados durante um processo fermentativo envolvendo soro e permeado de soro de queijo desproteínizado, tendo destaque para o bioetanol, biomassa celular, ácidos orgânicos e galacto-oligosacarídeos.

Por fim, na quinta e última seção (V), intitulada por Estado da Arte, é apresentado o novo conceito a cerca deste cenário industrial, seguido da justificativa da pesquisa.

SEÇÃO I - CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

2.1 Segmento Leiteiro no Brasil

“O segmento leiteiro mundial apresenta números que impressionam: 133 milhões de propriedades mantêm 363 milhões de cabeças com aptidão leiteira, ocupando 20% das terras agrícolas do planeta. Mais de 600 milhões de pessoas vivem em propriedades leiteiras. Somente 0,3% das

propriedades têm mais de 100 vacas, o que demonstra a importância da atividade para a agricultura familiar e de subsistência. O leite é o 3º produto agropecuário em produção total e o 1º em valor monetário, fornecendo 5% da energia, 10% da proteína e 9% da gordura consumida em nível global (GLOBAL DAIRY PLATFORM (2017) apud SORIO, 2018).

Ainda, segundo SORIO (2018), a produção de leite no Brasil se iniciou no século XVI, porém não era uma atividade de valor econômico significativa, permanecendo em segundo plano às demais atividades econômicas brasileiras. Porém, em meados do século XX, a produção leiteira passou a merecer atenção crescente devido ao seu crescimento e produtividade, isso ocorreu mais especificadamente no ano de 2000, tendo alcançado um crescimento de 74 % entre os anos de 2000 a 2017.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no Brasil a produção de leite continua em ascensão, assim como, o valor comercial do leite e seus derivados. Advindo, no ano de 2018, as maiores altas no valor do creme de leite (24,82 %) e da manteiga (19,86 %) (IBGE, 2018).

2.2 Leite

O Leite, segundo Instrução Normativa Nº 51 de 18 de setembro de 2002 e Resolução nº 065/2005, é o produto natural, fresco e integral oriundo da ordenha completa e ininterrupta, segregado pelas glândulas mamárias de fêmeas sadias, descansadas e bem alimentadas, em condições higiênico-sanitárias (BRASIL, 2002; BRASIL, 2005), com cor, sabor, odor e consistência normais (BRASIL, 2005). A composição média do leite é descrita na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Composição média do leite

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

* peso por volume

Fonte: Adaptado de SILVA (1997); GAVA (2002); BRASIL (2005); MOHANTY *et al.* (2016).

O volume global de leite produzido no mundo incluindo todas as espécies

produtoras é crescente, podendo ser melhor observado na Figura 2.1, a qual mostra os dados das maiores regiões produtoras de leite no mundo nos anos de 2018 e 2019. É perceptível que as 4 maiores regiões produtoras, Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul, obtiveram incrementos na produção de um ano para o outro (FAO, 2020).

Dados recentes, divulgados pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) ou Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO 2020) no documento intitulado Revisão do mercado de laticínios (*Dairy Market Review*) em março deste ano, apontam que a produção global de leite em 2019 atingiu 852 milhões de toneladas, um aumento de 1,4 % em relação a 2018, e os países responsáveis por este incremento foram: Índia, Paquistão, Brasil, União Europeia e Federação Russa.

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2019) estima que aproximadamente 600 bilhões de litros de leite bovino são produzidos na atualidade no mundo. O Brasil encontra-se entre os países que possuem uma produção elevada, em 2019 atingiu a marca de 35,2 milhões de toneladas de litros de leite (FAO, 2020). As Figuras 2.2 e 2.3 apresentam as maiores regiões produtoras do Brasil, os três maiores estados produtores, Minas Gerais em primeiro lugar, seguido do Paraná e Rio Grande do Sul, e os maiores laticínios em relação ao número de produtores.

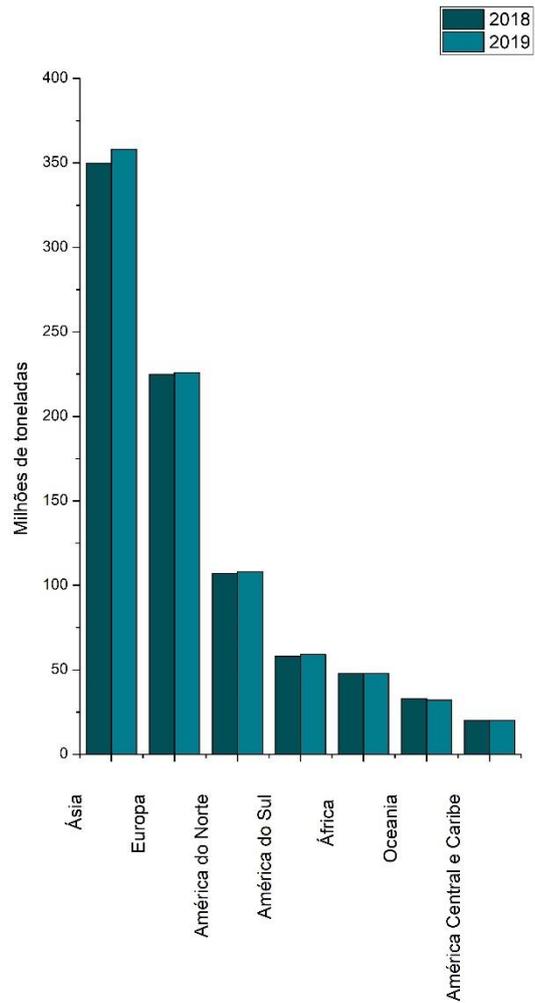


Figura 2.1 - Maiores regiões produtoras de Leite no mundo

Fonte: FAO (2020).

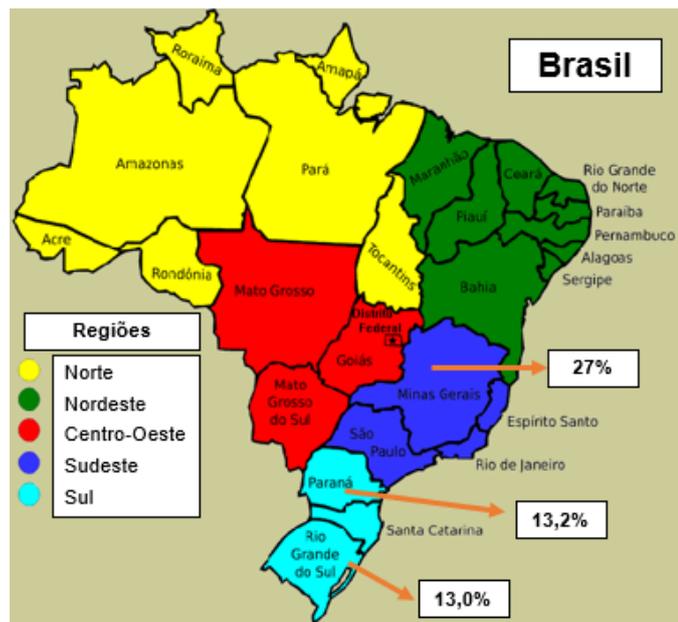
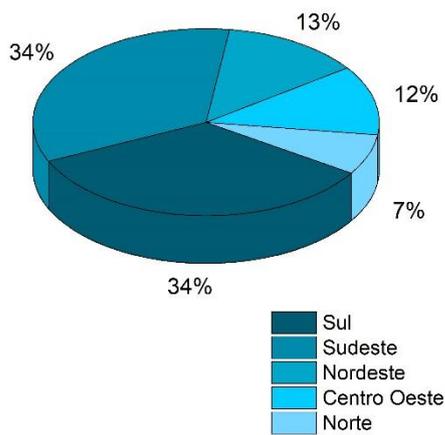


Figura 2.2 - Maiores regiões produtoras de Leite no Brasil

Fonte: USDA (2019).

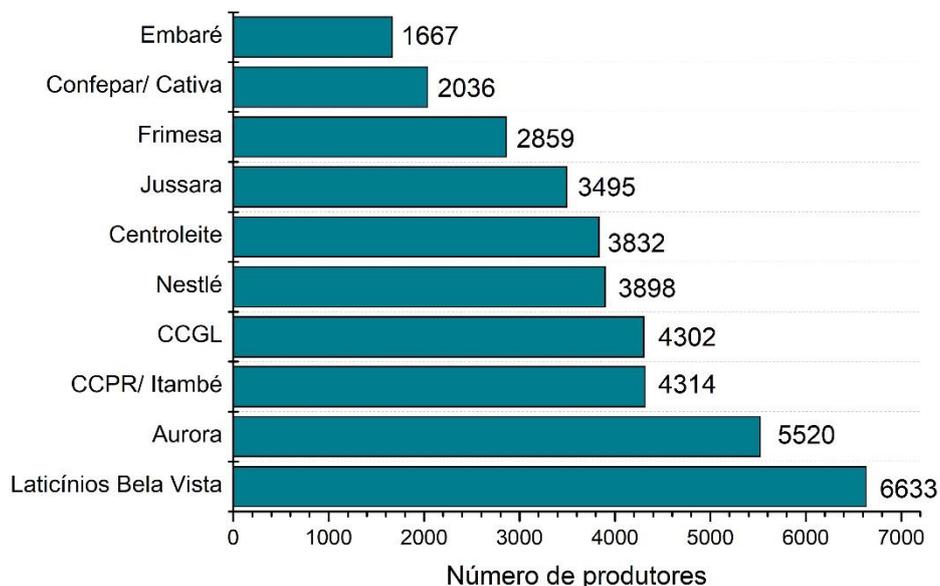


Figura 2.3 - Maiores Laticínios no Brasil em número de produtores

Fonte: USDA (2017).

Esta estatística apresenta as principais empresas de laticínios do Brasil em 2017, com base no número de produtores diretos. Nesse ano, a Laticínios Bela Vista liderou o ranking, operando através de uma rede de mais de 6,6 mil produtores de leite, seguida pela Aurora, com aproximadamente 5,5 mil.

O consumo de leite por humanos é de cerca de 5,2 bilhões de litros, para alimentação animal são utilizados cerca de 1,7 bilhões de litros (SORIO, 2018) e aproximadamente 32% do montante total de leite produzido, 7,4 bilhões de litros, são destinados à indústria de produção de queijos, a qual fabrica o equivalente a 770 mil toneladas de queijos por ano no Brasil (USDA, 2017). Outros 12,10%, ou seja 2,8 bilhões de litros de leite, são utilizados para a produção de caseína, iogurtes, leites desnatados, manteiga, doce de leite e leites fermentados (BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998; USDA, 2017).

2.3 Queijo

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2005), o queijo é caracterizado como produto fresco ou maturado, produzido pela

separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, integral, parcial, totalmente desnatado ou soro lácteo, após o processo de coalhar (MAPA, 2005).

O processo de fabricação de queijo pode ser realizado pela ação física, enzimática, bactérias específicas ou ácidos orgânicos. Além disso, a massa do queijo pode ser elaborada com ou sem a presença de especiarias, condimentos, substâncias aromatizantes e materiais corantes (MAPA, 2005). Ao final do processo, o queijo deve ter aproximadamente 48 % de gordura, de 23-25 % de proteína de alto valor proteico (PERRY, 2004), sais minerais, cálcio, fósforo, além de carboidratos e vitaminas (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001; PERRY, 2004).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) destaca que a produção de queijo no Brasil aumentou nos últimos anos em 10 %, tendo como último dado registrado pelo órgão, em 2018, o montante de 780 mil toneladas (USDA, 2019). A Figura 2.4 mostra os queijos mais produzidos no Brasil em 2017 e o seu equivalente em porcentagem.

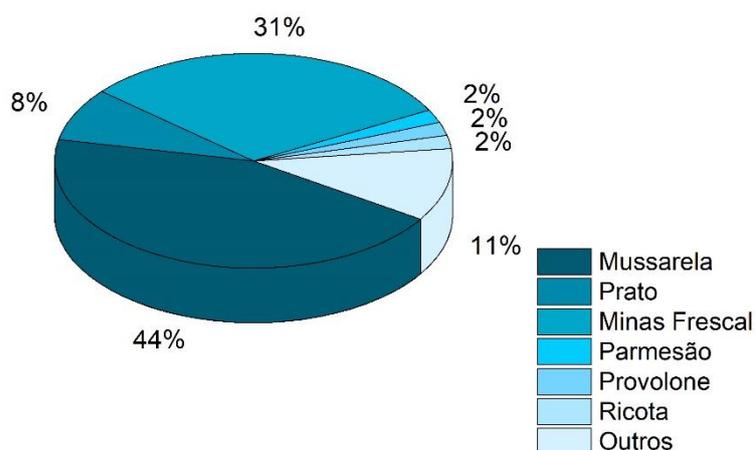


Figura 2.4 - Os seis tipos de queijos mais produzidos no Brasil
Fonte: Euromonitor International, 2017 apud USDA (2019).

Devido à alta produção de queijos, por consequente, este processo pode gerar grandes proporções de resíduo (TEIXEIRA & FONSECA, 2008; YORGUN *et al.*, 2008). No caso do soro, ele representa cerca de 85-90 % do volume de leite utilizado inicialmente, restando ao final, 55 % dos nutrientes do leite (GUIMARÃES *et al.*, 2010; HADIYANTO *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2015).

Considerando que cada quilo de queijo produzido gera cerca de 9 litros de soro, estima-se que 10,3 bilhões de litros de soro tenham sido gerados em 2017 no mundo, com uma taxa de crescimento estimada em 1 a 2 % ao ano (ABIQ, 2018).

Deste montante, apenas 145 milhões de toneladas, equivalente em média a 50-60 %, são utilizados industrialmente, enquanto o restante é destinado à alimentação animal, pequena parte utilizada como fertilizante ou então descartado, como resíduo (GANJU & GOGATE, 2017).

2.4 Soro de queijo

O soro de queijo também é conhecido por soro de leite, soro lácteo, soro doce, soro ácido, lactossoro ou simplesmente soro (BARBOSA *et al.*, 2010; PRAZERES *et al.*, 2012; ZACARCHENCO *et al.*, 2012). Ele equivale de 80 a 90 % do volume total de leite que inicialmente é utilizado no processo e retém, em média, 55 % dos nutrientes do leite após produção do queijo, caseína e iogurte (Tetra PaK, 2020).

O soro lácteo apresenta características que podem variar de acordo com o tipo de animal, reprodução, tipo de leite, bem como alimentação, saúde e higiene durante o processo de ordenha, de modo geral é constituído por lactose (4,5 % a 5 % p/v), proteínas solúveis (0,6-0,8 % p/v), lipídios (0,4-0,5 % p/v), vitaminas (complexo B e outros), sais minerais (8-10 % extrato seco), ácido láctico (0,05 % p/v), ácido cítrico, compostos nitrogenados não proteicos (ureia e ácido úrico), compostos bioativos como β -Lactoglobulina, α -Lactoglobulina, imunoglobulinas, albumina sérica e lactoferrina (GHALY & BEMSSAN, 1995; SISO, 1996; TALABARDON *et al.*, 2000; GIROTO & PAWLOWSKY, 2001; GAVA, 2002; COTÉ *et al.*, 2004; CASAL *et al.*, 2006; SERPA *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2010; PRAZERES *et al.*, 2012; HADIYANTO *et al.*, 2014; GABARDO *et al.*, 2015).

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) do soro de queijo, encontra-se na faixa de 60 a 80 g L⁻¹, e, 50 a 102 g L⁻¹, respectivamente, cem vezes mais poluente que o esgoto doméstico (GAVA, 2002; SERPA *et al.*, 2009; PRAZERES *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015; HUGO *et al.*, 2016), tornando-o altamente poluidor, devido a composição química do soro de queijo ser rica em nutrientes, quando descartado de forma inadequada e/ou sem tratamento na natureza causa danos drásticos ao meio ambiente. Uma vez que, possui rápida degradabilidade devido à grande presença de lactose e proteínas, constituintes, facilmente utilizados como substrato pelas mais variadas espécies de microrganismos (TALABARDON *et al.*, 2000; BARBOSA

et al., 2010; PRAZERES *et al.*, 2012; ZACARCHENCO *et al.*, 2012; HADIYANTO *et al.*, 2014; GABARDO *et al.*, 2015; MOHANTY *et al.*, 2016).

Nessa perspectiva, TUNICK (2008) estimou que 4000 L de soro poderiam causar um dano ambiental equivalente ao causado por resíduos fecais produzidos por 1900 seres humanos. O despejo do soro cria preocupações severas de poluição para o meio ambiente, pois afeta características físico-químicas do local de eliminação do resíduo. Se o despejo ocorrer em corpos de água, a maior consequência é a redução do oxigênio dissolvido, dificultando deste modo a biodegradação, o que representa um risco para a vida aquática, para o meio ambiente e também para a saúde humana.

Assim, mesmo que a maioria das indústrias lácteas, principalmente as de pequeno e médio porte, considere o soro apenas como um resíduo, devido a sua composição nutricional, comprovou-se que o soro possui potencial de aplicação no desenvolvimento de novos produtos com elevado valor agregado (PRAZERES *et al.*, 2012; ZACARCHENCO *et al.*, 2012; BACH *et al.*, 2014; HADIYANTO *et al.*, 2014; GABARDO *et al.*, 2015).

O alto valor nutricional do soro de queijo e os avanços recentes da indústria de alimentos, além de aspectos legislativos quanto ao meio ambiente, fizeram com que ocorresse a valorização de aproximadamente 50-60 % do soro residual para a geração de produtos de valor agregado para as indústrias alimentícia e química (VASALA *et al.*, 2005; PRAZERES *et al.*, 2012).

O principal uso que tradicionalmente emprega o soro de leite de forma rentável é, a proteína do soro de leite como promotor de saúde, tanto em nutrição humana quanto animal. Cerca de 1,5 milhões de toneladas de constituintes proteicos de alto valor biológico são produzidos a partir de soro de queijo, os quais impulsionam um mercado crescente de produção de concentrados proteicos, isolados proteicos, hidrolisados proteicos, entre outros produtos (KHEZRI *et al.*, 2016). Esta exploração em termos da proteína do soro, deve-se as tecnologias avançadas de ultrafiltração e nanofiltração que aprimoraram a exploração de fluxos de soro de leite (CARVALHO *et al.*, 2013; MARX *et al.*, 2018). Além disso, várias tecnologias de processo e abordagens biotecnológicas também foram desenvolvidas para converter o soro em um recurso de componentes valiosos em uma ampla gama de bebidas comercializáveis como o mercado das bebidas lácteas (KRÓLCZYK *et al.*, 2016),

A lactose, carboidrato presente no soro de queijo, corresponde a cerca de 8,6 milhões de toneladas do total de soro gerado, tem grande aplicação mas é mais restrita que a proteína do soro, devido à grande quantidade de pessoas intolerantes a lactose. Diante deste potencial de aplicações, pode-se citar produção de biocombustíveis, polímeros biodegradáveis e bioetanol (YADAV *et al.*, 2015), concentrados proteicos via processos fermentativos, metabólitos para indústrias de alimentos e produtos farmacêuticos, como o ácido lático e polissacarídeos, além de preparação de novos alimentos e bebidas (PESCUMA *et al.*, 2015). O soro, quando em pó, é utilizado para intensificar a cor de produtos cárneos embutidos, durante o cozimento (DAGUER *et al.*, 2010), e atua como anti-aglutinante em misturas secas (ZAVAREZE *et al.*, 2010). Todas essas aplicações acabam reduzindo os efeitos ambientais causados pelo descarte indevido do soro (SERPA *et al.*, 2009; YADAV *et al.*, 2014; PESCUMA *et al.*, 2015; YADAV *et al.*, 2015).

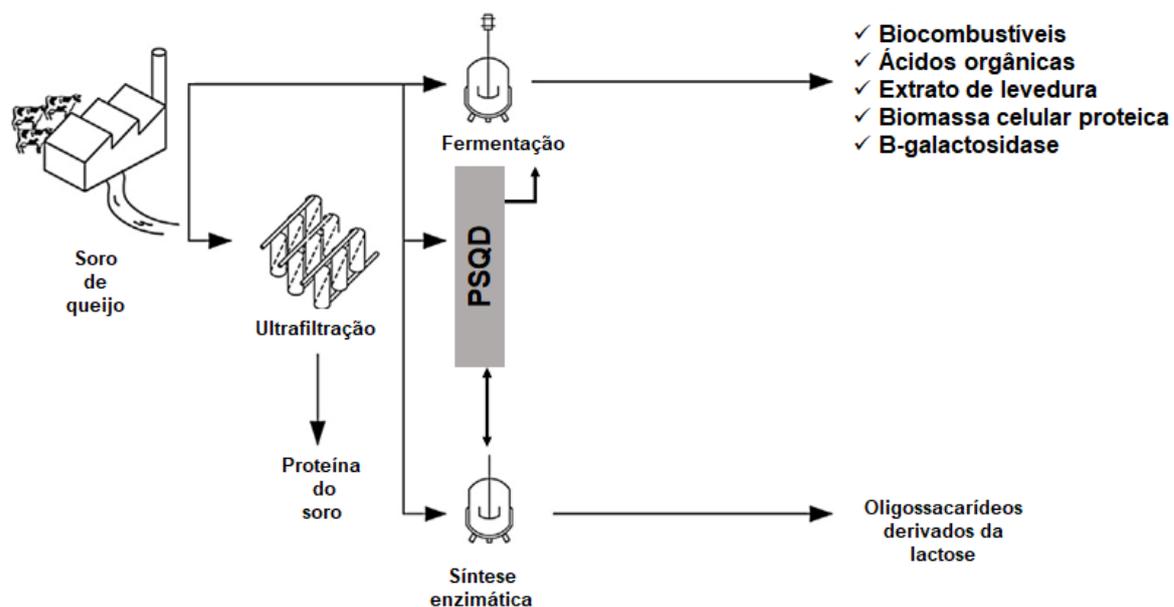
De acordo com aplicações já implantadas em escala industrial, a alternativa mais rentável de uso e transformação do soro é a obtenção de concentrados, isolados e hidrolisados proteicos, e queijo ultrafiltrado. Neste processo de concentração, durante a passagem do soro por um sistema de filtração de membrana do tipo ultrafiltração, a proteína fica retida na membrana, obtendo-se um retentado composto por proteínas, gordura e minerais coloidais, e um líquido que permeia (passa) pela membrana, originando o permeado de soro de queijo desproteínizado (LAGRANGE & DALLAS, 1997; ANDRADE & MARTINS, 2002; ZACARCHENCO *et al.*, 2012).

Segundo a empresa Sooro Renner Nutrição S.A., a quantidade de soro utilizada para obter os concentrados proteicos varia de acordo com o tipo de concentrado requerido, conhecido comercialmente por concentrado proteico de soro (*whey protein concentrate* - WPC). Para a obtenção de concentrado proteico WPC 80 % de proteínas em sua composição, libera-se, para cada 1 kg produzido, em torno de 8 kg de permeado, enquanto para a produção do WPC 35 % são necessários 26 kg de soro leite, os quais resultam em 2,3 kg de permeado e 1 kg de WPC (RUSSO, 2016; SOORO, 2020). A partir desta relação, tem-se uma produção anual de permeado líquido de aproximadamente 170 milhões de litros. Ademais, devido à composição do soro e permeado de soro de queijo desproteínizado, estes se descartados incorretamente na natureza provocam

impactos indesejáveis. Para tanto, se apenas considerado como um efluente líquido industrial, eles demandam elevados custos para o tratamento (SOORO, 2020).

2.5 Permeado de soro de queijo desproteínizado

O permeado de soro de queijo desproteínizado (PSQD), também conhecido por permeado de soro de leite desproteínizado, soro de leite desproteínizado de queijo, soro ácido desproteínizado, soro doce desproteínizado, ou ainda soro lácteo desproteínizado, é constituído por nutrientes como lactose, minerais e proteína (MOULIN & GALZI, 1984; ZACARCHENCO *et al.*, 2012; HU & DICKSON, 2015; WOYENGO *et al.*, 2015; SOORO, 2020), além de macro e micronutrientes, como vitaminas (HU & DICKSON, 2015; HUGO *et al.*, 2016). O Fluxograma 2.1 esboça as etapas até aqui descritas para a produção do permeado de soro de queijo ou leite desproteínizado. A Tabela 2.2 apresenta a composição média do permeado de soro de queijo desproteínizado.



Fluxograma 2.1 - Esquema representativo de produção do permeado de soro de queijo desproteínizado

Fonte: Adaptado de ILLANES (2016).

PSQD: permeado de soro de queijo desproteínizado.

Segundo a empresa SOORO (SOORO, 2020) e RUSSO (2016), o permeado possui diversas aplicações, tais como, suplemento alimentar, ração animal, confeitaria, panificação, lácteos, salgadinhos, entre outras aplicabilidades.

Contudo, o seu valor comercial é baixo, sendo comercializado a R\$ 2,20 o quilograma de permeado em pó (SOORO, 2020). Diante disso, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de agregar valor comercial ao permeado de soro de queijo desproteínizado (ZACARCHENCO *et al.*, 2012).

Tabela 2.2 - Composição média do permeado de soro de queijo desproteínizado de queijo

| Componente | (mg 100 g⁻¹) | % (p/p) |
|---|--------------------------------|----------------|
| Lactose | | 70 – 90 |
| Sais Minerais | | 4 – 20 |
| Proteínas | | 0,5 – 5 |
| Gorduras | | <0,1 – 2 |
| Cálcio | 500 | |
| Sódio | 434 | |
| Fósforo | 470 | |
| Manganês | 90 | |
| Potássio | 40 | |
| Zinco | 30 – 33 | |
| Ferro | 3 – 11 | |
| Cobre | 1 – 3 | |
| Vitamina A | 80 | |
| Riboflavina (B2) | 15 – 20 | |
| Piridoxina (B6) | 5 – 10 | |
| Tiamina (B1) | 5 – 6 | |
| Cobalamina (B ₁₂) | 0,02 – 0,05 | |
| Vitamina C | 20 – 40 | |
| Pantotenato de cálcio (B ₅) | 50 – 60 | |
| Biotina (B ₈) | 0,1 – 0,3 | |

Fonte: Adaptado de MOULIN & GALZI (1984); TALABARDON *et al.* (2000); PRAZERES *et al.* (2012); ZACARCHENCO *et al.* (2012); HU & DICKSON, (2015); WOYENGO *et al.* (2015); GABARDO *et al.* (2016); SOORO (2020).

Dentre os processos a que o permeado pode ser submetido, destacam-se os processos fermentativos, uma vez que esta mistura heterogênea, constituída de lactose, residual de proteínas e lipídeos, vitaminas e sais minerais, é uma fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismos (SISO, 1996; BABU *et al.*, 2014; BACH *et al.*, 2014; MAESTRE, 2017).

Por consequente, como visto no soro de leite (SL), o permeado de soro de queijo desproteínizado (PSQD) é composto por, praticamente, todos os nutrientes pré-existentes no soro de leite, e portanto, possui valores de DBO e DQO elevados, cerca de 55.000 e 72.400 mg L⁻¹, respectivamente (EL-TANBOLY *et al.*, 2017).

Assim, torna-se cada vez mais necessário que alternativas viáveis sejam encontradas para o aproveitamento integral destes resíduos lácteos, e que passem a ser 100 % utilizados na produção de novos produtos de valor agregado, uma vez que, sua produção não é sazonal. A seguir são descritas algumas possíveis aplicações com estas matérias-primas.

2.6 Aplicações das matérias-primas lácteas em processos biotecnológicos

De acordo com estudos, estima-se que aproximadamente 50-60 % do total de soro e permeado de soro de queijo desproteínizado são aplicados na produção de novos produtos, incluindo os bioprocessos (COTÉ *et al.*, 2004; PRAZERES *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2015). Dentre os quais, destacam-se a fermentação para a obtenção de bioetanol (DOMINGUES *et al.*, 1999; KOURKOUTAS *et al.*, 2002; COTÉ *et al.*, 2004; ZAFAR & OWAIS, 2006; OZMIHCI & KARGI, 2007^a; OZMIHCI & KARGI, 2007^b; DRAGONE *et al.*, 2009; SANSONETTI *et al.*, 2009; BACH *et al.*, 2014; GABARDO *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015; GABARDO *et al.*, 2016; MAESTRE, 2017), biopolímeros, hidrogênio, metano, proteína unicelular e probióticos (YADAV *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2015, TRIGUEROS *et al.*, 2016) e produção de simbiótico (PASSOS, 2018).

SACHDEVA *et al.* (2014) estudaram, como terapia complementar no tratamento de doenças associadas a gastrites crônicas, o emprego de leites fermentados enriquecidos com proteínas do soro de leite e *Helicobacter pylori* (microrganismos já utilizados em tratamentos gástricos). Os autores concluíram que a lactoférrica bovina apresenta efeito benéfico na erradicação da *Helicobacter pylori* em organismo humano, entretanto, afirmam que novos estudos práticos do processo fermentativo devem ser realizados para ampliar a aplicabilidade.

O soro de leite também é aplicado em estudos que visam a redução de custos de produção dos polihidroxialcanoatos (PHAs), polímeros considerados 100 % biodegradáveis, os quais vêm sendo analisados como uma alternativa para substituir plásticos advindos da indústria petroquímica (MARANGONI *et al.*, 2002; ZORTÉA *et al.*, 2013).

ZORTÉA *et al.* (2013) averiguaram a produção de PHAs com a bactéria *Cupriavidus necator* em diversas fontes renováveis de substrato, tais como, soro de queijo, óleo de soja e bagaço de mandioca. Concluíram, que todas as fontes

estudadas podem ser empregadas como fontes de carbono (substrato) para o crescimento de *C. necator*, uma vez que, as distintas matérias-primas não apresentaram resultados significativamente diferentes no crescimento microbiano.

HASSEMER *et al.* (2015) objetivaram a obtenção de polihidroxibutirato (PHB) em substrato de permeado de soro de queijo desproteínizado cultivando a bactéria *Bacillus megaterium*. Em 20 h de processo, com condições de cultivo a 30 °C, 180 rpm, com 23 g L⁻¹ de permeado como fonte de carbono, produziram 80 g L⁻¹ de concentração celular.

BARBOSA *et al.* (2010) verificaram a elaboração de aguardente em soro de queijo de coalho acrescido de 100 g L⁻¹ de sacarose como substrato e empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O processo fermentativo foi conduzido em pH 4,6, a 30 °C e em 24 h de cultivo, foram obtidos 7,33 °GL de etanol. Os autores concluíram com o estudo que a levedura *S. cerevisiae* mostrou-se adequada para a produção de aguardente em subproduto lácteo.

Em estudo de BACH *et al.* (2014), foram constatados que, além da produção de bioetanol a partir do soro, foi possível reduzir a carga orgânica deste resíduo lácteo, obtendo-se redução de 73,8 % de DBO e 75 % de DQO, em 59 h.

Nesse sentido, verifica-se o potencial de aplicação tanto do soro quanto do permeado de soro de queijo desproteínizado como matérias-primas lácteas (resíduos, subprodutos ou coprodutos da indústria láctea) propícias para o emprego em processos biotecnológicos, devido a sua composição nutricional (COTÉ *et al.*, 2004; PRAZERES *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2015).

Portanto, as indústrias geradoras do resíduo permeado de soro de queijo podem ter acesso às alternativas viáveis de transformação e aplicação destes resíduos, de forma a reduzir os efeitos ambientais provocados por eles, e/ou, custos necessários para o seu tratamento, se forem considerados apenas efluentes (MAESTRE, 2017; MAESTRE, 2018).

Um segmento de processo fermentativo que vem se destacando é o de produção de bioetanol. Este setor vem ganhando crescente importância dentro da plataforma de energia, devido à busca mundial por biocombustíveis de origem não fóssil. Cerca de 95 % do bioetanol atualmente produzido é oriundo de produtos agrícolas, açúcares simples (principalmente sacarose de cana ou beterraba) ou polissacarídeos complexos (principalmente amido do milho). No primeiro caso, a sacarose é fermentada diretamente por levedura para produzir bioetanol e dióxido

de carbono; no segundo, o amido precisa ser hidrolisado, química ou enzimaticamente, para fornecer açúcares fermentáveis (principalmente glicose e maltose) como substratos para fermentação de leveduras. A sacarose da cana-de-açúcar e a beterraba representam cerca de 40 % do total de bioetanol produzido (ILLAMES, 2016).

Atualmente, a produção de bioetanol no mundo está concentrada basicamente em 4 países principais, Estados Unidos (56 %), Brasil (28 %), União Europeia 5 % e China 4 %, sendo que os demais países totalizam 7 % juntos (RFA (2019). A Figura 2.5 mostra a produção mundial de bioetanol.

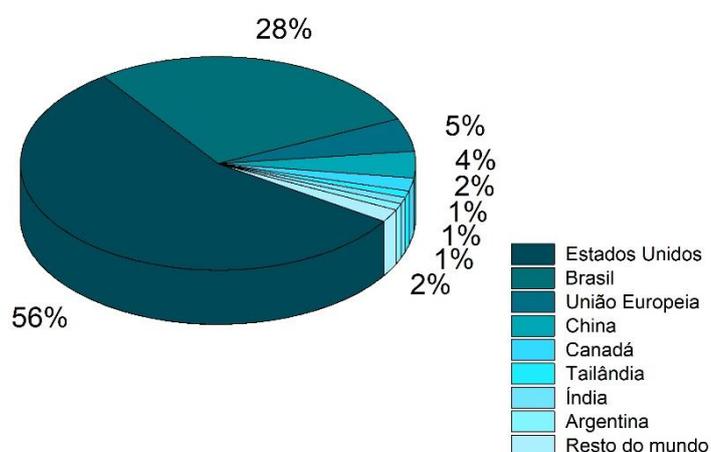


Figura 2.5 - Produção global de bioetanol por país

Fonte: Adaptada de RFA (2019).

**Estados Unidos: 16100, Brasil: 7950, União Europeia: 1430, China: 11800, Canada: 480, Tailândia: 390, Índia: 330, Argentina: 290 e Resto do mundo: 550 milhões de galões.

Em termos de números (Figura 2.5), os Estados Unidos produzem anualmente 600 bilhões de litros de bioetanol, seguidos pelo Brasil com 32,6 bilhões de litros, União Europeia 5,4 bilhões de litros e China com 3,4 bilhões de litros, dos quais 40 % provém de plantações de cana-de-açúcar e 60 % de culturas amido (PRATA *et al.*, 2010). Esse chamado bioetanol de primeira geração vem principalmente de materiais comestíveis produzidos a partir de terras aráveis, de modo que 50 % ou mais do custo de produção é representado pela matéria-prima (CARDONA *et al.*, 2010).

Nesse cenário, o bioetanol produzido a partir de resíduos que contenham lactose desempenham um papel secundário muito interessante, de acordo com uma estimativa realizada pelos autores GUIMARÃES *et al.* (2010), os quais concluíram que o potencial mundial de produção de bioetanol a partir de soro excedente atinge 2,3 milhões metros cúbicos, o que representa aproximadamente

3,5 % da produção mundial de etanol (ILLANES, 2016). Embora este valor pareça pequeno diante de outras matéria-primas primárias, já revela um grande potencial, conforme se observa na Figura 2.5, onde outros países não chegam a produzir isto. Principalmente se analisarmos o cenário mundial, pois muitos países não chegam a produzir este valor de 3,5 %, imagina produzir bioetanol fazendo uma conexão com a gestão de resíduos de soro de leite.

Considerado, há muito tempo, como uma fonte de carbono e energia para produção de bioetanol a partir de leveduras, o processo utilizando permeado de soro de queijo desproteínizado dificilmente será competitivo, pelo menos para a produção de biocombustíveis (ZADOW, 1984). Aplicar subprodutos lácteos na produção de bioetanol é “pensar” em processos sustentáveis, *eco-friendly*, em gestão de resíduos, economia de energia, geração de empregos e em um futuro melhor.

SEÇÃO II – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.7 Processos fermentativos

De acordo com AMORIM & LEÃO (2005), o termo fermentação vem do verbo fermentar, que é derivado da palavra “*fervere*” que significa ferver ou efervescer”. Nesse sentido, o processo de fermentação pode ser desenvolvido com substratos oriundos de matérias-primas orgânicas complexas, convertidas em compostos mais simples (BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998; AMORIM & LEÃO, 2005), os quais, dependendo do tipo de microrganismo (leveduras, bactérias e fungos) e das condições de processo, possibilitam a geração de inúmeros produtos, sejam estes metabólitos ou elevação de massa celular (GAVA, 2002; SPINOSA, 2002).

2.8 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica surgiu com os povos primitivos há milhares de anos e evoluiu com a ciência que está em contínuo desenvolvimento por meio das pesquisas. A fermentação consiste em um processo no qual açúcares solúveis são

transformados em etanol como produto principal (SHREVE, 1997; LIMA *et al.*, 2001; GAVA, 2002). Por definição, a fermentação alcoólica trata-se de um processo anaeróbio para produção de energia, com degradação de carboidratos, formação de etanol e dióxido de carbono (BORZANI *et al.*, 2001).

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

Salienta-se que durante a fermentação, além do etanol e dióxido de carbono, também são gerados produtos secundários, tais como glicerol, ácido succínico, outros álcoois superiores, e também ácidos orgânicos (EVANGELISTA, 2000; BORZANI *et al.*, 2001; SACHS, 2001; SPINOSA, 2002).

2.8.1 Fatores que interferem na fermentação alcoólica

Para a produção de bioetanol, distintos fatores físicos (temperatura e pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais, orgânicos e inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura e contaminação bacteriana) podem afetar o rendimento do processo, ou seja, comprometer a eficiência e o desenvolvimento da fermentação alcoólica (LIMA *et al.*, 2001). Nesse sentido, os principais fatores que necessitam de controle são temperatura, pH, matéria-prima (substrato), nutrientes, concentração de inóculo e inibidores (CARVALHO & SATO, 2001; PALMA *et al.*, 2001; SPINOSA, 2002; BACH, 2012; LIU, 2020).

2.8.1.1 Temperatura

Quanto ao fator temperatura, salienta-se que o seu controle é imprescindível para o processo de produção de etanol, pois em baixas temperaturas, há escassez de produção, enquanto temperaturas elevadas propiciam a perda por evaporação, ou ainda, o enfraquecimento da levedura. Ademais, a temperatura afeta as

fermentações paralelas, às quais originam compostos secundários (HASHIZUME, 2001; GAVA, 2002; BACH, 2012; LIU, 2020).

Segundo LIMA *et al.* (2001), conforme a temperatura aumenta, consequentemente eleva-se a velocidade da fermentação. Neste caso, se a ação não é desejável ao processo, pode haver contaminação microbiológica, paralelo a isso, a levedura pode apresentar-se sensível à toxicidade do etanol. Assim sendo, destaca-se a importância do controle de temperatura em processos industriais, sendo usualmente empregadas, então, temperaturas intermediárias de 30 a 33 °C.

De modo geral, outras pesquisas trazem uma faixa de temperatura um pouco maior, entre 26 a 35 °C, para se obter alto rendimento de etanol (EVANGELISTA, 2000; LIMA *et al.*, 2001; GAVA, 2002).

2.8.1.2 pH

Outra variável importante é o pH que, segundo GAVA (2002), para fermentações alcoólicas deve estar em torno de 4,5. Industrialmente, de acordo com LIMA *et al.* (2001), o pH geralmente encontra-se na faixa de 4,5 a 5,5, devido à capacidade tamponante.

HASHIZUME (2001) salienta que fermentações alcoólicas conduzidas em meios ácidos favorecem a produção de etanol. Contudo, para LIMA *et al.* (2001), pHs muito baixos provocam a perda de nutrientes como nitrogênio e potássio, podendo aumentar a sensibilidade ao etanol e aos ácidos orgânicos.

2.8.1.3 Matéria-prima

A matéria-prima que contenha algum açúcar ou glicose é empregada como substrato fermentativo, conhecido como fonte de carbono, sendo responsável pelo fornecimento do esqueleto carbônico ao meio de cultivo. As fermentações são denominadas como simples ou complexas, dependendo do tipo de substrato utilizado, tais como as matérias-primas açucaradas e amiláceas (LIMA *et al.*, 2001; GAVA, 2002).

As matérias-primas açucaradas podem ser fermentescíveis e não fermentescíveis. As fermentescíveis são as que contêm monossacarídeos, se limitando aos sucos oriundos de frutas. Já as não fermentescíveis, são as

constituídas por açúcares dissacarídeos, as quais dependendo do microrganismo utilizado é necessária a realização do processo hidrolítico (LIMA *et al.*, 2001). Enquanto as amiláceas e feculentas fermentam obrigatoriamente após o processo de hidrólise, etapa denominada por sacarificação, pois o amido in fermentescível é transformado em açúcar fermentescível (LIMA *et al.*, 2001).

Diante do exposto, são exemplos de substratos açucarados a cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino, melaços (residual), mel de abelhas e frutas. Como matérias-primas amiláceas e feculentas, tem-se as raízes e tubérculos feculentos, e, as matérias-primas celulósicas, tais como palhas, madeiras, resíduos agrícolas e sulfíticos de fábricas de papel (LIMA *et al.*, 2001; GAVA, 2002). Entre outras diversas fontes de carbonos residuais da indústria de alimentos, tem-se o soro e permeado de queijo ou leite (BACH *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2015; GABARDO *et al.*, 2016, TRIGUEROS *et al.*, 2016; MAESTRE, 2017).

2.8.1.4 Nutrientes

O mosto fermentativo deve conter compostos nutritivos, sendo auxiliares no desenvolvimento dos microrganismos, pois são responsáveis pelo fornecimento de energia química, como estruturas celulares do carbono (LIMA *et al.*, 2001; LIU, 2020).

Dependendo do microrganismo e dos produtos de interesse, avalia-se a necessidade em realizar ou não a suplementação do meio reacional com macroelementos (hidrogênio, oxigênio e nitrogênio), com micronutrientes (fósforo, enxofre e selênio), oligoelementos ou elementos traços (metais) (vanádio, molibdênio, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre, zinco e cofatores) ou vitaminas (biotina e riboflavina) e aminoácidos (MAESTRE, 2018; MAESTRE, 2019; LIU, 2020).

Por fim, o processo de produção pode ainda necessitar de aeração ou não do meio, podendo esta aeração ser por injeção direta de oxigênio, ar comprimido ou por agitação mecânica (MAESTRE, 2018). Nota-se que o excesso de oxigênio irá favorecer a via metabólica para o crescimento celular (biomassa microbiana) como produto principal em detrimento à produção de etanol (HASHIZUME, 2001; LIMA *et al.*, 2001; GAVA, 2002; TRIGUEROS *et al.*, 2016; MAESTRE, 2018).

2.8.1.5 Concentração de inóculo

Segundo Maestre (2018), para uma condução adequada do processo etanólico, a concentração de inóculo deve ser correspondente com a concentração e tipo do substrato. Para tanto, quando necessário, desenvolver o processo de hidrólise enzimática para os dissacarídeos ou oligossacarídeos, a fim de disponibilizar os açúcares ao meio de cultivo do inóculo, promovendo o crescimento microbiano, de modo a não haver a inibição devido ao excesso ou falta de substrato.

2.8.1.6 Inibidores

O processo fermentativo pode ser inibido por fatores distintos, como a formação dos produtos, excesso de substrato, nutrientes adicionados, temperatura, pH, reações paralelas do meio de cultivo e atividade enzimática (LIMA *et al.*, 2001; BELLAVER *et al.*, 2004; PHISALAPHONG *et al.*, 2006; LIU, 2020).

2.9 Curva de crescimento microbiano

A Figura 2.6 mostra o perfil do crescimento microbiano dividido em suas várias fases, desde a fase *lag*, passando pela fase *log*, estacionária e de declínio. A fase *lag* corresponde ao período de adaptação das células microbianas ao meio ao qual foram inseridas, não ocorrendo reprodução celular ($X = X_0 = \text{constante}$). A duração dessa fase é variável, e dependente de vários fatores como a concentração do inóculo (valor de X_0), idade do microrganismo (tempo de pré-cultivo) e estado fisiológico da célula.

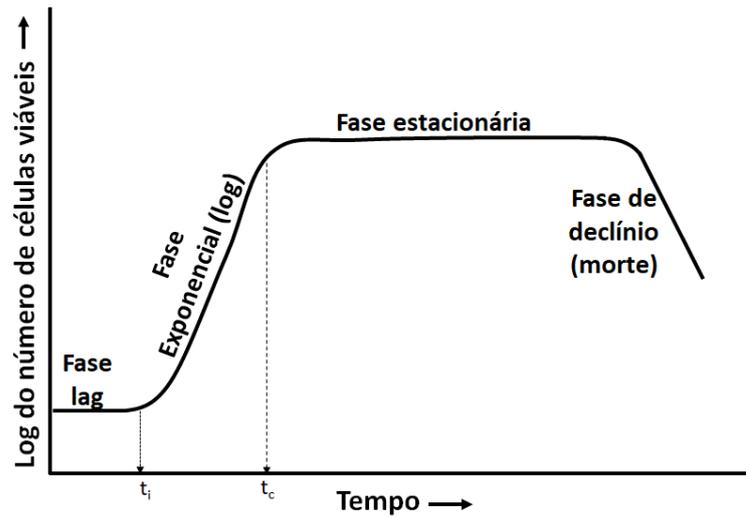


Figura 2.6- Curva típica de um crescimento microbiano
 Fonte: Adapado de FIORESE *et al.* (2018).

A fase *log*, também conhecida por crescimento exponencial, é a etapa ativa do crescimento microbiano após a transição, onde é possível verificar a reprodução microbiana efetivamente no decorrer do tempo de geração (t_g). Nesta fase a velocidade de crescimento, identifica-se com a velocidade específica máxima e, portanto, a constante de crescimento é dita como velocidade específica (μ_x) de reprodução do microrganismo = velocidade específica máxima (μ_m) (FOGLER, 1999; PARRONDO *et al.*, 2000).

Neste ponto, identifica-se a velocidade de crescimento conforme Equação (2.1), compreendida entre t_i (tempo inicial) e t_c (tempo crítico) de acordo com a Equação (2.2). Para HISS (2001), como tempo de geração esta como correlacionado com a Equação (2.2), e com μ_m , obtêm-se a equação simplificada Equação (2.3).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \quad \text{Eq. (2.1)}$$

$$X = X_0 \exp [\mu_m(t - t_0)] \quad \text{Eq. (2.2)}$$

$$\mu_m = \frac{0,693}{t_g} \quad \text{Eq. (2.3)}$$

Em que X a concentração celular (g L^{-1}), t o tempo (h^{-1}), μ_m velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}), X_0 concentração celular inicial (g L^{-1}), t_0 tempo inicial (h^{-1}) e t_g tempo de geração (h^{-1}).

O crescimento microbiano entra em fase estacionária quando X atinge o seu máximo e permanece constante, obtendo um equilíbrio relativo entre as taxas de reprodução e de morte celular, as quais se igualam e permanecem constantes, provocando modificações na estrutura bioquímica do meio de cultivo (BONONI & SCHMIDELL, 2001; HISS, 2013). Essa interrupção pode ser ocasionada por esgotamento de nutrientes, quantidade de oxigênio reduzida, devido ao excesso de microrganismos, acúmulo de resíduos tóxicos à célula (metabólitos primários), alterações no pH que podem ser danosas a célula (WILLEY *et al.*, 2009)

Por fim, o processo chega à etapa de declínio do metabolismo, conhecida por fase de desaceleração ou fase de morte, onde o valor da concentração celular de células viáveis diminui a uma velocidade que excede a velocidade de produção de células novas, observando-se a diminuição da curva de crescimento celular (HISS, 2001). Esta fase também é conhecida como fase de respiração endógena, pois em condições de carência de substrato uma proporção considerável de células sobrevive utilizando suas reservas internas para manutenção e sobrevivência. Quando estas reservas internas esgotam-se, as células começam a se auto-oxidar (autólise) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

2.10 Comportamento cinético dos processos fermentativos

O estudo cinético em processos fermentativos consiste primeiramente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo de fermentação (BONONI & SCHMIDELL, 2001; HISS, 2013).

Dessa forma, a cinética de biotransformação está relacionada com o crescimento celular (biomassa microbiana) e os produtos do metabolismo, sendo estes dependentes dos substratos e nutrientes empregados, e das condições processuais de cultivo que compõem o meio (BONONI & SCHMIDELL, 2001; HISS, 2013).

Nessa perspectiva, a cinética química estuda as velocidades e os mecanismos das reações químicas (SOUZA & FARIAS, 2008). Isso possibilita a

comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo, como a temperatura, pH e outros, por meio das velocidades de transformação e os fatores de conversão, os quais são obtidas a partir das curvas de ajuste (HISS, 2013).

Assim, realiza-se uma análise dos valores experimentais quanto à concentração de biomassa (X), de produto (P) e de substrato (S), que ao serem representados em função do tempo pelas curvas de ajuste, são indicadas por ΔX , ΔP e ΔS como sendo a variação dentro de um intervalo de tempo ($t_f - t_i$), de acordo com a Figura 2.7 (HISS, 2013).

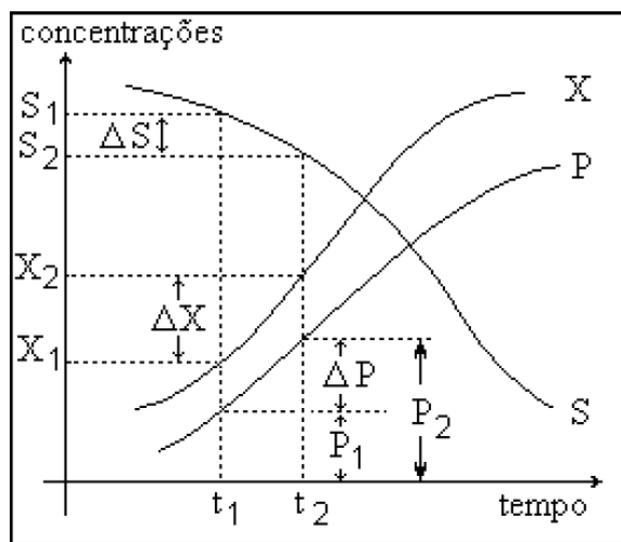


Figura 2.7 - Curva de cinética de processos fermentativos

Fonte: HISS (2013).

É fundamental conhecer o conjunto de dados durante a fermentação por meio do monitoramento temporal, conforme apresentado na Figura 2.7. Sistemas fermentativos são altamente sensíveis a mudanças sob condições anormais de operação. Obter um produto com o máximo de rendimento implica, portanto, em manter as condições de operação dentro do bioreator bem próximas de uma trajetória pré-estabelecida, visando processos em escala industrial, e assim, realizar o dimensionamento de uma instalação produtiva, bem como ampliação de escala e avaliação das condições operacionais, devido à possibilidade de comparação dos fatores que interferem nos processos fermentativos (HISS, 2013).

2.10.1 Velocidades específicas (μ)

Segundo FOGLER (1999); PARRONDO *et al.* (2000); HISS (2013) e ZLATEVA *et al.* (2015), em processos descontínuos, a taxa de concentração de biomassa (X) aumenta no cultivo, proporcionando, por consequência, o aumento da concentração das enzimas que transformam o substrato (S) em produto (P), considerando o tempo de fermentação.

Para tanto, GADEN (1955) fundamentou as velocidades específicas de crescimento microbiano (μ_x) conforme Equação (2.4), consumo de substrato (μ_s) pela Equação (2.5) e formação de produto (μ_P) pela Equação (2.6), em um dado instante:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{Eq. (2.4)}$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left(- \frac{dS}{dt} \right) \quad \text{Eq. (2.5)}$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad \text{Eq. (2.6)}$$

Sendo, μ_x velocidade específica de crescimento microbiano (h^{-1}), μ_s velocidade específica de consumo do substrato (h^{-1}), μ_P velocidade específica de formação do produto (h^{-1}), X concentração celular ($g L^{-1}$), S concentração do substrato ($g L^{-1}$), P a concentração do produto ($g L^{-1}$) e t o tempo (h^{-1}).

2.10.2 Fatores de conversão (Y)

Um modelo que prediz o comportamento do processo fermentativo é determinado a partir das características específicas do processo, analisando as relações cinéticas pelo tratamento fenomenológico dos dados experimentais (PARRONDO *et al.*, 2000; GABARDO *et al.*, 2015; ZLATEVA *et al.*, 2015). Dessa forma, ao considerar um tempo t de fermentação, é possível relacionar os valores de X, S e P (Figura 2.6), obtendo os fatores de conversão de substrato em célula

($Y_{X/S}$), produto em célula ($Y_{X/P}$) e substrato em produto ($Y_{S/P}$) que estão representados nas Equações (2.7), (2.8) e (2.9), respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{Eq. (2.7)}$$

$$Y_{X/P} = \frac{X - X_0}{P - P_0} \quad \text{Eq. (2.8)}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad \text{Eq. (2.9)}$$

Sendo, X_0 a concentração inicial de biomassa (g L^{-1}), X a concentração final de biomassa (g L^{-1}), S_0 a concentração inicial de substrato (g L^{-1}) e S a concentração final de substrato (g L^{-1}), P a concentração do produto (g L^{-1}), P_0 a concentração inicial do produto (g L^{-1}), S_0 a concentração inicial de substrato (g L^{-1}) e S a concentração final de substrato (g L^{-1}).

2.11 Modelagem matemática de processos fermentativos

A modelagem matemática em processos fermentativos pode ser definida como a busca por representar por meio equações de balanço de massa ou molar dos componentes que constituem o meio reacional de fermentação, as transformações bioquímicas que ocorrem nos processos fermentativos através das velocidades de reação. Enquanto a simulação do processo corresponde à busca por aperfeiçoar o processo através do modelo matemático (BONONI & SCHMIDELL, 2001).

A partir disso, a modelagem matemática e a simulação correspondem a ferramentas utilizadas na biotecnologia, bem como no desenvolvimento tecnológico de processos fermentativos, com o propósito de prever o comportamento do processo, suas condições ideais para atingir o ponto ótimo do sistema (BONONI & SCHMIDELL, 2001; TAVARES, 2017).

A modelagem matemática dos bioprocessos consiste na proposição de um modelo matemático que descreve a fermentação, considerando o microrganismo,

substrato e condições operacionais específicas (BORZANI *et al.*, 2001; PHISALAPHONG *et al.*, 2006; ZLATEVA *et al.*, 2015).

Para tanto, os modelos matemáticos auxiliam no desenvolvimento de novas estratégias, com a finalidade de otimizar o processo de fermentação, relacionando a influência de parâmetros operacionais com as taxas de crescimento celular (MORESI *et al.*, 1990; BONONI & SCHMIDELL, 2001). E, para o modelo ser considerado eficiente, o mesmo deve levar em consideração para sua elaboração, as taxas de crescimento microbiano e consumo de substrato, além de efeitos de limitação de substrato, inibição pelo produto, e também o que isso representa em termos de gastos com manutenção e morte celular (GHALY *et al.*, 2007).

2.11.1 Modelos mais comumente utilizados em bioprocessos

Existem inúmeros modelos disponíveis na literatura que podem prever o comportamento cinético em bioprocessos, tais como: Monod (MONOD, 1949); Edwards (EDWARDS, 1970); Phisalaphong (PHISALAPHONG *et al.*, 2006); e Levenspiel (HAN & LEVENSPIEL, 1988), entretanto, avaliar qual dos modelos se adequa melhor ao processo fermentativo em estudo, para que possa se averiguar quem melhor pode descrever o comportamento dos dados experimentais se faz necessário quando se almeja alta produtividade.

O modelo mais clássico para representar o comportamento do processo fermentativo é o Modelo de Monod (1949). A equação proposta por Monod interpreta a fase exponencial de crescimento, relacionando a concentração do substrato limitante no meio (S) com a velocidade específica (μ_x) de reprodução do microrganismo conforme proposto pela Equação (2.10), em que μ_m corresponde à velocidade específica máxima de crescimento e K_{sc} é a constante de saturação (GABARDO *et al.*, 2015; ZLATEVA *et al.*, 2015).

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_{sc} + S} \quad \text{Eq. (2.10)}$$

Sendo, μ_x velocidade específica de crescimento microbiano (h^{-1}), μ_m velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}), S concentração do substrato ($g L^{-1}$) e K_{sc} constante de saturação.

Baseado na equação de Monod, o K_{sc} pode ser considerado como metade de seu valor máximo, já que a constante representa a concentração do substrato na qual a velocidade de crescimento é a metade do seu valor máximo (FOGLER, 1999; HISS, 2013; ZLATEVA *et al.*, 2015).

A inibição do crescimento e produção de etanol pode ocorrer devido a vários fatores, entre eles o excesso de substrato e a formação dos próprios produtos (LIMA *et al.* 2001; BORZANI *et al.*, 2008). A inibição pelo excesso de substrato é comumente explorada pela interpretação física do modelo de inibição derivada da cinética enzimática de Michaelis-Menten. Esse modelo avalia a velocidade da reação enzimática pela influência das concentrações iniciais de enzima e de substrato, corroborando basicamente, na concentração do substrato maior que a concentração da enzima (BORZANI *et al.*, 2008).

Nessa perspectiva, BELLAYER *et al.* (2004) avaliaram a atividade enzimática, aumentando a concentração de substrato (lactose e glicose) para o crescimento da levedura *K. marxianus* CBS 6556. Os autores constataram que a atividade de algumas enzimas aumentou, enquanto de outras permaneceu inalterada, dessa forma, sugeriram que, para a produção de bioetanol, o fluxo glicolítico deve ser mantido constante.

Quando há presença de inibidores, tais como os próprios produtos, outros modelos são mais aconselháveis que o modelo de Monod. Dessa forma, é possível representar a concentração celular ($g L^{-1}$) na presença de inibidores, a partir das taxas de crescimento celular (μ_x) conforme Equação (2.11), consumo do substrato (μ_s) pela Equação (2.12) e produção de produto (μ_p) de acordo com a Equação (2.13) (PHISALAPHONG *et al.*, 2006).

$$\mu_x = \mu_m \left(\frac{S}{S + K_{sc} + \frac{S^2}{K_{ic}}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) + k_d \quad \text{Eq. (2.11)}$$

$$\mu_s = \frac{\mu_x}{Y_{S/X}} + \frac{\mu_p}{Y_{S/P}} + m_s \quad \text{Eq. (2.12)}$$

$$\mu_p = \mu_m^p \left(\frac{S}{S + K_{sc}^p + \frac{S^2}{K_{ic}^p}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_m'} \right) \quad \text{Eq. (2.13)}$$

Sendo, μ_x velocidade específica de crescimento microbiano (h^{-1}), μ_m velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}), S concentração do substrato ($g L^{-1}$), K_{sc} constante de saturação, P a concentração do produto ($g L^{-1}$), K_{ic} constante de inibição, P_m constante de inibição pelo produto para o crescimento celular, k_d efeitos da fase de morte (h^{-1}), μ_s velocidade específica de consumo do substrato (h^{-1}), μ_p velocidade específica de formação do produto (h^{-1}), $Y_{s/x}$ fator de conversão substrato em biomassa celular, $Y_{s/p}$ substrato em produto, $\mu_m^p = \mu_m$ máxima velocidade específica de produção do produto (h^{-1}) e K_{sc}^p constante de saturação pelo produto.

Com as Equações (2.11 a 2.13), identifica-se a inibição pelo substrato e produto para a formação de biomassa e produto. Partindo disso, ao conhecer e identificar as características específicas do processo fermentativo, é possível a aplicação de métodos de modelagem e controle matemático a fim de melhorar as condições do processo analisado (ZLATEVA *et al.*, 2015).

Assim sendo, o modelo de Edwards, que é uma adaptação do modelo de Monod (1949), se diferencia entre os modelos por considerar o efeito de inibição do crescimento de biomassa e produto pelo substrato (K_sP e $K_{is}P$). Contudo, este modelo não considera os efeitos da fase de morte ou consumo do substrato na manutenção das células (k_d e K_{cm}) (EDWARDS, 1970), conforme exposto pelas Equações (2.14) a (2.16).

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} \cdot S}{(K_s + S + \frac{S^2}{K_{is}})} X \quad \text{Eq. (2.14)}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{v_{max} \cdot S}{(K_{sP} + S + \frac{S^2}{K_{isP}})} \cdot X \quad \text{Eq. (2.15)}$$

$$\frac{dS}{dt} = \left(-\frac{1}{Y_{xs}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{ps}} \cdot \frac{dP}{dt} \right) \quad \text{Eq. (2.16)}$$

Sendo, μ_{\max} taxa de crescimento específico máximo (h^{-1}), S concentração do substrato ($g L^{-1}$), K_s coeficiente de saturação do crescimento celular (constante de Monod) ($g L^{-1}$), K_{is} coeficiente de inibição pelo substrato no crescimento celular ($g L^{-1}$), X a concentração final de biomassa ($g L^{-1}$), v_{\max} taxa máxima de produção específica de bioetanol (h^{-1}), K_{sP} coeficiente de saturação para a produção de bioetanol ($g L^{-1}$), K_{isP} coeficiente de inibição pelo substrato na formação de bioetanol ($g L^{-1}$), $Y_{X/S}$ fator de conversão de substrato em célula e $Y_{P/S}$ fator de conversão de produto em substrato.

O modelo de PHISALAPHONG *et al.* (2006) segue os mesmos princípios do modelo de Edwards: considera o efeito de inibição do crescimento de biomassa e produto pelo substrato (K_{is} e K_{isP}), não identificando os efeitos da fase de morte e nem o consumo do substrato na manutenção celular (K_{cm}). Este método diferencia-se por englobar um termo de inibição não competitiva do crescimento pelo produto, de acordo com as Equações (2.17-2.19).

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{(K_s + S + \frac{S^2}{K_{is}})} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{x\max}}\right) \cdot X \quad \text{Eq. (2.17)}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{v_{\max} \cdot S}{(K_{sP} + S + \frac{S^2}{K_{isP}})} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{p\max}}\right) \cdot X \quad \text{Eq. (2.18)}$$

$$\frac{dS}{dt} = \left(-\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/S}} \cdot \frac{dP}{dt}\right) \quad \text{Eq. (2.19)}$$

Sendo, μ_{\max} taxa de crescimento específico máximo (h^{-1}), S concentração do substrato ($g L^{-1}$), P a concentração do produto ($g L^{-1}$), $P_{x\max}$ termo de inibição pelo bioetanol para o crescimento celular ($g L^{-1}$), X a concentração final de biomassa ($g L^{-1}$), K_s coeficiente de saturação do crescimento celular (constante de Monod) ($g L^{-1}$), K_{is} coeficiente de inibição pelo substrato no crescimento celular ($g L^{-1}$), v_{\max} taxa máxima de produção específica de bioetanol (h^{-1}), K_{sP} coeficiente de saturação para a produção de bioetanol ($g L^{-1}$), K_{isP} coeficiente de inibição pelo substrato na formação de bioetanol ($g L^{-1}$), $P_{p\max}$ termo de inibição pelo bioetanol na produção de bioetanol ($g L^{-1}$), $Y_{X/S}$ fator de conversão de substrato em célula e $Y_{P/S}$ fator de conversão de produto em substrato.

Nesse sentido, a avaliação do modelo com melhor desempenho de representação do processo fermentativo é feita por meio do ajuste de parâmetros cinéticos dos modelos aos dados experimentais da fermentação e posterior comparação de parâmetros estatísticos de regressão, tais como, critério de Akaike (AIC) e coeficiente de determinação (R^2).

SEÇÃO III – Leveduras produtoras de etanol

Os agentes de fermentação são as leveduras, as quais são fungos unicelulares (GAVA, 2002), classificadas de acordo com os processos envolvidos no metabolismo dos açúcares e geração de energia. As leveduras que apresentam efeito *Crabtree*, ou seja, repressão do metabolismo respiratório pela glicose, ao realizarem fermentação alcoólica em condições aeróbias são denominadas de *Crabtree* positivas, resultando em uma menor produção de biomassa, uma vez que a maior quantidade de açúcares fermentescíveis é convertida em etanol. Já as leveduras *Crabtree* negativas produzem mais biomassa a partir da glicose disponível no meio (LIMA *et al.*, 2001; DASHKO *et al.*, 2014; SUZART & DIAS, 2007).

Para a produção de etanol, as leveduras são os microrganismos preferidos para esta finalidade. As mais usualmente empregadas são as cepas do gênero *Saccharomyces* e suas subespécies, tendo destaque a subespécie *S. cerevisiae* (LIMA *et al.*, 2001; SUZART & DIAS, 2007; BACH *et al.*, 2014; GABARDO *et al.*, 2016).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são *Crabtree* positivas, pois realizam respiração sob condição aeróbia, porém, se adicionada certa quantidade de glicose ao meio, automaticamente a levedura inverte seu metabolismo e passa a realizar a fermentação alcoólica, e, portanto, chamada de *Crabtree* de curto prazo (DASHKO *et al.*, 2014).

Assim, visando a aplicação industrial, os microrganismos devem apresentar-se com elevada eficiência na conversão do substrato em produto, acúmulo do produto ao meio fermentativo, não produzir substâncias incompatíveis com o

produto, não serem patogênicos e promover a rápida liberação do produto ao meio (LIMA *et al.*, 2001).

Nessa perspectiva, a levedura *Kluyveromyces marxianus* tem sido estudada na produção de bioetanol, por apresentar resistência a temperaturas processuais mais elevadas, e também, metabolizar substratos de origem láctea, além de outros açúcares de forma direta, não necessitando do processo de hidrólise (COTÉ *et al.*, 2004; HADIYANTO *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016).

2.12 *Kluyveromyces marxianus*

Emil Christian Hansen descobriu a levedura descrita por *Kluyveromyces marxianus*, após ser isolada da uva. Inicialmente, esta levedura era denominada de *Saccharomyces marxianus* por apresentar características semelhantes às do gênero *Saccharomyces* (FONSECA *et al.*, 2008).

Observou-se que as leveduras *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces fragilis* e *Saccharomyces lactis* apresentavam capacidade de metabolizar diferentes açúcares que as demais leveduras do gênero *Saccharomyces*. Em 1956, estas leveduras passaram a constituir um novo gênero denominado *Kluyveromyces*. Assim, passaram a ser descritas por *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis* (FONSECA *et al.*, 2008). A Figura 2.8 apresenta a morfologia da *K. marxianus* por microscopia óptica e eletrônica.

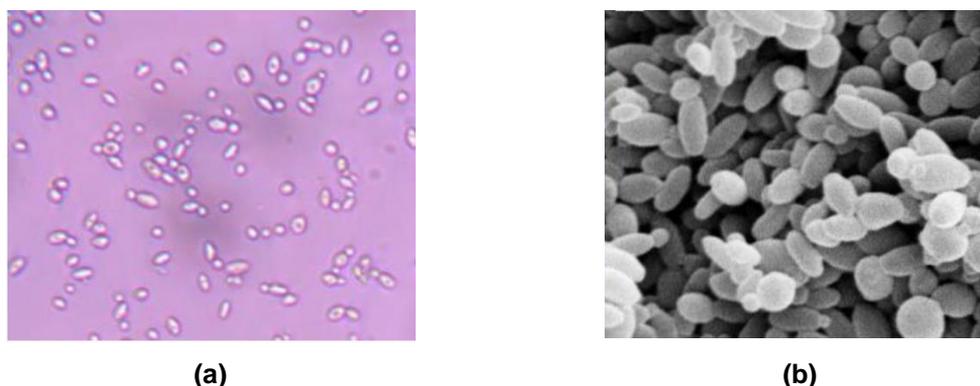


Figura 2.8 - Morfologia da levedura *K. marxianus* ATCC 36907 por microscopia óptica e eletrônica
* **(a)** corresponde na microscopia óptica com ampliação de 100x.
** **(b)** Microscopia eletrônica com aumento de 5000X.
Fonte: TAVARES (2017).

A levedura *K. marxianus* (Figura 2.8) vem despertando interesse na área da biotecnologia quando comparada com outras espécies de leveduras, devido a sua grande diversidade metabólica, capacidade de assimilar uma variedade de açúcares, apresentar taxa mais elevada de crescimento e amplo espectro de termotolerância (FONSECA *et al.*, 2008; LANE & MORRISSEY, 2010; LANE *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2015; NACHAIWIENG *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016), crescendo em temperaturas de 30 a 52 °C (ROSSI *et al.*, 2009; LANE & MORRISSEY, 2010) e produzindo etanol na faixa de 45-50 °C (BOYLE *et al.*, 1997).

Essa levedura atua na faixa de pH de 4,5 a 6,5 (FONSECA *et al.*, 2008; YADAV *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016) e é classificada como *Crabtree* negativa, capaz de realizar, simultaneamente, fermentação e respiração. Esse efeito é caracterizado pela fermentação alcoólica em aerobiose, em elevadas concentrações de carboidratos ou cultivos com alta taxa de crescimento, e portanto, considera-se que o fator mais importante para a determinação do metabolismo fermentativo da *Kluyveromyces* é a concentração de oxigênio disponível no meio (FONSECA *et al.*, 2008; LANE & MORRISSEY, 2010).

A *K. marxianus* apresenta uma taxa de crescimento elevada, com tempo de geração equivalente a aproximadamente 70 min e uma alta capacidade secretória (LANE & MORRISSEY, 2010). Dessa forma, possui a capacidade natural de excretar enzimas com propriedades desejadas no que se refere ao custo benefício das etapas de *downstream* de um processo fermentativo, isto é, etapas de separação, purificação de produtos e subprodutos e tratamento de efluentes (HENSING *et al.*, 1995). Além disso, apresenta elevadas taxas de sacarificação e fermentação, remoção contínua de etanol e contaminação reduzida (BANAT *et al.*, 1998).

Segundo LANE & MORRISSEY (2010), a levedura em estudo apresenta poucas restrições de utilização, visto que é reconhecida como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) e QPS (*Qualified Presumption of Safety*) nos Estados Unidos e Europa, tem destaque de aplicações nos setores alimentício, farmacêutico e de cosméticos.

Este gênero de levedura tem motivado inúmeras pesquisas e aplicações industriais biotecnológicas como a produção de enzimas (β -galactosidase, β -glicosidase, e poligalacturonases, inulinase entre outras), de proteínas para

alimentação animal ou humana, de compostos aromáticos como fenil-etanol e de biocombustíveis como o bioetanol (FONSECA *et al.*, 2008). Seu destaque na produção de bioetanol ocorre com matérias-primas lácteas, uma vez que assimila de forma direta a lactose em seu metabolismo (COTÉ *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2005; GABARDO *et al.*, 2014; HADIYANTO *et al.*, 2014; TOFALO *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2014; NACHAIWIENG *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017).

Nas Tabelas 2.3-2.5, são apresentadas pesquisas realizadas nos últimos nove anos advindos de processos biotecnológicos com potencial de aplicação da levedura *K. marxianus* para a obtenção de diversos produtos fermentativos relacionados a diversas matérias-primas, como soro e permeado de soro de queijo desproteínizado. A busca de artigos foi feita na base de dados *Science Direct*, *Google Scholar* e *Scopus*, empregando as palavras-chave: *Kluyveromyces marxianus*, *K. marxianus*, *alcoholic fermentation*, *whey permeate*, *cheese whey*, *milk* e *bioproducts*, os quais apresentaram relevância para a presente pesquisa.

Tabela 2.3 - Estudos que empregaram a levedura *K. marxianus* em processos biotecnológicos com substratos diversos

| Substrato fermentativo | Produto de interesse ou aplicação | Concentração de produto (g L ⁻¹) | Tempo (h) | Condições processuais | Referência |
|---|---|--|-----------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Indústrias de tequila (agave tequilana fructans - ATF) | Bioetanol | 49,90 | 96 | 30 °C, pH 4,5 | FLORES <i>et al.</i> (2013) |
| Bagaço de cana e soro de ricota (100 g L ⁻¹ lactose consumida) | Etanol e biomassa celulósica | 49,65 e 80, respectivamente | 72 | 39,2 °C, pH 5,05, 65 rpm | FERREIRA <i>et al.</i> (2015) |
| Leite fermentado | Purificação e a identificação os peptídeos: aminopeptidase, carboxipeptidase e endoproteínase | 105,60, 9,96 e 5,44, respectivamente | 48 | 31 °C, pH 6,5, 189 rpm, 6 % inóculo | LI <i>et al.</i> (2015) |
| Xilose (200 g L ⁻¹ consumida) | Etanol | 60,07 | 72 | 37 °C, | ZHANG <i>et al.</i> (2015) |
| Glicose (120 g L ⁻¹) e xilose (60 g L ⁻¹) | Etanol | 50,10 | 28 | 42 °C | ZHANG <i>et al.</i> (2016) |
| Sacarificação simultânea de bagaço de maçã e caju | Etanol celulósico | 58,00 | 48 | 40 °C, 150 rpm, pH 4,5- 5,0 | BARROS <i>et al.</i> (2017) |
| Enzima β-galactosidase imobilizada em dióxido de silício em soro de leite (150 g L ⁻¹), com co- imobilização <i>S. cerevisiae</i> e <i>K. marxianus</i> | Bioetanol | 63,90 | 6 | 37 °C, pH 7,0 | BENIWAL <i>et al.</i> (2018) |
| Palha de carnaúba | Etanol celulósico | 4,77 | 36 | 35 °C, pH 5, 150 rpm | SILVA <i>et al.</i> (2018) |
| Sorgo (hidrolisado de enzima de farelo vermelho) | Bioetanol | 24,35 | 48 | 30 °C, pH 5, 120 rpm | EL-IMAM <i>et al.</i> (2019) |
| Bagaço de cana | Etanol | 29,45 | 24 | 37 °C, pH 5 | GUILHERME <i>et al.</i> (2019) |
| Farinha cladódio oriunda de <i>Opuntia ficus-indica</i> | Etanol | 12,98 | 4 | 40 °C, pH 5,5 | LOPEZ-DOMÍNGUEZ <i>et al.</i> (2019) |
| Agave salmiana (planta) | Bioetanol | 18,31 | 48 | 30 °C, 100 rpm | LAINEZ <i>et al.</i> (2019) |
| Xilose | Etanol | 24,10 | 72 | 40 °C | SUZUKI <i>et al.</i> (2019) |
| Palha de milho | Xilitol e etanol | 24,2 e 52, respectivamente | 24 | 40 °C, pH 5, 200 rpm | DU <i>et al.</i> (2020) |

Tabela 2.4 - Estudos que empregaram a levedura *K. marxianus* em processos biotecnológicos com substrato soro

| Substrato fermentativo | Produto de interesse ou aplicação | Concentração de produto (g L⁻¹) | Tempo (h) | Condições processuais | Referência |
|---------------------------------------|--|---|------------------|--|-----------------------------|
| Soro de queijo | Acetato de etila | 0,25 g de etil acetato por g de lactose | 18 | 32 °C, pH 4-5, 101,325 Pa | URIT <i>et al.</i> (2011) |
| Soro de leite | Bioetanol | 17,04 | 72 | 28 °C, 400rpm | ZOPPELLARI & BARDI (2013) |
| Soro de leite | Acetato de etila | 1,59 | 25 | 32 °C, pH ≥ 5, 800 rpm | LÖSER <i>et al.</i> (2013) |
| Soro de queijo (60g L ⁻¹) | Etanol | 29,78 | 12 | 33 °C, pH 5, 150 rpm | MURARI <i>et al.</i> (2019) |
| Soro de leite bovino | Redução da antigenicidade das proteínas por técnicas ultrassônicas | 29% e 53%, respectivamente | 12 | 35 °C, pH 7,25, 150 rpm, antigenicidade de α-LA e β-LG | ZHAO <i>et al.</i> (2020) |

Tabela 2.5 - Estudos que empregaram a levedura *K. marxianus* em processos biotecnológicos com substrato permeado (PSQD)

| Substrato fermentativo | Produto de interesse ou aplicação | Concentração de produto (g L ⁻¹) | Tempo (h) | Condições processuais | Referência |
|--|-----------------------------------|---|-----------|---|-------------------------------------|
| Permeado de soro de leite desproteínizado de queijo (150 g L ⁻¹) | Biomassa celular | 15,70 | 26 | 30 °C, pH 4,0, 100 rpm | ASSUNÇÃO (2014) |
| Permeado (60 g L ⁻¹) | Etanol | ≈27,5 | 12 | 30 °C, pH 7, 100 rpm | GABARDO <i>et al.</i> (2014) |
| Permeado de soro de queijo desproteínizado (250 g L ⁻¹) | Oligossacarídeos de lactose | 322 g de prebióticos por kg de permeado de soro | 6 | 50 °C, pH 6,5, enzima β-galactosidase oriunda de <i>K. lactis</i> | PADILLA <i>et al.</i> (2015) |
| Permeado de soro de leite desproteínizado | Etanol | 79,1 | 50 | 30 °C, pH 8,5, 150 rpm | GABARDO <i>et al.</i> (2016)* |
| Permeado de soro de queijo (120 g L ⁻¹) | Etanol | 53,44 | 48 | 30 °C, pH 5, 150 rpm | DÍEZ-ANTOLÍNEZ <i>et al.</i> (2018) |
| Permeado de soro de leite | Etanol | 8,90 | 18 | 30 °C, sem agitação | MURARI <i>et al.</i> (2018) |

* Co-imobilização de *S. cerevisiae* e *K. marxianus*.

Assim, optou-se por aplicar a levedura *K. marxianus* na presente pesquisa, devido a sua capacidade em metabolizar de forma direta o dissacarídeo lactose, presente na matéria-prima láctea PSQD.

2.12.1 Ação prebiótica

A biomassa microbiana formada a partir de fermentações com a levedura *K. marxianus* pode proporcionar ações prebióticas ao produto. Sugere-se também que a levedura apresenta potencial para desenvolvimento como levedura probiótica (SMITH *et al.*, 2016; PENDÓN *et al.*, 2020).

Os prebióticos são responsáveis por estimular o crescimento de bactérias bífidas, devido à fermentação no cólon realizadas por estas bactérias. Esta bioconversão provoca uma redução do pH intestinal e consequente ação bactericida, restringindo os microrganismos patógenos e demandando função anticarcinogênicas (SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2001). Além disso, os prebióticos proporcionam, ainda, a melhora do sistema imunológico por cooperar com a renovação das células epiteliais intestinais, facilitando a absorção de minerais, com destaque para o cálcio, magnésio, zinco e ferro (SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2001).

PASSERON *et al.* (2006) avaliaram a manifestação de dermatite atópica a partir do uso dos simbióticos e prebióticos em crianças de dois anos ou mais. As crianças foram divididas em dois grupos, sendo o primeiro grupo acometido a doses de simbióticos e o segundo a prebióticos. O monitoramento de ambos os grupos foi feito com a pontuação da doença antes e depois da pesquisa. Concluíram que houve diminuição das manifestações da dermatite, tanto para os simbióticos quanto para os prebióticos, tendo em vista que, antes do tratamento, o grupo simbiótico apresentou a pontuação de 39,1 e após 3 meses a pontuação foi reduzida para 20,7. Todavia, o grupo prebiótico teve pontuação reduzida de 39,3 para 24,0, ao final dos 3 meses de tratamento.

SEÇÃO IV – BIOPRODUTOS FERMENTATIVOS

2.13 Bioprodutos formados pelos processos fermentativos

As bioconversões dos processos fermentativos ocorrem quando os microrganismos metabolizam os substratos em produtos de interesse, e dependendo da via metabólica (primária), há maior produção de bioetanol. Contudo, na sequência das reações enzimáticas das rotas metabólicas alternativas, pode aparecer a formação de compostos secundários, os quais podem ou não ser de interesse. Estes compostos estão diretos ou indiretamente relacionados com a adaptação e sobrevivência dos microrganismos empregados ao meio de cultivo (BORZANI *et al.*, 2001; HASHIZUME, 2001; LIMA *et al.*, 2001).

À exemplo, têm-se como compostos secundários ou subprodutos, os ácidos orgânicos, biomassa microbiana e galacto-oligosacarídeo (EVANGELISTA, 2000; BORZANI *et al.*, 2001; HASHIZUME, 2001; LIMA *et al.*, 2001; SACHS, 2001; GAVA, 2002; SPINOSA, 2002; HADIYANTO *et al.*, 2014; MAESTRE, 2017; MAESTRE, 2018a; MAESTRE, 2018; PASSOS, 2018).

2.13.1 Bioetanol

Sabe-se que combustíveis oriundos de petróleo dominam o consumo mundial, nessa perspectiva, a busca por alternativas sustentáveis para sua substituição é constante e imediata, devido aos impactos ambientais causados pelos combustíveis fósseis (NIKOLIC *et al.*, 2010).

Dessa forma, o bioetanol de segunda geração pode ser utilizado como uma fonte alternativa de biocombustíveis, especialmente considerando seu baixo custo de produção em comparação aos combustíveis fósseis e a possibilidade de ser obtido por diferentes fontes naturais (CALDEIRÃO *et al.*, 2016).

Entretanto, ainda há fatores impulsionantes na economia global que tornam necessária a elevação da produção de biocombustível (bioetanol), um deles, refere-se ao alerta mundial sobre a escassez futura de combustíveis de origem fóssil, a qual foi estimada com uma duração máxima de 40 a 50 anos. Atrelado a essa deficiência energética de combustíveis fósseis, há também o apelo das instituições

governamentais quanto à redução da poluição ambiental e aquecimento global, fatores estes, que tem impulsionado o mercado na busca por combustíveis de natureza não poluente, como é o caso do bioetanol (MAESTRE, 2018).

Nessa vertente, HEGDE *et al.* (2018) destacam que o processamento de alimentos produz quantidades consideráveis de resíduos ricos em nutrientes e, embora parte destes resíduos já seja utilizada para produzir produtos de valor agregado, a maioria ainda é descartada. Então, apresentar viabilidade de produção de álcoois, principalmente etanol e butanol, seguido de metanol, a serem empregados como combustíveis e solventes industriais é uma alternativa viável de utilização destes resíduos alimentares para a indústria.

Em dezembro de 2017, o então presidente do Brasil, Michel Temer, sancionou a lei que estabeleceu o programa RenovaBio, no intuito de impulsionar o uso de biocombustíveis no país. A origem desta lei se deu por meio do compromisso do Brasil de "descarbonizar" ainda mais sua matriz energética, conforme acordado firmado na conferência climática de Paris (COP21). O Brasil se comprometeu, até 2030, uma redução de 43 % nas emissões de gases de efeito estufa, frente ao que era gerado no ano de 2005, e também incrementar uma participação de 45 % de energias renováveis na matriz energética do país, sendo os biocombustíveis responsáveis por 18 % deste total (BAKKER, 2018).

Assim, visando a produção de biocombustível, bioetanol, as matérias-primas lácteas têm se mostrado uma opção inovadora, por ser um processo benéfico de reutilização e biorremediação desses subprodutos industriais altamente poluidores. Esse tratamento alternativo resultaria na redução dos custos decorrentes da necessidade de processos de tratamento de efluentes complexos e de custo intensivo necessário para o descarte (KARGI & OZMIHCI, 2006; CHENG & TIMILSINA, 2011; SANSONETTI *et al.*, 2011; GABARDO *et al.*, 2014; GABARDO *et al.*, 2015; GABARDO *et al.*, 2016; MAESTRE, 2017).

Diante disso, a bioconversão do permeado de soro de queijo desproteínizado em bioetanol é desejável, pois a matéria-prima a ser utilizada é secundária, ou até mesmo residual do processamento da indústria de laticínio, é gerada em volume elevado, e não compromete a produção principal de produtos do portfólio de lácteos, podendo ser direcionada para a produção de biocombustível em grande escala. Compactuando desta forma com o predito acima, há o aumento da produção de biocombustível sem danificar o meio ambiente, e o aproveitamento da

matéria-prima na integralidade, ou seja, emissão zero de resíduos (MAESTRE, 2018).

2.13.1.1 Pesquisas relacionadas à obtenção de bioetanol

BACH *et al.* (2014) avaliaram a produção de bioetanol de soro de leite *in natura* a partir da levedura *S. cerevisiae*. Em 59 h de fermentação a 28 °C, 100 rpm, 0,05 % de enzima lactase, 65 g L⁻¹ de sacarose e pH ≈ 6, produziu-se 6,41 % (v/v) de bioetanol.

GABARDO *et al.* (2014) avaliaram a bioconversão de permeado em bioetanol pela *K. marxianus*. O melhor ensaio gerou 1,15 g L⁻¹ h⁻¹ de produtividade em bioetanol, sendo desenvolvido a 30 °C, pH 7,0, 150 rpm com permeado a 60 g L⁻¹, extrato de levedura 3 g L⁻¹ e peptona bacteriológica 5 g L⁻¹. Contudo, seguidamente, desenvolveu-se um fermentado em biorreator de leito fluidizado, com células imobilizadas em alginato de cálcio nas mesmas condições experimentais (30 °C, pH 7,0, 60 g L⁻¹ permeado), obtendo uma maior produtividade em bioetanol, 2,53 g L⁻¹ h⁻¹, demonstrando assim, potencial de utilização em biorreator de leito fluidizado, com células imobilizadas em alginato de cálcio.

FERREIRA *et al.* (2015) investigaram a otimização da produção de bioetanol a partir de uma mistura de bagaço de cana e soro de ricota pela levedura termotolerante *K. marxianus*. Os resultados permitiram concluir que o ensaio a 39,2 °C, pH 5,05 e 65 rpm foi o melhor em termo de rendimento de bioetanol 49,65 g L⁻¹, com concentração de celulase de 20,50 FPU e 80 g L⁻¹ de biomassa celulósica. Evidenciando assim, potencial de aplicação promissora para produção de bioetanol de 2ª geração a partir da mistura, ao comparar com a produção apenas oriunda do bagaço de cana.

GABARDO *et al.* (2016) produziram bioetanol em biorreatores de leito fluidizado empregando a levedura industrial *S. cerevisiae* e a não industrial *K. marxianus*, a partir de soro e permeado de soro de queijo desproteínizado de leite. Ambas leveduras produziram bioetanol nos dois substratos, contudo, para a *K. marxianus*, a formação foi de 79,1 g L⁻¹ em 50 h de fermentação em permeado. Segundo os autores, a *K. marxianus* apresentou-se mais eficiente quando comparada com a *S. cerevisiae* nos dois substratos utilizados, devido à ausência

da etapa hidrolítica da lactose, destacando o potencial explorável desta levedura, visando uso industrial.

O processo hidrolítico do soro e permeado de soro de queijo desproteínizado de leite foi analisado por GENNARI *et al.* (2016), que avaliaram duas enzimas β - galactosidase provenientes de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*, variando a concentração de enzima e a temperatura. Pelos resultados, pôde-se concluir que a enzima oriunda do fungo *A. oryzae*, independente da concentração, em 12 h de processo a 55 °C, hidrolisou por completo o substrato. Enquanto a hidrólise desenvolvida pela enzima provinda da levedura *K. lactis* a 10 °C, foi mais eficiente, mesmo não hidrolisando o substrato por completo.

Nessa perspectiva, é possível verificar a viabilidade econômica e sustentável para empregar o permeado de soro de queijo desproteínizado como matéria-prima fermentativa em processos biotecnológicos. Uma vez que, além de ser um subproduto altamente poluente, apresenta composição rica em fonte de carbono possuindo diversas aplicabilidades em processos fermentativos.

2.14 Subprodutos fermentativos

2.14.1 Biomassa microbiana

A crescente demanda mundial por alimentos e proteínas alimentares, principalmente em países subdesenvolvidos estimulou nos últimos anos a busca por fontes de proteína não convencionais, seja para consumo humano ou alimentação animal. Dessa forma, devido às projeções oficiais divulgadas a acerca do montante populacional a ser atingido em 2050, em torno de 9,8 bilhões de indivíduos (UN DESA, 2017), faz-se necessário um aumento na eficiência energética dos alimentos em 60 % em relação aos níveis atuais para que seja possível atender a demanda deste novo número populacional (ONUBR, 2018).

Uma das fontes não convencionais de proteína é a de origem microbiana. O termo proteínas celulares ou unicelulares (*single cell protein* - SCP) surgiu na década de 1960 para especificar a biomassa microbiana produzida por fermentação, e segundo o Instituto de Tecnologia de Massachusetts, refere-se às células secas de microrganismos unicelulares comestíveis, tais como leveduras, fungos, bactérias e microalgas, cultivados em sistemas de cultura em larga escala

para uso como fontes de proteína em alimentos para humanos ou rações animais (SCRIMSHAW, 1968).

As tecnologias de produção de SCP de leveduras surgiram como forma promissora para resolver o problema da escassez mundial de proteínas (ASHY *et al.*, 1982). E, no decorrer dos anos, elas evoluíram para os processos de bioconversão de subprodutos de baixo valor (resíduos) em produtos com valor nutricional e preço de mercado elevado (UGALDE & CASTRILLO, 2002).

Outros termos como biomassa microbiana, biomassa celular e proteína de biomassa microbiana são utilizados atualmente para se referir às proteínas ou aos concentrados proteicos obtidos de células microbianas.

A proteína microbiana pode ser consumida diretamente, ou seja, célula intacta, particularmente em formulações para alimentação animal, ou pode ser lisada, e suas partes internas e externas extraídas e processadas. Nesse caso, pode ser utilizada como um ingrediente ou um substituto para alimentos ricos em proteínas, adequados tanto para consumo humano ou como ração animal, ou na forma de suplementos, aditivos (intensificadores de sabor) e agentes que fornecem textura (UGALDE & CASTRILLO, 2002).

A produção de biomassa microbiana tornou-se desejável por apresentar rápido crescimento do microrganismo, ou seja, extraordinária capacidade de reprodução em curto espaço de tempo, a exemplo, algas: 2–6 h, leveduras: 1–3 h, bactérias: 0,5–2 h; possibilidade de uso de um número diversificado de substratos e alimentos não consumidos pelo homem, realizando a reciclagem e contribuindo com a preservação do meio ambiente; e elevado teor de proteína, podendo chegar a 30 a 70 % do conteúdo microbiano dissecado (ARAÚJO *et al.*, 2009; NASSERI *et al.*, 2011).

Além do perfil de aminoácidos, muitos microrganismos SCP têm geralmente qualidade nutricional considerável e comparável a um ovo de galinha; além disso podem ser processados continuidade independente das variações sazonais e climáticas, e podem ser facilmente protegidos de eventos climáticos extremos, pois sua produção ocorre em bioreatores; independem da luz para crescer quando oriundas de microrganismo, ao contrario das algas onde se faz necessário o uso de luz 24 horas por dia; ainda como vantagem, a produção de SPC têm a possibilidade de controle da composição nutricional por meio de manipulações genéticas e ambientais (ARAÚJO *et al.*, 2009; NASSERI *et al.*, 2011).

Diante do exposto, países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, são favoráveis para a produção de biomassa microbiana, pois são ricos em resíduos agroindustriais, tais como resíduos do processamento de lácteos, o soro de leite e permeado de soro de queijo desproteínizado, os quais se utilizados no cultivo de microrganismos podem ser uma alternativa viável para bioconversão em biomassa microbiana rica em proteínas, reduzindo em torno de 90-95 % dos seus constituintes em termos de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (GRUBB & MAWSON, 1988), e resultando em bio-ingredientes de alto valor agregado para a indústria de alimentos (BELEM *et al.*, 1997).

2.14.1.1 Pesquisas relacionadas à produção de biomassa microbiana

MULLER (2006) verificou o crescimento da *S. boulardii* em *shaker* empregando glicose como substrato, na temperatura de 30 °C, pH 3,0 e agitação de 200 min⁻¹. O autor obteve 3,90 g L⁻¹ de produção celular, com velocidade específica de crescimento de 0,35 h⁻¹, produtividade 0,32 g L⁻¹ h⁻¹ e conversão de substrato em células 0,41 g g⁻¹. Diante disso, concluiu que é possível cultivar a levedura com a premissa de obter biomassa celular.

Em outro estudo, MULLER *et al.* (2007) avaliaram o crescimento da *S. boulardii* por dois fermentadores diferentes, agitador orbital tipo *shaker* e *air-lift*, empregando como substrato glicose, a 30 °C. No fermentador, a rotação foi estabelecida em 200 min⁻¹, enquanto no fermentador do tipo *air-lift* foram testadas duas vazões de oxigênio, 1,0 e 1,5 vvm. Os autores indicaram que não houve diferença significativa quanto à produtividade entre os dois sistemas. Entretanto, os autores perceberam que, quando a aeração foi alterada de 1,0 para 1,5 vvm, a velocidade específica de crescimento aumentou, e desta forma concluíram que a inserção de oxigênio no meio (relação da oxigenação) é um fator fundamental para o crescimento da *S. boulardii*.

A produção de biomassa microbiana probiótica também foi estudada por KITAMURA (2013) em substrato melaço de cana-de-açúcar enriquecido com selênio a partir da *S. boulardii* por fermentação submersa. O cultivo foi suplementado com 40 g L⁻¹ de glicose, 12 g L⁻¹ de extrato de levedura e 50 g L⁻¹ de melaço de cana, seguido de alimentação, a cada 4 h com 100 g L⁻¹ de melaço de cana. Em 10 h de cultivo, a biomassa seca foi de 13,18 g L⁻¹ com produtividade

de $1,32 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. O autor concluiu que o uso adicional de selênio favoreceu o crescimento celular, evidenciando o potencial de aplicação visando a obtenção da biomassa proteica.

ASSUNÇÃO (2014) estudou a formação de biomassa microbiana com as leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* em meio contendo permeado de soro de queijo desproteínizado a 150 g L^{-1} (lactose hidrolisada), suplementado com sulfato de amônio, sulfato de magnésio e fosfato monobásico de potássio, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 100 rpm . A levedura *S. boulardii* destacou-se na produção da proteína microbiana, pois em 24 h de fermentação a pH 5,5, produziu $22,85 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que com a *S. cerevisiae*, obteve-se $14,22 \text{ g L}^{-1}$ em 26 h a pH 4,0.

ASSUNÇÃO (2014), ainda, avaliou a redução do teor poluidor com base na demanda química e bioquímica de oxigênio do permeado, após o processo de fermentação alcoólica. Os resultados permitiram concluir que a produção de biomassa com permeado de soro de queijo desproteínizado reduziu a DQO e DBO em 69,31 e 97,19 % para a *S. cerevisiae*, assim como também reduziu 97,67 e 99,53 % para a levedura *S. boulardii*, respectivamente. Demonstrando, dessa forma, que o efluente gerado após os processos fermentativos podem ser tratáveis e com redução de custos.

ESPINOSA-GONZALEZ *et al.* (2014) vislumbraram a conversão de permeado de soro de queijo desproteínizado em biomassa celular e lipídeos por microalgas utilizando a espécie *Chlorella protothecoides* em sistema descontínuo. Em 24 h de fermentação a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm , foram obtidos $9,10 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa celular, apresentando 42 % de lipídeos totais (base seca), proporcionando assim, competência para aplicações biotecnológicas.

YADAV *et al.* (2014) avaliaram o potencial de produção de proteína microbiana e remoção de carga orgânica após os cultivos mistos pelas leveduras *K. marxianus* e *Candida krusei* em soro de leite. A produtividade máxima de proteína microbiana foi obtida após 24 h, sendo $0,38 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, com remoção de DQO de 34 % em 6 h. Neste estudo, os autores comprovaram que é possível empregar cultivos mistos com o intuito de obter melhor eficiência na remoção de carga orgânica em temperaturas maiores que $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH baixos, como 3,5.

NADAI (2015) e TRIGUEROS *et al.* (2016) também estudaram o uso da levedura probiótica *S. boulardii* visando a produção de biomassa microbiana probiótica, em sistema descontínuo com meio de cultivo formulado com permeado

de soro de queijo desproteínizado de leite e sais, nas mesmas condições processuais a 30 °C, pH 5,5 e 100 rpm. NADAI (2015) atingiu a maior produção, 40,06 g L⁻¹, no ensaio com 180 g L⁻¹ de permeado em 24 h, enquanto TRIGUEROS *et al.* (2016), em 24 h e com concentração de permeado de 145 g L⁻¹, obtiveram 10 g L⁻¹ de biomassa microbiana. Diante do explanado, ambos os estudos apontaram potencial para produção de biomassa microbiana probiótica de *S. boularii* a partir deste subproduto, sendo esta uma possível aplicação lucrativa para indústrias geradoras deste resíduo.

YADAV *et al.* (2015) também analisaram a biotransformação do soro de queijo pela *K. marxianus* em bioproteínas, denominadas por proteínas funcionais, e seus peptídeos. Os autores constataram que é cabível a produção de bioproteínas, devido às vantagens apresentadas pelo processo, tanto de aplicar o resíduo quanto pela produção das proteínas funcionais.

TRIGUEROS *et al.* (2016) avaliaram a otimização do cultivo de *S. boulardii* em meio composto por permeado de soro de queijo desproteínizado hidrolisado suplementado com sais inorgânicos, sendo que o crescimento microbiano foi avaliado a 30 °C, 100 rpm por 30 h. Segundo os autores, os resultados mostraram que a faixa ótima de pH para esta levedura é de 4,5 a 5,5, e a razão C:N deve estar entre 8 e 20, favorecendo assim, a obtenção de maiores taxas de crescimento, por conseguinte, maior quantidade de biomassa microbiana probiótica.

Diante do explanado, verifica-se que as mais variadas matérias-primas podem ser empregadas em processos biotecnológicos almejando a produção de biomassa microbiana. Ainda, possibilitando que as indústrias geradoras de resíduos e/ou efluentes tenham alternativas viáveis de biotransformação e aplicação destes resíduos.

2.14.2 Ácidos orgânicos

A produção de ácidos orgânicos diferentemente do bioetanol é considerada recente, pois estes processos vêm sendo desenvolvidos a pouco mais de cem anos. Sendo registrado em 1881, a primeira indústria em larga escala para produção de lactato de cálcio empregando bactérias foi em Massachusetts nos Estados Unidos. Este lactato era submetido a fermentações com fungos do gênero

Citromyces, atualmente conhecido por *Penicillium*, para formação do ácido cítrico (PENNA *et al.*, 2001).

Dessa forma, para PENNA *et al.* (2001), ácidos orgânicos também são conhecidos como ácidos carboxílicos, e devem ser produzidos visando a escala industrial, devido às possibilidades de desenvolvimento, sendo assim, comercializados como ácidos ou sais de ácidos.

As fermentações que almejam a formação dos mais diversos ácidos orgânicos podem ser realizadas com ou sem agitação, fermentação estática ou submersa, tanto com leveduras quanto com fungos, bem como a partir de substratos fermentativos variados (MAESTRE, 2018).

No caso da produção de ácido acético, alguns cuidados processuais são fundamentais para um rendimento satisfatório, tais como a escolha correta do tipo de processo fermentativo a ser empregado, tempo de fermentação, excesso ou carência de nutrientes, natureza da matéria-prima, embalagens adequadas, presença de contaminantes na fase de produção, acabamento e armazenamento do ácido acético obtido (PALMA *et al.*, 2001; SACHS, 2001; SPINOSA, 2002; MAESTRE, 2017). Estes cuidados devem ser realizados na formação de todos os ácidos orgânicos (MAESTRE, 2018; MAESTRE, 2019).

2.14.2.1 Pesquisas relacionadas à aplicação e formação de ácidos orgânicos

Para SILVA *et al.* (2008), a utilização de ácidos orgânicos, como os ácidos ascórbico, cítrico, láctico e fumárico, na alimentação animal tem se mostrado viável, visando o controle bacteriológico na alimentação animal. Como demonstrado pelos testes em que realizaram adição destes ácidos orgânicos às rações, os autores perceberam que as tilápias do Nilo consumiram normalmente as rações, obtiveram ganho de peso, conversão alimentar aparente, taxa de eficiência proteica e taxa de sobrevivência de acordo com a normalidade.

LUSTRATO *et al.* (2013) almejaram a reciclagem do soro de leite para a bioconversão de ácido acético, com a premissa de aplicar este produto na nutrição de vacas leiteiras. Ao final da fermentação acética (segunda etapa fermentativa), o teor de ácido acético foi de 8,70 g L⁻¹. Os autores relataram que, pelos processos de produção de fermentado acético de soro de leite, foi possível disponibilizar uma

fonte alimentar alternativa para ruminantes, devido à sua estabilidade unida à sua palatabilidade e ao valor nutritivo do fermentado.

No estudo de LÖSER *et al.* (2013), foi avaliada a produção de acetato de etila com a levedura *K. marxianus* DSM 5422, aproveitando soro de leite como substrato. Especificamente, analisaram o efeito que o ferro, biocatalisador da síntese de ésteres, no crescimento do microrganismo, já que ele é requerido. Contudo, ferro em elevadas concentrações pode inibir a formação do produto de interesse (acetato de etila). Os autores concluíram que nas maiores concentrações de ferro, a formação do solvente não era satisfatória, já nas menores concentrações, o crescimento da levedura era limitado reduzindo o processo de síntese.

SPINOSA *et al.* (2015) desenvolveram um fermentado alcoólico de arroz (*Oryza sativa* L.) com o intuito de produzir ácido acético pelo método submerso com a bactéria *Acetobacter sp.* Para tanto, os autores oxidaram uma solução alcoólica de 6,28 % (p/v) de etanol a 30 °C numa vinagreira (Frings Alemanha) por 10 dias. Ao final deste período, foi detectada formação de 61,50 g L⁻¹ de ácido acético, e ainda, composição de ácidos orgânicos, tais como ácido cis-aconítico, ácido maleico, ácido trans-aconítico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido fumárico e ácido itacônico.

GUNESER *et al.* (2016) avaliaram a formação de metabólitos voláteis a partir de matérias-primas residuais industriais, tais como soro de leite, polpas de tomates, uva e pimentões. O bioetanol foi o produto com maior concentração obtida, principalmente com o substrato soro de leite. Além do bioetanol, foram produzidos ésteres como acetato de etila, acetato de isoamílico e acetato de fenil-etila, e álcoois, tais como isoamílico, isoamilacetato, isobutirato de 2- fenil etil, acetato de feniletíl e álcool fenil etílico, e ácido isovalérico.

No estudo de BERGAMASCHI & BITTANTE (2018), foi pesquisada a evolução das características do sabor de queijos produzidos artesanalmente a partir do soro, durante o verão nas pastagens alpinas. Os autores constataram que, durante a fabricação do queijo, houve produção de diversos compostos voláteis como álcoois, aldeídos, ésteres, ácidos graxos livres, cetonas, enxofre, terpenos, fenol, e benzeno, compostos estes, que influenciam diretamente no sabor do produto desejado.

MARTÍNEZ *et al.* (2018) estudaram o uso da fermentação em estado sólido para produzir compostos aromáticos análogos a frutas, a partir da mistura de

bagaço de cana-de-açúcar com melaço de açúcar de beterraba, visando aumentar a produção e seletividade dos ésteres formados.

Por fim, fica evidente o nicho de produtos e aplicabilidades tecnológicas com as matérias-primas lácteas entre outras, a fim de produzir ácidos láctico, fórmico, propiônico e butírico, ou compostos voláteis. Estes produtos são demandados para aplicações diversas, tais como em cosméticos, medicamentos, bebidas, conservação de alimentos e indústria química (MAESTRE, 2019).

2.14.3 Galacto-oligosacarídeo

Pela reação de transgalactosilação de substratos ricos em lactose pela enzima β -galactosidase, popularmente conhecida como lactase, têm-se os galacto-oligosacarídeos (GOS). Estes são um dos principais probióticos pertencentes à classe dos oligossacarídeos (GREENBERG & MAHONEY, 1983; RUSTOM *et al.*, 1998; MARTINS & BURKERT, 2009; BASSETO *et al.*, 2014).

Os GOS são constituídos por moléculas de galactose ligadas à glicose, variando suas estruturas químicas de tri a decassacarídeos com 2 a 9 unidades de galactose (LI *et al.*, 2008). Além disso, podem apresentar distinções na composição, regioquímica, ligação glicosídica e grau de polimerização (FAI & PASTORE, 2015).

A produção deste oligossacarídeo se dá pela reação de transgalactosilação. Contudo, esta reação não é prioritária no processo de ruptura da lactose, e sim, há uma competição entre as duas reações, a transgalactosilação e a hidrólise. Assim, além da formação de GOS, há liberação de monossacarídeos, glicose e galactose ao mosto (TORRES *et al.*, 2010).

Deste modo, o mecanismo da reação de transgalactosilação ocorre em duas etapas, a primeira pela formação do complexo enzima-galactosil com liberação simultânea de glicose. Seguidamente, o complexo anteriormente formado é transferido para um aceptor com grupo hidroxil. Nesta fase, é imprescindível ao processo que a concentração de lactose seja elevada, uma vez que, caso isso não ocorra, a molécula de água será favorecida como aceptor, advindo então a liberação de galactose e não de GOS (TORRES *et al.*, 2010; GOSLING *et al.*, 2011).

Nesta vertente, têm-se oligossacarídeos (probióticos), como fibras não digeríveis, que podem ser encontrados naturalmente em alimentos, tais como leite, mel, frutas ou ainda, ser obtido de modo enzimático, reação química ou fermentação microbiana (MUSSATO & MANCILHA, 2007; JOVANOVIC-MALINOVSKA *et al.*, 2014; DWIVEDI *et al.*, 2014; GARCÍA-CAYUELA *et al.*, 2013; FAI & PASTORE, 2015).

De acordo com alguns estudos (MUSSATO & MANCILHA, 2007; JOVANOVIC-MALINOVSKA *et al.*, 2014; DWIVEDI *et al.*, 2014; GARCÍA-CAYUELA *et al.*, 2013; FAI & PASTORE, 2015), dentre os prebióticos, os GOS têm se destacado ao vislumbrarem aplicações industriais.

2.14.3.1 Pesquisas relacionadas à obtenção de galacto-oligossacarídeo

PADILLA *et al.* (2015) utilizaram permeado de soro de queijo desproteínizado para a obtenção de oligossacarídeos de lactose, pela isomerização de transgalactosilação a partir da enzima β -galactosidase oriunda de *K. lactis*. Os resultados evidenciaram a produção de 50 g 100 g⁻¹ de carboidratos totais, correspondendo a 322 g de prebióticos por kg de PSQD em 6 h de reação, a 50 °C, pH 6,5 e PSQD 250 g L⁻¹. Este potencial de biotransformação aguçou o interesse da indústria alimentar, diante da disponibilidade de aplicabilidade do permeado na formação de novos produtos.

HUGO *et al.* (2016) estudaram a obtenção de biomassa microbiana de *Lactobacillus plantarum*, pela bioconversão do PSQD em galacto-oligossacarídeos como meio de cultivo, a 37 °C, pH 4,5, 150 rpm e 10 g enzima do tipo β -galactosidase. Os autores constataram como eficiente a produtividade de proteína celular empregando este subproduto e a bactéria não patogênica, destacando a maior produção de 27,40 g por cada 100 g de lactose.

A produção de GOS também foi estudada a partir da hidrólise da lactose do soro de leite utilizando a β -galactosidase (origem da *K. lactis*) na forma imobilizada por VASILEVA *et al.* (2016). Os autores obtiveram atividade enzimática de 13,6 U em processo hidrolítico a 40 °C, pH 6,8 e 10 h e concluíram que a reação hidrolítica na condição imobilizada foi 16 vezes mais eficiente ao comparar com a hidrólise enzimática tradicional.

PASSOS (2018) estudou a produção de simbiótico, constituído por galacto-oligosacarídeo (GOS) e *S. boulardii*, utilizando o resíduo lácteo PSQD como matéria-prima, a partir de processo combinado de hidrólise e fermentação. Nesta pesquisa, o autor constatou que a melhor condição para produção tanto de GOS (262,13 g L⁻¹) quanto de crescimento celular (2,50.10⁸ células viáveis mL⁻¹) foi na condição de 29 °C, 0,055 % de enzima lactase oriunda do fungo *Aspergillus oryzae*, 350 g L⁻¹ de lactose, pH 5,5, triptona de soja, aeração e agitação como modo de inserção de oxigênio e adição da levedura probiótica após 6 h de hidrólise.

VERA *et al.* (2020) indicaram que a enzima β-galactosidase tem destaque entre as enzimas com aplicação industrial. Seu principal uso está relacionado à produção de lactose baixa, ausência de lactose ou produtos lácteos. Na atualidade, tem sido empregada como catalisador nas reações de transgalactosilação, auxiliando na síntese de oligossacarídeos de alto valor agregado.

Para tanto, salienta-se o potencial para produção de GOS a partir de um subproduto industrial de baixo valor agregado, o PSQD.

SEÇÃO V - ESTADO DA ARTE

2.15 Biorrefinaria - Motivação e concepção

O bioetanol emergiu nos últimos anos como uma questão de extrema importância na política energética em todo o mundo. Veio para atender à crescente demanda de energia e economia sustentável, que vem sendo exigida pelos mais diversos órgãos governamentais como FAO, USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), ODS (Objetivos de Desenvolvimento Sustentável) e *Bioeconomy Program for Europe*. Atualmente, a produção de bioetanol é um processo energeticamente eficiente, pesquisas adicionais estão em andamento para melhorar sua viabilidade econômica a longo prazo (MOHANTY *et al.*, 2019).

Hoje, mais de 99% de todos os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de culturas comestíveis. No entanto, a viabilidade a longo prazo desses combustíveis é questionável, devido a fatores como: (1) o uso de matéria-prima otimizada para produção de alimentos, e não para produção de energia,

resultando em concorrência direta com o suprimento de alimentos; (2) aumento dos preços de certas culturas e alimentos devido à rápida expansão da produção global de biocombustíveis e, em troca, ao aumento dos custos para a produção de biocombustíveis; e (3) a utilização de apenas uma parte da biomassa total da planta para a produção de biocombustível, o que resulta em desperdício, ou seja, a ineficiência no uso da terra e ineficácia de energia e/ou geração de gases de efeito estufa desnecessários (TO *et al.*, 2014).

A poluição ambiental, a geração de resíduos e a utilização de combustíveis fósseis têm feito a sociedade repensar e buscar por alternativas de produção, tecnologias e inovação tecnológicas com a premissa de aplicar os recursos de maneira consciente, sustentável e integrada.

Assim, com novos estudos a definição de biorrefinaria antes quase que exclusiva de bioetanol de segunda geração, ou seja, oriunda de biomassas agroindustriais, passou por evoluções e tomou novas formas e inclusões de conceitos, e para DRAGONE *et al.* (2020) hoje as biorrefinarias almejam a valorização dos processos pelas inovações e estratégias em um amplo espectro de produtos, para a implementação de economia sustentável, ambientalmente amigáveis e economicamente viáveis a partir de biotransformações visando escala industrial.

O desenho de conceitos integrados de biorrefinaria busca uma abordagem consolidada para valorizar todos os possíveis fluxos de resíduos e subprodutos sob o conceito de economia circular, e não somente mais biomassas, mas sim qualquer tipo de resíduos que possa ser biotransformado. De acordo com isso, é pré-requisito para direcionar a formulação de vários produtos em uma única vez para garantir processos sustentáveis (LAPPA *et al.*, 2019).

Subprodutos e resíduos agroindustriais podem ser transformados em compostos valiosos em biorrefinarias. Em trabalho recente publicado em 27 de abril de 2020, PENDÓN *et al.* (2020) apresentaram como alternativa promissora a produção de bioetanol combustível, proteína de soro de leite e leveduras probióticas a partir de soro de queijo. Uma triagem inicial em condições industrialmente relevantes, envolvendo trinta cepas de *Kluyveromyces marxianus*, foi realizada usando ensaios pontuais para avaliar sua capacidade de crescer em soro de queijo ou em soro de leite permeado. Quatro linhagens de *K. marxianus* apresentaram melhor crescimento e foram selecionadas e posteriormente

avaliadas em um processo de fermentação industrial em “miniatura”, usando permeado de soro de queijo reconstituído (com reciclagem de células). Após cinco ciclos consecutivos de fermentação, o rendimento de bioetanol atingiu 90 % do máximo teórico nos melhores casos, com viabilidade celular de 90 %. As células colhidas neste momento apresentaram propriedades probióticas, como capacidade de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e capacidade para modular a resposta imune inata do epitélio intestinal, ambas *in vitro*. Além disso, a cepa CIDCA 9121 foi capaz de proteger contra danos histopatológicos em um modelo animal de colite aguda. As descobertas da equipe demonstram que *K. marxianus* CIDCA 9121 foi capaz de fermentar eficientemente a lactose presente no PSQD em bioetanol e que a biomassa de levedura residual possui propriedades probióticas, permitindo um processo integrado para a obtenção de proteínas de soro de leite, biocombustível e probióticos.

HAN *et al.* (2019) avaliaram a produção de biocombustíveis, produtos químicos e nutracêuticos de forma sustentável a partir de fontes renováveis por vias biológicas. Os autores indicaram que a inovação da atualidade é compreender o metabolismo celular e os ciclos bioquímicos dos microrganismos, viabilizando assim, os bioprocessos e reações de hidrólise de modo sustentável. Contudo, salientaram a necessidade de estudos a cerca deste fato, destacando a escassez de estudos relacionados ao metabolismo microbiano.

Buscando um processo autossustentável, HE *et al.* (2019) estudaram o emprego de suínos doentes como substrato para fermentação anaeróbica na produção de biohidrogênio e biometano. Com o estudo, os autores concluíram que a concentração de enzima e o pH influenciaram diretamente no rendimento máximo de produção, indicando que o biohidrogênio pode ser produzido em maiores concentrações a ser comparado com o biometano no substrato avaliado.

HUA *et al.* (2018) produziram ácido glicólico por biocatálise de etileno glicol pela ação de *Gluconabcter oxydans*. A aplicabilidade deste substrato se deu por se tratar de um material biodegradável por polímeros e com alta qualidade. A bioprodução foi considerada promissora devido à redução dos impactos ambientais e benefícios do uso desta matéria-prima, pois a tecnologia integrada apresentou-se com viabilidade e eficiência na bioprodução em escala industrial.

Nesta perspectiva de biorrefinaria e processo sustentável, uma das preocupações é com os resíduos da indústria láctea. LAPPA *et al.* (2019)

exploraram a utilização do soro de leite em sua totalidade pela integração de biorrefinaria e transição da economia circular, implementando um bioprocesso sustentável e sem geração de resíduos, para a conversão de soro de leite em produtos de alto valor agregado.

Um estudo recente (BEKATOROU *et al.*, 2019) relatou a produção fermentativa de celulose bacteriana (BC) usando fluxos excedentes de acabamento de groselha coríntia com alto teor de antioxidantes e açúcar, via adição de fontes de nitrogênio e soro de queijo (SFC). Metodologia da superfície de resposta foi utilizada para avaliar as condições de produção de BC para misturas de SFC, e os autores concluíram que os resultados ótimos foram alcançados com 50,4 % de permeado de soro de queijo e 1,7 % de levedura, a pH 6,36. O produto poderia ser indicado como ingrediente para formular alimentos com potenciais efeitos prebióticos, melhorando assim a funcionalidade do produto final, não havendo assim, desperdício nas cadeias alimentares.

É notável que, processos sustentáveis a partir de matérias-primas lácteas na biotransformação e industrialização de novos produtos com valor comercial são possíveis de serem implementados e são rentáveis, de modo a disponibilizar, no mercado, produtos diversificados (MAESTRE, 2018; MAESTRE, 2019). O conceito de economia circular, que idealmente permite a reintrodução de componentes alimentares de base biológica produzidos na cadeia alimentar, empreendendo em novas abordagens para o desenvolvimento de biorrefinaria, considerando também os pilares fundamentais da economia, sociedade, e meio ambiente, ou seja, em, um processo completo em que o permeado soro de queijo desproteínizado é o protagonista e pode justamente compactuar para a produção destes produtos diversificados, resultando na produção de bioetanol, pré (GOS), probióticos (levedura) e simbióticos (GOS e levedura), SPC, levedura *in natura*, lisada, inativada etc., na formulação de suplementos nutricionais, alimentos ou agentes de encapsulação com maior inclusão nos alimentos tanto para humanos quanto animais, o que faz com que ao final os produtos gerados tenham maior valor econômico, que o permeado de soro de queijo bruto.

2.16 Justificativa da pesquisa

Devido ao potencial de aplicações da levedura *K. marxianus* em matérias-primas lácteas, salienta-se que a inovação desta pesquisa consiste no uso de tecnologia integrada, pois não há relatos na literatura referente à produção destes produtos (bioetanol, ácidos orgânicos, biomassa microbiana e galacto-oligosacarídeo) em um mesmo bioprocessos, destacando apenas a bioconversão na formação de bioetanol e biomassa por esta levedura.

Cabe ressaltar que a matéria-prima utilizada é um subproduto de baixo valor agregado e com irrisória aplicabilidade comercial. Para tanto, o desenvolvimento de bioconversões disponibiliza novos nichos ao mercado, possibilitando ampliação do portfólio de produtos industriais, bem como, das indústrias já existentes, gerando empregos e participando do novo modelo preconizado pela sociedade para o segmento industrial. Este modelo visa o desenvolvimento de processos autossustentáveis, com emissão zero de resíduos, denominados por processos *eco-friendly*, no qual, a matéria-prima é aplicada de forma íntegra nos diversos sistemas de biotransformação, constituindo assim, uma biorrefinaria pelos potenciais de aplicações.

Além disso, esta pesquisa compactua com o que foi preconizado pelo Brasil ao que refere-se ao comprometimento em reduzir as emissões domésticas de gases de efeito estufa em 37 % até 2025 e em 43 % até 2030, com base nos níveis de 2005, aumentando a produção de combustíveis renováveis.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo é composto por quatro seções, sendo que na primeira seção (I), estão dispostos os procedimentos empregados na execução da parte experimental (processos fermentativos) para ambos os planejamentos experimentais.

Já a segunda seção (II) dispõe os dois delineamentos experimentais, com as melhores condições processuais para a produção de bioetanol e dos demais produtos de interesse (ácidos orgânicos, biomassa microbiana e galacto-oligosacarídeo).

Na terceira seção (III), são apresentadas as técnicas, metodologias, equipamentos e materiais necessários para a concretização da pesquisa. E, por fim, a quarta seção (IV) exhibe o processo de modelagem matemática para os planejamentos experimentais da seção (II).

O desenvolvimento da pesquisa se deu no Laboratório de Engenharias Sustentáveis: Bioprocessos, Separação e Catálise na Unioeste, Campus Toledo-Paraná.

SEÇÃO I – PROCESSOS FERMENTATIVOS

3.1 Substrato

O substrato empregado nesta pesquisa foi o permeado de soro de queijo desproteínizado em pó (embalagens de 1 kg), o qual foi doado gentilmente pela empresa Sooro Renner Nutrição S.A., localizada na cidade de Marechal Cândido Rondon, Oeste do Paraná. A empresa disponibilizou a especificação técnica do produto, conforme Anexo A.

3.1.1 Caracterização elementar do permeado de soro de queijo desproteínizado em pó

A caracterização elementar do teor de minerais, como cálcio, magnésio, potássio e sódio, do permeado do soro de queijo foi realizada em equipamento de Espectrometria por emissão atômica por Plasma Acoplado por Indução (ICP-OES) marca *Thermo Scientific*, modelo ICAP-3600-DUO. O método de digestão foi efetuado por aquecimento em chapa aquecedora com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio conforme disposto por JIMÉNEZ-AGUILAR & GRUSAK (2015), no laboratório de físico-química da Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNDETEC), da cidade de Cascavel, região Oeste do Paraná.

A concentração dos demais elementos químicos presentes no PSQD foi determinada a partir da técnica analítica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF), a partir de uma fonte de molibdênio incidindo raios X sobre a amostra com energia de 20 keV durante 500 s, utilizando o equipamento marca Bruker, modelo S2 PICOFOX no laboratório de análises analíticas do Grupo de Pesquisa em Engenharia Química da Unioeste de Toledo, conforme ESPINOZA-QUIÑONES *et al.* (2015).

3.1.2 Caracterização do permeado de soro de queijo desproteínizado em pó quanto à demanda química e bioquímica de oxigênio

As análises de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) foram desenvolvidas no laboratório de Limnologia Aplicada, do Grupo de Pesquisa em Recursos Pesqueiros e Limnologia (GERPEL) da Unioeste, Campus de Toledo-PR, seguindo a metodologia APHA (2005).

Para a quantificação da DBO e DQO, o permeado em pó foi solubilizado na concentração de 100 g L⁻¹, enquanto para o permeado líquido não houve diluição (este permeado foi empregado na caracterização, a título de comparação quanto à DBO e DQO para o subproduto líquido e em pó).

3.2 Microrganismo fermentativo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus*, CCT 4086, Referência ATCC 46537, a qual foi doada pela indústria empresa Sooro Renner Nutrição S.A., oriunda da Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosello, e encontrava-se na forma liofilizada.

3.3 Produção de bioetanol e demais produtos de interesse

Para a produção de bioetanol, ácidos orgânicos, biomassa microbiana e galacto-oligosacarídeo se faz necessária a ativação celular, seguida de três etapas correspondentes às condições dos meios de cultura, sendo estas, pré-inóculo, inóculo e, por fim, o cultivo em diferentes condições processuais.

3.3.1 Ativação celular

A *Kluyveromyces marxianus* foi obtida na forma liofilizada, sendo ativada em meio de cultura ágar de extrato de malte de levedura (*yeast malt extract agar* - YMA) adaptado, composto por 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ de peptona de carne e 10 g L⁻¹ de dextrose, baseado nas orientações do fabricante.

O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Após este procedimento, inoculou-se duas alçadas da levedura *K. marxianus* no meio YMA. Posteriormente, o meio foi acondicionado em incubadora orbital do tipo *shaker* da marca *New Lab*, modelo NL 161-04 a 100 rpm, na temperatura de 30 °C por 24 h.

3.3.1.1 Manutenção celular

A levedura foi preservada pelo método de repique em tubos inclinados, com composição idêntica ao meio de cultura YMA acrescidos de 20 g L⁻¹ de ágar, a 30°C por 48 h em estufa de crescimento microbiológico. Por conseguinte, os tubos foram armazenados em refrigeradora em temperatura de 4°C. Repiques periódicos foram realizados em média a cada 45 dias.

3.3.2 Preparo do pré-inóculo

O meio de cultura denominado de pré-inóculo foi elaborado em frasco de Erlenmeyer de 500 mL previamente autoclavado (a 121 °C por 15 min), com volume de meio correspondente a 250 mL, constituído pelos mesmos nutrientes e condições experimentais utilizados na etapa de ativação celular (item 3.3.1). O meio foi acondicionado em *shaker* por aproximadamente 18 h ou até atingir $2 \cdot 10^8$ número de células viáveis mL⁻¹.

3.3.3 Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados com o intuito de eliminar o período de adaptação dos microrganismos ao meio de cultivo (fase *lag*) (CARVALHO & SATO, 2001) para produção de bioetanol e demais produtos. Para tanto, os inóculos foram elaborados em condições semelhantes às que foram utilizadas durante os ensaios fermentativos do item 3.3.4, e compostas pelos nutrientes dos itens 3.3.3.1 e 3.3.3.2.

O PSQD em pó passou por um processo de redução de contaminantes microbiológicos, sendo que este não deve ser inferior a uma pasteurização (MAESTRE, 2018; MAESTRE, 2019). Assim, o permeado foi pasteurizado pelo processo lento a 65° C por 30 min (BRASIL, 2002), em estufa de secagem e esterilização marca Nova Instruments, modelo NI 1514, conforme metodologia de PARRONDO *et al.* (2003); MAESTRE (2017); MAESTRE (2018); MAESTRE (2019).

O meio do inóculo foi previamente esterilizado em autoclave por 15 min a 121 °C, e o pH foi ajustado para 6,0, utilizando soluções de ácido clorídrico 0,1 N e hidróxido de sódio 0,1 N. Na sequência, de acordo com CARVALHO & SATO (2001), foram adicionados ao inóculo 30 mL de pré-inóculo que corresponde a 10 % do volume total do inóculo, sendo incubado com agitação orbital de 100 rpm a 30 °C, por aproximadamente 12 h ou até atingir $1,15 \cdot 10^8$ número de células viáveis mL⁻¹.

3.3.3.1 Composição nutricional do inóculo - Planejamento experimental fatorial 2³

De acordo com estudo de MAESTRE (2017), foi preparado o meio do inóculo constituído por 6 g L⁻¹ de ureia ((NH₂)₂CO), 1,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄), 1,5 g L⁻¹ de fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄) e 6 g L⁻¹ de extrato de levedura, acrescido de aproximadamente 88 g L⁻¹ de lactose oriunda do permeado de soro de queijo desproteínizado.

3.3.3.2 Composição nutricional do inóculo – Delineamento composto central rotacional

O volume de meio preparado para o inóculo foi de 270 mL. Os meios foram compostos por aproximadamente 88 g L⁻¹ de lactose (permeado), e nutrientes adicionais: 1,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄), 1,5 g L⁻¹ de fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄) e 12 g L⁻¹ de extrato de levedura, baseado no estudo de MAESTRE (2017).

3.3.4 Cultivos nas condições processuais

Os cultivos foram desenvolvidos em reatores de vidro com volume útil de 3 L. A tampa do reator contém dois orifícios na parte superior, um para a coleta de amostras por meio de uma seringa acoplada em mangueira de silicone, e outro orifício para alívio da pressão interna do reator.

Os reatores apresentavam volume de 1800 mL de meio a fermentar, com concentração de lactose, temperatura e pH definidos pelos níveis dos planejamentos experimentais (seção II).

Para iniciar os cultivos, fez-se a adição de 10 % do volume total (CARVALHO & SATO, 2001) a ser fermentado (2000 mL) de inóculo (200 mL) contendo a levedura *K. marxianus*.

Durante os processos fermentativos, fez-se o acompanhamento das cinéticas pela determinação do pH, biomassa microbiana (número de células viáveis), proteína microbiana, consumo do substrato, quantificação de bioetanol, ácidos orgânicos e galacto-oligosacarídeo, em tempos pré-estabelecidos.

3.3.4.1 Planejamento experimental fatorial 2³

As fermentações foram preparadas com concentrações variáveis de lactose, e enriquecida com sais, 6 g L⁻¹ de ureia ((NH₂)₂CO), 1,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄), 1,5 g L⁻¹ de fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄) e 6 g L⁻¹ de extrato de levedura, sem adição de oxigênio dissolvido, incubados a 100 rpm, por 45 h (MAESTRE, 2017).

3.3.4.2 Delineamento composto central rotacional

Os meios de cultivos foram elaborados baseados em estudos de HULL *et al.*, (2014) e MAESTRE (2017), os quais eram composto por 12 g L⁻¹ de extrato de levedura, 1,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio, 1,5 g L⁻¹ de fosfato monobásico de potássio e 6 gotas de soro de queijo (para complementar a suplementação nutricional). Houve adição de oxigênio (1 vvm) conforme HULL *et al.* (2014). Os cultivos foram incubados em agitação orbital a 100 rpm por 58 h.

SEÇÃO II – DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4 Planejamento experimental fatorial 2³

O planejamento experimental fatorial 2³ com triplicata no ponto central foi desenvolvido por MAESTRE (2017), para avaliar a influência das seguintes variáveis: temperatura (X₁), pH (X₂) e concentração de lactose (X₃), para a variável resposta bioetanol. As amostras foram armazenadas e melhor analisadas quanto à concentração de bioetanol. Quatro ensaios foram repetidos (5, 6, 7 e 8) e novos produtos formados durante os processos fermentativos, os quais não haviam sido quantificados na etapa do mestrado, foram avaliados, além disso também foi analisado o comportamento da concentração de lactose presente no permeado. Isto, se fez necessário, pois estes dados foram utilizados na etapa posterior de modelagem e otimização do processo. Os níveis e valores reais das variáveis

averiguadas no planejamento fatorial 2^3 estão dispostos nas Tabelas 3.1 e 3.2, respectivamente. Em que, possui como variáveis de resposta a concentração de bioetanol (g L^{-1} , v/v) (Y_1) e biomassa celular (g L^{-1}) (Y_2), e os interceptos, representam a Equação do modelo polinomial (3.1), obtidos a partir das variáveis reais durante a análise estatística realizada pelo *Software STATISTICA*TM (versão 7.0, Statsoft, Inc.).

Tabela 3.1 - Especificação dos níveis e valores reais das variáveis empregadas no planejamento experimental fatorial 2^3 para a levedura *K. marxianus* CCT 4086

| Variáveis | Unidades | Código | Níveis | | |
|-------------|-----------------------|--------|--------|-----|-----|
| | | | -1 | 0 | +1 |
| Temperatura | (°C) | X_1 | 29 | 37 | 45 |
| pH | | X_2 | 4,5 | 5,5 | 6,5 |
| Lactose | (g L^{-1}) | X_3 | 88 | 176 | 264 |

Tabela 3.2 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 para a levedura *K. marxianus* CCT 4086, com valores reais e codificados para suas variáveis

| Variáveis | Codificadas | | | Reais | | |
|-----------|-------------|-------------|----|---------|------------------|-----|
| | Ensaio | Temperatura | pH | Lactose | Temperatura (°C) | pH |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 29 | 4,5 | 88 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | 45 | 4,5 | 88 |
| 3 | -1 | +1 | +1 | 29 | 6,5 | 88 |
| 4 | +1 | +1 | +1 | 45 | 6,5 | 88 |
| 5 | -1 | -1 | -1 | 29 | 4,5 | 264 |
| 6 | +1 | -1 | -1 | 45 | 4,5 | 264 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | 29 | 6,5 | 264 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | 45 | 6,5 | 264 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 37 | 5,5 | 176 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 37 | 5,5 | 176 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 37 | 5,5 | 176 |

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4 X_1:X_2 + b_5 X_1:X_3 + b_6 X_2:X_3 \quad \text{Eq. (3.1)}$$

3.5 Delineamento composto central rotacional

De acordo com os resultados obtidos pelo planejamento experimental do item 3.4, elaborou-se um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) para as variáveis temperatura (X_4) e pH (X_5), com quatro pontos fatoriais (níveis ± 1), três pontos centrais (nível 0) e quatro pontos axiais (níveis $\pm\sqrt{2}$), totalizando 11 experimentos. Este planejamento objetivou determinar qual das variáveis independentes, temperatura (X_4) e pH (X_5), influenciariam o processo de produção de bioetanol e demais produtos, sendo o

bioetanol a variável resposta principal. Os níveis e variáveis foram determinadas a partir dos dados da superfície de resposta obtidas pelo planejamento experimental fatorial 2³ e estudo de HULL *et al.* (2014) além de análise da ficha técnica da levedura em estudo.

Os níveis e valores reais das variáveis utilizadas no planejamento experimental para a levedura *K. marxianus* estão dispostos nas Tabelas 3.3 e 3.4, respectivamente. Salienta-se que a concentração de lactose foi fixada em 88 g L⁻¹ para todos os ensaios fermentativos. Sendo que variável resposta a concentração de bioetanol (g L⁻¹, v/v) (Y₃) e os interceptos estão representados na Equação (3.2), obtidos pelo *Software* STATISTICA™ (versão 7.0, Statsoft, Inc.) a partir das variáveis reais.

Tabela 3.3: Especificação dos níveis e valores reais das variáveis empregadas no delineamento composto central rotacional para a levedura *K marxianus* CCT 4086

| Variáveis | Unidades | Código | Níveis | | | | |
|-------------|----------|----------------|--------|------|-----|------|-------|
| | | | -1,41 | -1 | 0 | +1 | +1,41 |
| Temperatura | (°C) | X ₄ | 20 | 22,9 | 30 | 37,1 | 40 |
| pH | | X ₅ | 2,5 | 2,8 | 3,5 | 4,2 | 4,5 |

Tabela 3.4 - Matriz do delineamento composto central rotacional com valores reais e codificados para suas variáveis para a levedura *K marxianus* CCT 4086

| Variáveis | Codificados | | Reais | |
|-----------|-------------|-------------|-------|------------------|
| | Ensaio | Temperatura | pH | Temperatura (°C) |
| 12 | -1 | -1 | 22,9 | 2,8 |
| 13 | 1 | -1 | 37,1 | 2,8 |
| 14 | -1 | 1 | 22,9 | 4,2 |
| 15 | 1 | 1 | 37,1 | 4,2 |
| 16 | -1,41 | 0 | 20 | 3,5 |
| 17 | +1,41 | 0 | 40 | 3,5 |
| 18 | 0 | -1,41 | 30 | 2,5 |
| 19 | 0 | +1,41 | 30 | 4,5 |
| 20 | 0 | 0 | 30 | 3,5 |
| 21 | 0 | 0 | 30 | 3,5 |
| 22 | 0 | 0 | 30 | 3,5 |

$$Y = b_0 + b_1X_4 + b_2X_5 + b_{11}X_4^2 + b_{11}X_5^2 + b_{12}X_4:X_5 \quad \text{Eq. (3.2)}$$

3.6 Análise estatística

Os resultados de bioetanol e biomassa celular dos planejamentos experimentais foram avaliados a partir do *Software* STATISTICA™ (versão 7.0, Statsoft, Inc.). Dessa forma, calcularam - se os principais efeitos das variáveis estudadas e suas interações, validação do modelo ao nível de 10 % de significância para o planejamento fatorial 2³ e 5 % para o DCCR, análise de variância (ANOVA) e teste F (BARROS *et al.*, 2010; RODRIGUES & IEMMA, 2014).

SEÇÃO III – METODOLOGIAS ANALÍTICAS

3.7 Amostragem

Para o planejamento experimental fatorial 2³, as amostras foram coletadas desde o início das fermentações em intervalos de 2,5 em 2,5 h até completar 15 h. Seguidamente, foram retiradas amostras em intervalos de 4 h até 45 h. Para os cultivos do DCCR, amostras foram coletadas desde o início das fermentações, em intervalos de 3 h até completar 15 h, após este período, coletou-se amostras a cada 6 h até completar 58 h de cultivo.

Em cada amostragem, foi coletado um volume de 15 mL para posterior análises, a distribuição do volume foi realizada da seguinte forma, 5 mL para leitura de absorbância, pH e contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, 5 mL foram centrifugados a 14000 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante separado do precipitado. O sobrenadante foi então armazenado em tubos do tipo eppendorf com capacidade de 1,5 mL em freezer à temperatura de -10 °C para posterior análise do consumo do substrato lactose (glicose e galactose) e quantificação dos produtos de interesse.

3.8 Determinações analíticas

3.8.1 Bioetanol e ácidos orgânicos

Para quantificar a produção de bioetanol e outros ácidos orgânicos, utilizou-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), aplicando a metodologia baseada em estudos realizados por SANTOS (2013) e EL-IMAM *et al.* (2019), além de orientações do fabricante.

O equipamento utilizado foi o Cromatógrafo Shimadzu® Proeminence com coluna Rezex ROA-Ácido orgânico H⁺ (8 %) (250 mm x 4,6 mm), forno CTO-20A a temperatura de 40 °C, bomba LC-20AT, controlador CBM-20^a e detector por índice de refração RID-10^a. A operação se deu com fase móvel de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,005 mol L⁻¹ em fluxo de 0,8 mL min⁻¹, e volume de injeção de 20 µL. Os dados foram obtidos pelo *Software LS Solutions*. Para a determinação do bioetanol, construiu-se uma curva padrão com soluções de etanol conhecidas de 5 a 100 g L⁻¹ e ácidos orgânicos na faixa de concentrações de 0,02 a 1,00 g L⁻¹. Estas curvas padrões estão disponíveis no Apêndice A. Os reagentes utilizados foram etanol e ácidos orgânicos: acético, propiônico, valérico, láctico, fórmico e butírico grau HPLC de alta pureza >99 % (Sigma Aldrich).

As quantificações foram realizadas no laboratório de Cromatografia do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola do Campus Cascavel da Unioeste.

3.8.2 Consumo de substrato

O consumo do substrato lactose e dos monossacarídeos (glicose e galactose) foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), pelo laboratório de Cromatografia do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola-Cascavel. O equipamento utilizado foi o Cromatógrafo Shimadzu® Proeminence com coluna Rezex RSO – OLIGOSSACARIDEO Ag⁺ (4 %) (200 x 10 mm) com um fluxo de 0,3 mL min⁻¹ de água degaseificada a 75 °C, injetando-se 20 µL de amostra, detectadas por índice de refração. Os dados foram adquiridos pelo *Software LS Solutions*.

Os carboidratos foram quantificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões de glicose, galactose e lactose, sendo que foram obtidas equações lineares para cada um dos padrões, por meio de curva padrão com soluções conhecidas de 5 a 295 g L⁻¹. A análise foi desenvolvida conforme metodologia adaptada de ZIMMER *et al.* (2017) e ficha técnica da coluna (Anexo B). Para a avaliação dos resultados, fez-se necessário à utilização de curvas padrões de lactose (glicose e galactose) preparadas com reagente de alta pureza >99,9 % (Sigma Aldrich), as quais encontram-se no Apêndice B.

Com a finalidade da confirmação do perfil de consumo do substrato de todos os pontos fermentativos, realizou-se a quantificação da lactose pelos açúcares redutores pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) em triplicata, seguindo a metodologia de MILLER (1959), conforme metodologia apresentada no Anexo C e curva padrão disponível no Apêndice C.

3.8.2.1 Consumo de glicose

A concentração de glicose foi verificada pelo Kit de Glicose PP, método enzimático-colorimétrico (Trinder), marca Gold Analisa, conforme descrito no Anexo D, sendo que a análise foi realizada em triplicata.

3.8.3 Biomassa microbiana

A biomassa microbiana foi determinada por meio da curva de correlação entre os métodos de espectrofotometria UV-VIS e concentração celular, conforme metodologia de MULLER (2006); MULLER *et al.* (2007) e MAESTRE (2017), a qual está disponível no Anexo E.

Com os valores de concentração microbiana e leitura de densidade óptica obtidos, plotou-se a curva de correlação, a qual gerou uma equação linear. Esta equação foi utilizada para estimar os valores de concentração celular (g L⁻¹) ao longo do tempo de cultivo a partir da leitura da densidade óptica realizada em cada amostragem. Para a quantificação da biomassa celular, aplicou-se a curva de correlação que encontra-se disposta no Apêndice D.

3.8.4 Concentração de GOS total

A concentração de GOS total foi estimada conforme proposto por GOSLING *et al.* (2011), pela Equação 3.3.

$$C_{GOS} = C_{Lactose\ inicial} - C_{lactose} - C_{glicose} - C_{galactose} \quad \text{Eq. (3.3)}$$

Em que C representa a concentração de GOS, lactose inicial, lactose, glicose e galactose (g L^{-1}).

3.8.5 Número de células viáveis

Para quantificar o número de células viáveis, utilizou-se a metodologia adaptada da Sociedade Americana de de Químicos Cervejeiros (*American Society of Brewing Chemists* - ASBC, 1988). Para tanto, empregou-se um microscópio marca OPTON, modelo TNE-01B-INF-LED, posicionado na objetiva de 40, ajustando aumento de 400x e câmara de Neubauer da marca KASVI modelo Neubauer Improved Bright-Line 0,0025 mm^2 .

As células vivas foram identificadas com a coloração azul através da adição do corante azul de metileno a 1 % em sua parede celular. A amostra foi preparada com um volume de 0,1 mL (forma homogeneizada), 0,1 mL de solução de azul de metileno (corante) e adicionou-se água destilada para diluir a amostra, de acordo com a concentração celular. Fez-se a distribuição da amostra de forma equivalente sobre a câmara de Neubauer.

A partir disso, com o intuito de obter o número de células em 1mm^2 , contaram-se cinco quadrados na diagonal da área demarcada da câmara de Neubauer. Elaborou-se uma curva a partir das contagens representando-a na forma logarítmica $\ln(N/N_0)$, em que, N_0 é a contagem do número de células viáveis (NCV) no tempo zero (mL^{-1}) e N é a contagem no tempo t . O número de células viáveis foi determinado pela Equação (3.4).

$$NCV = N \times 5 \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \quad \text{Eq. (3.4)}$$

3.8.6 Consumo de elementos químicos por TXRF

O perfil da concentração dos elementos químicos presentes no melhor meio de cultivo, foi quantificado durante a cinética pela técnica analítica do TXRF, conforme metodologia ESPINOZA-QUIÑONES *et al.* (2015).

3.8.7 Determinação do pH

O valor de potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado em um pHmetro portátil devidamente calibrado marca Akso, modelo AK 103 com eletrodo de vidro, conforme metodologia de LUTZ (2008).

3.8.8 Monitoramento do oxigênio dissolvido

O oxigênio dissolvido foi monitorado com medidor de oxigênio dissolvido portátil marca HANNA, modelo HI 9146, com sonda de 4 m, conforme orientação do fabricante, com o intuito de manter constante a adição de oxigênio dissolvido ao meio de cultivo.

3.8.9 Proteína microbiana

A proteína solúvel microbiana foi determinada pelo método colorimétrico de LOWRY *et al.* (1951).

SEÇÃO IV – MODELAGEM MATEMÁTICA

3.9 Tratamento de dados

3.9.1 Velocidade específica de crescimento celular

Os dados experimentais de biomassa celular (X) em função do tempo (t) foram ajustados a um polinômio, por conseguinte, derivou-se esta equação

polinomial, obtendo-se a Equação (3.5). A partir da qual pode se determinar a velocidade específica de crescimento celular (μ) (h^{-1}). E, $\frac{dX}{dt}$ foi calculada na fase exponencial (HISS, 2013; MURARI *et al.*, 2018).

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{Eq. (3.5)}$$

3.9.2 Fatores de conversão

3.9.2.1 Conversão de substrato em célula

Determinou-se o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) (g g^{-1}) a partir da massa de células formada (X) pela massa do substrato consumido (S), baseado na Equação (3.6) (HISS, 2001; HISS, 2013; MURARI *et al.*, 2018).

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

Em que, X_0 é a concentração inicial de biomassa (g L^{-1}), X_f é a concentração final de biomassa (g L^{-1}), S_0 é a a concentração inicial de substrato (g L^{-1}) e S_f é a concentração final de substrato (g L^{-1}).

3.9.2.2 Conversão de produto em célula

O fator de conversão de bioetanol em célula ($Y_{X/P}$) (g g^{-1}) foi obtido conforme Equação (3.7) (HISS, 2001; HISS, 2013).

$$Y_{X/P} = \frac{X_f - X_0}{P_t - P_f} \quad \text{Eq. (3.7)}$$

Sendo, X_0 a concentração inicial de biomassa (g L^{-1}), X_f a concentração final de biomassa (g L^{-1}), P_t a concentração total do produto (g L^{-1}) e P_f a concentração final do produto (g L^{-1}).

3.9.2.3 Conversão de substrato em produto

O fator de conversão de substrato em bioetanol ($Y_{P/S}$) (g g^{-1}) foi obtido a partir do bioetanol produzido no decorrer da fermentação em relação ao substrato consumido, conforme Equação (3.8) (HISS, 2001; HISS, 2013; MURARI *et al.*, 2018).

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Eq. (3.8)}$$

Em que, P é a concentração do produto (g L^{-1}), P_0 é a concentração inicial do produto (g L^{-1}), S_0 é a concentração inicial de substrato (g L^{-1}) e S_f é a concentração final de substrato (g L^{-1}).

3.9.2.4 Produtividade de bioetanol

A produtividade (Q_p) ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) foi determinada pela quantidade de etanol formado durante o período de fermentação, conforme a Equação (3.9) (HISS, 2001; HISS, 2013; MURARI *et al.*, 2018).

$$Q_p = \frac{P - P_0}{t_f} \quad \text{Eq. (3.9)}$$

Sendo, P a concentração do produto (g L^{-1}), P_0 a concentração inicial do produto (g L^{-1}) e t_f o tempo final de fermentação (h).

3.9.2.5 Conversão teórica

A conversão teórica de substrato em bioetanol (n) (%) foi determinada pela Equação (3.10) (HISS, 2001; HISS, 2013; MURARI *et al.*, 2018).

$$n = \frac{(P - P_0)_{100}}{(S_t - S_f)_{0,5368}} \quad \text{Eq. (3.10)}$$

Em que, P é a concentração do produto (g L^{-1}), P_0 a concentração inicial do produto (g L^{-1}), S_t a concentração total de substrato (g L^{-1}), S_f concentração final de substrato (g L^{-1}) e 0,5368 é a conversão de massa.

3.10 Modelagem matemática dos processos fermentativos

Em alguns casos o substrato pode inibir a formação do produto quando em níveis elevados de concentração, nestas condições é necessário usar modelos de inibição pelo substrato, como por exemplo o modelo de EDWARDS (1970) que considera a inibição do crescimento pelo substrato sob o modelo de Monod. E, o modelo de Phisalaphong, que apresenta inibição pelo substrato e produto, também partindo do modelo de Monod. Dessa forma, para o desenvolvimento da modelagem matemática dos cultivos de *K. marxianus* foram avaliados os modelos fenomenológicos de Edwards (EDWARDS, 1970) referentes as Equações (3.11) a (3.13) e PHISALAPHONG *et al.* (2006) conforme as Equações (3.14) a (3.16).

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_{is}}\right)} X \quad \text{Eq. (3.11)}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{v_{\max} \cdot S}{\left(K_{sP} + S + \frac{S^2}{K_{isP}}\right)} \cdot X \quad \text{Eq. (3.12)}$$

$$\frac{dS}{dt} = \left(-\frac{1}{Y_{xs}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{ps}} \cdot \frac{dP}{dt} \right) \quad \text{Eq. (3.13)}$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_{is}}\right)} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{x\max}} \right) \cdot X \quad \text{Eq. (3.14)}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{v_{\max} \cdot S}{\left(K_{sP} + S + \frac{S^2}{K_{isP}}\right)} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{p\max}} \right) \cdot X \quad \text{Eq. (3.15)}$$

$$\frac{dS}{dt} = \left(-\frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{PS}} \cdot \frac{dP}{dt} \right) \quad \text{Eq. (3.16)}$$

Sendo, μ_{\max} taxa de crescimento específico máximo (h^{-1}), S concentração do substrato ($g L^{-1}$), K_S coeficiente de saturação do crescimento celular (constante de Monod) ($g L^{-1}$), K_{IS} coeficiente de inibição pelo substrato no crescimento celular ($g L^{-1}$), X a concentração final de biomassa ($g L^{-1}$), v_{\max} taxa máxima de produção específica de bioetanol (h^{-1}), K_{SP} coeficiente de saturação para a produção de bioetanol ($g L^{-1}$), K_{ISP} coeficiente de inibição pelo substrato na formação de bioetanol ($g L^{-1}$), Y_{XS} fator de conversão de substrato em célula, Y_{PS} fator de conversão de produto em substrato e $P_{p\max}$ termo de inibição pelo bioetanol na produção de bioetanol ($g L^{-1}$).

O modelo de Edwards é uma adaptação do modelo de MONOD (1949), e se diferencia por considerar o efeito de inibição do crescimento de biomassa e produto pelo substrato (K_{SP} e K_{ISP}), não considerando, contudo, os efeitos da fase de morte ou consumo do substrato na manutenção das células (k_d e K_{cm}). Já o modelo de PHISALAPHONG *et al.* (2006) segue os mesmos princípios do modelo de Edwards, pois considera o efeito de inibição do crescimento de biomassa e produto pelo substrato (K_{IS} e K_{ISP}), não identificando os efeitos da fase de morte e nem o consumo do substrato na manutenção celular (K_{cm}). Este modelo diferencia-se por englobar um termo de inibição não competitiva do crescimento pelo produto.

Em função do comportamento experimental observado na cinética de fermentação na qual detectou-se a formação de bioetanol quando não existia substrato disponível e com a redução da população dos microrganismos. O modelo fenomenológico desenvolvido, é apresentado pelas Equações (3.17-3.20).

$$\frac{dP}{dt} = \frac{v_{\max} \cdot S}{(K_{SP} + S + \frac{S^2}{K_{ISP}})} \left(1 - \frac{P}{P_{p\max}} \right) \cdot X \quad \text{Eq. (3.17)}$$

$$\frac{dS}{dt} = \left(-\frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{PS}} \cdot \frac{dP}{dt} \right) \quad \text{Eq. (3.18)}$$

Se $P(t) \leq P_{x\max}$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_{is}}\right)} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{x\max}}\right) \cdot X \quad \text{Eq. (3.19)}$$

Se $P(t) > P_{x\max}$

$$\frac{dX}{dt} = k_d \cdot X \quad \text{Eq. (3.20)}$$

Sendo, μ_{\max} taxa de crescimento específico máximo (h^{-1}), S concentração do substrato ($g L^{-1}$), X a concentração final de biomassa ($g L^{-1}$), K_s coeficiente de saturação do crescimento celular (constante de Monod) ($g L^{-1}$), K_{is} coeficiente de inibição pelo substrato no crescimento celular ($g L^{-1}$), v_{\max} taxa máxima de produção específica de bioetanol (h^{-1}), K_{sP} coeficiente de saturação para a produção de bioetanol ($g L^{-1}$), K_{isP} coeficiente de inibição pelo substrato na formação de bioetanol ($g L^{-1}$), $Y_{x/s}$ fator de conversão de substrato em célula, $Y_{p/s}$ fator de conversão de produto em substrato, $P_{p\max}$ termo de inibição pelo bioetanol na produção de bioetanol ($g L^{-1}$) e k_d de morte celular na fase de morte (h^{-1}).

O novo modelo proposto se baseia no modelo de Phisalaphong, com três novas proposições, sendo estas, a regulação da fase de crescimento *versus* fase de morte; o coeficiente de manutenção celular e a liberação de bioetanol residual.

Propõe-se como início da fase de morte celular o momento que a concentração de bioetanol atinge seu valor crítico, isto é, $P(t) = P_{x\max}$. Divide-se o modelo, então, em dois termos: um, representado conforme Equação (3.8) no modelo de PHISALAPHONG *et al.* (2006), válido do início da fermentação até o instante que o bioetanol atinge sua concentração crítica; outro após este instante, representado por uma taxa constante de morte celular.

O coeficiente de manutenção celular (K_{cm}) representa a quantidade de substrato consumido pela célula para reestabelecer níveis energéticos além da quantidade necessária para crescimento, e já foi utilizado em modelos matemáticos como de ARIYAJAROWONG *et al.* (2016) e TRIGUEROS *et al.* (2016).

A liberação de bioetanol residual, corresponde a liberação do produto bioetanol quando o mesmo encontra-se intracelular (DUTTA, 2008). Assim, o modelo proposto é uma proposição baseada no comportamento do modelo em

comparação aos dados experimentais de bioetanol durante a fase de morte celular, visto que, a cinética não acompanha o crescimento experimental.

3.10.1 Análise e avaliação dos modelos

Os modelos foram estudados a partir do ajuste dos parâmetros cinéticos dos modelos de forma simultânea para os dois conjuntos de dados cinéticos que apresentaram a maior produção de bioetanol. O ajuste empregando um conjunto maior de dados é importante devido ao aumento dos graus de liberdade, além disso, os parâmetros ajustados são mais confiáveis e representam melhor o fenômeno investigado.

Dessa forma, realizou-se o ajuste de parâmetros pela minimização dos quadrados dos desvios entre valores experimentais e teóricos, utilizando o método global de otimização de Nelder-Mead (NELDER & MEAD, 1965), e para a resolução do sistema de equações diferenciais, utilizou-se o método de Rosenbrock (ROSENBROCK, 1963) no *Software Maple 18*® em um microcomputador Asus IntelCore i7, 8GB RAM de memória.

As estimativas iniciais para os parâmetros cinéticos e função objetivo, necessárias para efetuar o ajuste, foram construídas baseadas em uma sequência de considerações e análises. Assim, os valores de P_{xmax} e P_{pmax} foram obtidos a partir da análise gráfica dos dados experimentais de biomassa e produto, e definiu-se como estimativa inicial o valor da concentração de bioetanol, em que a respectiva curva de crescimento muda sua concavidade.

Os parâmetros de velocidade de crescimento celular e de produto (μ_{max} , K_S , v_{max} e K_{sP}) foram obtidos através de regressão linear do gráfico de Lineweaver–Burk pelas estimativas iniciais (corrigir), neste caso, pode ser utilizado a linearização, construído através da linearização da equação de Monod, apresentada na Equação Eq. (3.21):

$$\frac{X}{\frac{dX}{dt}} = \frac{K_S}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad \text{Eq. (3.21)}$$

Essa avaliação (Equação 3.21) desconsidera os termos de inibição de substrato (K_{is} e K_{isP}) e produto (P_{xmax} e P_{pmax}) dos modelos. Portanto, com

intuito de minimizar os erros na estimativa pelos efeitos de inibição, a determinação dos parâmetros foi realizado com os dados experimentais do Ensaio 1, que possui menor concentração de substrato e os valores de μ_{max} e v_{max} obtidos pelo gráfico de Lineweaver–Burk (LB) foram corrigidos pelas correlações expressas nas Equações Eq. (3.) e Eq. (3.23)

$$\mu_{max} = \mu_{max_{LB}} \cdot \frac{1}{\left(1 - \frac{P(t)}{P_{xmax}}\right)} \quad \text{Eq. (3.22)}$$

$$v_{max} = v_{max_{LB}} \cdot \frac{1}{\left(1 - \frac{P(t)}{P_{pmax}}\right)} \quad \text{Eq. (3.23)}$$

Para os termos de inibição de substrato (K_{is} e K_{isP}) ($g L^{-1}$), fator de conversão de substrato em célula e de produto em substrato ($Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$) ($g g^{-1}$), k_d de morte celular na fase de morte (h^{-1}), coeficiente de manutenção celular (K_{cm}) ($g L^{-1}$) e constante de liberação de etanol residual (h^{-1}) foram utilizados valores médios encontrados em BORZANI *et al.* (2001) e PHISALAPHONG *et al.* (2006) e ajustados manualmente com base na boa adequação gráfica de modelo e dados experimentais.

A função objetivo para o ajuste (Equação 3.23) foi construída baseada na análise empírica dos dados e nas proporções entre os dados experimentais disponíveis (Equações 3.24-3.27):

$$E1 = \left(\frac{X_{exp} - X_{modelo}}{X_{modelo}}\right)^2 \quad \text{Eq. (3.24)}$$

$$E2 = \left(\frac{S_{exp} - S_{modelo}}{S_{modelo}}\right)^2 \quad \text{Eq. (3.25)}$$

$$E3 = \left(\frac{P_{exp} - P_{modelo}}{X_{modelo}}\right)^2 \quad \text{Eq. (3.26)}$$

$$\text{Função Objetivo} = 6 \cdot E1 + 2 \cdot E2 + 5 \cdot E3 \quad \text{Eq. (3.27)}$$

O desempenho dos modelos matemáticos foi avaliado pelos parâmetros de regressão critério de Akaike (AIC) (AKAIKE, 1974) e coeficiente de determinação (R^2).

Salienta-se que o valor do coeficiente de determinação (R^2) avalia a qualidade da regressão de forma absoluta, enquanto, o critério de Akaike considera o número de parâmetros do modelo, com objetivo de “punir” o aumento desnecessário desse número, evitando assim erros por *overfitting*. Quanto maior o coeficiente de determinação e menor o valor do critério de Akaike, melhor é o modelo.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, são apresentados os resultados e discussões, referentes à caracterização da matéria-prima, planejamentos experimentais, modelagem matemática na formação de bioprodutos e possibilidade de criação de uma biorrefinaria a partir de permeado de soro de queijo desproteínizado (PSQD).

4.1 Caracterização do permeado de soro de queijo desproteínizado em pó

A análise quantitativa dos elementos presentes na matéria-prima láctea, permeado de soro de queijo desproteínizado (PSQD), foi realizada para identificar e quantificar quais elementos encontravam-se já presentes no PSQD em pó, e quais eram necessários fazer-se uma suplementação no meio, para ocorrer crescimento celular, produção de bioetanol e bioprodutos pela levedura *K. marxianus*.

A Tabela 4.1 disponibiliza a caracterização da composição química elementar do PSQD em pó, enquanto a Tabela 4.2 apresenta os valores referentes à caracterização do PSQD em pó quanto ao teor de lactose, carboidratos, proteínas, lipídios, umidade, cinzas, acidez, DBO, DQO, sais minerais e pH. No anexo A, estão dispostos maiores detalhes referente às características do permeado, fornecidos pela empresa Sooro Renner Nutrição S.A.

Tabela 4.1 - Caracterização da composição química elementar do permeado de soro de queijo desproteínizado em pó

| Elementos | Símbolos | Concentração (mg kg ⁻¹)* |
|-----------|----------|--------------------------------------|
| Fósforo | P | 4660,07 |
| Enxofre | S | 623,19 |
| Cloro | Cl | 5918,29 |
| Ferro | Fe | 35,07 |

* Técnica TXRF.

Tabela 4.2 - Caracterização do permeado de soro de queijo desproteínizado em pó

| Caracterização | (mg L ⁻¹) | (mg kg ⁻¹) | (g 100g ⁻¹) | (%) |
|----------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------|
| DBO* | 65.258 | | | |
| DQO* | 85.300 | | | |
| Lactose** | | | | 89,42 |
| Proteínas** | | | 4,16 | |
| Cálcio*** | | 250 | | |
| Magnésio*** | | 50 | | |
| Potássio*** | | 751 | | |
| Sódio*** | | 305 | | |
| Carboidratos** | | | 90 | |
| Gordura Total** | | | 0,1 | |
| Umidade** | | | | 1,14 |
| Acidez (% ácido láctico)** | | | | 1,03 |
| Cinzas (sais minerais)** | | | | 5,28 |
| pH** | | | | 6,47 |

* Método APHA (2005).

** Ficha técnica Sooro Renner Nutrição S.A.

*** Técnica ICP.

Observa-se nas Tabelas 4.1 e 4.2, que o PSQD possui em sua constituição sais minerais, considerados macronutrientes na composição de meios de cultura, como o cálcio, magnésio, potássio, fósforo e enxofre, e como micronutrientes, o sódio, cloro e ferro. Estes nutrientes são essenciais para o metabolismo e crescimento de leveduras (ROSE, 1976).

Segundo REHM *et al.* (1995), os sais minerais são requeridos no meio por serem responsáveis pela regulação do transporte de cátions divalentes, como é o caso do potássio. O magnésio é utilizado como cofator ou ativador de enzimas na etapa de glicólise, e na membrana ATP-ases, aumenta a síntese de ácidos graxos e regulando o nível de íons intracelulares. Já o sódio é requisitado em menores quantidades, porém apresenta papel fundamental na regulação da pressão osmótica da célula, sendo responsável pela manutenção da viabilidade celular.

Verifica-se na Tabela 4.2, que o teor de lactose presente no PSQD (89,42 %) foi condizendo com os relatados por ZACARCHENCO *et al.* (2012), HU & DICKSON (2015), MAESTRE (2017) e SOORO (2020), os quais citam frações mássicas médias deste componente na faixa de 68 a 90 %.

Em relação ao teor de proteína (fonte de N) no permeado, observa-se uma quantidade baixa deste nutriente, 4,16 g 100 g⁻¹ (Tabela 4.3). ESPOSITO (2004) cita que os macroelementos adicionados no meio fermentescível quando o produto de interesse é etanol devem ter uma relação (C:N), onde o componente (C) esteja em excesso, para favorecer a formação deste produto e outros metabólitos secundários. Já uma relação (C:N) maior ou igual a 10 promoverá alto conteúdo

proteico (biomassa celular), e conseqüentemente menor quantidade de etanol. Verifica-se que o PSQD atende esta relação (C:N), apresentando uma razão 89:0,0416 (C:N) %, ou seja, elevado teor de lactose, frente à pequena quantidade de proteína, o que favorece sua aplicação na etapa de fermentação alcoólica, inclusive se fazendo necessário a suplementação do meio de cultivo com fonte de nitrogênio ureia para que haja crescimento celular.

Para um processo fermentativo, a fonte de carbono (C) é o elemento solicitado em maior quantidade, pois é imprescindível como fonte de energia para que o processo ocorra, embora o nitrogênio (N) seja também um elemento necessário para a síntese de proteínas ($\approx 16\%$) e outros componentes celulares, como ácidos nucléicos (HALÁSZ & LASZTITY, 1991; REED & NAGODAWITHANA, 1995).

Em relação à DBO e DQO para o PSQD *in natura* (líquido), foram obtidos os valores de 60.149 e 75.300 mg L⁻¹, respectivamente, demonstrando seu potencial poluidor. Observa-se que os valores de DBO e DQO do permeado são condizentes com a literatura, sendo citados valores de DBO entre 30.000 e 60.000 mg L⁻¹ (GUIMARÃES *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2012; PRAZERES *et al.*, 2012; ZACARCHENCO *et al.*, 2012). Em relação à DQO, GUIMARÃES *et al.* (2010), CARVALHO *et al.* (2013) e BANASZEWSKA *et al.* (2014) relataram valores entre 60.000 e 80.000 mg L⁻¹. EL-TANBOLY *et al.* (2017) obtiveram valores de DBO e DQO de 55.000 e 72.400 mg L⁻¹, respectivamente.

4.2 Produção de bioetanol e biomassa microbiana: planejamento experimental fatorial 2³

Os resultados médios das variáveis referentes à produção de bioetanol e biomassa celular com levedura *K. marxianus* em 45 h de fermentação investigado por meio de um planejamento experimental fatorial 2³ são apresentados na Tabela 4.3, com valores expressos em (g L⁻¹).

Tabela 4.3 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 com os valores reais das variáveis averiguadas e a resposta para o bioetanol (g L^{-1}) para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 45 h

| Ensaio | Variáveis independentes | | | Variáveis respostas | |
|--------|--|--------------|---|---|--|
| | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (X_1) | pH (X_2) | Lactose (g L^{-1}) (X_3) | Bioetanol (g L^{-1}) (Y_1) | Biomassa celular (g L^{-1}) (Y_2) |
| 1 | 29 | 4,5 | 88 | 50,65±0,05 | 4,00±0,01 |
| 2 | 45 | 4,5 | 88 | 27,37±0,07 | 3,93±0,04 |
| 3 | 29 | 6,5 | 88 | 33,23±0,03 | 2,95±0,05 |
| 4 | 45 | 6,5 | 88 | 19,59±0,09 | 1,91±0,02 |
| 5 | 29 | 4,5 | 264 | 42,80±0,08 | 5,87±0,07 |
| 6 | 45 | 4,5 | 264 | 18,04±0,04 | 5,90±0,09 |
| 7 | 29 | 6,5 | 264 | 29,00±0,05 | 9,44±0,04 |
| 8 | 45 | 6,5 | 264 | 12,36±0,06 | 7,39±0,09 |
| 9 | 37 | 5,5 | 176 | 34,53±0,06 | 5,30±0,07 |
| 10 | 37 | 5,5 | 176 | 33,28±0,08 | 5,38±0,07 |
| 11 | 37 | 5,5 | 176 | 33,50±0,07 | 5,40±0,08 |

Analisando a Tabela 4.3, nota-se que a maior produção de bioetanol ocorreu no ensaio 1, realizado com 88 g L^{-1} de lactose, $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4,5 em 45 h, obtendo $50,65 \text{ g L}^{-1}$ enquanto produziu 4 g L^{-1} de biomassa celular, seguido do ensaio 5 com concentração de $42,80 \text{ g L}^{-1}$ de bioetanol que também foi conduzido a $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 4,5, porém com 264 g L^{-1} de lactose, obtendo uma concentração celular de $5,87 \text{ g L}^{-1}$. Além disso, a menor produção se deu no ensaio 8, sendo esta, de $12,36 \text{ g L}^{-1}$ de bioetanol, apresentando $7,39 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa celular.

Constata-se (Tabela 4.3) que os dois ensaios com maior produção em bioetanol (Ensaio 1 e 5) empregaram temperatura (X_1) e pH (X_2) iguais, tendo como única variável a concentração de lactose (X_3).

Diante do exposto, para avaliar quais foram as variáveis interferentes no processo de produção de bioetanol e biomassa celular foi realizada a análise estatística dos dados. Os resultados foram expressos em termos de Diagrama de Pareto (Figura 4.1), estimativa de efeitos principais e interações das variáveis (Tabela 4.4), análise de variância (ANOVA) (Tabela 4.5), modelo de regressão (Eq. 4.1 e 4.2), gráfico de valores preditos por valores observados (Figura 4.2) e superfícies de contorno (Figura 4.3 e 4.4).

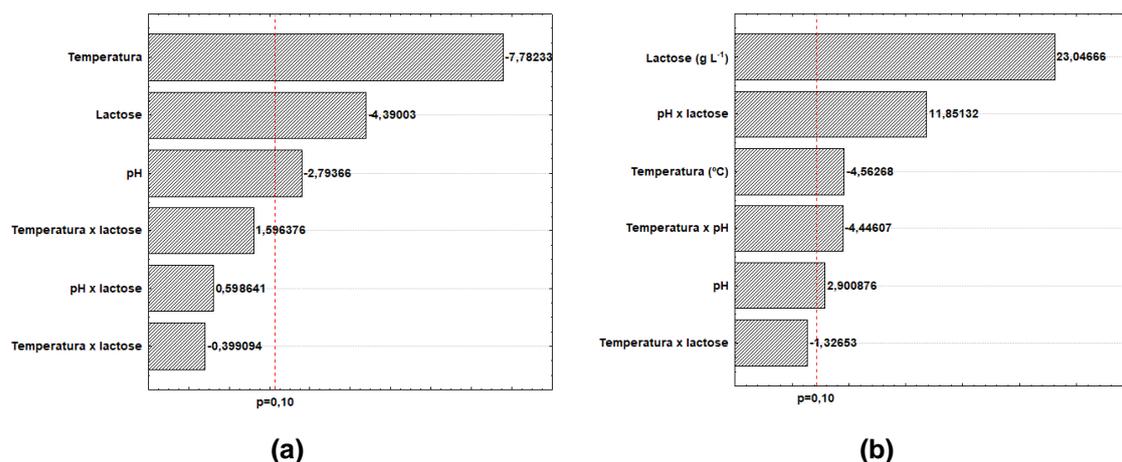


Figura 4.1 - Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações verificadas no planejamento experimental fatorial 2^3 ao nível de confiança de 90 % para as variáveis bioetanol **(a)** e biomassa celular **(b)** para a levedura *K. marxianus* CCT 4086

Tabela 4.4 - Estimativa de efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas no planejamento experimental fatorial 2^3 em 45 h de fermentação para as variáveis bioetanol e biomassa celular para a levedura *K. marxianus* CCT 4086

| Resposta | Variáveis | Efeito | p-valor | Coefficiente | Erro padrão do coeficiente |
|----------------|---------------------------------|--------------|----------------|--------------|----------------------------|
| Y ₁ | Média/Intercepto | 30,04 | 0,00001 | 30,04 | 1,06 |
| | X ₁ | -19,50 | 0,00147 | -9,75 | 1,25 |
| | X ₂ | -11,000 | 0,01178 | -5,50 | 1,25 |
| | X ₃ | -7,00 | 0,04912 | -3,50 | 1,25 |
| | X ₁ x X ₂ | 4,00 | 0,18564 | 2,00 | 1,25 |
| | X ₁ x X ₃ | -1,00 | 0,71021 | -0,50 | 1,25 |
| | X ₂ x X ₃ | 1,50 | 0,58166 | 0,75 | 1,25 |
| Y ₂ | Média/Intercepto | 5,22 | 0,00000 | 5,22 | 0,07 |
| | X ₁ | -0,78 | 0,01031 | -0,39 | 0,08 |
| | X ₂ | 0,49 | 0,04408 | 0,25 | 0,08 |
| | X ₃ | 3,95 | 0,00002 | 1,98 | 0,08 |
| | X ₁ x X ₂ | -0,76 | 0,01128 | -0,38 | 0,08 |
| | X ₁ x X ₃ | -0,23 | 0,25533 | 0,11 | 0,08 |
| | X ₂ x X ₃ | 2,03 | 0,00029 | 1,02 | 0,08 |

R²: 0,95776 (Y₁) e R²: 0,99449 (Y₂).

Analisando o Diagrama de Pareto (Figura 4.1) e o p-valor (Tabela 4.4), nota-se que dentre as variáveis avaliadas, visando a produção de bioetanol (Y₁), a temperatura (X₁), concentração de lactose do PSQD (X₂) e o pH (X₃) foram significativos negativamente. Assim, para a produção de bioetanol (Figura 4.1.a) concentrações menores de lactose e baixos valores de pH e temperaturas favorecem a formação deste composto. Em relação à biomassa celular (Y₂), as variáveis lactose (X₂), pH (X₂) e relação pH e lactose (X₂ x X₃) foram significativos positivamente, influenciando em concentração e valores maiores (Figura 4.1.b). Já os fatores temperatura (X₁) e relação temperatura e pH (X₁ x X₂) apresentaram

relevância negativamente. A influência foi determinada dentro de um intervalo de confiança de 90 % (p-valor<0,10).

Tabela 4.5 - Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento experimental fatorial 2³ para a levedura *K. marxianus* CCT 4086

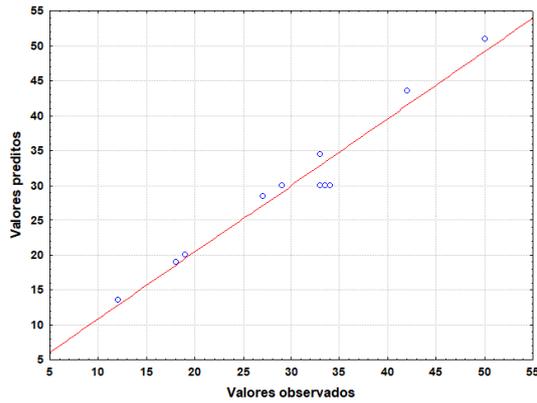
| Resposta | Fonte de variância | Soma Quadrática (SQ) | Graus de Liberdade (GL) | Média Quadrática (MQ) | F _{calc} | F _{tab} |
|----------------|--------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|
| Y ₁ | Modelo | 1100,50 | 3 | 366,83 | 29,21 | 4,19 |
| | Erro | 50,23 | 4 | 12,55 | | |
| | TOTAL | 1189,28 | | | | |
| Y ₂ | Modelo | 42,39 | 5 | 8,48 | 144,12 | 4,05 |
| | Erro | 0,24 | 4 | 0,06 | | |
| | TOTAL | 42,73 | | | | |

Observa-se pelas Tabelas 4.4 e 4.5, que o modelo foi significativo quando empregado para fins preditivos, uma vez que o mesmo proporcionou um coeficiente de determinação, R², de 0,96 (bioetanol) e 0,99 (biomassa). Aplicando o teste F, tem-se que o valor de F(calc) = 29,21 foi aproximadamente 7 vezes maior para a produção de bioetanol (F_{tab 3,4,0,10} = 4,19), já para a biomassa microbiana foi ≈ 35 vezes maior que o valor de F_{tab 5,4,0,10} = 4,05, para um intervalo de confiança de 90 % (BARROS *et al.*, 2010). Assim, pode-se afirmar a partir das variáveis reais que o modelo de regressão proposto (Eq. 4.1 e 4.2) é válido para a produção de bioetanol (Y₁) e biomassa celular (Y₂).

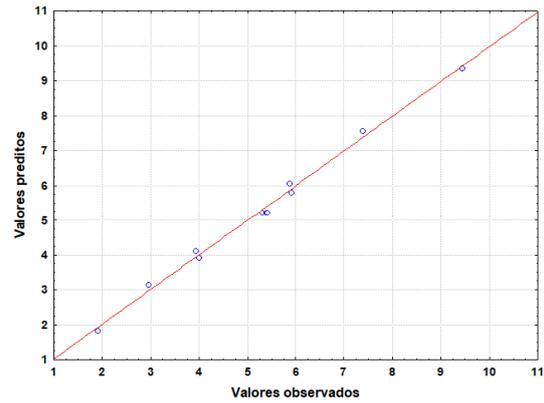
$$Y_1 = 179,23 - 3,06X_1 - 17,26X_2 - 0,05X_3 + 0,32X_1:X_2 - 0,0002X_1:X_3 + 0,0014X_2:X_3 \quad \text{Eq. (4.1)}$$

$$Y_2 = 2,14 + 0,24X_1 - 0,02X_2 - 0,03X_3 - 0,04X_1:X_2 - 0,0001X_1:X_3 + 0,01X_2:X_3 \quad \text{Eq. (4.2)}$$

O modelo obtido pela ANOVA pode ainda ser avaliado, pelo comportamento observado no gráfico de valores preditos pelos observados, conforme apresentado na Figura 4.2 (a e b), e pelas superfícies de contorno (Figuras 4.3 e 4.4).



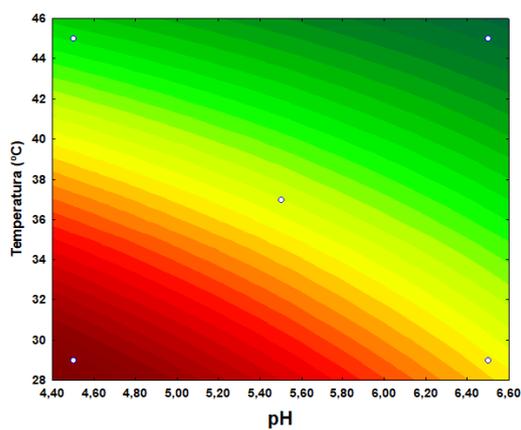
(a)



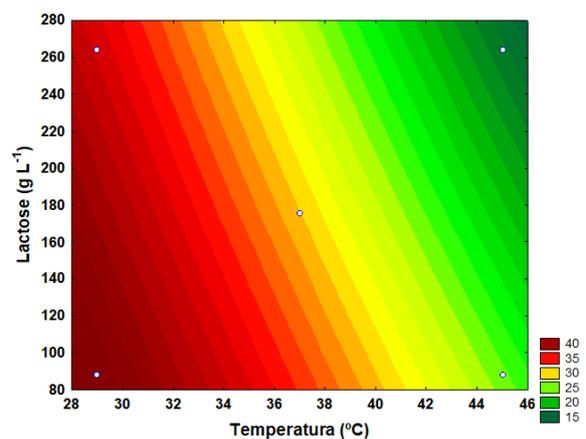
(b)

Figura 4.2 - Resultado estatístico do planejamento experimental fatorial 2^3 para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em relação as variáveis bioetanol **(a)** e biomassa celular **(b)**, para os valores preditos pelos valores observados

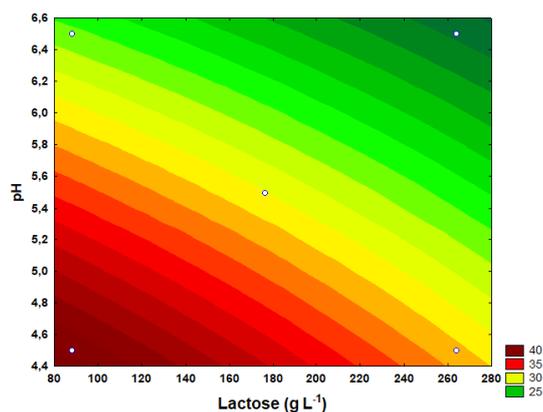
A Figura 4.2 **(a)** e **(b)** mostra que os valores observados estão em concordância em relação aos valores preditos, sendo que o modelo de bioetanol é explicado por 96 % de variância, enquanto a biomassa celular é justificada por 99 %. Estes altos valores de R^2 indicam correlação entre os valores e apresentam confiabilidade (REENCHER & SCHAALJE, 2007; BARROS *et al.*, 2010), comportamento também identificados por MURARI *et al.* (2019) para fermentações com a levedura *K. marxianus*.



(a)

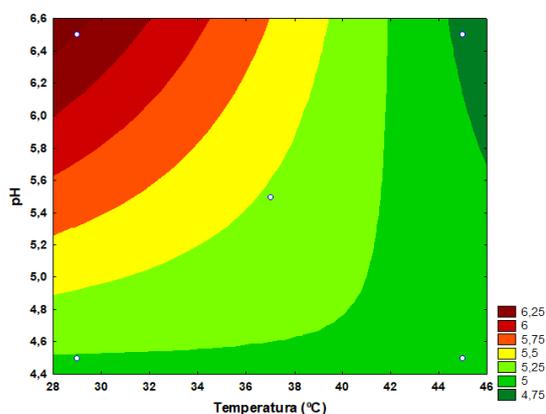


(b)

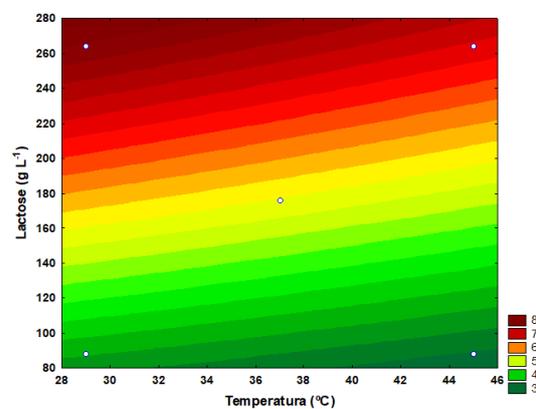


(c)

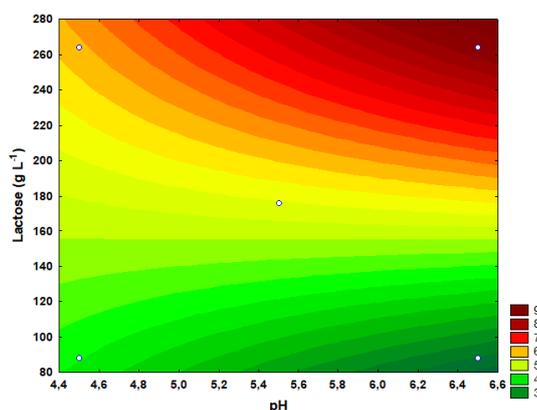
Figura 4.3 - Superfície de contorno para o planejamento experimental fatorial 2^3 para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em relação a variável bioetanol – (a) temperatura por pH, (b) lactose por temperatura e (c) pH por lactose



(a)



(b)



(c)

Figura 4.4 - Superfície de contorno para o planejamento experimental fatorial 2^3 para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em relação a variável biomassa celular – (a) temperatura por pH, (b) temperatura por lactose e (c) pH por lactose

Pelas Figuras 4.3 e 4.4 (a, b e c), pode-se verificar que concentrações altas de lactose não são favoráveis para a produção de bioetanol. Para tanto, almejando a produção de bioetanol por via primária seguido de outros bioprodutos, o ideal é

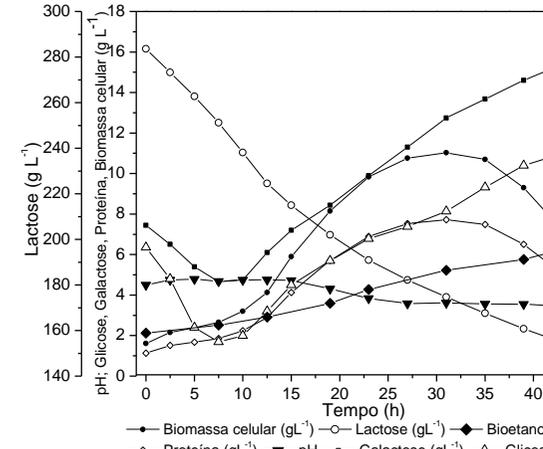
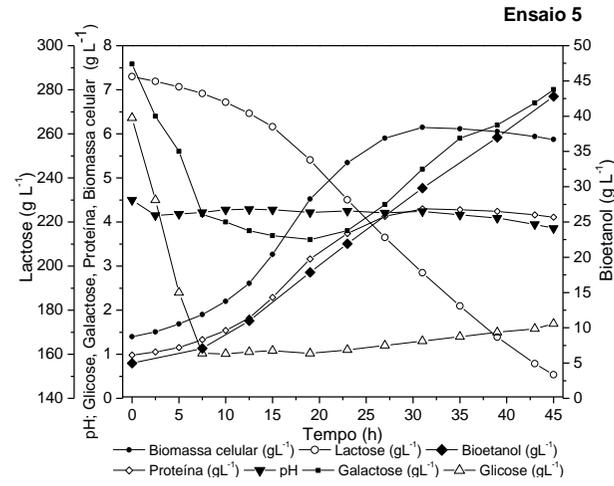
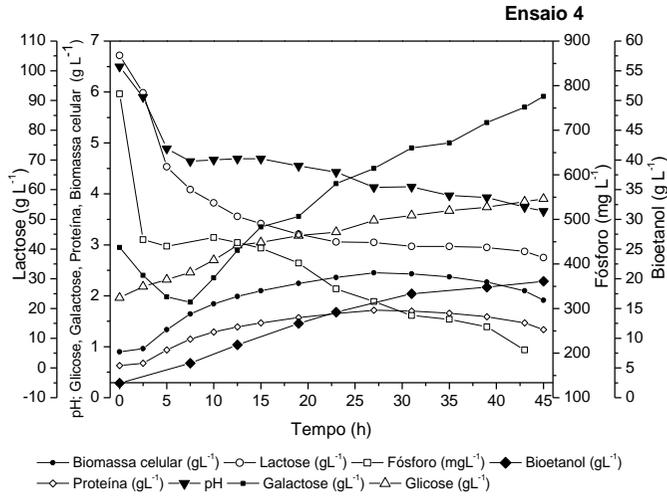
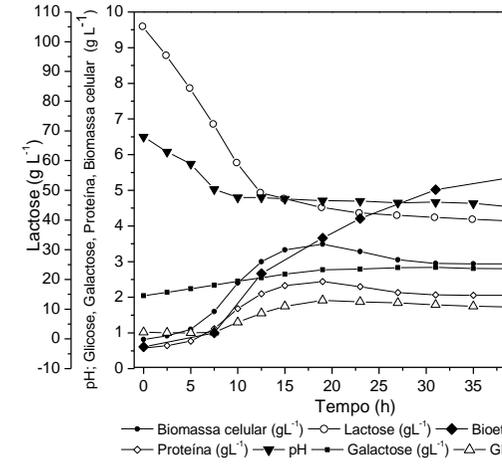
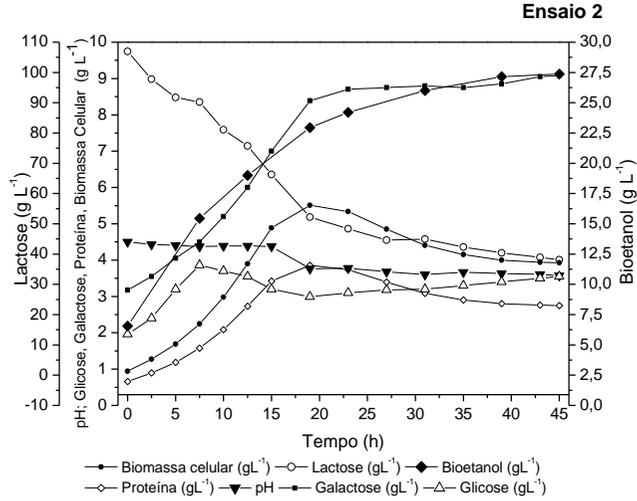
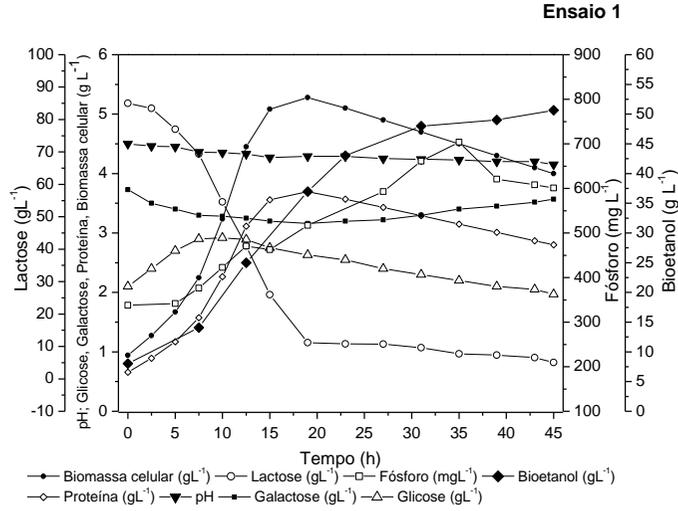
empregar condições processuais com concentrações equivalentes ou não acima de 88 g L⁻¹ de lactose. As variáveis temperatura e pH podem ser empregadas nas faixas de 28 - 32 °C e 4,4-5 e 6-6,6 para bioetanol e biomassa celular, respectivamente, conforme Figuras 4.3 e 4.4.

Este comportamento em relação ao uso de temperaturas menores também foi mensurado por ZOPPELLARI & BARDI (2013). Os autores analisaram a produção de bioetanol a partir de soro de leite com *K. marxianus* e alcançaram maiores produções nas fermentações anaeróbias, conduzidas a 400 rpm, a 28 e 40 °C, obtendo 17,04 g L⁻¹ de bioetanol (quarto dia) e 14,91 g L⁻¹ (terceiro dia), respectivamente. Por fim, concluíram que empregar o soro para a produção de bioetanol é uma alternativa viável e temperaturas menores favoreceram a produção.

A partir dos resultados estatísticos e analisando a Tabela 4.3, verifica-se que o PSQD é facilmente metabolizado pela levedura e convertido em bioetanol e biomassa. O comportamento observado pela presente pesquisa também foi ressaltado em outros estudos, tais como, ASSUNÇÃO (2014); COTÉ *et al.* (2004); SILVEIRA *et al.* (2005); GABARDO *et al.* (2014); FERREIRA *et al.* (2015); FASOLI *et al.* (2016), GABARDO *et al.* (2016) e MURARI *et al.* (2018).

A relevância em utilizar a levedura *K. marxianus* na produção de bioetanol se deve ao fato de ela converter a lactose em monossacarídeos de forma direta, ou seja, não é necessário um processo hidrolítico induzido. As próprias enzimas de β -galactosidase são produzidas por esta levedura durante seu metabolismo e produzem a quebra da lactose. Assim, as enzimas β -galactosidase e *lactose permease* são decodificadas para desempenharem papéis essenciais dentro do metabolismo, pois a *lactose permease* realiza o transporte da lactose através da membrana citoplasmática para o interior da célula (GUIMARÃES *et al.*, 2010, GABARDO, 2011) e a β -galactosidase é responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose (GUIMARÃES *et al.*, 2010, GABARDO, 2011; FERREIRA *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016; GABARDO *et al.*, 2016; MURARI *et al.*, 2018; MURARI *et al.*, 2019). Para HADIYANTO *et al.* (2014), estas variáveis são importantíssimas em bioprocessos que visam a produção do composto bioetanol.

O comportamento cinético dos ensaios 1 ao 11 (Tabela 4.3) de crescimento celular da levedura *K. marxianus* durante a produção de bioetanol e biomassa celular são apresentados na Figura 4.5.



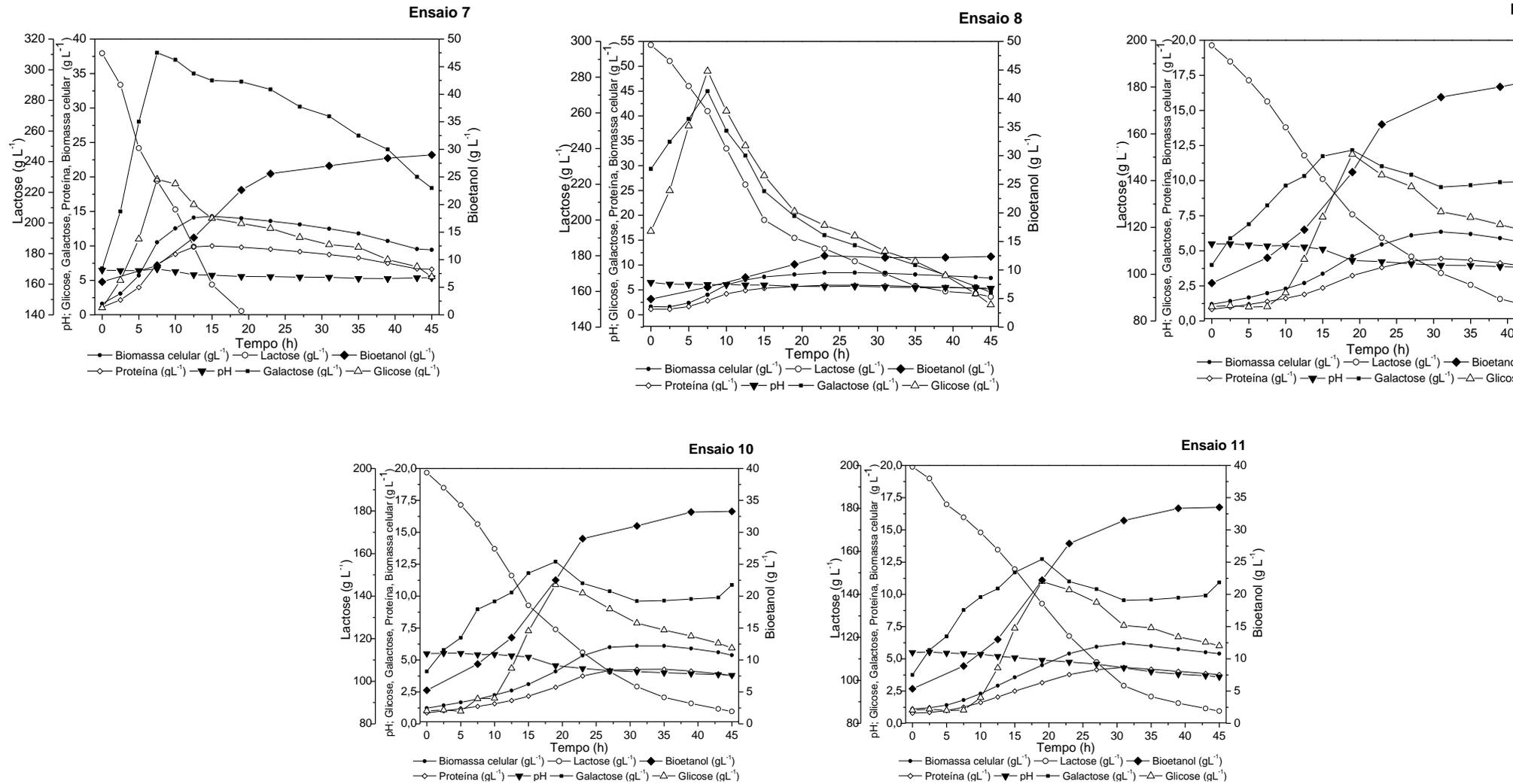


Figura 4.5 - Perfil cinético da levedura *K. marxianus* CCT 4086 para produção de bioetanol, biomassa celular, proteína microbiana (g L⁻¹), consumo de substrato lactose, glicose e galactose (g L⁻¹) e pH dos ensaios do planejamento experimental fatorial 2³

No que se refere ao consumo de substrato (Figura 4.5), observou-se que houve conversão da lactose em glicose e galactose, sendo a glicose consumida quase em sua totalidade em todos os ensaios. Já para a fonte de carbono galactose, o mesmo comportamento não foi observado, restando ao final dos processos fermentativos um residual não consumido, o que pode ser indicativo de uma provável inibição por excesso de galactose, devido ao elevado teor de bioetanol como pode ser verificado no ensaio 1 e 5, ou ainda, um possível déficit do nutriente oxigênio.

Para YOU *et al.* (2003), altas concentrações de bioetanol inibem o crescimento dos microrganismos, e segundo NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976) e MOT *et al.* (1985), o bioetanol produzido pela levedura pode ter um efeito tóxico nas células superior ao efeito causado pelo etanol adicionado ao meio fermentativo.

Em relação aos efeitos tóxicos do bioetanol para as leveduras, pode-se fazer uso de aditivos para promover a proteção dos microrganismos em relação à presença do bioetanol no meio de cultivo, como no estudo de YOU *et al.* (2003) onde foram adicionados diferentes composições de ácidos graxos insaturados no meio de cultivo. Os autores verificaram que o ácido oleico e ácido monopalmitoléico minimizaram os efeitos inibitórios do bioetanol sobre o crescimento da *S. cerevisiae*.

De acordo com HENDERSON & BLOCK (2014), a levedura *S. cerevisiae* suporta determinadas concentrações de etanol sem haver prejuízos metabólicos, devido à composição da membrana celular deste gênero microbiano.

Nota-se que houve acidificação em todos os ensaios, visto que reduziram o pH no decorrer da fermentação (Figura 4.5). Para tanto, a diminuição do pH na solução é causada pela formação de ácidos, álcoois aromáticos e compostos secundários (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976; THOMSON *et al.*, 2005; WIEBE *et al.*, 2008; GUNESER *et al.*, 2016). PARRONDO *et al.* (2009) e MURARI *et al.* (2019) apresentaram a redução do pH como resposta para a produção de etanol.

De acordo com a Figura 4.5, em relação à concentração proteica microbiana, pode-se inferir, conforme já citado por MURARI *et al.* (2018), que a levedura *K. marxianus* é composta principalmente por proteínas, evidenciado a possibilidade de exploração deste bioproduto fermentativo para a produção de biomassa celular,

comportamento constatado pela formação de concentração proteica condizente com a biomassa celular em todos os ensaios.

Na Tabela 4.6 são apresentados os resultados dos parâmetros cinéticos de velocidade específica de crescimento (μ_X), coeficiente de conversão do substrato em biomassa celular ($Y_{X/S}$), conversão de coeficiente de bioetanol e biomassa celular ($Y_{X/P}$), conversão de coeficiente de substrato em bioetanol ($Y_{P/S}$), produtividade de bioetanol (Q_P) e conversão teórica de substrato em bioetanol (n) para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 para o planejamento experimental fatorial 2³.

Tabela 4.6 - Parâmetros cinéticos para os ensaios do planejamento experimental fatorial 2³ a partir da levedura *K. marxianus* CCT 4086

| Ensaio | μ_X (h ⁻¹) | $Y_{X/S}$ (g g ⁻¹) | $Y_{X/P}$ (g g ⁻¹) | $Y_{P/S}$ (g g ⁻¹) | Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹) | n (%) |
|--------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|--------------|
| 1 | 0,05 | 0,06 | 0,15 | 0,39 | 1,52 | 72,83 |
| 2 | 0,16 | 0,08 | 0,28 | 0,30 | 0,86 | 55,59 |
| 3 | 0,04 | 0,04 | 0,21 | 0,19 | 0,59 | 34,45 |
| 4 | 0,04 | 0,02 | 0,14 | 0,14 | 0,43 | 26,65 |
| 5 | 0,31 | 0,08 | 0,71 | 0,18 | 0,35 | 32,89 |
| 6 | 0,56 | 0,12 | 0,58 | 0,20 | 0,86 | 37,16 |
| 7 | 0,08 | 0,06 | 0,52 | 0,12 | 1,11 | 23,21 |
| 8 | 0,12 | 0,05 | 0,91 | 0,06 | 0,40 | 10,68 |
| 9 | 0,31 | 0,05 | 0,17 | 0,32 | 1,00 | 59,11 |
| 10 | 0,31 | 0,05 | 0,16 | 0,30 | 0,96 | 55,07 |
| 11 | 0,30 | 0,05 | 0,17 | 0,29 | 0,96 | 54,75 |

Analisando a conversão de substrato (lactose) em bioetanol, pela Tabela 4.3, tem-se que o ensaio 1 apresentou a maior produção de bioetanol, com a maior produtividade 1,52 g L⁻¹h⁻¹, rendimento (72,83 %), conversão de substrato em bioetanol (0,39 g g⁻¹), obtendo-se uma concentração de 50,65 g L⁻¹ de bioetanol, contudo com baixa produção de biomassa celular, 4,00 g L⁻¹ (Figura 4.5). Neste ensaio, nas 18 primeiras horas, não foi observada alta produção de bioetanol. Sua produção iniciou-se após este período. Verifica-se que há um aumento da produção de biomassa celular após 9 h, isso pode ter ocorrido porque a produção de bioetanol foi atrasada e quando começou a sua formação, a biomassa já havia sofrido redução, promovendo um efeito da inibição do bioetanol no crescimento celular.

Este comportamento também foi observado por FASOLI *et al.* (2016) e GABARDO *et al.* (2016), sendo considerado como período de adaptação para que a levedura *K. marxianus* possa recuperar seu metabolismo fermentativo, e gerar

bioprodutos (TAVARES *et al.*, 2018). Salienta-se que a lactose é consumida na fase estacionária como requisitos energéticos (PARRONDO *et al.*, 2009).

Constata-se que os dois ensaios com maior produtividade em bioetanol (ensaio 1 e 7), empregaram temperatura (X_1) and pH (X_2) iguais, tendo como única variável a concentração de lactose. Acredita-se que o excesso de lactose do PSQD pode ter desfavorecido a produção de bioetanol, provocando inibição e favorecendo o crescimento celular (ANDREWS, 1968). DRAGONE *et al.* (2011) e MURARI *et al.* (2019) indicaram que altas concentrações de lactose e elevadas temperaturas diminuem o rendimento da produção de bioetanol. Ademais, DRAGONE *et al.* (2011) atribuem esta redução de produção à desnaturação das membranas celulares das leveduras. Além disso, segundo GABARDO *et al.* (2014), o metabolismo da lactose e a bioconversão em bioetanol diferem-se entre as estirpes.

De modo geral (Tabela 4.3, 4.6 e Figura 4.5), nota-se que os ensaios conduzidos com concentração de lactose de 264 g L^{-1} apresentaram-se mais favoráveis para a produção de biomassa celular do que para a produção de bioetanol. Vale ressaltar que mesmo que haja processo inibitório devido ao excesso de lactose, sempre que haverá maiores produções de células e menor produção de bioetanol (CHIN *et al.*, 2015).

Em relação à composição do PSQD, para PARRONDO *et al.* (2009), o mosto fermentativo contendo *K. marxianus* não consegue assimilar todas as fontes de nitrogênio contidas no soro de leite. Nessa vertente, ensaios conduzidos com soro de leite enriquecido com peptona bacteriológica e extrato de levedura para uma estirpe de *K. marxianus* identificaram inibição do crescimento celular, já que o soro é rico em nutrientes e a adição de fontes de nitrogênio pode levar à diminuição do metabolismo celular, afetando a formação de produtos (GABARDO *et al.* 2014). O mesmo pode ter ocorrido com os ensaios conduzidos a elevadas concentrações de lactose oriundas do PSQD nesta pesquisa, já que sua composição é muito similar à do soro de leite, pois é rico em lactose (70 - 90 % p/p), proteínas e sais minerais (MOULIN & GALZI, 1984; GONZÁLEZ-SISO, 1996; PRAZERES *et al.*, 2012; ZACARCHENCO *et al.*, 2012; HU & DICKSON, 2015; WOYENGO *et al.*, 2015. MURARI *et al.*, 2018).

Quanto ao coeficiente de bioetanol e biomassa celular ($Y_{X/P}$), (Tabela 4.6), o ensaio 8 converteu $0,91 \text{ g g}^{-1}$, ensaio este com produção considerável de biomassa celular e baixa produção de bioetanol. Já o ensaio 6 atingiu valores elevados de

$\mu_x = 0,56 \text{ h}^{-1}$ e $Y_{x/s} = 0,12 \text{ g g}^{-1}$, condição com baixa produção de bioetanol e elevada produção de biomassa celular.

O ensaio 7 (29 °C, 6,5, 264 g L⁻¹) apresentou maior concentração de biomassa celular, 9,44 g L⁻¹, em 45 h de fermentação (Tabela 4.3). A redução de produção de bioetanol, ao comparar com o ensaio 1, pode estar relacionada ao aumento do pH (X₂) e concentração da lactose (X₃).

FERREIRA *et al.* (2015) avaliaram a fermentação com mistura de bagaço de cana e soro de ricota e *K. marxianus*, obtendo 49,65 g L⁻¹ de bioetanol com biomassa celulósica de 80 g L⁻¹, pH 5,05, agitação de 65 rpm e temperatura de 39,2°C, resultado similar ao obtido por esta pesquisa no ensaio 1. SANSONETTI *et al.* (2009) produziram bioetanol com *K. marxianus* e 4,6–4,8 % (v/v) de permeado de soro de queijo a 37 °C, 150 rpm, pH 5 e adição de oxigênio dissolvido de 0,2 %. Os autores obtiveram 5 g L⁻¹ de bioetanol em 18 h de processo.

MURARI *et al.* (2018) avaliaram o efeito da agitação na produção bioetanol com a *K. marxianus* URM 7404 com soro e permeado de soro de leite desproteínizado, e observaram que este produto foi obtido em maiores proporções em condições anaeróbicas. DELGENES *et al.* (1986) também investigaram o metabolismo da levedura *K. marxianus* em condições aeróbicas, anaeróbicas e microaerófilas em D-xylose, e observaram que a taxa de aeração influenciou a taxa de crescimento celular e produção de bioetanol. Apesar disso, a levedura *K. marxianus* é facultativa em termos de necessidade do componente oxigênio (FERREIRA *et al.*, 2015; NACHAIWIENG *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016), de forma que o presente estudo empregou a agitação promovida pela incubadora orbital do tipo *shaker* com 100 rpm.

As diferenças de rendimento de bioetanol (Tabela 4.6) pode ser explicada pelas variações dos parâmetros de fermentação, como pH inicial, temperatura, agitação e suplementação de nutrientes, conforme já citado por LAINEZ *et al.* (2019).

LUCERO *et al.* (1993); ENTIAN (1997); DOES & BISSON (1998); OZMIHCI & KARGI (2007c); STANISZEWSKI *et al.* (2009) relataram que comportamentos, como da Figura 4.6, podem ser explicados, devido à glicose ser rapidamente metabolizável pelas mais diversas espécies de microrganismos. Assim, dependendo das condições de cultivo, pode ocorrer a inibição/repressão da

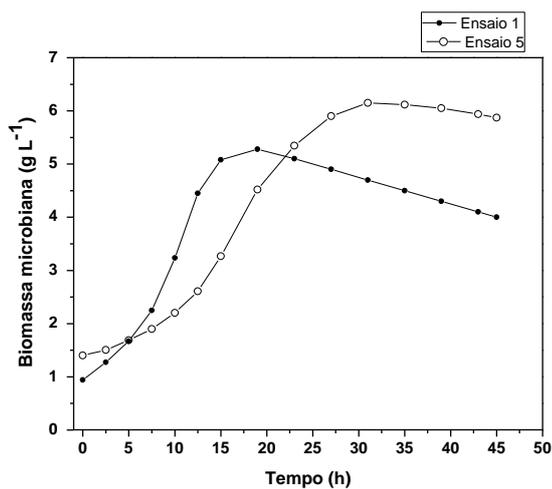
expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono, particularmente, enzimas envolvidas na glicogênese, ciclo do ácido tricarboxílico e do ácido glioxilato, e ao catabolismo de açúcar fornecido ao meio, tais como, maltose, sacarose e galactose. Portanto, não sendo capaz de metabolizar todas as fontes de carboidratos, limitando a continuidade do processo fermentativo.

Por fim, de acordo com a Figura 4.5, em relação à concentração proteica microbiana, pode-se inferir conforme já citado por MURARI *et al.* (2018), que a levedura *K. marxianus* é composta principalmente por proteínas, evidenciando a possibilidade de exploração deste subproduto fermentativo para a produção de biomassa celular.

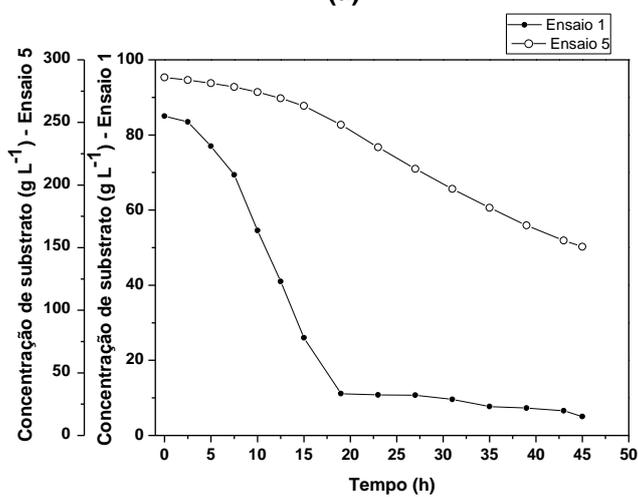
4.3 Modelagem matemática para o planejamento experimental fatorial 2³

Desenvolveu-se um estudo com os dados experimentais apresentados no item 4.2, com o objetivo de identificar hipóteses quanto às características específicas dos bioprocessos, avaliando possibilidades de alteração nos modelos e refino das estimativas iniciais de regressão.

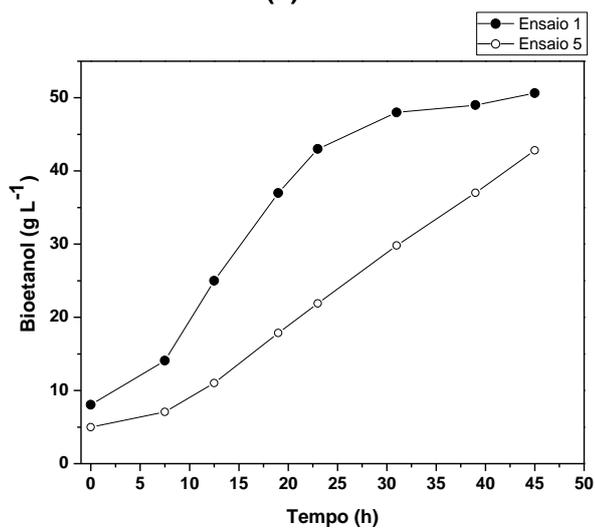
Para a construção do modelo, empregou-se o conjunto de ensaios, sob mesmas condições cinéticas que resultaram em maior produção de bioetanol, ou seja, ensaios 1 e 5 que foram conduzidos a 29 °C, pH 4,5 e 88 e 264 g L⁻¹ de lactose, respectivamente. Os dados experimentais destes ensaios estão apresentados na Figura 4.6.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.6 - Dados cinéticos dos Ensaios 1 e 5 do planejamento experimental fatorial 2³ da levedura *K. marxianus* CCT 4086 em relação à **(a)** biomassa celular, **(b)** consumo do substrato e **(c)** bioetanol

Pela Figura 4.6 (a-c), os dados cinéticos compreendem tanto a fase de crescimento quanto a fase de morte celular, logo o modelo também tem que prever estes fenômenos, ou seja, deve-se considerar um termo de inibição pelo substrato e a possibilidade de representar a fase de morte celular. Assim, a partir destas condições podem verificar que até 18 h, houve crescimento celular devido ao consumo do substrato ($\approx 88\%$), depois disso, praticamente não tendo mais substrato no meio de cultivo, tendo redução da biomassa (ensaio 1).

Para o ensaio 5, o crescimento da biomassa e conseqüentemente o consumo de substrato ($\approx 42\%$) foi mais lento, porém a concentração de biomassa foi maior, devido à maior concentração de lactose neste ensaio. Este comportamento deve-se, pois, concentrações maiores de substrato lactose favorecendo o crescimento celular (ANDREWS, 1968). Este comportamento perfil cinético acontece, pois, a glicose é consumida rapidamente por ser o monossacarídeo preferido pelas mais diversas espécies de microrganismos (LUCERO *et al.*, 1993; ENTIAN, 1997; DOES & BISSON, 1998, OZMIHCI & KARGI, 2007c, STANISZEWSKI *et al.*, 2009) inclusive pela *K. marxianus* avaliada nesta pesquisa.

Diante disso, as condições do modelo podem apresentar-se pelo termo de inibição do substrato (K_{is}), na presença de um termo exponencial de inibição pelo produto ou substrato (K_{is} ou K_{ip}), associando a morte celular através da constante (k_d), ou ainda, pela constante de morte celular (k_d) no balanço material da biomassa há morte celular.

Nessa perspectiva, os modelos avaliados inicialmente foram Edwards (EDWARDS, 1970) e Phisalaphong (PHISALAPHONG *et al.*, 2006). Os resultados obtidos para a simulação dos dados experimentais pelos modelos estão dispostos nas Figuras 4.7 (a-c) e 4.8 (a-c) e os parâmetros de ajuste dos modelos encontram-se na Tabela 4.7.

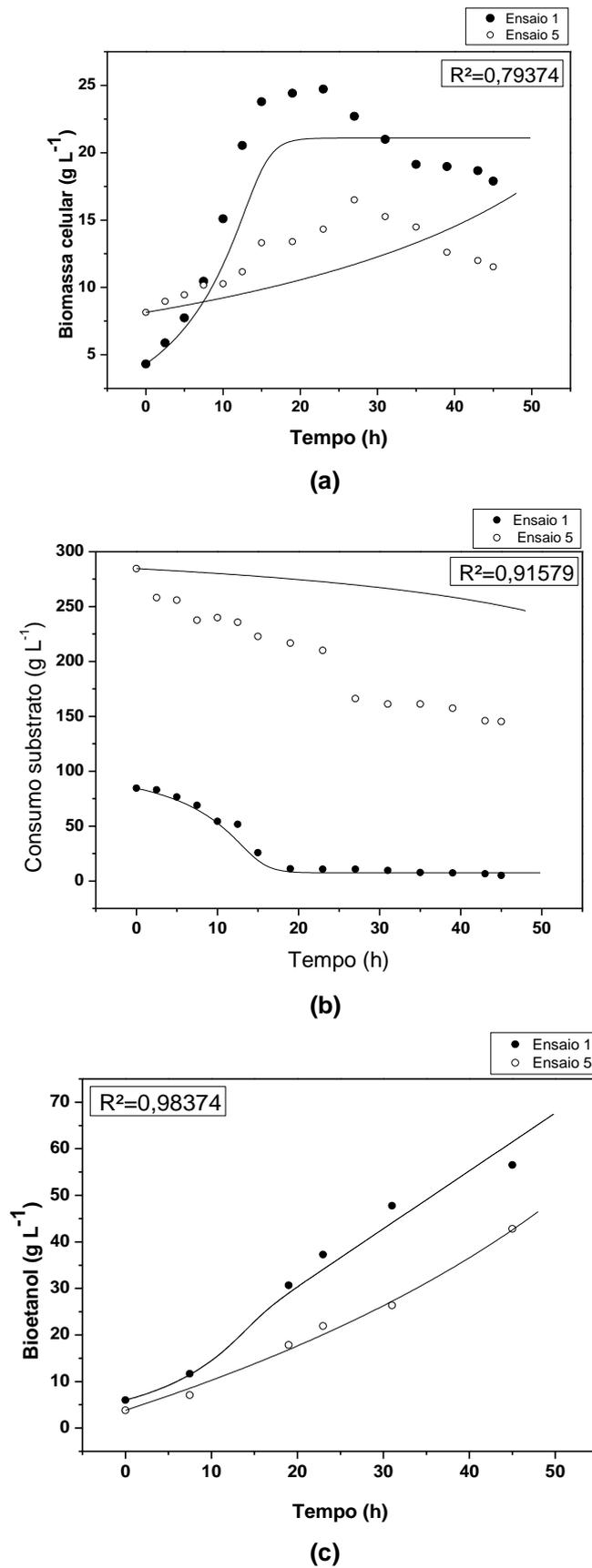
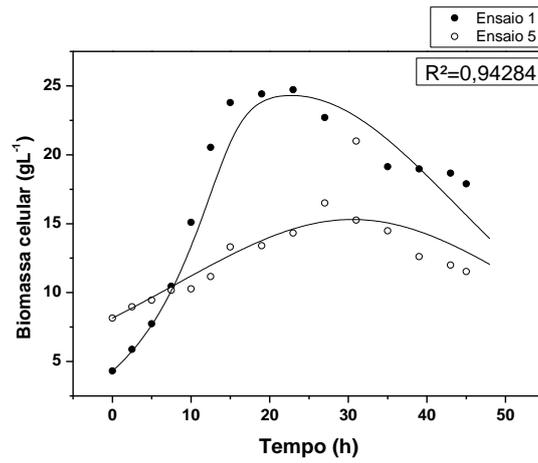
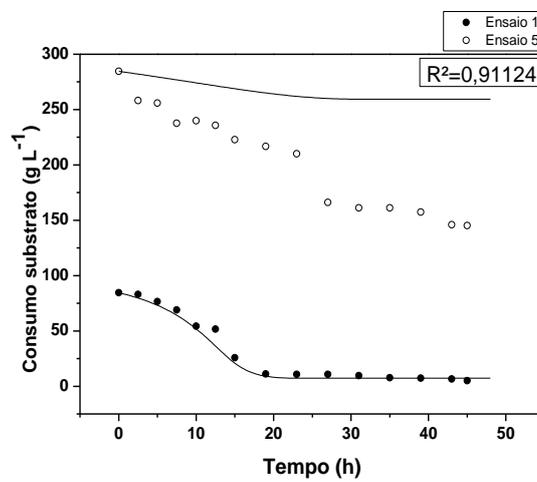


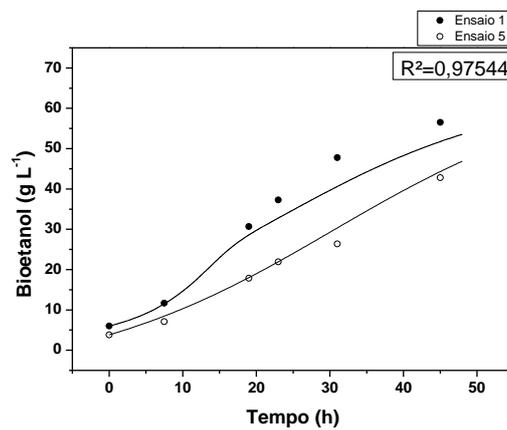
Figura 4.7 - Simulação dos dados dos Ensaios 1 e 5 do planejamento experimental fatorial 2^3 da levedura *K. marxianus* CCT 4086 pelo modelo de Edwards em termos de **(a)** biomassa celular, **(b)** consumo do substrato e **(c)** bioetanol



(a)



(b)



(c)

Figura 4.8 - Simulação dos dados dos Ensaios 1 e 5 do planejamento experimental fatorial 2^3 da levedura *K. marxianus* CCT 4086 pelo modelo de Phisalaphong em termos de (a) biomassa celular, (b) consumo do substrato e (c) bioetanol

Tabela 4.7 - Parâmetros de Critério de Akaike para os ajustes dos modelos

| Modelo | Função Objetiva | Critério de Akaike (AIC) |
|--------------|-----------------|--------------------------|
| Edwards | 15,25 | -12,19 |
| Phisalaphong | 14,35 | -29,54 |

Conforme as Figuras 4.7 e 4.8 (a-c) e Tabela 4.7, em ambos os parâmetros o modelo de Phisalaphong superou o modelo de Edwards, indicando-o como uma melhor alternativa para representação dos dados experimentais. Contudo, ainda é possível supor, devido aos valores de R^2 , que o modelo pode ser ajustado para um melhor desempenho. Em que o modelo de Edwards foi analisado quando à 8 parâmetros, o modelo de Phisalaphong por 10 e o novo modelo proposto a partir de 13 parâmetros ajustados.

Para isso, um novo modelo foi desenvolvido considerando o comportamento da cinética de crescimento, a da regulação da fase de crescimento *versus* fase de morte, do coeficiente de manutenção celular e liberação de bioetanol residual.

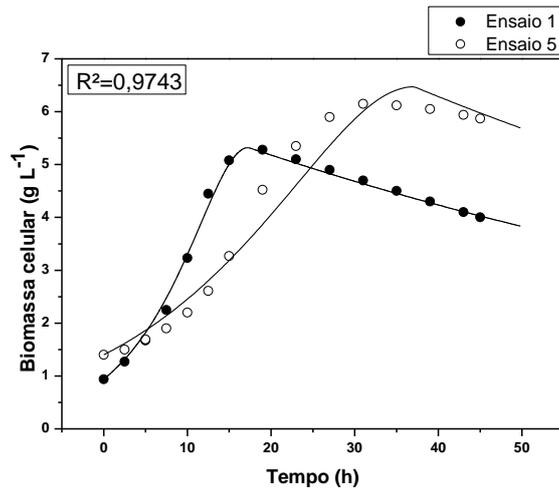
Nessa perspectiva, salienta-se que a regulação da fase de crescimento e morte celular em um único modelo é uma etapa crítica, visto que a morte celular raramente é estudada nos modelos cinéticos disponíveis na literatura. Para a validação, o ajuste dos dados experimentais com o modelo proposto foi comparado com o ajuste em quatro cenários, sendo o cenário de melhor perfil representado pela Figura 4.9 (a-c) e a comparação com os cenários citados encontra-se na Tabela 4.8.

Cenário 1: Modelo de Phisalaphong sem modificação.

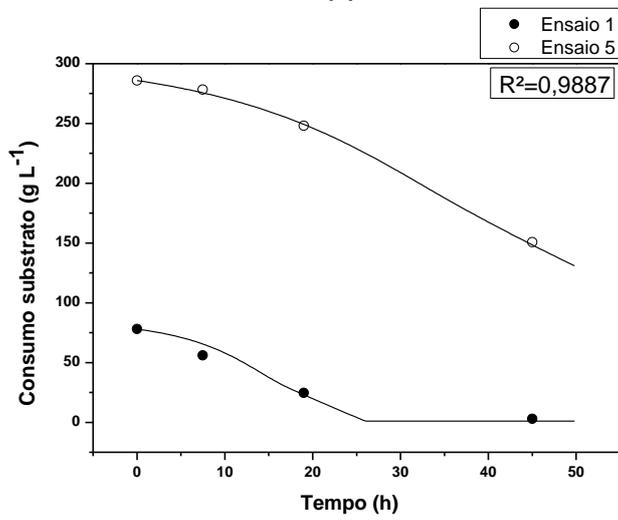
Cenário 2: Modelo de Phisalaphong com regulação da fase de crescimento e morte.

Cenário 3: Modelo de Phisalaphong com termo de manutenção celular e regulação da fase de crescimento e morte.

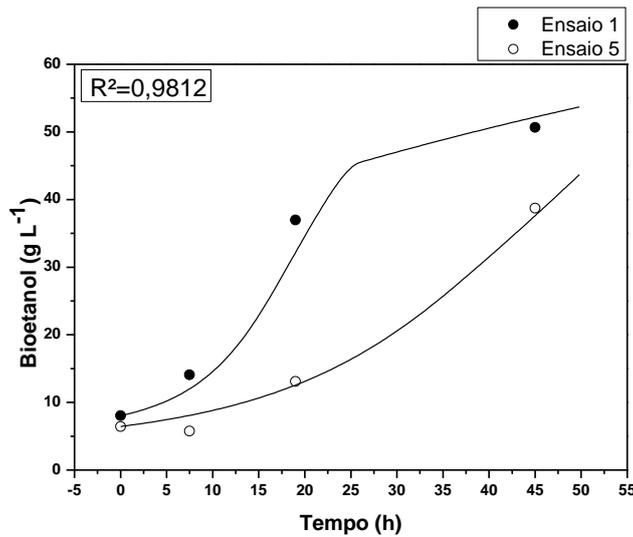
Cenário 4: Modelo proposto, baseado no modelo de Phisalaphong, com adição dos termos de liberação de bioetanol residual e manutenção celular e regulação da fase de crescimento e morte.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.9 - Simulação dos dados experimentais com o novo modelo proposto (cenário 4) em termos de (a) biomassa celular, (b) consumo do substrato e (c) bioetanol

Tabela 4.8 - Parâmetros de Critério de Akaike dos testes realizados para validação do modelo proposto

| Modelo | Função Objetivo | Critério de Akaike (AIC) |
|-----------------|-----------------|--------------------------|
| Cenário 1 | 14,35 | -29,54 |
| Cenário 2 | 13,56 | -49,52 |
| Cenário 3 | 13,25 | -57,31 |
| Modelo proposto | 12,31 | -60,32 |

Pela Tabela 4.8, o aumento do número de parâmetros de um modelo naturalmente aumenta a precisão do ajuste e, conseqüentemente, o coeficiente de determinação (R^2). Por isso, para validar se um novo parâmetro representa, de fato, o comportamento do fenômeno, observa-se a resposta do critério de Akaike.

A implementação das condições propostas gradualmente melhora o resultado do ajuste (Tabela 4.8) e valida-se, assim, um modelo cinético mais representativo para a fermentação estudada, baseado na premissa de confiabilidade construída pela restrição dos ajustes a dois ensaios combinados de diferentes concentrações de substrato, na temperatura e pH iguais. Além disso, foram avaliados os parâmetros cinéticos a partir do modelo, que estão dispostos na Tabela 4.9:

Tabela 4.9 - Valores dos parâmetros cinéticos estimados pelo modelo proposto

| Parâmetros | Unidades | Valores |
|------------|------------|---------|
| U_{max} | h^{-1} | 0,50 |
| K_s | $g L^{-1}$ | 0,80 |
| K_{is} | $g L^{-1}$ | 28,40 |
| PX_{max} | $g L^{-1}$ | 26,30 |
| Y_{xs} | $g g^{-1}$ | 0,62 |
| K_d | h^{-1} | 0,02 |
| K_{cm} | $g L^{-1}$ | 0,17 |
| V_{max} | h^{-1} | 0,52 |
| K_{sP} | $g L^{-1}$ | 19,20 |
| K_{iP} | $g L^{-1}$ | 1,56 |
| P_{pmax} | $g L^{-1}$ | 45,60 |
| Y_{ps} | $g g^{-1}$ | 0,62 |
| K_p | h^{-1} | 0,06 |

A Tabela 4.9 apresenta os 13 parâmetros estimados pelo modelo proposto a partir das estimativas iniciais. E, quanto aos graus de liberdade, o número de dados experimentais que foram usados: tem que somar o número de dados experimentais para biotanol, biomassa e substrato.

Ainda, pela Tabela 4.9, salienta-se que baixos valores de Px_{max} , K_{is} e K_{iP} ($26,3$, $28,4$ e $1,56 g L^{-1}$) obtidos neste estudo em comparação aos dispostos em estudos de ARIYAJAROENWONG *et al.* (2016) ($83,35 g L^{-1}$; $308,13 g L^{-1}$ e

299,67 g L⁻¹) e de TRIGUEROS *et al.* (2016) (25-150 g L⁻¹; 80-110 g L⁻¹ e 65-200 g L⁻¹) exibem a alta inibição do substrato e do produto, respectivamente, no crescimento.

Desta forma, a determinação destes parâmetros ajustados possibilita a avaliação de aspectos fermentativos e aplicações industriais, assim como permite projetar equipamentos a operar nestas mesmas condições citadas pela presente pesquisa e dentro das condições experimentais delimitadas pela modelagem.

4.4 Produção de bioetanol: delineamento composto central rotacional

Os ensaios referentes ao DCCR (12 -22), conforme descritos em materiais e métodos (item 3.5), os ensaios foram fermentados por um tempo de 58 h para a produção de bioetanol. Entretanto, a análise estatística foi realizada no tempo de 40 h. A Tabela 4.10 apresenta o efeito dos resultados médios da produção de bioetanol (g L⁻¹) em 40h para o DCCR.

Tabela 4.10 - Matriz do delineamento composto central rotacional com os valores reais das variáveis averiguadas e a resposta para o bioetanol (g L⁻¹) para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 40 h

| Ensaio | Variáveis independentes | | Variável resposta |
|--------|------------------------------------|----------------------|--|
| | Temperatura (°C) (X ₄) | pH (X ₅) | Bioetanol (g L ⁻¹) (Y ₃) |
| 12 | 22,9 | 2,8 | 13,53±0,09 |
| 13 | 37,1 | 2,8 | 24,19±0,04 |
| 14 | 22,9 | 4,2 | 23,95±0,09 |
| 15 | 37,1 | 4,2 | 40,97±0,08 |
| 16 | 20 | 3,5 | 30,00±0,07 |
| 17 | 40 | 3,5 | 44,97±0,06 |
| 18 | 30 | 2,5 | 8,75±0,10 |
| 19 | 30 | 4,5 | 27,80±0,09 |
| 20 | 30 | 3,5 | 45,95±0,07 |
| 21 | 30 | 3,5 | 44,91±0,08 |
| 22 | 30 | 3,5 | 40,73±0,07 |

Ao realizar a análise estatística em 58 h e avaliar o comportamento cinético destes ensaios (12-22), percebeu-se que, entre 21 - 40 h de fermentação, com exceção de 4 ensaios, todos os demais encontravam-se com concentrações de substrato “carbono” abaixo de 10-15 g L⁻¹. Este valor implicava diretamente no comportamento do bioetanol, fazendo com que este pouco se elevasse, estabilizasse ou até mesmo caísse, o mesmo ocorrendo com o número de células viáveis. Por este motivo, o planejamento DCCR foi avaliado em 40 h e não 58h.

Entretanto, os dados estatísticos de 21 h e 58 h encontram-se apresentados no Apêndice E.

Analisando a Tabela 4.10, nota-se que as maiores produções de bioetanol ocorreram nos ensaios do ponto central, valor médio igual a $43,86 \text{ g L}^{-1}$ ($30 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 3,5) e ensaio 17 ($40 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 3,5), com $44,91 \text{ g L}^{-1}$ de bioetanol. Verifica-se que ambos os ensaios possuem o mesmo pH, diferindo na temperatura, bem como as duas temperaturas estão na faixa ótima para a levedura em estudo, 30 a $52 \text{ }^\circ\text{C}$, segundo ROSSI *et al.* (2009) e LANE & MORRISSEY (2010).

A análise estatística dos resultados do DCCR foi realizada por meio do Diagrama de Pareto (Figura 4.10), estimativa de efeitos principais e interações das variáveis (Tabela 4.11), análise de variância (ANOVA) (Tabela 4.12), modelo de regressão (Eq. 4.3), gráfico dos valores preditos por valores observados (Figura 4.11), além de superfícies de contorno e resposta (Figura 4.12) para avaliar as variáveis significativas no processo de produção de bioetanol (Y_3).

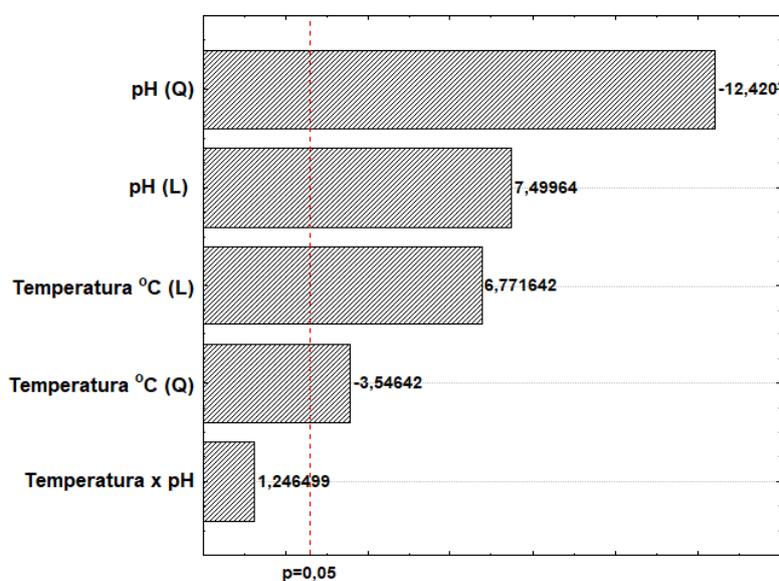


Figura 4.10 - Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações averiguadas no delineamento composto central rotacional ao nível de confiança de 95% para a variável bioetanol para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 40 h

Tabela 4.11 - Estimativa de efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas no delineamento composto central rotacional em 58 h de fermentação para a variável bioetanol para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 40 h

| Resposta | Variáveis | Efeito | p-valor | Coefficiente | Erro padrão do coeficiente |
|----------------|---------------------------------|--------|----------|--------------|----------------------------|
| Y ₃ | Média/Intercepto | 43,85 | 0,000001 | 43,85 | 1,47 |
| | X ₄ (L) | 12,24 | 0,001067 | 6,12 | 0,90 |
| | X ₄ (Q) | -7,67 | 0,016450 | -3,84 | 1,08 |
| | X ₅ (L) | 13,46 | 0,000666 | 6,73 | 0,90 |
| | X ₅ (Q) | -26,25 | 0,000060 | -13,12 | 1,06 |
| | X ₄ x X ₅ | 3,18 | 0,267794 | 1,59 | 1,28 |

R²: 0,98098 (Y₃).

(L) é condição linear e (Q) quadrática.

Tabela 4.12- Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento delineamento composto central rotacional para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 40 h

| Resposta | Fonte de variância | Soma Quadrática (SQ) | Graus de Liberdade (GL) | Média Quadrática (MQ) | F _{calc} | F _{tab} |
|----------------|--------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|
| Y ₃ | Modelo | 1750,51 | 4 | 437,63 | 67,24 | 5,19 |
| | Erro | 32,54 | 5 | 6,51 | | |
| | TOTAL | 1711,45 | | | | |

Analisando o Diagrama de Pareto (Figura 4.10) e o p-valor (Tabela 4.11) num intervalo de confiança de 95 % (p-valor<0,05), verifica-se que dentre as variáveis avaliadas, a temperatura (X₄) e o pH (X₅) foram significativas positivamente para a produção de bioetanol na condição linear e negativamente na condição quadrática, ou seja, quanto menor (X₄) e (X₅) na condição quadrática, maior será a obtenção de bioetanol, e quanto maior (X₄) e (X₅) na condição linear, maior será (Y₃).

Observa-se, nas Tabelas 4.11 e 4.12, que o modelo se apresentou significativo para fins preditivos, proporcionando um coeficiente de determinação de R² 0,98098. Aplicando o teste F, tem-se que o valor de F(calc) = 67,24 foi aproximadamente 13 vezes maior que o F tabelado (F_{tab 4,5,0,05} = 5,19) num intervalo de confiança de 95 % (BARROS *et al.*, 2010). Além disso, o modelo de regressão proposto obtido a partir das variáveis reais (Eq. 4.3) é válido para a produção de bioetanol descrevendo o comportamento da levedura *K. marxianus* CCT 4086 em PSQD para a formação do composto de interesse (Y₃) em 40 h de bioprocessamento.

$$Y_3 = -378,68 + 4,31X_4 - 0,08X_4^2 + 187,51X_5 - 26,78X_5^2 + 0,32 X_4:X_5 \quad \text{Eq. (4.3)}$$

O modelo de variância obtido pela ANOVA pode ainda ser avaliado pelo comportamento observado no gráfico de valores preditos pelos observados, conforme apresentado na Figura 4.11 e pela superfície de contorno e de resposta (Figura 4.12).

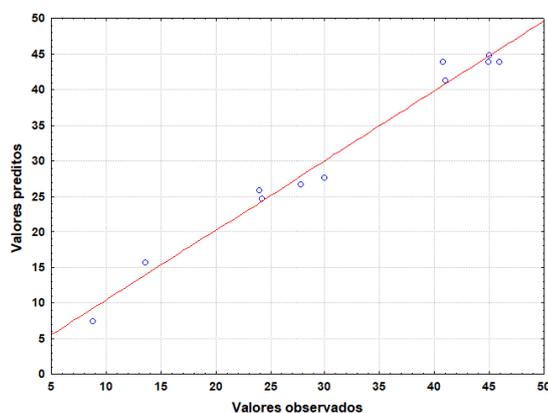


Figura 4.11 - Resultado estatístico do delineamento composto central rotacional para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 para os valores preditos pelos valores observados para a variável bioetanol em 40 h

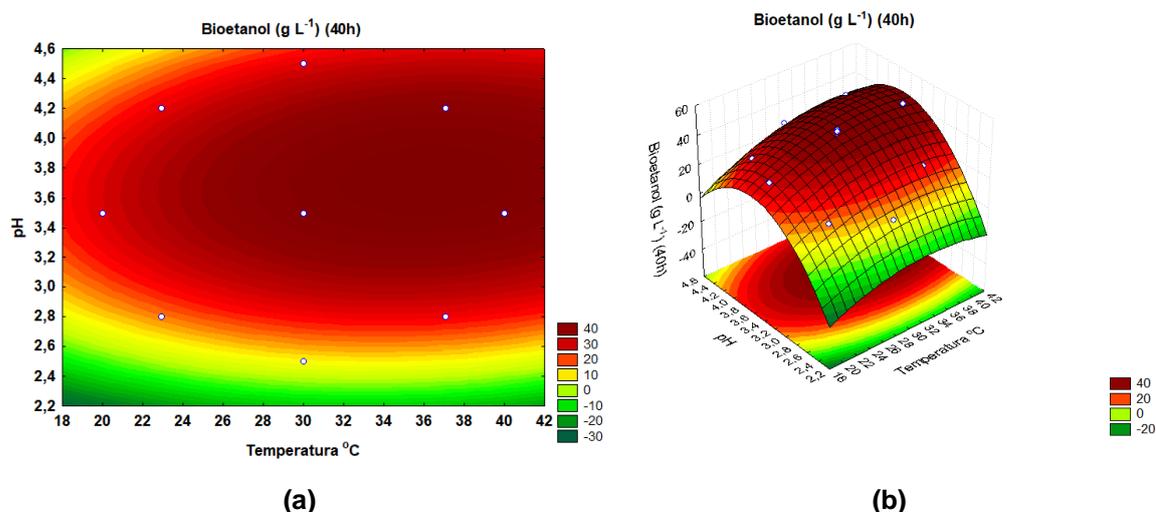


Figura 4.12 - Superfície de contorno (a) e de resposta (b) do delineamento composto central rotacional para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 para a variável bioetanol em 40 h

A Figura 4.11 apresenta que os valores observados estão em concordância em relação aos valores preditos, sendo que o modelo de bioetanol é explicado por 98% de variância, indicando correlação entre os valores e apresenta confiabilidade (REENCHER & SCHAALJE, 2007; BARROS *et al.*, 2010; MURARI *et al.*, 2019).

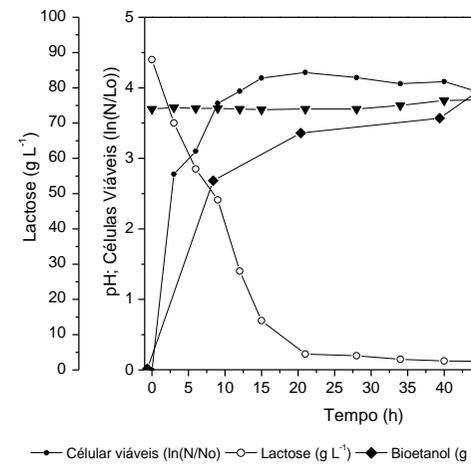
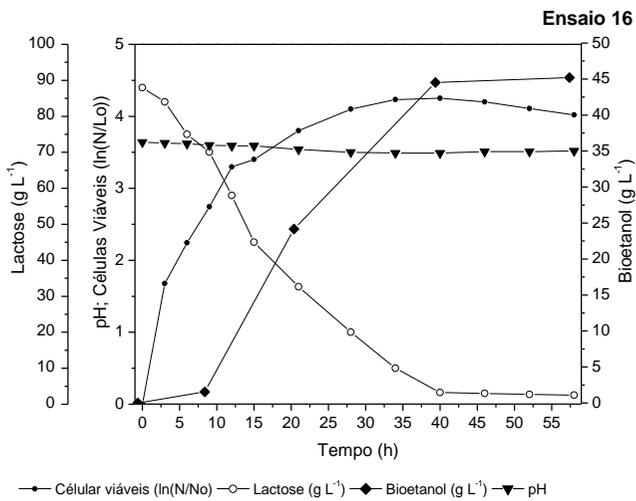
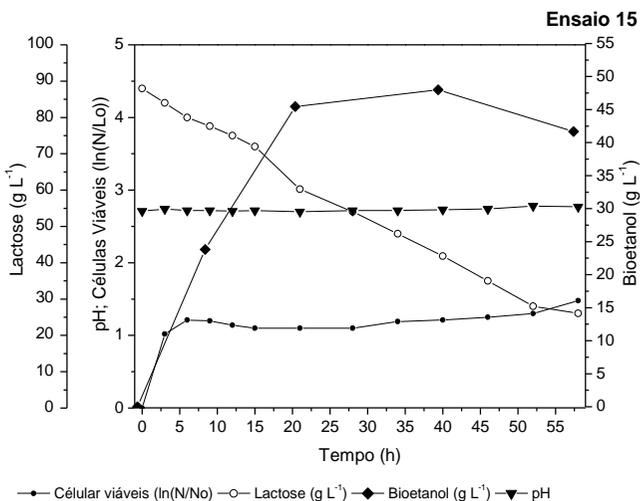
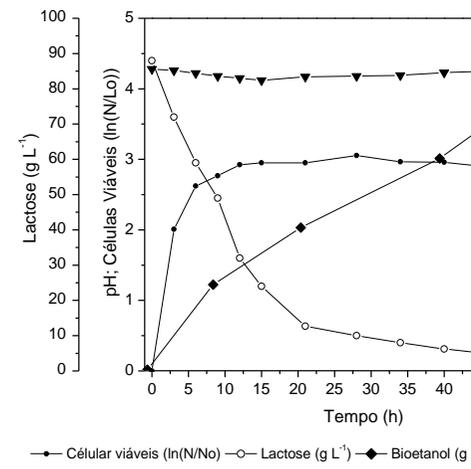
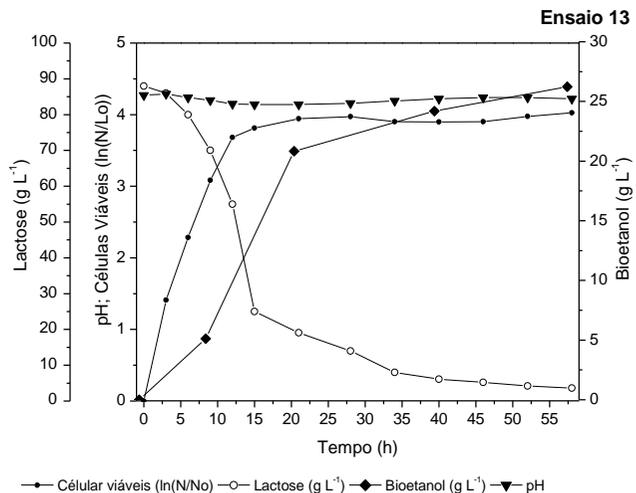
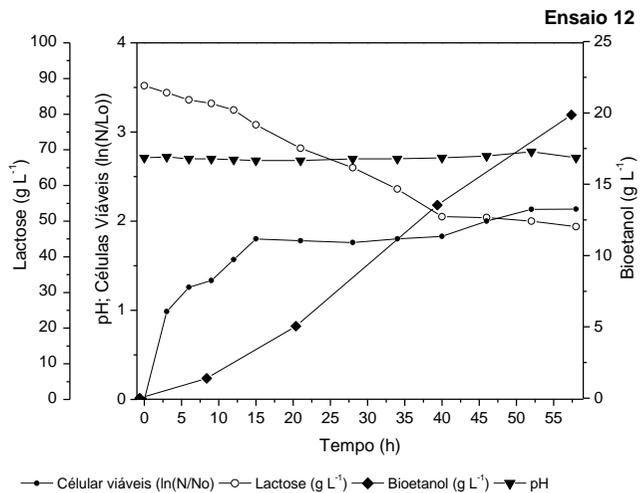
A análise estatística mostrou que os fatores temperatura e pH influenciam na produção de bioetanol quando utiliza-se PSQD e *K. marxianus*, sendo a faixa de pH ótima para a produção de 3,5 - 4,0, e temperatura entre 36 e 40 °C. Estes são condizentes com a literatura, a qual indica que o crescimento desenvolveu-se

entre a faixa de temperatura usual do espectro de termotolerância (FONSECA *et al.*, 2008; ROSSI *et al.*, 2009; LANE & MORRISEY, 2010; LANE *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2015; NACHAIWIENG *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016; MURARI *et al.*, 2018; MURARI *et al.*, 2019).

Na Tabela 4.13 são apresentados o número de células viáveis (NCV mL⁻¹) e os resultados dos parâmetros cinéticos de velocidade específica de crescimento (μ_x), conversão de coeficiente de substrato em bioetanol ($Y_{P/S}$), produtividade de bioetanol (Q_P) e conversão teórica de substrato em bioetanol (n) para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 para o delineamento composto central rotacional. O comportamento cinético dos ensaios 12 ao 22 representados pelo crescimento celular da levedura *K. marxianus* durante as bioconversões estão apresentados na Figura 4.13.

Tabela 4.13 - Parâmetros cinéticos para os ensaios do delineamento composto central rotacional a partir da levedura *K. marxianus* e CCT 4086

| Ensaio | NCV (10 ⁸ mL ⁻¹) 40 h | μ_x (h ⁻¹) | $Y_{P/S}$ (g g ⁻¹) | Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹) | n (%) |
|--------|--|----------------------------|--------------------------------|--|--------------|
| 12 | 0,55 | 0,14 | 0,50 | 0,34 | 93,56 |
| 13 | 0,26 | 0,20 | 0,52 | 0,60 | 97,57 |
| 14 | 3,25 | 0,30 | 0,41 | 0,59 | 76,43 |
| 15 | 0,96 | 0,43 | 0,48 | 0,72 | 90,98 |
| 16 | 3,05 | 0,30 | 0,52 | 1,11 | 97,87 |
| 17 | 0,86 | 0,38 | 0,32 | 1,27 | 59,82 |
| 18 | 0,50 | 0,15 | 0,36 | 0,32 | 67,21 |
| 19 | 2,68 | 0,44 | 0,48 | 0,56 | 90,24 |
| 20 | 2,93 | 0,31 | 0,58 | 1,14 | 94,11 |
| 21 | 2,28 | 0,28 | 0,54 | 1,15 | 93,88 |
| 22 | 2,34 | 0,30 | 0,56 | 1,06 | 95,36 |



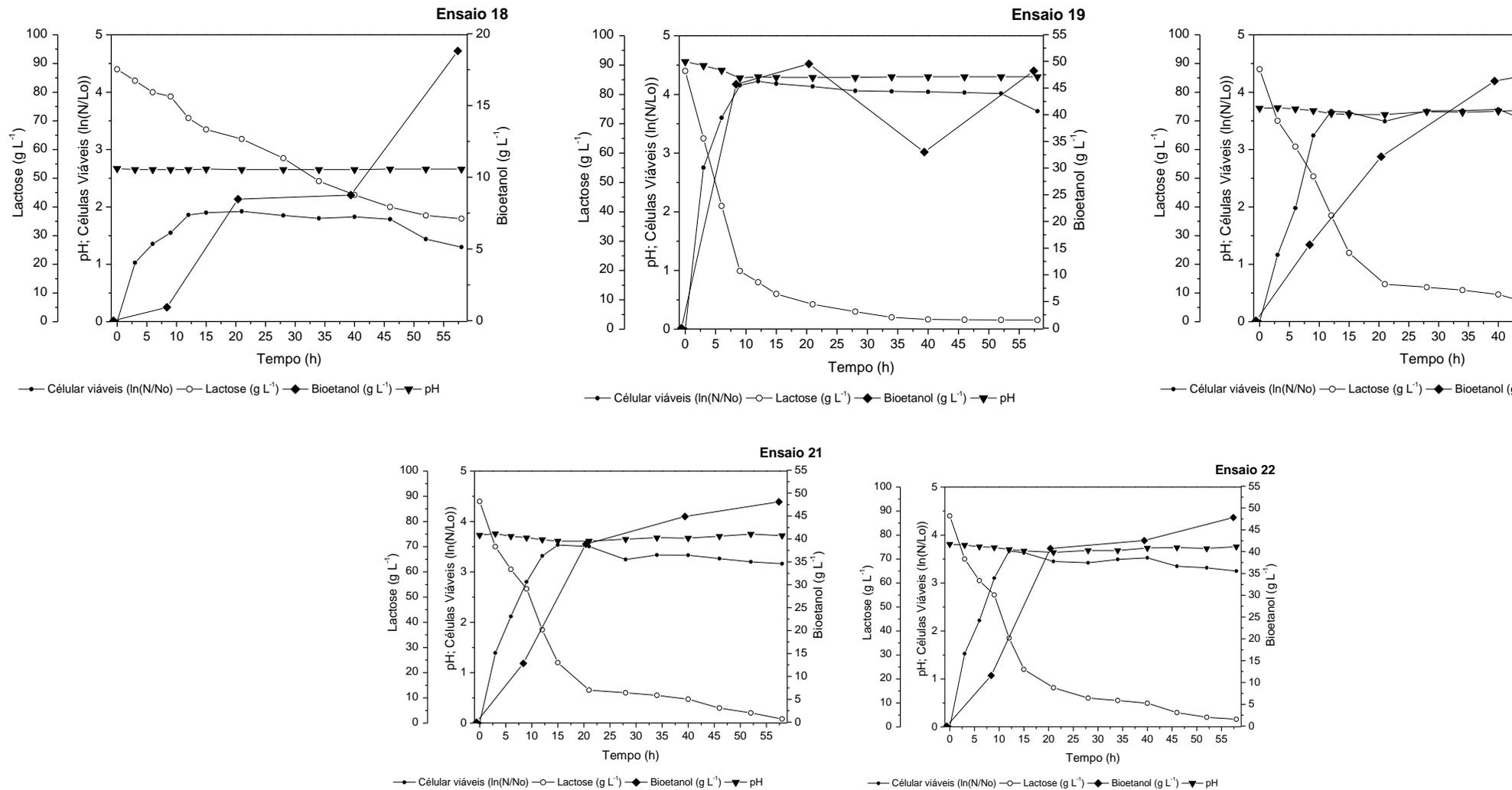


Figura 4.13 - Perfil cinético da levedura *K. marxianus* CCT 4086 para produção de bioetanol (g L⁻¹), células viáveis (ln(N/No)), consumo de substrato lactose (g L⁻¹) e pH dos ensaios do delineamento composto central rotacional

Analisando a Tabela 4.10, a maior produção de bioetanol em 40 h se deu no ponto central, a 30 °C, pH 3,5 e 88 g L⁻¹ de lactose, nos ensaios 20, 21 e 22, sendo 45,95, 44,91 e 40,73 g L⁻¹, respectivamente. Em relação ao crescimento celular (Tabela 4.13), o ensaio com maior produção foi o 14 (37,1 °C e pH 4,2) com 3,25.10⁸ NCV mL⁻¹ no mesmo tempo de processo (40 h), seguido do ensaio 16 com 3,05.10⁸ NCV mL⁻¹ e os ensaios 20, 21 e 22 (ponto central), com média de 2,52.10⁸ NCV mL⁻¹ e desvio padrão de 0,35.

Quanto aos parâmetros cinéticos (Tabela 4.13), a velocidade específica de crescimento (μ_x) foi melhor para o ensaio 7 ($\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$), o coeficiente de substrato em bioetanol ($Y_{P/S}$) foi melhor para os ensaios do ponto central, sendo 0,58, 0,54 e 0,56 g g⁻¹, respectivamente. Enquanto a produtividade foi melhor para o ensaio 17 (1,27 g L⁻¹ h⁻¹), a conversão teórica de substrato em bioetanol (η) apresentou os melhores valores para os ensaios 16 e 13, com 97,87 e 97,57 % de rendimento, respectivamente.

Como já mencionando ao se observar a Figura 4.13, se verifica que as fermentações alcoólicas foram desenvolvidas por 58 h no intuito de avaliar a maior produção e rendimento em bioetanol, contudo, observou-se um efeito negativo no tempo, a partir de 40 h, com queda ou baixa produção de células viáveis a partir deste tempo, pois pelos perfis cinéticos (Figura 4.13), nota-se a diminuição da fonte de carbono (lactose total) em quase todos os ensaios.

É possível constatar um processo inibitório pela insuficiência ou baixas concentrações de açúcares, indicando que a levedura *K. marxianus* CCT 4086 apresenta uma limitação em termos de carbono quando as concentrações deste nutriente estiverem abaixo de 10 g L⁻¹. Visto que, para dar continuidade às bioreações, faz-se necessário a adição de pulsos deste nutriente, caso queira-se aumentar a concentração de bioetanol, tornando o processo, ao invés de batelada, batelada alimentada. Caso contrário, o processo deve ser cessado antes de 40 h, sendo necessário um novo estudo entre 21- 40 h para determinar o melhor tempo para a produção de bioetanol e célula, se estes forem os produtos de interesse.

Outrossim, ainda é possível identificar (Figura 4.13) que houve uma leve acidificação em todos os meios, sendo que o processo entrou em fase estacionária de crescimento, em torno de 9 h (ensaios 12-22), indicando que houve conversão de lactose em bioprodutos fermentados. Para TORTORA *et al.* (2010), a diminuição do pH no meio reacional é provocada pela formação de ácidos, resultantes do

metabolismo das leveduras e expelidos para o meio fermentativo, promovendo a estabilização do pH que é um indicativo do cessar do crescimento microbiano. Este comportamento estacionário também observado por FASOLI *et al.* (2016), TAVARES *et al.* (2018) e MURARI *et al.* (2018).

Nessa perspectiva, ANDREWS (1968), SCHMIDELL *et al.* (2001) e CHIN *et al.* (2015) descreveram que, em processos etanólicos, o pH baixo colabora para a formação de bioetanol, contudo, pode inibir o crescimento celular. Ainda, em relação à fase estacionária, salienta-se que, além da formação de metabólitos secundários, inibitórios ou tóxicos, a viscosidade do mosto fermentativo pode influenciar na transferência do nutriente oxigênio para o meio e por consequente, uso do oxigênio pelas leveduras (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Segundo MURARI *et al.* (2018), a produção de bioetanol é possível em condições aeróbicas, pois com a aeração há um estímulo pelo consumo da lactose, bem como na conversão em seu monossacarídeos. Para YOUSEF (2015), este fato é possível para a levedura em estudo, pois devido à inibição da respiração em ambientes agitados, há uma saturação do meio, proporcionando o Efeito *Crabtree* (ZOPPELLARI & BARD, 2013).

Em relação à aeração, a levedura do gênero *Kluyveromyces* é *Crabtree* negativa, ou seja, possui a capacidade em obter elevadas taxas de crescimento celular em aerobiose e alta concentração de bioetanol em condições de anaerobiose (SUZART & DIAS, 2007; FONSECA *et al.*, 2008; LANE & MORRISSEY, 2010; DASHKO *et al.*, 2014). Entretanto, a levedura comumente mais empregada é a *S. cerevisiae*, que é *Crabtree* positiva (BELLAVAR *et al.*, 2004).

Considerando a produção de bioetanol e células microbianas, para NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976), o bioetanol produzido pela levedura pode ocasionar efeito tóxico maior nas células do que o efeito causado pelo etanol adicionado no mosto fermentativo.

SILVEIRA *et al.* (2005), empregando a mesma levedura desta pesquisa em 240 g L⁻¹ de lactose a 250 rpm e 30 °C, obtiveram 57g L⁻¹ de bioetanol. Já HADIYANTO *et al.* (2014) produziram bioetanol a partir de soro de leite e *K. marxianus* em reator batelada alimentada (30 °C e pH 4,5) na concentração de bioetanol (5,46 g L⁻¹), com velocidade específica de crescimento de 0,186 h⁻¹ e conversão de substrato em bioetanol Y_{P/S} 0,21 g g⁻¹.

JIN *et al.* (2016) alcançaram 89,5 % de conversão em bioetanol com a levedura *S. cerevisiae*, utilizando permeado de soro de leite e 30 % de trigo como substrato, entretanto os autores mencionam que a lactose em sua pesquisa foi menos favorável para a produção de bioetanol ao ser comparada ao amido presente no trigo.

BACH (2012) também avaliou a produção de bioetanol com *S. cerevisiae* em soro de queijo e obteve 5,60 % (v/v) de bioetanol em 59 h (28 °C, pH ≈ 6,00, 0,10 % de enzima lactase).

Diante do explanado, destaca-se que as condições experimentais dos melhores ensaios produtores de bioetanol estão condizentes entre si, visto que para o planejamento experimental fatorial 2³ o ensaio 1 (29 °C, pH 4,5 e 88 g L⁻¹ de lactose) obteve concentração de 50,65 g L⁻¹ em 45 h e para o DCCR os ensaios do ponto central (30 °C, pH 3,5 e 88 g L⁻¹ de lactose) formaram em média 43,87 g L⁻¹ deste composto em menor tempo (40 h), assim, destaca-a diferença para o valor de pH.

O DCCR conduzido por 58 h, ao ser analisado sob o ponto de vista industrial, não seria um bom processo, devido a baixa variação na produção de bioetanol nos tempos de 40 a 58 h. Visto que esta diferença no tempo processual, ocasionam custos operacionais, mão-de-obra e espaço físico empregados.

4.6 Bioprodutos

Dentre os bioprodutos formados durante os bioprocessos realizados com PSQD e a *K. marxianus* CCT 4086 (ensaios do planejamento experimental fatorial 2³ e DCCR), estão as células microbianas (levedura), galacto-oligossacarídeos e os ácidos orgânicos.

Deste modo, a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 foi caracterizada em termos de composição química elementar e teor de proteínas em 58 h, conforme apresentado pela Tabela 4.14.

Tabela 4.14 - Caracterização da composição química elementar e proteica da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 (seca) em 58 h

| Elementos | Símbolos | Concentração (mg kg ⁻¹) | IDR (mg kg ⁻¹)* | (%) |
|-----------|----------|-------------------------------------|-----------------------------|-------|
| Fósforo | P | 20800,79 | 700 | |
| Enxofre | S | 6226,45 | | |
| Cloro | Cl | 16238,52 | | |
| Potássio | K | 63183,63 | 3500 | |
| Cálcio | Ca | 2515,47 | 800 - 1200 | |
| Vanádio | V | 6,88 | 0,5 - 5 | |
| Ferro | Fe | 553,96 | 15 | |
| Cobre | Cu | 11,09 | 1,5 - 3 | |
| Zinco | Zn | 108,81 | 12 - 15 | |
| Proteína | | | 50 | 74,54 |

* Ingestão diária recomendada (FAO, 1991).

Analisando a Tabela 4.14, nota-se que a composição da levedura é rica em elementos químicos essenciais à nutrição humana, os quais possuem recomendação diária de consumo (FAO, 1991). Dentre os elementos, o potássio e o fósforo apresentaram as maiores concentrações, respectivamente.

A proteína de origem microbiana pode ser uma solução para atender à demanda mundial por alimentos e proteínas alimentares (SCRIMSHAW, 1968; UN DESA, 2017). Dessa forma, a levedura *K. marxianus* CCT 4086 seca apresentou 74,54 ± 0,17 % de proteína, sendo uma concentração viável por se tratar de uma levedura não patogênica (LANE & MORRISSEY, 2010).

Segundo ARAÚJO *et al.* (2009) e NASSERI *et al.* (2011), a produção de biomassa microbiana pode chegar a aproximadamente 70 % do conteúdo microbiano proteico dissecado, disponibilizando a qualidade nutricional comparável à de um ovo de galinha.

Dessa forma, destaca-se o potencial de aplicação da levedura *K. marxianus* CCT 4086 na alimentação humana e animal em virtude da sua composição nutricional. Pois, além de ser uma fonte rica em proteínas, esta levedura apresenta minerais essenciais para a saúde alimentar e recomendados pela FAO (1991), com o intuito de suprir as necessidades de nutrientes.

Além disso, a *K. marxianus* é um microrganismo com precárias restrições de uso, além de ser reconhecida por ser GRAS (*Generally Regarded As Safe*) e QPS (*Qualified Presumption of Safety*) nos Estados Unidos e Europa (LANE & MORRISSEY, 2010).

Ademais, a biomassa celular pode ser consumida diretamente em formulações para alimentação animal como célula intacta, na forma lisada com suas partes internas e externas extraídas e processadas ao serem empregadas como ingrediente ou um substituto para alimentos ricos em proteínas, ou ainda, na forma suplementos e aditivos alimentares como os intensificadores de sabor e agentes que influenciam a textura dos alimentos (UGALDE & CASTRILLO, 2002).

Nessa perspectiva, uma alimentação adequada e balanceada, promove saúde, bem estar e qualidade de vida, assegurando as reações saudáveis do corpo e prevenindo doenças (SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2016).

Como citado por SMITH *et al.* (2016), a biomassa microbiana oriunda da levedura *K. marxianus* pode proporcionar ações prebióticas ao produto, além de ser probiótica. PENDÓN *et al.* (2020) também afirmaram que as células da *K. marxianus* possuem efeito probiótico no organismo.

A formação de oligossacarídeos de lactose pela reação de transgalactosilação com a enzima β -galactosidase é denominado por galacto-oligossacarídeos, os GOS. Assim, a Tabela 4.15 dispõe da concentração do GOS para os bioprocessos advindos da levedura *K. marxianus* CCT 4086. No Apêndice F, pode ser visualizado o cromatograma do Ensaio 1, em 45 h de fermentação, detectado por CLAE.

Na Tabela 4.15, destaca-se que a maior produção de GOS ocorreu no ensaio 7 (29 °C, pH 6,5 e 264 g L⁻¹ de lactose), obtendo-se 20,30 g L⁻¹ de GOS, seguido do ensaio 8 (45 °C, pH 6,5 e 264 g L⁻¹ de lactose) com 13,60 g L⁻¹. Ambos ensaios foram conduzidos na mesma concentração de lactose e pH, tendo, como única variável distinta, a temperatura de realização da biotransformação da lactose do PSQD pela *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 em GOS. Além disso, nota-se que estes ensaios (7 e 8) produziram baixas concentrações do composto bioetanol, obtendo-se 29 e 12,80 g L⁻¹, respectivamente.

A condição menos favorecida pela reação de transgalactosilação foi o ensaio 12 (3,91 g L⁻¹ de GOS), realizado com 88 g L⁻¹ de lactose a 37,1 °C e pH 2,8. Esta redução de síntese pode ser justificada pelo baixo pH de realização do processo, assim como a baixa concentração de lactose inicial.

Tabela 4.15 - Formação de GOS total pela *K. marxianus* CCT 4086 nos bioprocessos

| Ensaio | GOS total (g L ⁻¹) | Tempo (h) |
|--------|--------------------------------|-----------|
| 1 | 7,44 | 45 |
| 2 | 5,60 | 45 |
| 3 | 6,10 | 45 |
| 4 | 5,80 | 45 |
| 5 | 12,60 | 45 |
| 6 | 10,20 | 45 |
| 7 | 20,30 | 45 |
| 8 | 13,60 | 45 |
| 9 | 4,80 | 45 |
| 10 | 4,70 | 45 |
| 11 | 4,82 | 45 |
| 12 | 3,91 | 58 |
| 13 | 8,40 | 58 |
| 14 | 6,10 | 58 |
| 15 | 8,01 | 58 |
| 16 | 8,54 | 58 |
| 17 | 8,83 | 58 |
| 18 | 5,21 | 58 |
| 19 | 8,40 | 58 |
| 20 | 8,50 | 58 |
| 21 | 8,60 | 58 |
| 22 | 8,40 | 58 |

Salienta-se ainda (Tabela 4.15) que, é possível realizar a produção de GOS, pelo processo de fermentação alcoólica (ensaio 1-22) sem que haja a adição da enzima β -galactosidase ao bioprocessos. Isto indica o desenvolvimento natural da bioconversão da lactose pela *K. marxianus* em galacto-oligosacarídeos, ou seja, a capacidade de realizar o próprio processo hidrolítico e assim metabolizar a lactose presente no PSQD nos bioprodutos de interesse.

Para INTANON *et al.* (2014) e FRENZEL *et al.* (2015), o processo de formação de GOS é controlado e dependente dos fatores processuais, tais como a temperatura, pH, concentração de lactose no substrato e de enzima adicionada.

MANERA *et al.* (2012) verificaram a síntese do GOS com enzima β – galactosidase oriunda da *K. marxianus* em diferentes fluidos comprimidos, indicando como viável o uso desta enzima em reações de transgalactosilação.

BASSETO *et al.* (2014) estudaram o processo de produção de GOS a partir do substrato soro concentrado de leite (40 % de lactose) por meio de fermentação sequencial, iniciando com a hidrólise pela enzima lactase advinda de *Penicillium sp.*, seguida da adição da bactéria *Bifidobacterium animalis subsp lactis* em 6 h. Após 12 h de bioconversão, os autores identificaram a formação de oligossacarídeos.

Dessa forma, os resultados (Tabela 4.15) estão de acordo com o que prediz a literatura, pois para haver o favorecimento da produção de GOS é necessária elevada concentração de lactose, uma vez que a reação de transgalactosilação compete com a de hidrólise. Nestes ensaios (1-4 e 12-22), as concentrações de lactose são baixas, indicando assim, baixa formação de concentrações de GOS.

Nessa vertente, segundo MAHONEY (1998), a redução do monossacarídeo glicose do meio fermentativo pode elevar os picos de oligossacarídeos. Entretanto, sabe-se que este nutriente pode ter sido convertido pela levedura em bioetanol, biomassa microbiana e ácidos orgânicos, ou ainda, compostos voláteis não identificados.

Ademais, destaca-se que nos fermentados avaliados detectou-se a formação dos ácidos acético, propiônico e valérico. Resultados estes que estão apresentados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 - Formação dos ácidos orgânicos pela *K. marxianus* CCT 4086 nos bioprocessos

| Ensaio | Ácidos orgânicos (g L ⁻¹) | | | Tempo (h) |
|--------|---------------------------------------|------------|----------|-----------|
| | Acético | Propiônico | Valérico | |
| 1 | 9,94 | 3,15 | -- | 45 |
| 2 | 8,37 | 7,75 | 2,55 | 45 |
| 3 | 9,01 | 3,83 | 3,86 | 45 |
| 4 | 7,92 | 7,23 | 3,32 | 45 |
| 5 | 9,97 | 6,83 | -- | 45 |
| 6 | 10,76 | 10,70 | -- | 45 |
| 7 | - | 10,52 | -- | 45 |
| 8 | 11,24 | 20,45 | -- | 45 |
| 9 | 11,13 | 10,62 | -- | 45 |
| 10 | 11,45 | 11,15 | -- | 45 |
| 11 | 10,8 | 10,96 | -- | 45 |
| 12 | 3,73 | -- | 0,89 | 58 |
| 13 | 3,55 | -- | 1,10 | 58 |
| 14 | 5,25 | 2,56 | 0,89 | 58 |
| 15 | 8,28 | -- | 1,50 | 58 |
| 16 | 3,44 | -- | 1,25 | 58 |
| 17 | 6,42 | 4,60 | 1,34 | 58 |
| 18 | 2,60 | -- | 1,75 | 58 |
| 19 | 3,42 | -- | 1,99 | 58 |
| 20 | 2,60 | -- | 1,12 | 58 |
| 21 | 2,55 | -- | 0,99 | 58 |
| 22 | 2,58 | -- | 0,98 | 58 |

-- NÃO DETECTADO.

Pela Tabela 4.16, nota-se que o ácido acético esteve presentes em todos os bioprocessos, apresentando maior produção no ponto central dos ensaios 9, 10 e 11, sendo 11,24; 11,13 e 10,8 g L⁻¹, respectivamente. Já para o ácido propiônico, a maior produção ocorreu no ensaio 8 (45 °C, pH 6,5 e 264 g L⁻¹ de lactose), enquanto

o ácido valérico teve maior detecção nos ensaios 2-4. Os demais ácidos (lático, fórmico e butírico) foram produzidos em menores concentrações na faixa de 0,5 a 2 g L⁻¹.

Esta produção (Tabela 4.16) pode ser confirmada pela leve diminuição do pH nos ensaios fermentativos (Figuras 4.5 e 4.13), a qual é ocasionada pela formação ácidos, álcoois aromáticos e compostos secundários (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976; THOMSON *et al.*, 2005; WIEBE *et al.*, 2008; GUNESER *et al.*, 2016), além da própria produção de bioetanol (PARRONDO *et al.*, 2009; MURARI *et al.*, 2019).

Nessa vertente, para LIMA *et al.* (2001), pH baixos podem provocar a redução dos nutrientes como nitrogênio e potássio, ocasionando sensibilidade ao bioetanol e/ou ácidos orgânicos.

LUSTRATO *et al.* (2013) relataram a produção de 8,70 g L⁻¹ de ácido acético pelo reuso do soro de leite. A aplicação deste bioproduto foi como fonte alimentar alternativa para ruminantes, devido à sua estabilidade unida à sua palatabilidade e ao valor nutritivo do fermentado. SILVA *et al.* (2008) reportaram que o uso de ácidos orgânicos (ascórbico, cítrico, lático e fumárico) no controle bacteriológico ao serem acrescentados na alimentação animal tem sido viável.

Assim, ficou evidenciado que é possível empregar a matéria-prima PSQD na produção de ácidos orgânicos, como produtos secundários ou subprodutos fermentativos, além de bioetanol, biomassa microbiana e GOS. Esta pesquisa também demonstrou que a integralidade dos bioprocessos pode gerar biotransformações sustentáveis pela aplicação de um processo *eco-friendly*, devido à inexistência de liberação de resíduos, atrelada à valorização do permeado de soro de queijo desproteínizado na produção de novos produtos comerciais, constituindo, assim, uma biorrefinaria.

4.7 Biorrefinaria

Com este estudo foi possível estimar o potencial da matéria-prima PSQD como fonte nutricional para bioconversões com o intuito de agregar valor comercial a este subproduto pouco apreciado, disponibilizar variabilidade de produtos no mercado, além de desenvolver um processo sustentável, limpo e integrado, possível constituição de uma biorrefinaria.

Como mencionando ao longo desta tese 50-60 % do volume de soro e permeado de soro de queijo desproteínizado já possuem aplicações industriais (COTÉ *et al.* 2004; PRAZERES *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2015), entretanto, o volume restante não, e esta pesquisa mostrou que existem diferentes formas de valorizar o permeado de soro de queijo desproteínizado, de modo a tornar o processo totalmente sustentável e bioeconômico.

Nessa perspectiva, pode-se considerar a biorrefinaria como uma via promissora para o processamento dos subprodutos ou coprodutos industriais, devido à variedade de produtos que podem ser formados, proporcionando um contexto de economia circular, fluxos e valorizando a saída dos produtos (TOMÁS-PEJÓ *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2019; DRAGONE *et al.*, 2020). Além disso, pode-se obter produtos com perfil ecológico pela sustentabilidade do desempenho ambiental, econômico e social, além da otimização dos processos de produção (JULIO *et al.*, 2017).

Além disso, a biomassa produzida durante esse processo integrado pode ser recuperada e adicionada em alimentos, como forma de incremento proteico, aminoácidos e vitaminas. Isto é possível devido a sua composição nutricional ser rica em micro e macro constituintes, além da biomassa ser de fácil digestibilidade e apresentar-se como alternativa para as ineficiências que afligem os sistemas alimentares. Como citado por PENDÓN *et al.* (2020) obter uma biomassa celular probiótica.

Assim, é inovação o uso industrial da levedura *K. marxianus*, valorizando sua variabilidade metabólica ao compará-la com outras leveduras convencionais como a *S. cerevisiae* (LANE & MORRISSEY, 2010; LANE *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2015; NACHAIWIENG *et al.*, 2015; FASOLI *et al.*, 2016; MURARI *et al.*, 2018; MURARI *et al.*, 2019).

Deste modo, a comercialização de levedura *K. marxianus* como biomassa celular na forma íntegra ativa ou inativa, lisada, liofilizada, encapsulada, ou ainda, como biomassa recuperada pode se tornar vantajosa, por se tratar de um novo processo de produção. Segundo LANE & MORRISSEY (2010), essa levedura pode ser usada também como bio-íngrediente de alto valor agregado para a indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, além de fornecer uma alternativa para reduzir o impacto ambiental.

Ademais, este gênero de levedura tem sido estudada na produção de enzimas como a β -galactosidase, proteínas microbianas para alimentação animal ou humana e biocombustíveis (FONSECA *et al.*, 2008). VERA *et al.* (2020) indicaram que a enzima β -galactosidase tem aplicabilidade diversa na indústria, como produção com baixa lactose ou isenta desta, como catalisador nas reações de transgalactosilação e síntese de oligossacarídeos.

Segundo estudos de COTÉ *et al.* (2004); SILVEIRA *et al.* (2005); GABARDO *et al.* (2014); HADIYANTO *et al.* (2014); TOFALO *et al.* (2014); YADAV *et al.* (2014); ZHOU *et al.* (2014); NACHAIWIENG *et al.* (2015); FASOLI *et al.* (2016); BARROS *et al.* (2017) e MURARI *et al.* (2017), o uso da levedura *K. marxianus* tem se destacado por assimilar de forma direta a lactose em seu metabolismo contribuindo para os processos biotecnológicos.

Quanto à obtenção de GOS, para BASSETO *et al.* (2014), a produção dos galacto-oligossacarídeos em associação ao crescimento microbiano que consome o excesso de produção dos monossacarídeos formados durante a bioconversão, promove o processo de pré-purificação do produto final, ou seja, a biotransformação fundamental para um processo integrado.

Em vista disso, deve-se trabalhar com a relação C e N para favorecer a via metabólica desejada, como corroborado por ESPOSITO (2004), que afirma que carbono em excesso favorece a formação de bioetanol e compostos secundários.

Para RODRIGUES *et al.* (2016), é essencial o surgimento de novas aplicações biotecnológicas para o emprego dos resíduos agroindustriais que podem ser implementados com sucesso, sustentabilidade econômica e ambiental como uma proposta industrial para a formação de bioetanol.

Assim sendo, a elaboração ou implantação de biorrefinaria possibilita a geração de novas indústrias no segmento lácteo, seguida da geração de empregos e possibilidade de novos mercados de exportação. Além de referir-se a transformações e industrialização de novos produtos, que compactuam com proteção ao ecossistema, por meio de processos *eco-friendly*, autossustentáveis, com emissão zero de resíduos, por empregar a matéria-prima PSQD na forma íntegra, valorizando os potenciais de aplicações.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

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

- As condições no bioprocesso foram imprescindíveis para atingir índices desejáveis de produção de bioetanol, bem como, dos demais bioprodutos de interesse;
- Em relação à produção de bioetanol, pelo planejamento experimental fatorial 2^3 e pelas interações, definiu-se que concentrações menores de lactose, pH e temperaturas baixas favorecem a formação deste composto;
- Quanto à modelagem matemática, verificou-se que o modelo proposto representou o processo de fermentação satisfatoriamente porque considera os efeitos de inibição de crescimento pelo substrato e a fase de morte celular no processo fermentativo, incorporando os efeitos de liberação de bioetanol residual durante a fase de crescimento celular;
- É possível integrar as biotransformações para a obtenção de biomassa microbiana, galacto-oligossacarídeos e ácidos orgânicos;
- Há potencial de empregabilidade deste subproduto, o PSQD, de forma íntegra, contribuindo com a redução dos impactos ambientais, e concomitantemente, obtendo-se produtos com valor agregado;
- Há a integração de uma biorrefinaria pela inexistência de produção de resíduos, sendo economicamente, ambientalmente e socialmente viável, propondo um modelo de inovação sustentável.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a elaboração de trabalhos futuros, sugere-se:

- Avaliação da adição de pulsos de alimentação de fonte de carbono (PSQD) e nutrientes durante o processo de fermentação, visando maior produção de bioetanol e biomassa;
- Realização de planejamentos experimentais almejando maiores concentrações de galacto-oligossacarídeos e ácidos orgânicos;
- Desenvolver a modelagem matemática, com o intuito de considerar todos ou a maioria dos bioprodutos na modelagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ, Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, 2018.

AGUSTRIYANTO, R.; FATMAWATI, A. **Model of Continuous Cheese Whey Fermentation by *Candida Pseudotropicalis***. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*, v. 3, n. 9, p. 471-475, september. 2009.

AKAIKE, H. **A new look at the statistical model identification**. *IEEE Transaction on Automatic Control*, v.19, p 715-723, 1974.

AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS. **Report of Subcommittee on Improved Microscopic Yeast Cell Counting**. *Journal*, v. 46, n.123, 1988.

AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M.; **Fermentação alcoólica: Ciência e tecnologia**. Piracicaba. Fermentec, 2005. 434 p.

ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P. **Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea Batatas L.*) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 3, p. 249-253, dezembro. 2002.

ANDREWS, J. F. **A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 10, p. 707 – 723. 1968.

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 21 ed. Washington, 2005.

ARAÚJO, L. DE F.; DIAS, M. V. C.; BRITO, E. A. DE; OLIVEIRA JÚNIOR, S. **Enriquecimento proteico de alimentos por levedura em fermentação**

semissólida: alternativa na alimentação animal. *Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária*, v. 3, n. 3, p.47-53, setembro. 2009.

ARIYAJAROENWONG, P., P. LAOPAIBOON, A. SALAKKAM, P. SRINOPHAKUN, L. LAOPAIBOON. **Kinetic Models for Batch and Continuous Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice by Yeast Immobilized on Sweet Sorghum Stalks.** *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 66, p 210–216, 2016.

ASHY M. A.; ABOU-ZEID, A. **Potentialities of Yeasts in Production of Single-Cell Proteins (SCP).** *Zentralblatt für Mikrobiologie*, v. 137, n. 5, p. 387 – 394. 1982.

ASSUNÇÃO, Grettya M. **Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de leite desproteínizado de queijo.** Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2014. 132 p. Dissertação (Mestrado).

BABU, M.; RAJ, S. P.; NIRMALA, C. B.; DECCARAMAN, M.; SAGADEVAN, E. **Production of Single Cell Protein using *Kluveromyces marxianus* isolated from paneer whey.** *International Journal of Biomedical and Advance Research*, v. 5, n. 5, p. 255 – 257. 2014.

BACH, F.; FIORESE, M. L.; HASAN, S. D. M.; MOREJON, C. F. M. **Estudo da influência de variáveis no processo de produção de bioetanol de soro de leite.** *Engevista*, v. 16, n. 3, p. 392 - 409, september. 2014.

BACH, Fabiane. **Avaliação das condições de produção de fermentado acético de soro de leite.** Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2012. 136 p. Dissertação (Mestrado).

BAKKER, E.J. **Brazil determined to increase role of biofuels.** Holland Innovation Network Brazil. January 2018. Disponível

em:<<https://www.rvo.nl/sites/default/files/2018/01/brazil-determined-to-increase-role-of-biofuels.pdf>>. Acesso: march 2020.

BANASZEWSKA, A.; CRUIJSSEN, F.; CLAASSEN G. D. H.; VAN DER VORST, J. G. A. J. **Effect and key factors of byproducts valorization: The case of dairy industry.** *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 4, p. 1893 – 1908, april. 2014.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; McHALE, A. O. **Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations. Part I: Yeast in general.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v.14, n.6, p. 809-821, november. 1998.

BARBOSA, A. S.; FLORENTINO, E. R.; FLORÊNCIO, I. M.; ARAÚJO, A. S. **Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: Estudo Cinético de produção de etanol.** *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa (GVAA)*, v.5, n.1, p.07 – 25, janeiro/março de 2010.

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

BARROS, E. M.; CARVALHO, V. C.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. **Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic ethanol production.** *Chemical Engineering Journal*, v. 307, p. 939 – 947, january. 2017.

BARROS, E. M.; CARVALHO, V. C.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. **Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic**

ethanol production. *Chemical Engineering Journal*, v. 307, p. 939 – 947, january. 2017.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de Tecnologia de Alimentos.** São Paulo. Atheneu Editora, 1998.

BASSETO, R. Z.; CRUZ, M. C. R.; ALMEIDA, M. M.; CHIQUETTO, N. C. **Caracterização da produção de Galactooligossacarídeos por fermentação sequencial.** *Evidência*, v. 14, n. 1, p. 57-68, 2014.

BEKATOROU, A.; PLIONI, I.; SPAROU, K.; MAROUTSIU, R.; TSAFRAKIDOU, P.; PETSIS, T.; KORDOULI, E. **Bacterial Cellulose Production Using the Corinthian Currant Finishing Side-Stream and Cheese Whey: Process Optimization and Textural Characterization.** *Foods*, v. 8, n. 4, p. 193. 2019.

BELEM, M. A. F.; GIBBS, B. F.; LEE, B. H. **Enzymatic production of ribonucleotides from autolysates of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey.** *Journal Food Science*, v. 62, p. 851 - 857, july. 1997.

BELLAVER, L. H.; de CARVALHO, N. M. B.; ABRAHÃO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. **Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess.** *FEMS Yeast Research*, v. 4, n.7, p. 691-698, may. 2004.

BENIWAL, A.; SAINI, P.; KOKKOLIGADDA, A.; VIJ, S. **Use silicone dioxide nanoparticles for β -galactosidase immobilization and modulated ethanol production by co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in deproteinized cheese whey.** *Food Science and Technology*, v. 87, p. 553 – 56, january. 2018.

BERGAMASCHI, M.; BITTANTE, G. **From milk to cheese: Evolution of flavor fingerprint of milk, cream, curd, whey, ricotta, scotta, and ripened**

cheese obtained during summer Alpine pasture. *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 1-17, december, 2017.

BERTOL, T. M.; FILHO, J. I. S.; BONETT, L. **Soro de leite integral na alimentação dos suínos.** Periódico técnico-informativo elaborado pela EMBRAPA–CNPSA. Ano IV – n. 17, abril.1996.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. **Biotechnology Industrial: Biotechnology da Produção de Alimentos.** Editora Edgard Blücher LTDA, 2001. Cap. VII: Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos.

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

BOYLE, M.; BARRON, N.; MACHALE, AP. **Simultaneous saccharification and 414 fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces 415 marxianus* IMB3.** *Biotechnology Lett*, v. 19, n. 1, p. 49–51, january. 1997.

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

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

CALDEIRAO, L.; TANAKA, C.; IDA, E.; SPINOSA, W. **Modeling and kinetic study of bio-ethanol production from soy protein concentrate by-product.** *Food Science and Technology*, v. 36, n. 2, p 369-374, may. 2016.

CARDONA, C.A.; SÁNCHEZ, O.J. **Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities.** *Bioresource Technology*, v. 98, n. 12, p. 2415–2457, september. 2007.

- CARVALHO, F.; PRAZERES, A.R.; RIVAS, J. **Cheese whey wastewater: Characterization and treatment.** *Science of the Total Environment*, v. 445 - 446, n. 15, p. 385 – 396, february. 2013.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia da Produção de Alimentos.** Editora Edgard Blücher LTDA, 2001. Cap. IX: Fermentação descontínua.
- CASAL, M.; SCHULLER, D.; RODRIGUES, G. M. M.; PAIS, C. **Métodos convencionais em microbiologia.** In: CASAL, Margarida, coord. – “Microbiologia e genética molecular microbiana: manual de laboratório”. [S.l.]: Copissaurio, 2004.
- CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. **Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review.** *Renewable Energy*, v. 36, n. 12, p. 3541-3549, december. 2011.
- COTÉ, A.; BROWN, W. A.; CAMERON, D. WALSUM, G. P. **Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate for Subsequent Fermentation to Ethanol.** *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 6, p. 1608 – 1620, june. 2004.
- DAGUER, H.; ASSIS, M. T. Q. M.; BERSOT, L. S. **Controle da utilização de ingredientes não cárneos para injeção e marinação de carnes.** *Ciência Rural*, v. 40, n. 9, p.2037-2046, setembro. 2010.
- DASHKO, S.; ZHOU, N.; COMPAGNO, C.; PIŠKUR, J. **Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?** *Fems Yeast Research*, v.14, n.6, p.826–832, june. 2014.
- DÍEZ-ANTOLÍNEZ, R.; VALSERO, M. H.; GARCIA, A. I. P.; CAMBRONERO, J. G.; GÓMEZ, X. **Yeast screening and cell immobilization on inert supports for ethanol production from cheese whey permeate with high lactose loads.** *Plos one*, december. 2018.

- DINIZ, R. H. S.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; FIETTO, L. G.; PASSOS, F. M. L.; SILVEIRA, W. B. **Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, n. 2, p. 111-117, april. 2014.
- DOES, A. L.; BISSON, L. F. **Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts.** *Journal of Bacteriology*, v. 171, n. 3, p. 1303 – 1308. 1989.
- DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Actas da 6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente. Universidade Nova de Lisboa, 1999. Cap.1: **Novas Metodologias para a Fermentação Alcoólica do Soro de Queijo**, p. 271 - 280.
- DRAGONE, G., MUSSATTO, S.I., ALMEIDA E SILVA, J.B., TEIXEIRA, J.A., **Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder.** *Biomass Bioenergy*, v. 35, n. 5, p. 1977–1982, may. 2011.
- DRAGONE, G.; KERSSEMAKERS, A. A. J.; DRIESSEN, J. L. S. P.; YAMAKAWA, C. K.; BRUMANO, L. P.; MUSSATTO, S. I. **Innovation and strategic orientations for the development of advanced biorefineries.** *Bioresource Technology*, v. 302, p. 122847, april. 2020.
- DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A. **Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation.** *Food Chemistry*, v. 4, n.112, p. 929 – 935, february. 2009.
- DU, C.; LI, Y.; ZONG, H.; YUAN, T.; YUAN, W.; JIANG, Y. **Production of bioethanol and xylitol from non-detoxified corn cob via a twostage fermentation strategy.** *Bioresource Technology*, v. 30, p. 123427, august. 2020.

DUTTA, R. **Fundamentals of Biochemical Engineering** - New Delhi, India: Ane Books India, 2008. Cap. 10: Downstream Processing, p.261-292.

DWIVEDI, S.; SAHRAWAT, K.; PUPPALA, N.; ORTIZ, R. **Plant prebiotics and human health: Biotechnology to breed prebiotic-rich nutritious food crops.** *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 17, n. 5, p. 238–245, september. 2014.

EDWARDS, V. H. **The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics,** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 12, p. 679, 1970.

EL-IMAM, A. M.; GREETHAM, D.; DU, C.; DYER, P. S. **Development of a biorefining strategy for the production of biofuel from sorghum milling waste.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 150, n.15, october. 2019.

EI-TANBOLY, E. S.; EI-HOFI, M.; KHORSHID. **Recovery of cheese whey, a by-product from the dairy industry for use as an animal feed.** *Journal of Nutritional Health Food Engineering*, v. 6, n. 5, p. 148 - 154, june. 2017.

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

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

ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; MÓDENES, A. N.; DE PAULI, A. R.; PALÁCIO, S. M. **Analysis of Trace Elements in Groundwater Using ICP-OES and TXRF Techniques and Its Compliance with Brazilian Protection Standards.** *Water Air Soil Pollut*, v. 226, n. 32, p. 1 - 12, february. 2015.

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

ETRA PAK (2020). **Dairy Processing Handbook**. Cap. 15: Whey processing. Disponível em: <<https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/whey-processing>>. Acesso: junho 2020.

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

FAI, A. E. C; PASTORE, G. M. **Galactooligossacarídeos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas**. *Scientia Agropecuaria*, v. 6, n. 1, p. 69 – 81, enero. 2015.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Protein quality evaluation**. Rome, Italy. 1991.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. **Dairy Market Review**. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/dairy/milk-and-milk-products/en>>. march 2020.

FASOLI, G.; BARRIO, E.; TOFALO, R.; SUZZI, G.; BELLOCH, C. **Multilocus analysis reveals large genetic diversity in *Kluyveromyces marxianus* strains isolated from Parmigiano Reggiano and Pecorino diN Farindola cheeses**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 233, p. 1 – 10, september. 2016.

FERREIRA, P. G.; SILVEIRA, F. A.; SANTOS, R. C. V.; GENIER, H. L. A.; DINIZ, R. H.; JÚNIOR, J. I. R.; FIETTO, L. G.; PASSOS, F. M. L.; SILVEIRA, W. B. **Optimizing ethanol production by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 in a mixture of sugarcane bagasse and ricotta whey**. *Food Science Biotechnology*, v. 24, n. 4, p. 1421 – 1427, july. 2015.

- FIGLIANO, M. L.; HASAN, S. D. M.; SANTANA, V. S.; MIOTTO, I. **Quantificação do crescimento celular de *Saccharomyces boulardii* utilizando diferentes metodologias**. Cap. II Encontro de Pesquisa da FATEB – Telêmaco Borba - PR, 29 e 30 de outubro de 2015. 2015.
- FIGLIANO, M. L.; MAESTRE, K. L.; PASSOS, F. R.; BACH, F. **Biotechnologia como perspectiva para o desenvolvimento sustentável**. 1 ed. Appris, 2018. Cap. I: Princípios e aplicações da engenharia no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, p. 19-104.
- FLORES, J. A.; GSCHAEDLER, A.; DELGADO, L. A.; LÓPEZ, E. J. H.; ARELLANO, M.; ARRIZON, J. **Simultaneous saccharification and fermentation of Agave tequilana fructans by *Kluyveromyces marxianus* yeasts for bioethanol and tequila production**. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 267 – 273, july. 2013.
- FOGLER, H.S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. Prentice Hall of India, New Delhi.1999.
- FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. **The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, n. 3, p. 339 – 354, june. 2008.
- FONTES, F. A. P. V.; COELHO, S. G.; LANA, A. M. Q.; COSTA, T. C.; CARVALHO, A. U.; FERREIRA, M. I. C.; SATURNINO, H. M.; REIS, R. B.; SERRANO, A. L. **Desempenho de bezerros alimentados com dietas líquidas à base de leite integral ou soro de leite**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 2, p.212-219, april. 2006.
- FRENZEL, M.; ZERGE, K.; CLAWIN-R DECKER, I., LORENZEN, P **Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different β -galactosidases**. *Food Science and Technology*, v. 60, n. 2, p. 1068–1071, march. 2015.

- GABARDO, A.; PEREIRA, G. F.; RECHM R.; AYUB, M. A. Z. **The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors.** *Journal of industrial Microbiology Biotechnology*, v. 42, p. 1243 – 1253, august. 2015.
- GABARDO, S. G.; PEREIRA, G. F.; KLEIN, M. P.; RECH, R.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. **Dynamics of yeast immobilized-cell fluidized-bed bioreactors systems in ethanol fermentation from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 39, p. 141 – 150, november. 2016.
- GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. **Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors.** *Renewable Energy*, v. 69, p. 89 - 96, september. 2014.
- GADEN, E.L.Jr. **Fermentation kinetics and productivity.** *Chemistry and Industry*, v. 12, p. 154-9, february. 1955.
- GANJU, S.; GOGATE, P. R. **A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents.** *Journal of Food Engineering*, v. 215, p. 84 – 96, december. 2017.
- GARCÍA-CAYUELA, M.; PUCHALSKA, P.; ESTEVE, C.; MARINA, M.L. M.L. **Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities.** *Talanta*, v. 106, n. 15, p. 328 - 49, march. 2013.
- GAVA, Altanir J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos.** São Paulo, Sp: Nobel, 1984. Reimpresso em 2002.
- GENNARI, A.; ROSOLEN, M. D.; VOLPATO, G.; SOUZA, C. F.V. **Estudo da Hidrólise Enzimática da Lactose em Soros Lácteos Utilizando β -**

galactosidases Microbianas. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. 2016.

GHALY, A. E.; BEN-HASSAN, R. M. **Kinetics of bath production of single-cell protein from cheese whey.** *Biochemistry and Biotechnology*, v. 50, n. 1, p.79 – 92, january. 1995.

GHALY, A. E.; MAHMOUD, N. S.; RUSHTON, D. G.; ARAB, F. **Potential environmental and health impacts of high land application of cheese whey.** *American Journal of Agricultural and Biological Science*, v. 2, n. 2, p. 106 - 117. 2007.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. **O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento.** *Revista Brasil Alimentos*, september. 2001.

GONZÁLEZ-SISO, M. I. **The biotechnological utilization of cheese whey: A review,** *Bioresource Technology*, v. 57, n. 1, p. 1-11, july. 1996.

GOSLING, A; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. **Effect of the substrate concentration and water activity on the yield and rate of the transfer reaction of β - galactosidase from *Bacillus circulans*,** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 13, p. 3366-3372, April. 2011.

GREENBERG, N. A.; MAHONEY, R. R. **Formation of oligosaccharides by β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*.** *Food Chemistry*, v. 10, n. 3, p. 195-204, march.1983.

GRUBB, C. F.; MAWSON, A. J. **Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113.** *Biotechnology Letters*, v. 15, p. 621 – 626, june. 1998.

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; PADILHA, C. E. A.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. **Ethanol production from sugarcane bagasse: Use off**

diferente fermentation strategies to enhance and environmental-friendly process. *Journal of Environmental Management* v. 234, p. 44 – 51. 2019.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. **Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey.** *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 3, p. 375 - 384, may. 2010.

GUNESER, O.; YUCEER, Y. K.; WILKOWSKA, A.; KREGIEL, D. **Volatile metabolites produced from agro-industrialwastes by Na-alginate entrapped *Kluyveromyces marxianus*.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 4, p.965-973, december. 2016.

HADIYANTO, H.; ARIYANTI, D.; AINIA. A. P.; PINUNDIA, D. S. **Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-Batch Fermentation Using *Kluyveromyces marxianus*.** *Energy Procedia*, v .47, p 108 – 112. 2014.

HALASZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production.** Boca Raton: CRC Press; 1991.

HAN, K.; LEVENSPIEL, O. **Extended Monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition,** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, p. 430-437, august. 1988.

HAN, S. O.; INUI, M.; JIN, Y.-S. **Bioenergy and Biorefinery.** *Biotechnology Journal*, v. 14, n. 6, p. 1900160, june. 2019.

HASHIZUME, T. **Biotechnologia industrial: Engenharia Bioquímica.** Editora Edgard Blücher LTDA., 2001. Cap. II: Tecnologia do vinho.

HASSEMER, G.; DALLAGNOL, G.; FACCIN, D. J. L.; RECH, R. **Avaliação do permeado de soro de leite desproteínizado como meio de cultivo de**

Bacillus megaterium. 5º Simpósio de Segurança Alimentar, Alimentação e Saúde. Bento Gonçalves, RS. 2015.

HAUPTLI, L.; LOVATTO, P. A.; SILVA, J. H. S.; GARCIA, G. G.; JUNIOR, B. S. B.; OLIVEIRA, J. L. S. **Níveis de soro de leite integral na dieta de leitões na creche**. *Ciência Rural*, v. 35, n. 5, p. 1161 - 1165, september. 2005.

HE, C.; QI, B.; JIAO, Y.; ZHANG, Q.; MA, X.; LI, G.; JING, Y.; JIANG, D.; ZHANG, Z. **Potentials of bio-hydrogen and bio-methane production from diseased swines**. *International Journal of Hydrogen Energy*, in press. Disponível online em setembro, 2019.

HEGDE, D.; LODGE, J. S.; TRABOLD, T. A. **Characteristics of food processing wastes and their use in sustainable alcohol production**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 81, p. 510–523, july. 2018.

HENDERSON, C. M.; BLOCK, D. E. **Examining the Role of Membrane Lipid Composition in Determining the Ethanol Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae***, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 10, p. 2966 – 2972, may. 2014.

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

HISS, H. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica**. Editora Edgard Blücher LTDA., 2001. Cap. VI: **Cinética de Processos Fermentativos**.

HISS, H. **Fermented Beverage Production**. 2ª E. SPRINGER SCIENCE, New York. 2013.

HU, K. DICKSON, J.M., **Membrane Processing for Dairy Ingredient Separation**, John Wiley and Sons Ltd., 2015.

- HUA, X.; CAO, R.; ZHOU, X.; XU, Y. **Integrated process for scalable bioproduction of glycolic acid from cell catalysis of ethylene glycol.** *Bioresource Technology*, v. 268, p. 402-407, november. 2018.
- HUGO, A.; BRUNO, F.; GOLOWCZYW, M. A. **Whey permeate containing galacto-oligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA.** *LWT - Food Science and Technology*, v. 69, p. 185 – 190, june. 2016.
- HULL, C. M.; LOVERIDGE, E. J.; DONNISON, I. S.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L. **Co-production of bioethanol and probiotic yeast biomass from agricultural feedstock: application of the rural biorefinery concept.** *AMB Express*, v. 4, n. 64, p. 1-8. 2014.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Trimestral do Leite**, 2018.
- ILLANES, A. **Lactose- Derived Prebiotics.** 1 ed. Academic Press, 2016. Cap. I: Lactose: Production and Upgrading, p. 1 - 33.
- INTANON, M.; ARREOLA, S.L.; PHAM, N.H.; KNEIFEL, W.; HALTRICH, D.; NGUYEN, T.H. **Nature and biosynthesis of galacto-oligosaccharides related to oligosaccharides in human breast milk.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 353, n. 2, p. 89 – 97, april. 2014.
- JIMÉNEZ-AGUILAR, D. M.; GRUSAK, M. A. **Evaluation of Minerals, Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Mexican, Central American, and African Green Leafy Vegetables.** *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 70, n. 4, p. 357–364, october. 2015.
- JIN, Y.; PARASHAR, A.; MASON, B.; BRESSLER, D.C. **Simultaneous hydrolysis and co-fermentation of whey lactose with wheat for ethanol production.** *Bioresource Technology*, v. 221, p. 616-624, december. 2016.

- JOVANOVIC-MALINOVSKA, R.; KUZMANOVA, S.; WINKELHAUSEN, E. **Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 22, p. 446-453, july. 2014.
- JULIO, R.; ALBET, J.; VIALLE, C.; VACA-GARCIA, C.; SABLAYROLLES, C. **Sustainable design of biorefinery processes: existing practices and new methodology.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 11, n. 2, p. 373-395, march/april. 2017.
- KARGI, F.; OZMIHCI, S. **Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, n. 5, p. 711–718, march. 2006.
- KHEZRI, S.; SEYEDSALEH, M.; EMAMI, N.; DEHGHAN, P. **Whey: Characteristics, Applications and Health Aspects.** *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, v. 7, n. 2, p1383-1389, april. 2016.
- KITAMURA, Denise H. **Produção de biomassa probiótica e enriquecida com selênio de *Saccharomyces boulardii* utilizando o melaço de cana-de-açúcar.** Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2013. Dissertação (Mestrado).
- 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.** *Bioresource Technology*, v. 82, n. 2, p. 177 – 181, april. 2002.
- KRÓLCZYK, J. B.; DAWIDZIUK, T.; JANISZEWSKA-TURAK, E.; SOŁOWIEJ, B. **Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry – a Review,** *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, v. 66, n. 3, p. 157-165,

september. 2016.

LAGRANGE, V.; E DALLAS, P. **Inovação de Produto com Concentrados de Proteína de Soro de Leite dos USA**. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, n. 1, p. 17 – 21. 1997.

LÁINEZ, M.; RUIZ, H. A.; ARELLANO-PLAZA, M.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, S. **Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of *Agave salmiana* leaves comparing *S. cerevisiae* and *K. marxianus***. *Renewable Energy*, v. 138, p. 1127-1133, august. 2019.

LANE, M. M.; BURKE, N.; KARREMAN, R; WOLFE, K.H.; O'BYRNE C.P.; MORRISSEY J.P. **Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus***. *Antonie Van Leeuwenhoek*, n. 100, p. 507-519, june. 2011.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. ***Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow**. *Fungal Biology Reviews*, v. 24, n. 1-2, p. 17 – 26, february. 2010.

LAPPA, I. K.; PAPADAKI, A.; KACHRIMANIDOU, V.; TERPOU, A.; KOULOUGLIOTIS, D.; ERIOTOU, E.; KOPSAHELIS, N. **Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications**. *Foods*, v. 8, n. 8, p. 347, august. 2019.

LI, Y.; SADIQ, A. F.; LIU, T.; CHEN, J.; HE, G. **Purification and identification of novel peptides with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of process conditions in milk fermented with the yeast *Kluyveromyces marxianus***. *Journal of Functional Foods*, v. 16, p. 278 – 288, june. 2015.

LI, Z.; XIAO, M.; LU, L.; LI, Y. **Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and**

fermentation with immobilized yeast cells. *Process Biochemistry*. V. 43, n. 1, p. 896–899, august. 2008.

LIMA, G. J. M. M. de; MANZKE, N. E.; TAVERNARI, F. de C.; KLEIN, C. H.; COSTA, O. A. D. **Uso de permeado *spray-dried* (PERLAC 850®) produzido a partir de soro de leite doce em substituição ao soro de leite e à lactose pura em dietas de leitões recém-desmamados.** Comunicado Técnico 507. ISSN nº 0100-8862. Versão eletrônica. 2012.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos Fermentativos e enzimáticos.** Editora Edgard Blücher LTDA., 2001. Cap. I: Produção de Etanol.

LIU, S. **Bioprocess Engineering_ Kinetics, Sustainability, and Reactor Design.** Elsevier Science Ltd. 2020.

LÓPEZ-DOMÍNGUEZ, C. M.; RAMÍREZ-SUCRE, M. O.; RODRÍGUEZ-BUENFILL, I. M. **Enzymatic hydrolysis of *Opuntia ficus-indica* cladode by *Acinetobacter pittii* and alcohol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: pH, temperature and microorganism effect.** *Biotechnology Reports*, v. 24, p. e00384, december. 2019.

LÖSER, C.; UR'IT, T.; STUKERT, A.; BLEY, T. **Formation of ethyl acetate of Ethyl Acetate From Whey by *Kluyveromyces marxianus* on a Pilot Scale,** *Journal of Biotechnology*, v. 163, n. 1, p. 17-23, january. 2012.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265 – 275, november. 1951.

LUCERO, P.; HERWNIER, M.; LAGUNA, R. **Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis.** *FEBS Letters*, v. 333, n. 1-2, p.165 -168, october. 1993.

- LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. de. **Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica.** *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 21, n. 1, p. 62-68, janeiro-abril. 2001.
- LUSTRATO, G.; SALIMEI, E. ALFANO, G.; BELLI, C.; FANTUZ, F. **Cheese whey recycling in traditional dairy food chain: effects of vinegar from whey in dairy cow nutrition.** *Acetic Acid Bacteria*; v. 2, n. 8, p. 47-53, december. 2013.
- LUTZ, Instituto Adolfo. (2008). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4ª ed. Brasília – DF: Ministério da Saúde.
- MAESTRE, Keiti L. **Estudo de condições de fermentação alcoólica e acética utilizando subproduto lácteo e diferentes leveduras.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2017. Dissertação (Mestrado). 139 p.
- MAHONEY, R. R. **Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review.** *Food Chemistry*, v. 63, n. 2, p. 147-154, october. 1998.
- MANERA, A. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F. **Galacto-oligosaccharides Production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*.** *International Journal of Food Engineering*, v. 6, n. 6, p. 1556-3758, novembro. 2010.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Resolução Nº 065/2005.** Regulamento da inspeção sanitária e industrial para leite e seus derivados. 2005.
- MARANGONI, C.; FURIGO, J. R. A.; ARAGÃO, G. M. F. **Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding.** *Process Biochemistry*, v. 38, n. 2, p. 137 – 141, october. 2002.

- MARANGONI, Cintia. **Estudo de estratégias de produção de Poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico.** Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2000. p.191. Dissertação (Mestrado).
- MARTÍNEZ, O.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; BARRENA, R. **Enhancing the bioproduction of value-added aroma compounds via solidstate fermentation of sugarcane bagasse and sugar beet molasses: Operational strategies and scaling-up of the process.** *Bioresource Technology*, v. 263, p. 136 – 144, march. 2018.
- MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. **Review Galactooligosaccharides (GOS) and their prebiotic and bifidogenic effects.** *Brazilian Journal Food Technology*, v. 12, n. 3, p. 230-240, jul./set. 2009.
- MARX, M.; KULOZIK, U. **Thermal denaturation kinetics of whey proteins in reverse osmosis and nanofiltration sweet whey concentrates.** *International Dairy Journal*, v. 85, p. 270–279, october. 2018.
- MAWSON, A. J. **Bioconversions for whey utilization and waste abatement.** *Bioresource Technology*, v. 47, n. 3, p. 195–203. 1994.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars.** *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426 - 428, march. 1959.
- MOHANTY, D. P.; MOHAPATRA, S.; MISRA, S.; SAHU, P. S. **Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review.** *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 23, n. 5, p. 577 – 583, september. 2016.
- MOHANTY, S. K.; SWAIN, M. R. **Bioethanol Production from Food Crops.** 2019. In: Chap. 3 - Bioethanol Production From Corn and Wheat: Food, Fuel, and Future. RAY, R. C.; RAMACHANDRAN, S. Academic Press, P. 45-59.

- MONOD, J. **The growth of bacterial cultures**, *Annual Review of Microbiology*, v. 3, p. 371-394, 1949.
- MORESI, M., TRUUFIO, A., PARENTE, E. **Kinetics of continuous whey fermentation by *Kluyveromyces fragilis***. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 49, n. 2, p. 205 – 222. 1990.
- MOT, R.; VAN DIJCK, K.; DONKERS, A.; VERACHTERT, H. **Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentation of starchy material with amylolytic yeasts**. *Applied and Microbiology Biotechnology*, v. 22, p. 222-226, july. 1985.
- MOULIN, G.; GALZY, P. **Whey, a potential substrate for biotechnology**. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 1, n. 1, p. 347 – 374, april. 1984.
- MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V. BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. **Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *air lift* e *shaker***. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 27, n. 4, p. 688 - 693, october. 2007.
- MULLER, José L. **Cultivo de *Saccharomyces boulardii* em biorreator tipo *air-lift* e em frascos agitados mecanicamente**. Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, 2006. Dissertação (Mestrado).
- MURARI, C. S.; da SILVA, D. C. M. N.; SCHUINA, G. L.; MOSINAHTI, E. F.; BIANCHI, V. L. D. **Bioethanol Production from Dairy Industrial Coproducts**. *BioEnergy Research*, v. 12, p. 112-122, october. 2018.
- MURARI, C. S.; MACHADO, W. R. C.; SCHUINA, G. L.; BIANCHI V. L. D. **Optimization of bioethanol production from cheese whey using**

***Kluyveromyces marxianus* URM 7404. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 20, april. 2019.**

MUSSATTO, S.I.; MANCILHA, I.M. **Non-digestible oligosaccharides: a review.** *Carbohydrate Polymers*, v. 68, n. 3, p. 587-597, april. 2007.

NACHAIWIENG, W.; LUMYONG, S.; YOSHIOKA, K.; WATANABE, T.; KLANONGNUCH, C. **Bioethanol production from rice husk under elevated temperature simultaneous saccharification and fermentation using *Kluyveromyces marxianus* CK8.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, n. 5, p. 543 – 549, october. 2015.

NADAI, Barbara L. **Efeito da suplementação de nutrientes e da concentração de permeado de soro de leite desproteínizado de leite no crescimento de *S. boulardii* em sistema descontínuo.** Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2015. 96 p. Dissertação (Mestrado).

NAGODAWITHANA, T. W.; STEINKRAUS, K. H. **Influence of the Rate of Ethanol Production and Accumulation on the Viability of *Saccharomyces cerevisiae* in “Rapid Fermentation”.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 158-162, february. 1976.

NASSERI, A. T.; RASOUL-AMI, S.; MOROWVAT, M. H.; GHASEMI, Y. **Single Cell Protein: Production and Process.** *American Journal of Food Technology*, v. 6, n. 2, p. 103 – 116. 2011.

NELDER, J.A.; MEAD, R. **A simplex for function minimization.** *Computer Journal*, v.7, p 308–313, 1965.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 6. Ed. Porto Alegre. Artmed, 2014.

- NIKOLIC, S., MOJOVIC, L., PEJIN, D., RAKIN, M., & VUKASINOVI, M. **Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus***. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, n. 10, p. 1449-1456, october. 2010.
- OBRUCA, S.; MAROVA, I.; MELUSOVA, S.; MRAVCOVA, L. **Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037**. *Annals of Microbiology*, v. 61, p. 947 – 953, february. 2011.
- ONUBR, Organização das Nações Unidas no Brasil. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/fao-se-o-atual-ritmo-de-consumo-continuar-em-2050-mundo-precisara-de-60-mais-alimentos-e-40-mais-agua/>>).
- OZMIHCI, S.; KARGI, F. **Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP)**. *Enzyme Microbial. Technology*, v.41, n. 6-7, p. 876 – 880, october. 2007a.
- OZMIHCI, S.; KARGI, F. **Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, n. 1-2, p.169 – 174, july. 2007b.
- OZMIHCI S.; KARGI F. **Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations**. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2978 – 2984, november. 2007c.
- PADILLA, B.; FRAU, F. MATUTE, A. I. R.; MONTILLA, A.; BELLOCH, C.; MANZANARES, P.; CORZO, N. **Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by β -galactosidases from dairy *Kluyveromyces***. *Journal of Dairy Research*, v. 98, n. 16, p. 356 – 364, may. 2015.

- PALMA, M. S. A; CARVALHO, L. F. C. P; GAVÓGLIO, L. C. **Biotecnologia industrial: Biotecnologia da Produção de Alimentos.** Editora Edgard Blücher LTDA., 2001. Cap. VI: Vinagres.
- PARRONDO, J.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. **Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 26, n. 3, p. 445 - 456, July - September. 2009.
- PARRONDO, J.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. **Production of an Alcoholic Beverage by Fermentation of Whey Permeate with *Kluyveromyces fragilis* II: Aroma Composition.** *Journal of The Institute of Brewing*, v. 106, n. 6, p. 377-382, october. 2000.
- PARRONDO, J.; HERRERO, M.; GARCÍA, L A.; DÍAZ, M. **A note - Production of Vinegar from Whey.** *Journal of the Institute of Brewing*. v. 109, n. 4, p. 1215 - 175. 2003.
- PASSERON, T.; LACOUR, J.P.; FONTAS, E.; ORTONNE, J.P. **Prebiotics and synbiotics: two promising approaches for the treatment of atopic dermatitis in children above 2 years.** *Allergy*, v.61, p. 431–437. 2006.
- PASSOS, Fernanda Rengel. **Produção de simbiótico galacto-oligossacarídeo e *Saccharomyces boulardii* utilizando permeado de soro de leite.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2018. Dissertação (Mestrado). 101 p.
- PELEGRINE, D. H. G; CARRASQUEIRA, R. L. **Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas.** *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 10, n. 1, p. 103-115, december. 2008.
- PENDÓN, M. D.; MADEIRA-Jr., J. V.; ROMANIN, D. E.; RUMBO, M.; GOMBERT, A. K.; GARROTE, G. L. **A biorefinery concept for the production of fuel**

ethanol, probiotic yeast and whey protein from a by-product of the cheese industry. *BioRxiv - The preprint server for biology*. April, 2020.

PENNA, T. C. V. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica.** Editora Edgard Blücher LTDA., 2001. Cap. II: Produção de ácidos.

PERRY, K. S. P. **Queijos: Aspectos químicos, Bioquímicos e Microbiológicos.** São Paulo. Química Nova, 2004. p. 293-300.

PESCUMA, M; VALDEZ, G. F.; MOZZI, F.; **Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 15, p.6183 - 6196, june. 2015.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. **Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 28, p. 36 – 43, february. 2006.

PRATA, M.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. **Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*,** *Biotechnology Lett*, v. 32, p. 837–840, march. 2010.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. **Cheese whey management: a review.** *Journal of Environmental Management*, v. 110, n.15, p. 48 – 68, november. 2012.

REHM, H.J., REED, G., PÜHLER, A. & STADLER, P. **Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise**, 2 Ed. REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. 1995. Cap. 1: Enzymes, biomass, food and feed.

RENCHER, A. C; SHAALJE, G. B. **Linear models in statistics.** John Wiley Sons, 2007.

- RFA, 2017. Ethanol Industry Outlook. Renewable Fuels Association, Washington, DC. Available from: www.ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2017/02/Ethanol-Industry-Outlook-2018.pdf.
- RODRIGUES, B.; COSTA, M. E. L.; CONSTANTINO, A.; RAPOSO, S.; FELIZARDO, C.; GONÇALVES, D.; FERNANDES, T.; DIONÍSIO, L.; PEINADO, J.M. **Growth kinetics and physiological behavior of co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*, fermenting carob sugars extracted with whey.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 92, p. 41–48, october. 2016.
- RODRIGUES, M. E.; IEMA, A. F. **Planejamento de experimentos & Otimização de processos.** 3 Ed., Editora Cárita, 2014.
- ROSE, A. **Chemical microbiology.** 3 Ed., Plenum Press, 1976.
- ROSENBROCK, H. **Some general implicit processes for the numerical solution of differential equations.** *Computer Journal*, v.5, p 329–330, 1963.
- ROSSI, M.; BUZZINI, P.; CORDISCO, L.; AMARETTI, A.; SALA, M.; RAIMONDI, S.; PONZONI, C.; PAGNONI, U. M.; MATTEUZZI, D. **Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 69, n. 3, p. 363-372, august. 2009.
- RUSSO, J.F. S. **Permeado de soro de leite desproteínizado e suas aplicações: um futuro promissor.** 2016.
- RUSTOM, I.; FODA, M.; LOPEZ-LEIVA, M. H. **Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis-analysis of factors.** *Food Chemistry*, v. 62, n. 2, p. 141-147, june. 1998.

- SACHDEVA, A.; RAWAT, S.; NAGPAL, J. **Efficacy of fermented milk and whey proteins in helicobacter pylori eradication: A review.** *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 3, p 724 – 737, january. 2014.
- SACHS, L. G. **Vinagre.** Apostila. Fundação Faculdades Luiz Meneghel, 2001. 23 p.
- 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 Bioenergy*, v. 33, n.12, p. 1687 – 1692, december. 2009.
- SANSONETTI, S.; HOBLEY, T. J.; CALABRÒ, V.; SIN, G. **A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: A batch fermentation and kinetic study.** *Bioresource Technology*, v. 102, n. 16, p. 7513-7520, august. 2011.
- SANTOS, Ana Maria dos. Regulação do Transporte de Lactose em *Kluyveromyces lactis* JA6. Universidade Federal de Ouro Preto, 2013. Dissertação (Mestrado). 60 p.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A., AQUARONE, E.; BORZANI, W (ed.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** v. 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 541.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A., AQUARONE, E.; BORZANI, W. (eds.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica – Volume 2.** São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ADOLPHI, B.; ROCHAT, F.; BARCLAY, D. V.; de VRESE, M.; AÇIL, Y.; SCHREZENMEIR, J. **Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats – impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over.** *NFS Journal*, v. 3, p. 41-50, august. 2016.

- SCRIMSHAW, N. S. **Single cell protein I**: MIT Press. Cap. 2: Introduction, 1968.
- SERPA, L.; REGINATO, V.; PRIAMO, W. L. **Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica**. 2nd International Workshop | Advances in Cleaner Production. Universidade Federal de Santa Catarina. São Paulo, Brasil, 20-22 de maio de 2009, p.2.
- SHREVE, R. N; JÚNIOR, J. A. B. **Indústrias de Processos Químicos**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1997.
- SILVA, F. L.; CAMPOS, A. O.; SANTOS, D. A.; BATISTA MAGALHÃES, E. R. B.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. **Valorization of an agro extractive residued Carnauba straws for the production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation (SSF)**. *Renewable Energy*, v. 127, p. 661 – 669. 2018.
- SILVA, P. H. F. **Leite: Aspectos de composição e propriedades**. *Revista: Química e Sociedade. Química nova na escola leite*, n. 6, november. 1997.
- SILVA, R. F.; LANNA, E. A. T.; BOMFIM, M. A.D.; RIBEIRO, F. B.; ASSIS JÚNIOR, F. A.; NAVARRO, R. D. **Uso de ácidos orgânicos em dietas para Tilápia do Nilo**. *Revista Ceres*, v. 55, n. 4, p. 352-355, julho-agosto, 2008.
- 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, p. 930 – 936, may, 2005.
- SISO, M. I. G. **The biotechnological utilization of cheese whey: A review**. *Bioresource Technology*, v. 57, n.1, p. 1 – 11, july. 1996.

- SMITH, I. M.; BAKER, A.; CHRISTENSEN, J. E.; BOEKHOUT, T.; FRØKIÆR, H.; ARNEBORG, N.; JESPERSEN, L. ***Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces boulardii* Induce Distinct Levels of Dendritic Cell Cytokine Secretion and Significantly Different T Cell Responses *In Vitro***. *PLoS One*, v. 11, n. 11, p. e0167410, november. 2016.
- SOORO Ingredientes Ltda. **Ficha técnica permeado de soro de leite desproteínizado em pó**. 2018.
- SOORO Ingredientes Ltda. **Ficha técnica permeado de soro de leite desproteínizado em pó**. 2020.
- SORIO, A. **Cadeia Agroindustrial do Leite no Brasil Diagnóstico dos Fatores Limitantes à Competitividade Ministério da indústria comércio exterior**. Brasília, dezembro de 2018.
- SOUZA, A. A.; FARIAS, R. F. **Cinética Química: teoria e prática**. Campinas: Átomo, 2008.
- SPINOSA, W. A.; SANTOS JÚNIOR, V.; GALVAN, D.; FIORIO, J. L.; GOMEZ, R. J. H. C. **Vinegar rice (*Oryza sativa* L.) produced by a submerged fermentation process from alcoholic fermented rice**. *Food Science Technology*, v. 35, n. 1, p. 196 - 201, january. 2015.
- SPINOSA, Wilma A.; **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústria de vinagre**. Engenharia de alimentos, Universidade estadual de Campinas, departamento de ciência de alimentos, 2002. Tese (Doutorado).
- STANISZEWSKI M.; KUJAWSKI W.; LEWANDOWSKA M. **Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product– Kinetic model predictions considering glucose repression**. *Journal of Food Engineering*, v. 91, n. 2, p. 240 – 249, february. 2009.

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

SUZUKI, T.; HOSHINO, T.; MATSUSHIKA, A. **High-temperature ethanol production by a series of recombinant xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* strains**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 129, october. 2019.

TALABARDON, M., SCHWITZGUE, J. P., PERIGER, P. **Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate**. *Journal of Biotechnology*, v. 76, n. 1, p. 83 – 92, january. 2000.

TAVARES, B.; FELIPE, M. das G. de A.; dos SANTOS, J. C.; PEREIRA, F. M.; GOMES, S. D.; SENE, L. **An experimental and modeling approach for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in stirred tank bioreactor using vacuum extraction as a strategy to overcome product inhibition**. *Renewable Energy*, v. 131, p. 261-267, february. 2019.

TAVARES, Bruna. **Estudo do desempenho fermentativo da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 com auxílio de modelagem fenomenológica**. Cascavel: Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2017. 97 p. Dissertação (Mestrado).

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. **Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas padrão produzidos em várias regiões do Estado de Minas Gerais**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 1, p. 243 – 250. 2008.

THOMSON, M. J.; GAUCHER, E. A.; BURGAN, F. M.; DE KEE, W.; LI, T.; ARIS, J. P.; BENNER, S. A. **Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast**. *Journal Nature Genetics*, v. 37, n. 6, p. 630-635, may. 2005.

- TO, H., SEM, S., CHARLES, M. B. 2014. **Economic Issues in the Liquid Biofuels Industry (2014)**. In: Liquid Biofuels: Emergence, Development and Prospects. PADULA, A. D.; SANTOS, M. S.; SANTOS, O. I. B.; BORENSTEIN, S. Ed. v. 27, p. 1-23.
- TOFALO, R.; FASOLI, G.; SCHIRONE, M.; PERPETUINI, G.; PEPE, A.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. **The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 187, p. 41-49, september. 2014.
- TOFALO, R.; FASOLI, G.; SHIRONE, M. PERPETUINI, G.; PEPE, A.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. **The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 187, p. 41 – 49, september. 2014.
- TOMÁS-PEJÓ, E.; FERMOSO, J.; HERRADOR, E.; HERNANDO, H.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, S.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SERRANO, D. P. **Valorization of steam-exploded wheat straw through a biorefinery approach: Bioethanol and bio-oil co-production**. *Fuel*, v. 199, p. 403-412, july. 2017.
- TORRES, D. P. M.; GONÇALVES, M. P. F.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. **Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, p. 438-454, august. 2010.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- TRIGUEROS, D. E. G.; FIORESE, M. L.; KROUMOV, A. D.; HINTERHOLZ, C. L.; NADAI, B. L.; ASSUNÇÃO, G. M. **Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as**

a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Biochemical Engineering Journal, v. 110, p. 71 – 83, June. 2016.

TUNICK, M. H. **Whey Processing, Functionality and Health Benefits. Whey protein production and utilization.** John Wiley & Sons, 2008. Cap. 1: A brief history. Whey Processing, Functionality and Health Benefits, p.1 - 13.

UGALDE, O.; CASTRILLO, J. I. **Applied Mycology and Biotechnology.** Elsevier, 2002. Cap.: Single cell proteins from fungi and yeasts, p. 123 - 149.

UN DESA, United Nations, Department of Economic and Social Affairs. World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100. Documento datado de 21 Junho de 2017, New York.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ (NIT). Keiti L. Maestre; Mônica L. Fiorese; Edson A. da Silva; Fernando Palú; Silvio C. Sampaio; Fabiano B. Scheufele. **Produção de vinagre, fermentado acético e ácido acético com matéria-prima láctea.** Unioeste (NIT). BR 10 2019 006772 1. Ap. 03, 2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ (NIT). Keiti L. Maestre; Mônica L. Fiorese; Edson A. da Silva; Fernando Palú; Silvio C. Sampaio; Fabiano B. Scheufele. Unioeste (NIT). **Método de produção de biocombustível (bioetanol) e biomassa microbiana/celular probiótica com matérias-primas lácteas e a levedura *Saccharomyces boulardii*.** Unioeste (NIT). BR 10 2018 013772 7. Jul. 05, 2018.

URIT. T.; LÖSER, C.; WUNDERLICH, M.; BLEY, T. **Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey: studies of the ester stripping.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, p. 547–559, May. 2011.

USDA, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Os seis tipos de queijos mais produzidos no Brasil. Fonte: Euromonitor International, 2017.

USDA. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. **Dairy and Products Annual - Annual Dairy Report – Brazil. 2017.**

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.** *Journal of Biotechnology*, v. 117, n. 4, p. 421–431, june. 2005.

VASILEVA, N.; IVANOV, Y.; DAMYANOVA, S.; KOSTOVA, I.; GODJEVARGOVA, T. **Hydrolysis of whey lactose by immobilized-galactosidase in abioreactor with a spirally wound membrane.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 82, p. 339 – 346, november. 2016.

VERA, C.; GUERRERO, C.; ABURTO, C.; CORDOVA, A.; ILLANES, A. **Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1868, n. 1, p. 140271, january. 2020.

WAWRZYNIAK, J.; KACZYŃSKI, Ł. K.; CAIS-SOKOLIŃSKA, D.; WÓJTOWSKI, J. **Mathematical modelling of ethanol production as a function of temperature during lactic-alcoholic fermentation of goat's milk after hydrolysis and transgalactosylation of lactose.** *Measurement*, v. 135, p. 287-293, march. 2019

WIEBE, M. G.; RINTALA, E.; TAMMINEN, A.; SIMOLIN, H.; SALUSJÄRVI, L.; TOIVARI, M.; KOKKONEN, J. T.; KIURU, J.; KETOLA, E. A.; JOUHTEN, P.; HUUSKONEN, A.; MAAHEIMO, H.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. **Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions.** *FEMS Yeast research*, v. 8, n. 1, p. 140-154, february. 2008.

- WILLEY, J.; SHERWOOD, L.; WOOLVERTON, C. J. **Prescott's Principles of Microbiology**. 1^a.ed. New York: McGraw-Hill Education, 2009. Chapter 7: Microbial Growth. p. 126 - 152.
- WOYENGO, T. A.; SÁNCHEZA, J. E.; YÁNEZA, J. L.; CERVANTES, M.; ARAIZAB, B. A.; ZIJLSTRAA, R. T. **Nutritional value of whey permeate and egg products in ileal-cannulated grower pigs**. *Animal Feed Science and Technology*, v. 210, p. 209 – 216, december. 2015.
- YADAV, J. S. S.; BEZAWADA, J.; AJULA, C. M.; YAN, D.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. **Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey**. *Bioresource Technology*, v. 164, 119–127, july. 2014.
- YADAV, J. S. S.; BEZAWADA, J.; AJULA, C. M.; YAN, D.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. **Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey**. *Bioresource Technology*, v. 164, p. 119 – 127, may. 2014.
- YADAV, J. S. S.; YANA, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. **Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides**. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 6, p. 756 – 774, november. 2015.
- YADAV, J. S. S.; YANA, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. **Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides**. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 6, p. 756–774, november. 2015.
- YORGUN, M. S.; BALCIOGLU, A.; SAYGIN, O. **Performance comparison of ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis on whey treatment**. *Desalination*, v. 229, n. 1-3, p. 204–216, september. 2008.

- YOU, K. M.; ROSENFELD, C. L.; KNIPPLE, D. C. **Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n.3, p. 1499-1503, march. 2003.
- ZACARCHENCO, Patrícia B. DENDER, Ariene G. F. SPADOTI, Leila M. GALFINA, Darlila A. TRENTO, Fabiana K. H.S. SILVA, Adriana T. **Permeado de soro de leite desproteínizado.** *Guia de referência do Setor Lácteo. Anuário leite e derivados.* ISSN 1807-9733, 2012.
- ZADOW, J.G. Lactose: properties and uses. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 11, p. 2654–2679, november. 1984.
- ZAFAR, S.; OWAIS, M. **Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, n. 3, p. 295 – 298, january. 2006.
- ZAVAREZE, E. R.; MORAES, K. S.; SALASMELLADO, M. M. **Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, n.1, p.102-106, 2010.
- ZHANG, B.; ZHANG, J.; WANG, D.; GAO, X.; SUN, L.; HONG, J. **Data for rapid ethanol production at elevated temperatures by engineered thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* via the NADP (H)-preferring xylose reductase-xylytol dehydrogenase pathway.** *Data in Brief*, v. 5, p. 179-186, december. 2015.
- ZHANG, B.; ZHANG, J.; WANG, D.; HAN, R.; DING, R.; GAO, X.; SUN, L.; HONG, J. **Simultaneous fermentation of glucose and xylose at elevated temperatures co-produces ethanol and xylytol through overexpression of a xylose-specific transporter in engineered *Kluyveromyces marxianus*.** *Bioresource Technology*, v. 216, p. 227 – 237, april. 2016.

- ZHAO, W.; SHU, Q.; HE, G.; QIHE, C. **Reducing of bovine whey proteins by *Kluyveromyces marxianus* fermentation combined with ultrasound treatment.** *Food Chemistry*, v. 311, may. 2020.
- ZHOU, H. X.; XIN, F. H.; CHI, Z.; LIU, G. L.; CHI, Z. M. **Inulinase production by the yeast *Kluyveromyces marxianus* with the disrupted MIG1 gene and the over-expressed inulinase gene.** *Process Biochemistry*, v. 49, n. 11, p. 1867 – 1874, november. 2014.
- ZIMMER, F. C.; SOUZA, A. H.P.; SILVEIRA, A.F.C.; SANTOS, M. R.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; RODRIGUES, A. C. **Application of Factorial Design for Optimization of the Synthesis of Lactulose Obtained from Whey Permeate.** *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 0, n. 0, p. 1-8, December. 2017.
- ZLATEVA, P.; DENCHEV, D.; SIMEONOV, I. KAIMAKTCHIEV, A. **Mathematical Modelling and Simulation of Fermentation Process for Citric Acid Production.** *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, p. 82-84. 2015.
- ZOPPELLARI, F.; BARDI, L. **Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*.** *New Biotechnology*, v. 30, n. 6, p. 607 – 613, september. 2013.
- ZORTÉA, M. E.; SAVOLDI, T. E.; GONGOLESKI, M. S.; HASAN, S. D. M.; FIORESE, M. L. **Uso de fontes renováveis de carbono provenientes de resíduos das indústrias de alimentos e óleo de soja visando à produção de poli (3-hidroxi-butirato).** *Engvista*, v. 15, n.2, p. 166 - 175, august. 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Curva padrão de etanol determinada por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a fim de quantificar o bioetanol e ácidos orgânicos durante as fermentações alcoólicas.

Conforme item (3.8.1) após leituras cromatográficas das soluções diluídas padrão para HPLC (100%), determinou-se o perfil de regressão linear apresentado por meio dos picos de etanol detectados pelo cromatógrafo na Figura 1. As curvas dos ácidos orgânicos estão na Figura 2.

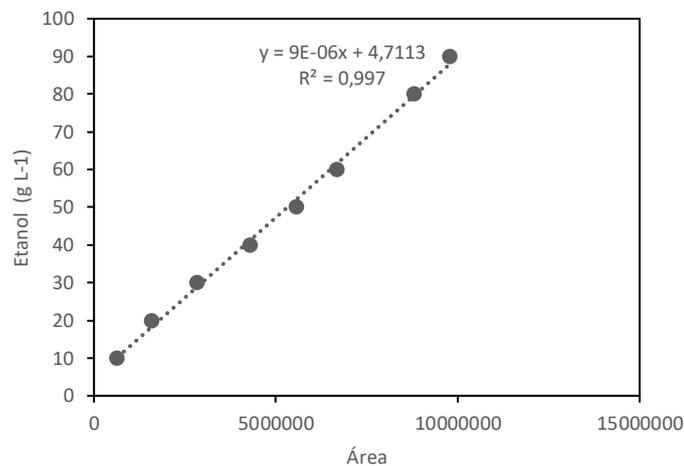


Figura 1 - Curva de padrão de etanol detectada por CLAE

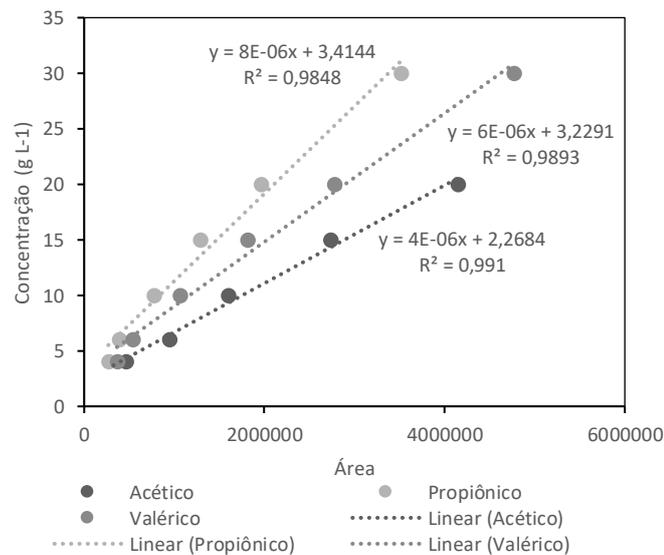


Figura 2 - Curva padrão dos ácidos orgânicos detectada por CLAE

APÊNDICE B

Curva padrão dos substratos lactose, glicose e galactose, determinada por Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) a fim de mensurar o consumo de substrato no decorrer das fermentações.

De acordo com o item (3.8.2) após leituras cromatográficas das soluções diluídas conhecidas de lactose, glicose e galactose padrão, determinou-se o perfil de regressão linear apresentado na (Figura 1) por meio dos picos detectados pelo cromatógrafo.

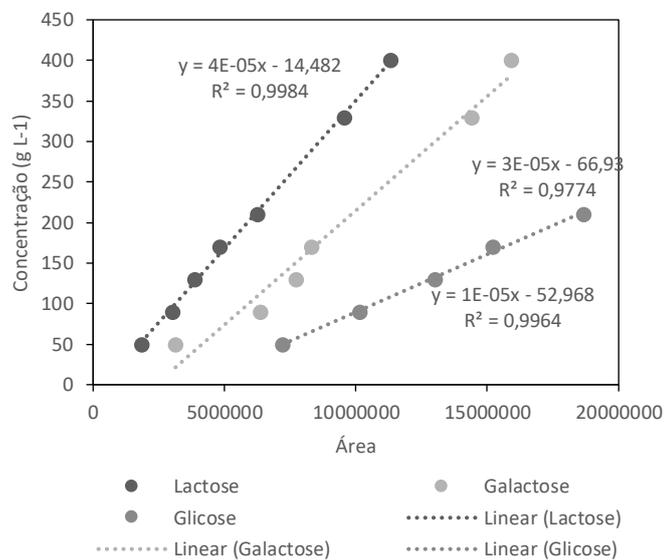


Figura 1 - Curva padrão de lactose, glicose e galactose detectada por CLAE

APÊNDICE C

Curva de correlação para determinação da biomassa microbiana

Para quantificar a biomassa celular (g L^{-1}) realizou-se a regressão linear entre a absorbância das diluições das amostras a 600 nm e a massa seca para a *Kluyveromyces marxianus*, conforme representação da Figura 1.

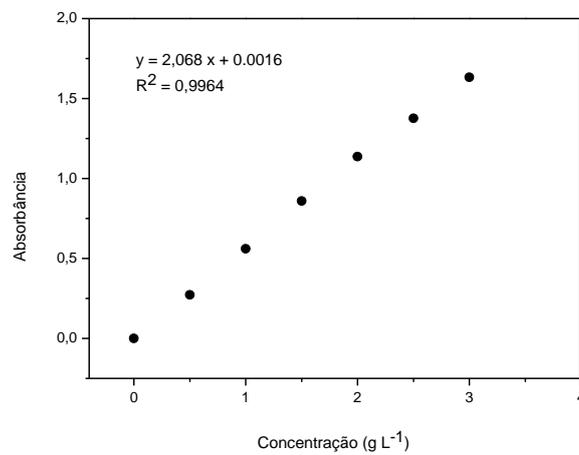


Figura 1 - Curva de regressão linear entre a absorbância e a massa seca para a *Kluyveromyces marxianus*

APÊNDICE D

Curva de correlação para determinação da biomassa microbiana

A fim de obter a biomassa microbiana (g L^{-1}), realizou-se a regressão linear entre a absorbância das diluições das amostras, lida a 600 nm, e a massa seca (item 3.8.3). A curva de correlação pode ser visualizada na Figura 1.

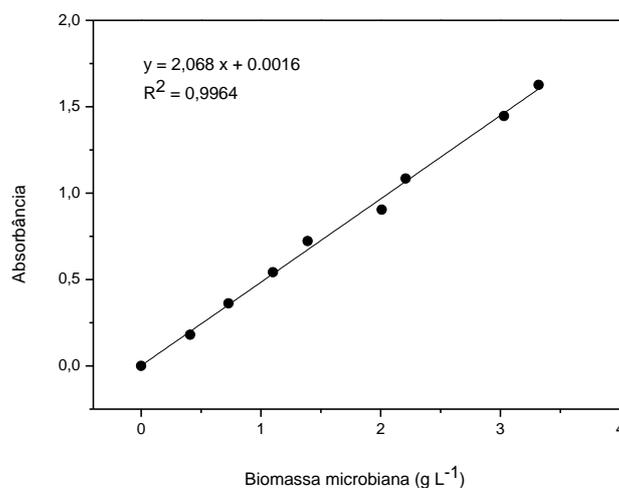


Figura 1 - Curva de correlação entre absorbância e biomassa microbiana (g L^{-1}).

APÊNDICE E

Produção de bioetanol: delineamento composto central rotacional.

De acordo com o item (4.4), a Tabela 1 apresenta a variável resposta para o bioetanol (g L^{-1}) em 21 h estudado por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR).

Tabela 1 - Matriz do delineamento composto central rotacional com os valores reais das variáveis averiguadas e a resposta para o bioetanol (g L^{-1}) para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 21 h

| Ensaio | Variáveis independentes | | Variável resposta |
|--------|------------------------------------|-----|----------------------------------|
| | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | pH | Bioetanol (g L^{-1}) |
| 12 | 22,9 | 2,8 | 5,05 \pm 0,12 |
| 13 | 37,1 | 2,8 | 20,84 \pm 1,10 |
| 14 | 22,9 | 4,2 | 16,11 \pm 0,07 |
| 15 | 37,1 | 4,2 | 39,91 \pm 0,10 |
| 16 | 20 | 3,5 | 24,17 \pm 0,08 |
| 17 | 40 | 3,5 | 45,47 \pm 0,07 |
| 18 | 30 | 2,5 | 8,47 \pm 0,05 |
| 19 | 30 | 4,5 | 49,10\pm0,06 |
| 20 | 30 | 3,5 | 37,00 \pm 0,08 |
| 21 | 30 | 3,5 | 38,86 \pm 0,08 |
| 22 | 30 | 3,5 | 42,54 \pm 0,08 |

Pela Tabela 1, verifica-se que o ensaio com maior formação do composto bioetanol foi o 19 (49,10 g L^{-1}). Dessa forma, para avaliar as variáveis influentes no processo de produção de bioetanol (Y_3) em 21 h, foi realizada a análise estatística dos resultados do DCCR por meio do Diagrama de Pareto (Figura 1), estimativa de efeitos principais e interações das variáveis (Tabela 2), análise de variância (ANOVA) (Tabela 3), modelo de regressão (Eq. 1), gráfico dos valores preditos e valores preditos por valores observados (Figura 2), além de superfícies de contorno e resposta (Figura 4.11).

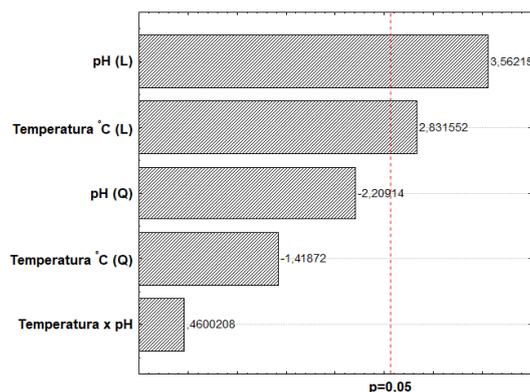


Figura 1 - Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações averiguadas no delineamento composto central rotacional ao nível de confiança de 95% para a variável bioetanol para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 21 h

Tabela 2 - Estimativa de efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas no delineamento composto central rotacional em 21 h de fermentação para a variável bioetanol para a levedura *K. marxianus* CCT 4086

| Resposta | Variáveis | Efeito | p-valor | Coefficiente | Erro padrão do coeficiente |
|----------------|---------------------------------|--------|----------|--------------|----------------------------|
| Y ₃ | Média/Intercepto | 39,42 | 0,000541 | 39,42 | 5,02 |
| | X ₄ (L) | 17,47 | 0,036608 | 8,74 | 3,08 |
| | X ₄ (Q) | -10,47 | 0,215193 | -5,24 | 3,69 |
| | X ₅ (L) | 21,82 | 0,016178 | 10,91 | 3,06 |
| | X ₅ (Q) | -15,94 | 0,078189 | -7,97 | 3,61 |
| | X ₄ x X ₅ | 4,00 | 0,664813 | 2,00 | 4,35 |

R²: 0,84095 (Y₃).

(L) é condição linear e (Q) quadrática.

Tabela 3- Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento delineamento composto central rotacional para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 21 h

| Resposta | Fonte de variância | Soma Quadrática (SQ) | Graus de Liberdade (GL) | Média Quadrática (MQ) | F _{calc} | F _{tab} |
|----------------|--------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|
| Y ₃ | Modelo | 1570,30 | 2 | 785,15 | 10,35 | 5,79 |
| | Erro | 379,18 | 5 | 75,84 | | |
| | TOTAL | 2384,03 | | | | |

Pelo Diagrama de Pareto (Figura 1) e o p-valor (Tabela 21) num intervalo de confiança de 95% (p-valor<0,05), verifica-se que dentre as variáveis avaliadas, a temperatura (X₄) e o pH (X₅) foram significativas positivamente para a produção de bioetanol na condição linear, de modo a obter maiores resultados em (Y₃), mais elevada deverá ser (X₄) e (X₅) na condição linear.

Observa-se nas Tabelas 2 e 3 que o modelo se apresentou significativo para fins preditivos, proporcionando um coeficiente de determinação de R² 0,84095. Aplicando teste F, tem-se que o valor de F(calc) = 10,35 foi aproximadamente 2 vezes maior que o F tabelado (F_{tab 2,5,0,05} = 5,79) num intervalo de confiança de 95% (BARROS *et al.*, 2010). Além disso, o modelo de regressão proposto (Eq. 1) é válido

para a produção de bioetanol descrevendo o comportamento da levedura *K. marxianus* CCT 4086 em PSQD para a formação do composto de interesse (Y_3).

$$Y_3 = -302,47 + 6,06X_4 - 0,1X_4^2 + 117,33X_5 - 16,26X_5^2 + 0,4X_4:X_5 \quad \text{Eq. (1)}$$

O modelo de variância obtido pela ANOVA pode ainda ser avaliado, pelo comportamento observado no gráfico de valores preditos pelos observados, conforme apresentado na Figura 2 e pela superfície de contorno e de resposta (Figura 3).

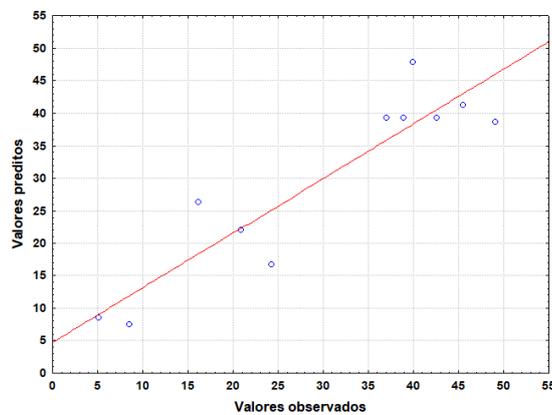


Figura 2 - Resultado estatístico do delineamento composto central rotacional para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 para os valores preditos pelos valores observados para a variável bioetanol em 21 h

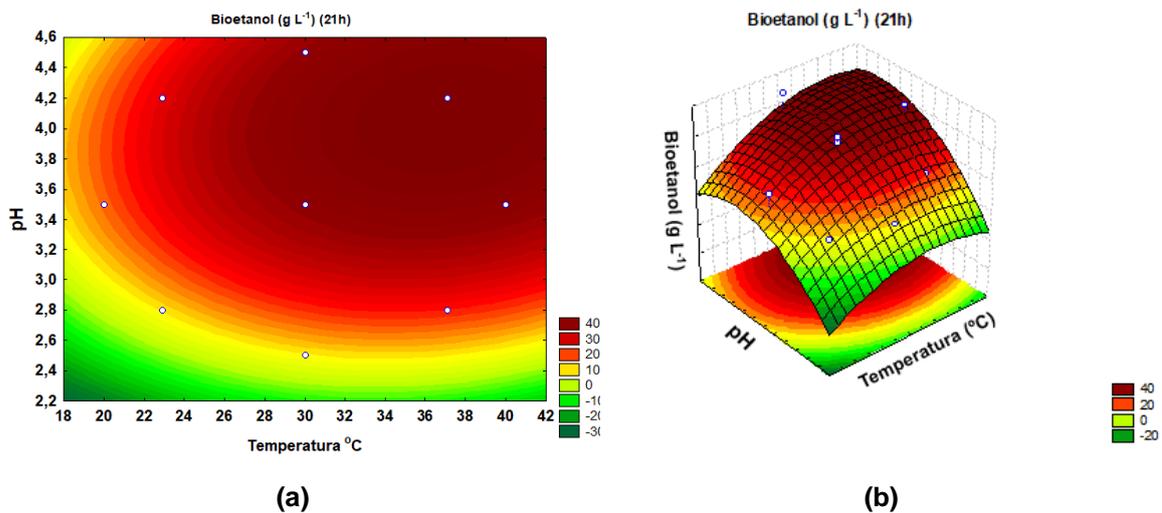


Figura 3 - Superfície de contorno (a) e de resposta (b) do delineamento composto central rotacional para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 para a variável bioetanol em 21 h

De acordo com as Figuras 2 e 3, e análise de variância do planejamento (Tabela 3), nota-se que os parâmetros temperatura e pH influenciam positivamente e linearmente na produção de bioetanol.

Ademais, a Tabela 4 apresenta a variável resposta para o bioetanol (g L^{-1}) estudado pelo DCCR em 58 h.

Tabela 4 - Matriz do delineamento composto central rotacional com os valores reais das variáveis averiguadas e a resposta para o bioetanol (g L^{-1}) para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 58 h

| Ensaio | Variáveis independentes | | Variável resposta |
|--------|------------------------------------|-----|----------------------------------|
| | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | pH | Bioetanol (g L^{-1}) |
| 12 | 22,9 | 2,8 | 26,31 \pm 0,09 |
| 13 | 37,1 | 2,8 | 39,19 \pm 0,12 |
| 14 | 22,9 | 4,2 | 30,59 \pm 0,05 |
| 15 | 37,1 | 4,2 | 43,00 \pm 0,11 |
| 16 | 20 | 3,5 | 30,01 \pm 0,09 |
| 17 | 40 | 3,5 | 47,50 \pm 0,07 |
| 18 | 30 | 2,5 | 26,90 \pm 0,06 |
| 19 | 30 | 4,5 | 32,90 \pm 0,09 |
| 20 | 30 | 3,5 | 52,77\pm0,08 |
| 21 | 30 | 3,5 | 50,69\pm0,07 |
| 22 | 30 | 3,5 | 50,95\pm0,08 |

Analisando a Tabela 4, nota-se que a maior produção de bioetanol ocorreu nos ensaios 20, seguido do 21 e 22, referentes ao ponto central (30°C e pH 3,5), sendo 52,77, 50,69 e 50,95 g L^{-1} , respectivamente ($\text{dp} \pm 1,13$).

Ao averiguar as variáveis significativas no processo de produção de bioetanol (Y_3) em 58 h foi realizada a análise estatística dos resultados do DCCR, por meio do Diagrama de Pareto (Figura 4), estimativa de efeitos principais e interações das variáveis (Tabela 5), análise de variância (ANOVA) (Tabela 6), modelo de regressão (Eq. 2), gráfico dos valores preditos e valores preditos por valores observados (Figura 5), além de superfícies de contorno e resposta (Figura 6).

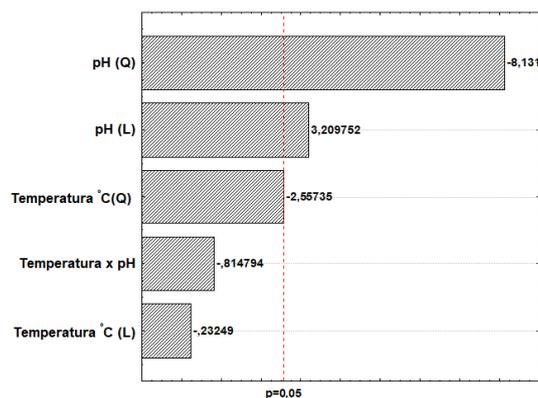


Figura 4 - Diagrama de Pareto com efeitos das variáveis e interações averiguadas no delineamento composto central rotacional ao nível de confiança de 95% para a variável bioetanol para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 58 h

Tabela 5 - Estimativa de efeitos principais e interações entre as variáveis analisadas no delineamento composto central rotacional em 58 h de fermentação para a variável bioetanol para a levedura *K. marxianus* CCT 4086

| Resposta | Variáveis | Efeito | p-valor | Coefficiente | Erro padrão do coeficiente |
|----------------|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------------------|
| Y ₃ | Média/Intercepto | 48,47 | 54,33 | 48,47 | 2,28 |
| | X ₄ (L) | -0,65 | 6,54 | -0,33 | 1,40 |
| | X ₄ (Q) | -8,57 | 0,04 | -4,28 | 1,67 |
| | X₅ (L) | 8,92 | 16,06 | 4,46 | 1,39 |
| | X₅ (Q) | -26,61 | -18,20 | -13,30 | 1,64 |
| | X ₄ x X ₅ | -3,22 | 6,94 | -1,61 | 1,98 |

R²: 0,93007 (Y₃).

(L) é condição linear e (Q) quadrática.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento delineamento composto central rotacional para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 em 58 h

| Resposta | Fonte de variância | Soma Quadrática (SQ) | Graus de Liberdade (GL) | Média Quadrática (MQ) | F _{calc} | F _{tab} |
|----------------|--------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|
| Y ₃ | Modelo | 1192,58 | 2 | 596,29 | 38,21 | 5,79 |
| | Erro | 78,02 | 5 | 15,60 | | |
| | TOTAL | 1282,15 | | | | |

Analisando o DCCR em 58 h, o Diagrama de Pareto (Figura 4) e o p-valor (Tabela 6) com intervalo de confiança de 95% (p-valor<0,05), constata-se que dentre as variáveis avaliadas, pH (X₅) foi influente na condição quadrática negativamente, e positivamente na linear, sendo que a temperatura quadrática (+) atingiu os 95% de influência.

Segundo as Tabelas 5 e 6, o modelo se apresentou significativo para fins preditivos, proporcionando um coeficiente de determinação de R² 0,93915. Ao aplicar o teste F, tem-se que o valor de F(calc) = 38,21 é em torno de 6,6 vezes superior ao F tabelado (F_{tab 2,5,0,05} = 5,79) (95% de confiança) (BARROS *et al.*, 2010). Bem como, validar o comportamento da levedura *K. marxianus* CCT 4086

em PSQD para a formação do composto de interesse (Y_3) pelo modelo de regressão proposto (Eq. 2).

$$Y_3 = -415,55 + 6,18X_4 - 0,085X_4^2 + 206,15X_5 - 27,15X_5^2 + 0,32X_4 \cdot X_5 \quad \text{Eq. (2)}$$

O modelo de variância obtido pela ANOVA pode ainda ser analisado, pelo comportamento observado no gráfico de valores preditos pelos observados, conforme apresentado na Figura 5 e pela superfície de contorno e de resposta (Figura 6).

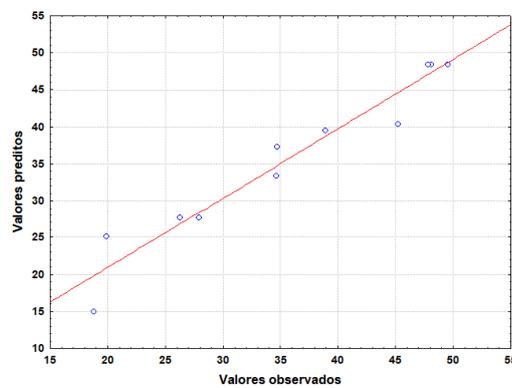


Figura 5 - Resultado estatístico do delineamento composto central rotacional para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 para os valores preditos pelos valores observados para a variável bioetanol em 58 h

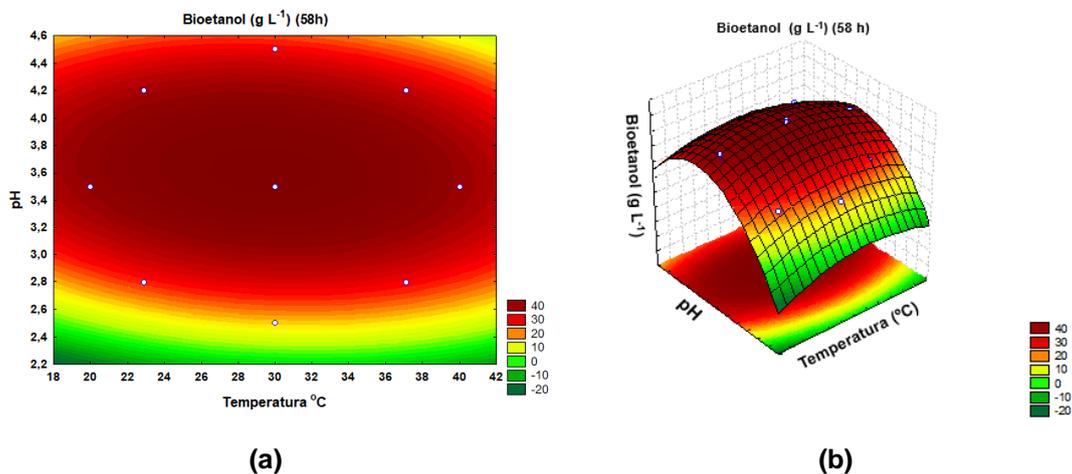


Figura 6 - Superfície de contorno (a) e de resposta (b) do delineamento composto central rotacional para a levedura *K. marxianus* CCT 4086 para a variável bioetanol em 58 h

Por apresentar coeficiente de determinação de R^2 0,93915, e ao observar a Figura 6, identifica-se confiabilidade em relação aos valores preditos e observados (REENCHER & SCHAALJE, 2007; BARROS *et al.*, 2010; MURARI *et al.*, 2019).

APÊNDICE F

Cromatograma destacando a formação de galacto-oligossacarídeos

O cromatograma do Ensaio 1 em 45 h de fermentação detectado em CLAE pela coluna Rezex RSO – Oligossacarídeo Ag⁺ (4%) (200 x 10 mm), evidenciando a formação deste subproduto fermentativo, conforme a Figura 1.

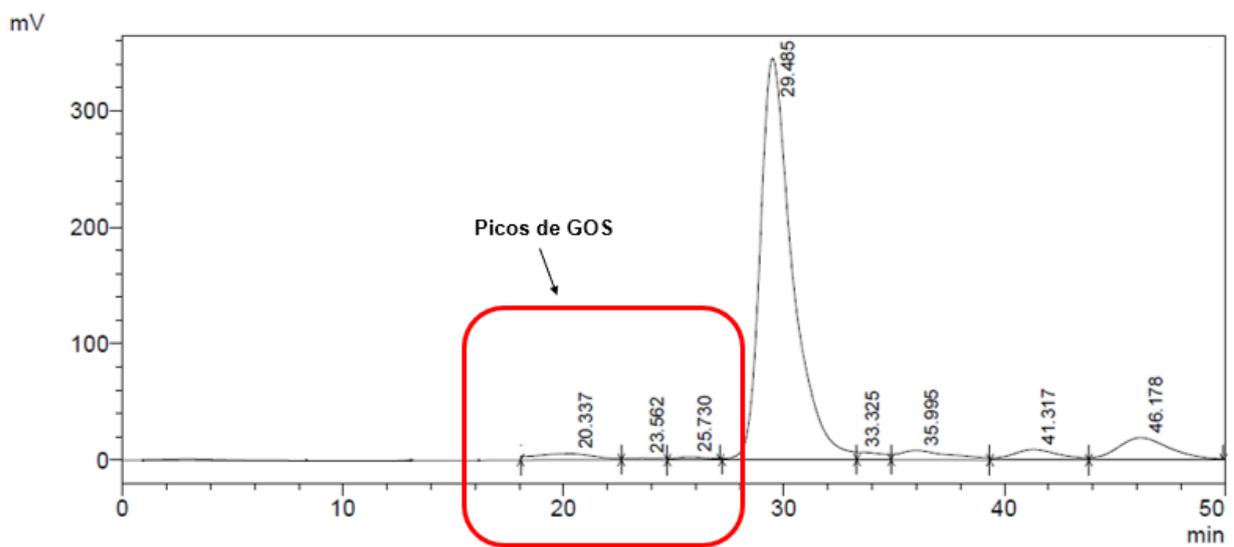


Figura 1 - Cromatograma detectado pela coluna Rezex RSO – Oligossacarídeo Ag⁺ (4%) (200 x 10 mm) referente ao Ensaio 1 em 45 h

ANEXOS

ANEXO A

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



Soluções em Ingredientes Confiáveis



ET024
Revisão:06
Data: 26.08.2015

Permeado de Soro de Leite em Pó

Registro no MAPA nº 011/1328

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

Ingredientes

Permeado de Soro de Leite Resfriado.

Não contém Glúten

Aplicações

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

Embalagem

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

Condições de Transporte e Armazenamento

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

Validade

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

Monitoramento

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

Características Sensoriais

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

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

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

Informação Nutricional

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

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

ACEITE DO CLIENTE

| | |
|----------|--------|
| Empresa: | Data: |
| Nome: | Visto: |
| Função: | |

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



Especificação Técnica



CERTIFICADO DE ANÁLISES

Laboratório Controle de Qualidade

Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda

(BR 163, Km 283,8 - Marechal Cândido Rondon/PR - CEP 85960-000)

SIF: 1328

| | | | |
|-----------------|--|--------------|------------|
| Produto: | Permeado de Soro de Leite em Pó | Data: | 12/03/2018 |
| Cliente: | Universidade do Oeste do Parná (UNIOESTE) | | |

AMOSTRA

| PARÂMETROS | ESPECIFICAÇÃO | VALORES ANÁLISES |
|---|---|--|
| Lote | | 1701060095 |
| Quantidade kg | | 25 kg |
| Data de fabricação | | 21/02/2018 |
| Validade | <i>01 ano após a data de fabricação</i> | 21/02/2019 |
| Aspecto | <i>Pó uniforme sem grumos</i> | Característicos, conforme especificação |
| Cor | <i>Branco a amarelado.</i> | Branco a amarelado, conforme especificação |
| Sabor/ Odor | <i>Levemente lácteos</i> | Característicos, conforme especificação |
| Umidade (%) | <i>Máximo 3,00</i> | 1,06 |
| Acidez (% ácido láctico) | <i>Máximo 2,00</i> | 1,04 |
| Gordura (%) | <i>Máximo 1,50</i> | 0,00 |
| pH | <i>6,00 – 6,70</i> | 6,49 |
| Cinzas (sais minerais %) | <i>Máximo 6,00</i> | 5,78 |
| Teor de Lactose (%) | <i>Mínimo 88,00</i> | 89,93 |
| Proteína (%) | <i>Mínimo 3,00</i> | 3,23 |
| Aeróbios Mesófilos (UFC/g) | <i>Máximo 5,0 x 10⁴</i> | <1,0 x 10 ² |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g) | <i>Máximo 1,0 x 10²</i> | <1,0 x 10 ¹ |
| Coliformes totais (NMP/g) | <i>Máximo 1,0 x 10²</i> | < 0,3 |
| Coliformes Termotol. (NMP/g) | <i>Máximo 1,0 x 10¹</i> | < 0,3 |
| Enterobactérias (UFC/g) | <i>Máximo 1,0 x 10¹</i> | <1,0 X 10 ¹ |
| Bolores e leveduras (UFC/g) | <i>Máximo 1,0 x 10²</i> | <1,0 X 10 ¹ |
| <i>Bacillus cereus</i> (UFC/g) | <i>Máximo 1,0 x 10³</i> | <1,0 X 10 ¹ |
| <i>Salmonella sp</i> (valor garantido) | <i>Ausência (25g)</i> | Ausente |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (valor garantido) | <i>Ausência (25g)</i> | Ausente |

Garantia da Qualidade

ANEXO B

Ficha de especificação técnica da coluna utilizada no item (3.8.2).

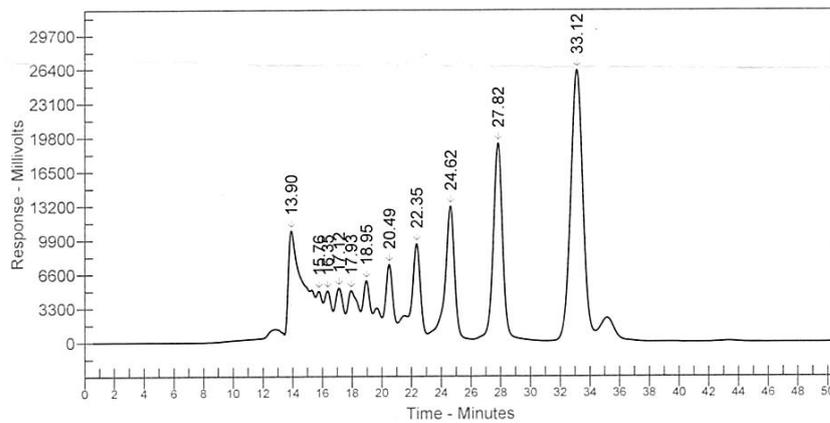
HPLC Certificate of Quality Assurance



Part No.: 00P-0133-N0 **Serial No.:** H17-205366
Description: Rezex™ RSO-Oligosaccharide Ag+ 4% **Size:** 200 X 10.0 mm

MEASURED PARAMETERS BASED ON LAST PEAK

Efficiency: 40028 plates/meter **k Factor:** 1.576 **Batch No.:** 1133-0049
Peak Asym.: 1.01 **Ret. Time:** 33.12 minutes **Analyte:** Light Corn Syrup



Test Analytes

| Peak | Analyte | Time | Area | k Factor | Width | Eff. | Asym. |
|------|---------|-------|---------|----------|-------|------|-------|
| 1 | | 13.90 | 669177 | 0.081 | 0.835 | 694 | 3.58 |
| 2 | | 15.76 | 138610 | 0.226 | 0.404 | 894 | 1.22 |
| 3 | | 16.35 | 169060 | 0.272 | 0.499 | 1450 | 1.15 |
| 4 | | 17.12 | 204858 | 0.331 | 0.589 | 2128 | 1.09 |
| 5 | | 17.93 | 244192 | 0.395 | 0.662 | 2600 | 1.83 |
| 6 | | 18.95 | 209876 | 0.474 | 0.514 | 3800 | 1.08 |
| 7 | | 20.49 | 275415 | 0.594 | 0.542 | 7501 | 1.05 |
| 8 | | 22.35 | 369505 | 0.738 | 0.583 | 8551 | 0.93 |
| 9 | | 24.62 | 626244 | 0.915 | 0.694 | 8964 | 0.74 |
| 10 | | 27.82 | 892823 | 1.164 | 0.706 | 9986 | 1.01 |
| 11 | | 33.12 | 1509930 | 1.576 | 0.883 | 8006 | 1.01 |

Testing Condition

Mobile Phase: H2O **Temperature:** 85C
Flow Rate: 0.3 mL **Injection:** 5 µL
Detection: ri **Back Pressure:** 116 psi
QC Approved: Hanan M. **Instrument:** LC-1200-13
 Tested: 07 July 2017

NOTE: Effective 4/09/2014 the equipment used to test this part number was changed. Due to this, you may notice slight changes in the area count. This does not impact the quality or performance of the column.

ANEXO C

Método para Determinação de Açúcares Redutores Totais (DNS).

A quantificação dos açúcares redutores totais (DNS) foi desenvolvida seguindo o método do ácido 3-5 dinitrosalicílico conforme proposto por MILLER (1959).

Iniciou-se com o preparo da curva padrão a partir de soluções padrões de glicose a 3 g L^{-1} , com concentrações no intervalo de $0,5$ a 3 g L^{-1} . Em um tubo de ensaio, adicionaram-se $400\mu\text{L}$ da amostra de glicose de acordo com a concentração da faixa e $400\mu\text{L}$ da solução de DNS. O preparo do branco foi com água destilada.

As amostras da fermentação lidas em triplicata em tubos de ensaio, adicionaram-se $400\mu\text{L}$ da amostra diluída proporcional à quantidade de açúcar na amostra e $400\mu\text{L}$ da solução de DNS. Levaram-se a curva e as amostras ao aquecimento em banho-maria, a 100°C por 5 min. Em seguida, foram resfriadas em banho de gelo e foram adicionados 4 mL de água destilada e homogeneizada. Após 10 minutos as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm, zerando o aparelho com o branco preparado.

ANEXO D

Método para determinação de açúcar redutor (Kit de glicose - PPP).

A quantificação do teor de glicose (g L^{-1}) dos fermentados foi realizada por metodologia enzimática-colorimétrica em kit de glicose (PPP) da marca Analisa e pela técnica de espectroscopia no ultravioleta visível (UV-VIS), de modo a compreender a faixa 0 e 0,8 de absorvância.

As amostras foram acometidas em tubos de ensaios, com $24\mu\text{L}$ da amostra preparada (diluída se necessária). Para estimar a glicose, foi necessária a leitura do padrão ($24\mu\text{L}$ do reagente 1). O padrão e as amostras receberam $2400\mu\text{L}$ do reagente 2 (reagente de cor) e $4800\mu\text{L}$ do reagente de cor, sendo empregado como branco. As amostras foram submetidas ao aquecimento em banho-maria, a 37°C por 10 min. Ao retirar as amostras do banho-maria, foi realizada imediatamente a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 505 nm.

ANEXO E

Método para determinação da concentração celular (biomassa celular).

O método de espectroscopia no UV-VIS corresponde à densidade óptica da suspensão celular, baseado na metodologia de MULLER (2006); MULLER *et al.* (2007); ASSUNÇÃO (2014); FIORESE *et al.* (2015), NADAI (2015), TRIGUEROS *et al.* (2016) e MAESTRE (2017).

As amostras foram lidas em espectrofotômetro UV-VIS marca Shimadzu (modelo 1800) no comprimento de onda de 600 nm, conforme LUDWIG *et al.* (2001), sendo esta determinação realizada em triplicata. Quando necessário, foram realizadas diluições das amostras de forma a manter a linearidade da absorção inferior a 0,8 unidades. A absorbância foi expressa na forma logarítmica $\ln(n/n_0)$, em que, n_0 é a absorbância no tempo zero e n é a absorbância no tempo t .

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

$$[X] = \frac{m (g)}{V (L)} \quad \text{Eq. (1)}$$

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

Para a construção da curva de calibração, fez-se diluições da amostra final em diferentes volumes de água destilada, e estas diluições foram lidas em espectrofotômetro a 600 nm, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Diluições da suspensão celular para leituras de densidade óptica a 600 nm

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

A partir da concentração celular obtida (Eq. 1), as correspondentes concentrações celulares (biomassa celular) para os volumes de amostra especificados na Tabela 1 foram calculadas pela Equação (2).

$$C_1.V_1 = C_2.V_2 \quad \text{Eq. (3.3)}$$

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