

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JANAINA MAYUMI HONMA

**BIOPROSPECÇÃO, SELEÇÃO E CULTIVOS FERMENTATIVOS EM MEIO
SINTÉTICO E SORO, COM MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LATICÍNIO PARA
APROVEITAMENTO DE RESÍDUO INDUSTRIAL**

Maringá – PR – Brasil

Março de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**BIOPROSPECÇÃO, SELEÇÃO E CULTIVOS FERMENTATIVOS EM MEIO
SINTÉTICO E SORO, COM MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LATICÍNIO PARA
APROVEITAMENTO DE RESÍDUO INDUSTRIAL**

Janaina Mayumi Honma
Engenheira de Alimentos, UFGD, 2017
Orientador: Prof Dr. Marcelino Luiz Gimenes
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Tait Vareschini

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte dos requisitos necessários
à obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia de Alimentos.

Maringá – PR – Brasil

Março de 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

H773b

Honma, Janaina Mayumi

Bioprospecção, seleção e cultivos fermentativos em meio sintético e soro, com microrganismos isolados de laticínio para aproveitamento de residuo industrial. -- Janaina Mayumi Honma -- Maringá, 2019.

73 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelino Luiz Gimenes.

Co-orientador(a): Prof. Dr. Daniel Tait Vareschini.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2019.

1. Leveduras. 2. Soro de queijo. 3. Fermentação. 4. Etanol. 5. Efluentes. I. Gimenes, Marcelino Luiz, orient. II. Vareschini, Daniel Tait, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

CDD 21.ed. 664.3

AHS-CRB-9/1065



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Tecnologia
Departamento de Engenharia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos – PEG/UEM

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Janaina Mayumi Honma perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos em 08 de março de 2019.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Marcelino Luiz Gimenes, Ph.D.

Orientador

Prof. Daniel Tait Vareschini, D.Sc

Co-orientador e Membro

Prof. Raquel Guttierres Gomes, D.Sc

Membro

Prof. Marco Aurelio Schuler de Oliveira, D.Sc

Membro

Dedico esta dissertação a todos que, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos contribuindo para o desenvolvimento desse trabalho. Em especial, ao meu companheiro de vida, que representou um incentivo vital desde o início até a finalização desse processo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PEG), pela oportunidade de realizar meu Mestrado, período no qual me dediquei intensamente para contribuir com aspectos relevantes para a pesquisa e ciência.

Ao Departamento de Engenharia Química (DEQ) e ao Laboratório de Gestão, Controle e Preservação Ambiental (LGCPA), pelo suporte para realização do trabalho.

Aos meus queridos professores Marcelino Luiz Gimenes (orientador) e Daniel Tait Vareschini (co-orientador), pelo aceite em me orientar nesse projeto e por não medirem esforços para que o trabalho se concretizasse. Obrigada por transmitirem a mim, parte da bagagem de experiência e conhecimento específicos que vocês possuem.

Aos professores membros da banca de avaliação, por ter colaborado com o trabalho desde a qualificação. Em especial, à professora Raquel, pela abertura desde seu primeiro contato e pelas oportunidades e confiança em mim depositada.

Durante essa jornada, muitas pessoas queridas cruzaram meu caminho, as quais colaboraram com momentos, atitudes e até mesmo palavras, que na singularidade de cada ocasião, foi essencial para me manter firme e seguir adiante. Posso citar:

Tatiana e Sofia, obrigada por somarem momentos prazerosos e felizes comigo. Sou muito grata por sua amizade e por toda as vezes que me diverti brincando com a Sofia. E ainda em seu nome, aproveito para agradecer a alegria compartilhada por todos os colegas de trabalho da Jin Jin, que tornaram a rotina (trabalho e estudo) menos exaustiva. Levarei vocês no coração.

Danilo Scarpari, agradeço pela oportunidade de trabalhar em seu time na Gelita, onde expandi meus conhecimentos na área ambiental, a qual sempre me interessou.

Maria Julia, agradeço pelos momentos ímpares somados desde quando iniciei minha temporada na Gelita. Sua amizade junto às calorosas reflexões sobre a vida, sociedade, política e pesquisa que surgiam em nossos encontros foram importantes momentos de descontração.

Thaís, obrigada pelo carinho e dedicação ao projeto. Como iniciante no universo científico, você sempre buscou aprender e contribuir da melhor forma, logo, é parte dessa conquista.

Ana Paula, sou grata pelos momentos compartilhados no grupo LGCPA, desde as discussões técnicas até as xícaras de café. Sua amizade, proatividade e determinação me inspira.

Gabrielli, obrigada por sua amizade e companheirismo. Você, como colega de turma de mestrado, acompanhou e passou junto as adversidades que surgiram no decorrer desse período. E como amiga, sempre estive ao meu lado em todos os momentos, perto ou distante. Sou muito grata por isso.

Agradeço aos meus amigos de longa data, que mesmo distante, apoiaram com palavras amigas e boas energias. Vocês são pontos de equilíbrio!

Por fim, mas não menos importante, agradeço minha família, em especial minha mãe, pai, irmã e ao meu companheiro de vida. Vocês são meu alicerce, dão sentido à existência e tornam as coisas mais simples e alcançáveis. Também sou grata aos meus companheirinhos de quatro patas (Wilfred e Nina), que em todos os momentos estiveram ao meu lado distribuindo amor e carinho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Crescimento microbiano em placas <i>Compact Dry Yeast and Molds</i>	15
Figura 2.2. Placas com estrias simples em Meio Basal e multiplicação celular em Meio YEPL.....	15
Figura 2.3. Linhagem P1 cultivada em MMS com lactose, glicose e galactose, a) após 24 h e b) no tempo final, respectivamente.....	21
Figura 2.4. Linhagens de leveduras cultivadas em MMS com amido.....	23
Figura 3.1 Cinéticas de crescimento de seis linhagens de leveduras (P1, PI1, PI3, SR, 1TE e STFB) em lactose, glicose e galactose como única fonte de carbono.....	35
Figura 4.1 Cinéticas de crescimento, consumo de substrato e formação de metabólitos, da levedura PI3, cultivada por 24 h no permeado de soro (três repetições de cultivo).....	58
Figura 4.2 Cinéticas de crescimento, consumo de substrato e formação de metabólitos, da levedura 1TE, cultivada por 24 h no permeado de soro (três repetições de cultivo).....	59
Figura 4.3 Cinéticas de crescimento, consumo de substrato e formação de metabólitos, da levedura SR, cultivada por 24 h no permeado de soro (três repetições de cultivo).....	60
Figura 4.4 Relação do perfil de crescimento das linhagens PI3, 1TE e SR no permeado de soro, representado pelos valores de DO e turbidez em função do tempo (0, 8, 14, 18 e 24 h). O valor de cada ponto representa uma média de resultados de 3 repetições de cultivo.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Micro- e macromorfologia de onze linhagens de leveduras bioprospectadas.....	17
Tabela 2.2. Resultado do teste de assimilação e fermentação de onze linhagens de leveduras cultivadas em Meio Mineral (MM) com lactose, glicose e galactose durante 168 h.....	18
Tabela 2.3. Resultado do teste de assimilação e fermentação de seis linhagens de leveduras cultivadas em Meio Mineral Suplementado (MMS) com sete substratos durante 168 h.....	20
Tabela 3.1 Parâmetros obtidos nos cultivos aeróbios de seis linhagens de leveduras em lactose, glicose e galactose como fonte única de carbono.....	36
Tabela 3.2 Formação máxima de biomassa e metabólitos extracelulares (succinato, acetato e etanol) durante cultivos aeróbios de seis linhagens de leveduras em lactose, glicose e galactose como única fonte de carbono.....	39
Tabela 4.1 Características físicas, químicas e físico-químicas do soro de queijo bruto (efluente) e do permeado de soro (meio de cultivo).....	51
Tabela 4.2 Características físicas, químicas e físico-químicas do permeado de soro (meio de cultivo), após 24 h de fermentação com as linhagens PI3, 1TE e SR.....	54
Tabela 4.3 Concentração inicial dos componentes detectados no permeado de soro por HPLC.....	55
Tabela 4.4 Parâmetros cinéticos dos cultivos no permeado de soro, com diferentes linhagens de leveduras, em condições de aerobiose.....	56
Tabela 4.5 Formação máxima de biomassa e metabólitos extracelulares (etanol e ácidos orgânicos), de três linhagens de leveduras durante a fermentação do soro.....	56
Tabela 4.6 Eficiências de consumo de lactose e remoção de DQO, após 24 h de cultivos independentes no permeado de soro, com diferentes linhagens de leveduras em aerobiose.....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	7
1.1	OBJETIVOS.....	8
2	BIOPROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE LATICÍNIO	9
	RESUMO	9
2.1	INTRODUÇÃO.....	10
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.2.1	Bioprospecção de leveduras em indústria de queijos.....	11
2.2.2	Micromorfologia e macromorfologia das linhagens isoladas.....	12
2.2.3	Teste bioquímico de capacidade de assimilação e fermentação em Meio Mineral.....	12
2.2.4	Teste bioquímico de capacidade de assimilação e fermentação em Meio Mineral Suplementado (MMS).....	13
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
2.3.1	Bioprospecção de leveduras em indústria de queijos.....	14
2.3.2	Micromorfologia e macromorfologia das linhagens isoladas.....	16
2.3.3	Teste bioquímico de capacidade de assimilação e fermentação em Meio Mineral (MM)....	18
2.3.4	Teste bioquímico de capacidade de assimilação e fermentação em Meio Mineral Suplementado (MMS).....	19
2.4	CONCLUSÕES.....	24
2.5	REFERÊNCIAS.....	24
3	CULTIVOS FERMENTATIVOS EM MEIO SINTÉTICO COM MICRORGANISMOS BIOPROSPECTADOS DE LATICÍNIO E AVALIAÇÃO DE SEUS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO, CONSUMO E FORMAÇÃO DE METABÓLITOS	28
	RESUMO	28
3.1	INTRODUÇÃO.....	29
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.2.1	Microrganismos e manutenção.....	30
3.2.2	Meio de cultivo.....	30
3.2.3	Condições de cultivo.....	31
3.2.4	Determinação de substrato, concentração de metabólitos extracelulares e biomassa microbiana.....	32
3.2.5	Determinação de parâmetros cinéticos.....	32
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.4	CONCLUSÕES.....	41
3.5	REFERÊNCIAS.....	42
4	CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO DO SORO COMO EFLUENTE, REDUÇÃO DA CARGA ORGÂNICA E GERAÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO PERMEADO COM MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LATICÍNIO	44
	RESUMO	44
4.1	INTRODUÇÃO.....	45

4.2	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.2.1	Métodos analíticos para a caracterização do soro bruto (efluente).....	46
4.2.2	Microrganismos e manutenção.....	47
4.2.3	Permeado de soro de queijo (meio de cultivo real)	48
4.2.4	Meios (sintético e real) e condições de cultivo.....	48
4.2.5	Determinação de substrato residual, concentração de metabólitos extracelulares e biomassa microbiana.....	49
4.2.6	Determinação de parâmetros cinéticos.....	50
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.3.1	Caracterização do soro bruto (efluente) e do permeado de soro.....	52
4.3.2	Cinética do cultivo e produtos.....	55
4.3.3	Desempenho biológico dos cultivos.....	60
4.4	CONCLUSÃO	64
4.5	REFERÊNCIAS	64
5	CONCLUSÃO GERAL	67
	APÊNDICE	68

1 INTRODUÇÃO GERAL

Esta dissertação apresenta as atividades realizadas pela aluna Janaina Mayumi Honma, durante o seu mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), com início em março de 2017. A aluna contou com bolsa CAPES/FA (88887.189140/2018-00) desde maio de 2018 até fevereiro de 2019.

O texto do presente trabalho foi estruturado de modo que cada capítulo venha corresponder a uma publicação, com exceção da introdução e conclusão geral (Capítulos 1 e 4, respectivamente). Durante o período que antecedeu o mestrado, foi realizado a bioprospecção dos microrganismos, o que também está incorporado a este trabalho como parte do Capítulo 2.

O desenvolvimento do projeto teve início com o isolamento de cepas de leveduras provenientes de indústria de laticínios, ambiente propício aos microrganismos assimiladores de fontes de carbono derivadas do leite. Partindo disso, houve a necessidade de avaliar o desempenho destes isolados frente às condições fermentativas, realizando uma análise sistêmica do comportamento das linhagens selecionadas.

Nesse contexto, o texto foi organizado da seguinte forma:

Capítulo 2: Bioprospecção, caracterização morfológica e bioquímica de linhagens de leveduras isoladas de laticínio.

Capítulo 3: Cultivos fermentativos em meio sintético com microrganismos bioprospectados de laticínio e avaliação de seus parâmetros cinéticos de crescimento, consumo e formação de metabólitos.

Capítulo 4: Caracterização do soro como efluente, redução da carga orgânica e geração de bioprodutos a partir da fermentação do permeado com microrganismos isolados de laticínio.

E conclusão geral.

1.1 OBJETIVOS

- Bioprospectar, selecionar e caracterizar linhagens de leveduras isoladas de laticínio com potencial para fermentação de lactose.
- Realizar teste bioquímico de assimilação e fermentação de diferentes fontes de carbono e apontar a influência do meio de cultivo no desenvolvimento das linhagens.
- Avaliar o crescimento, consumo e formação de produtos de seis linhagens por meio de cultivos fermentativos em meio sintético com lactose, glicose e galactose.

Caracterizar o soro de queijo como efluente e avaliar seu uso como meio de cultivo fermentativo por microrganismos bioprospectados de laticínio.

2 BIOPROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE LATICÍNIO

RESUMO

A crescente disponibilidade de substratos em resíduos agrícolas e industriais vem desencadeando pesquisas que valorizam esses produtos. Diferentes microrganismos são usados para converter uma ampla variedade de substratos disponíveis em produtos de valor agregado. A lactose é um substrato potencial a ser utilizado para gerar bioprodutos, já que é conhecida sua significativa disponibilidade nos processos de fabricação de queijos como forma de resíduo. Muitas leveduras podem assimilar certos monossacarídeos e oligossacarídeos em aerobiose, mas não em anaerobiose. Os testes fisiológicos comumente usados para identificação e caracterização de leveduras são a fermentação de sete a oito carboidratos e também crescimento em várias fontes de carbono. Objetivou-se com o presente trabalho bioprospectar novas linhagens de leveduras no ambiente industrial, analisando suas características fisiológicas e potencial fermentativo. A busca por novas linhagens de leveduras resultou em um total de onze isolados, permitindo a partir de dados de caracterizações fisiológicas e bioquímicas, a seleção de seis linhagens que apresentaram potencial de assimilar e fermentar diferentes substratos, principalmente a lactose e seus monossacarídeos derivados. Observou-se que esses microrganismos também apresentaram-se aptos a assimilarem outros substratos como amido, frutose, maltose e celobiose. Além disso, os constituintes do meio de cultivo influenciaram fortemente o metabolismo de consumo de substrato dos microrganismos.

PALAVRAS-CHAVE: Isolamento. Leveduras. Assimilação. Fermentação.

2.1 INTRODUÇÃO

A crescente disponibilidade de substratos em resíduos agrícolas e industriais vem desencadeando pesquisas que valorizam esses produtos. Dessa maneira, diferentes microrganismos são usados para converter uma ampla variedade de substratos disponíveis em produtos de valor agregado.

Trabalhar com microrganismos previamente selecionados e conhecidos, visando à bioconversão efetiva dos mais diferentes tipos de substratos é um desafio que nem sempre é alcançado, nesse sentido, alguns autores avaliam a possibilidade de substituição dos microrganismos convencionais por novas linhagens prospectadas de ambientes específicos, que podem revelar características de interesse industrial.

As leveduras podem ser prospectadas de uma ampla gama de habitats, como aquáticos, marinhos, atmosféricos e terrestres. A definição de determinadas características desejáveis nas leveduras conduzem a uma busca menos desordenada e exaustiva. As leveduras raramente ocorrem na ausência de fungos ou bactérias, para isso, técnicas seletivas são frequentemente aplicadas durante o isolamento (KURTZMAN et al., 2011).

Espécies não convencionais de levedura têm sido selecionadas por apresentarem grande capacidade de produzir ésteres de sabor e fenólicos de distintos perfis na produção de bebidas alcoólicas (HOLT et al., 2018).

Leite e colaboradores (2008) reportaram em sua pesquisa o isolamento da levedura *Aureobasidium pullulans ER-16* em resíduo industrial do suco de laranja, para avaliar o comportamento das enzimas em seu estado bruto, haja vista que a utilização em nível industrial de enzimas purificadas não é economicamente justificada em muitos casos.

A lactose é um substrato potencial a ser utilizado para gerar bioprodutos, já que é conhecida sua significativa disponibilidade nos processos de fabricação de queijos como forma de resíduo (GONZALEZ-SISO et al., 2015). Como a lactose é o constituinte de maior valor no soro, sua eliminação direta no meio ambiente pode causar sérios problemas devido à alta demanda biológica de oxigênio (DBO) (GUIMARÃES et al., 2010). Nesse cenário, a bioconversão de lactose em biocombustíveis e outros possíveis produtos não apenas amenizaria o problema da poluição, mas também contribuiria para uma produção econômica de produtos de valor agregado.

Muitas leveduras podem assimilar certos monossacarídeos e oligossacarídeos em aerobiose, mas não em anaerobiose. Esse fenômeno, conhecido sob o nome clássico de Kluver, é descrito em muitas leveduras para a utilização de substratos como galactose, maltose, rafinose, lactose, sacarose, celobiose, entre outros (FUKUHARA, 2003; KLUYVER e CUSTERS, 1940). Os testes fisiológicos comumente usados para identificação e caracterização de leveduras são a fermentação de sete a oito carboidratos e também crescimento em várias fontes de carbono e nitrogênio (KURTZMAN et al., 2011), no entanto, poucas linhagens de levedura assimilam a lactose como única fonte de carbono, sendo a *Kluyveromyces lactis* um exemplo que é parte de um grupo de apenas 2% das espécies das leveduras conhecidas (AKTAŞ et al. 2006; FONSECA et al. 2008).

Com vistas ao isolamento e caracterização de leveduras com potencial de fermentação, objetivou-se com o presente trabalho bioprospectar novas linhagens no ambiente industrial, analisando suas características fisiológicas e potencial fermentativo de lactose, glicose, galactose, frutose, celobiose, maltose e amido.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Bioprospecção de leveduras em indústria de queijos

Os microrganismos foram prospectados com auxílio de placas Compact Dry YM (*Nissui Pharma, Japan*) específica para crescimento leveduras e bolores, na qual foi semeada, separadamente, amostras de diferentes fontes (manteiga, queijo parmesão, soro residual da produção de queijo ricota, tanque de soro destinado a produtores rurais e primeiro tanque de efluente), de um laticínio localizado na cidade de Guaraçai, São Paulo, Brasil. Em seguida, incubou-se as placas de três a sete dias a 30°C para verificação do crescimento de colônias de levedura.

O meio de crescimento da placa continha substrato de enzima cromogênico, o qual torna-se azul com a presença de levedura. A formação de bactérias é inibida através de antibióticos e os bolores apresentam reações distintas de cor e textura, tornando-se fáceis de distinguir, além disso, devido à cavidade nas placas, os bolores desenvolvem a sua forma característica tridimensional com cores variadas.

Os microrganismos crescidos nas placas foram purificados pela separação das colônias de mofos e leveduras, selecionando apenas colônias com características leveduriformes.

Em seguida, foi feito diluições em água peptonada e inoculação (estrias por esgotamento), afim de se obter uma única colônia isolada crescida em Meio Basal sólido (em g.L⁻¹: (NH₄)₂SO₄, 5,0; KH₂PO₄, 3,0; MgSO₄.7H₂O, 0,5; lactose, 20,0; ágar-ágar, 15,0). As concentrações de (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, e MgSO₄.7H₂O utilizadas no Meio Basal sólido são de composição igual ao utilizado no meio líquido de Verduyn et al. (1992). As colônias que apresentaram morfotipos diferentes foram repicadas em meio basal até obter colônia pura.

As linhagens isoladas foram mantidas em placas de Petri com meio YEPL (em g L⁻¹: peptona bacteriológica, 20,0; extrato de levedura, 20,0; lactose, 20,0; ágar-ágar, 15,0) e estocadas a 4 °C.

2.2.2 Micromorfologia e macromorfologia das linhagens isoladas

Para analisar a micro- e macromorfologia das linhagens bioprospectadas, os microrganismos foram plaqueados por esgotamento em estrias simples em meio YEPL (em g L⁻¹: peptona bacteriológica, 20,0; extrato de levedura, 20,0; lactose, 20,0; ágar-ágar, 15,0) e incubados (incubadora New Lab, Brasil) a 30 °C por 48 h.

Após o tempo de incubação, a análise macromorfológica das colônias crescidas foi realizada visualmente, onde os parâmetros avaliados foram pigmentação, superfície e borda. Para a análise micromorfológica, as colônias foram diluídas em água destilada e observadas em microscópio óptico (Olympus U-PMTVC, Japão) para verificar características como formato.

2.2.3 Teste bioquímico de capacidade de assimilação e fermentação em Meio Mineral

Todas as linhagens de leveduras prospectadas foram testadas quanto a capacidade de assimilar e fermentar lactose, glicose e galactose, como fonte única de carbono.

O testes foram realizados em tubos de ensaio com 10 mL de Meio Mineral (MM), o qual continha em g L⁻¹ de água destilada: (NH₄)₂SO₄, 5,0; KH₂PO₄, 3,0; MgSO₄.7H₂O, 0,5 (VERDUYN et al., 1992) e substrato, 20,0. Não foi adicionado solução de vitaminas e elementos traço. O pH do meio foi ajustado para 6,0 com NaOH 1 M. Foi adicionado tubo de Durham invertido em cada tudo de ensaio, e em seguida, esterilizado em autoclave (121°C, 15 min). Um tubo de ensaio sem substrato foi usado como controle negativo.

Antes de realizar o inóculo das linhagens estudadas nos tubos contendo Meio Mineral, as células foram crescidas em meio YEPL (g L⁻¹: extrato de levedura, 20,0; peptona bacteriológica, 20,0; substrato, 20,0). Assim, os microrganismos foram inoculados na concentração de 1:10.

Os tubos foram incubados (incubadora New Lab, Brasil) a 30 °C por 168 h e inspecionados em intervalos de 24 h. Considerou-se positivo para assimilação, amostras em que o meio tornou-se turvo após incubação, o que evidencia multiplicação celular. Enquanto para a fermentação, considerou-se positivo amostras que apresentaram o tubo de Durham preenchido com gás.

2.2.4 Teste bioquímico de capacidade de assimilação e fermentação em Meio Mineral Suplementado (MMS)

Com o mesmo método utilizado para avaliar a capacidade de assimilar e fermentar fontes de carbono (lactose, glicose e galactose) em Meio Mineral, estudou-se a influência da suplementação do meio na assimilação e fermentação de lactose, glicose, galactose, frutose, celobiose, maltose e amido solúvel. Todos os substratos testados eram de alto grau de pureza (P.A.).

O Meio Mineral Suplementado (MMS) continha em g L⁻¹ de água destilada: (NH₄)₂SO₄, 5,0; KH₂PO₄, 3,0; MgSO₄.7H₂O, 0,5 (Verduyn et al., 1992); extrato de levedura, 4,5; peptona bacteriológica, 7,5; substrato, 20,0. Não foi adicionada solução de vitaminas e elementos traço. Entretanto, assim como descrito por Kutzman et al. (2011), adicionou-se ao meio uma solução de azul de bromotimol afim de tornar o meio cor verde escuro. A solução de azul de bromotimol estava na concentração 0,6 g L⁻¹ e foi esterilizada por filtração (0,45 µm). Foi adicionado tubo de Durham em cada tudo de ensaio, e em seguida, esterilizado em autoclave (121 °C, 15 min). Um tubo de ensaio sem substrato foi usado como controle negativo.

Quando os açúcares são consumidos, o Meio Mineral Suplementado contendo indicador reage alterando a cor do meio de verde escuro para amarelo. Mas, se os açúcares não forem consumidos e os aminoácidos presentes forem utilizados como fonte de carbono, o meio torna-se azul Kutzman et al. (2011).

Os tubos foram incubados (incubadora New Lab, Brasil) a 30 °C por 168 h e inspecionados em intervalos de 24 h. Considerou-se positivo para assimilação, amostras em que o meio tornou-se turvo após incubação, o que evidencia multiplicação celular. Enquanto para a fermentação, considerou-se positivo amostras que apresentaram o tubo de Durham preenchido com gás.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Bioprospecção de leveduras em indústria de queijos

Observou-se crescimento microbiano na maioria das placas inoculadas com amostras dos diferentes setores da indústria (desde seus produtos aos tanques de efluentes). Como as placas continham em seu meio substrato cromógeno de enzima, o qual torna-se azul com a presença de levedura, foi possível observar (Figura 2.1) característica de levedura na maioria das placas.

A Figura 2.1 ilustra colônias crescidas em placas *Compact Dry Yeast and Molds* após incubação de 7 dias a 30 °C.

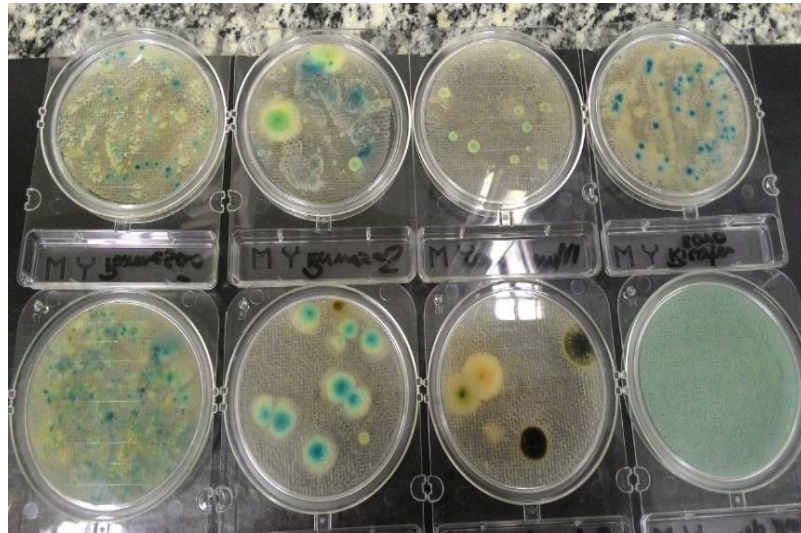


Figura 2.1. Crescimento microbiano em placas *Compact Dry Yeast and Molds*.

Como pode ser observado na Figura 2.1, houve crescimento de colônias com características leveduriformes, estas foram inoculadas com auxílio de um *swab*, em placas de Petri contendo Meio Basal, onde notou-se (Figura 2.2) crescimento em lactose como única fonte de carbono. As linhagens que conseguiram assimilar lactose no meio basal foram transferidas e mantidas em placas que continham Meio YEPL sólido.

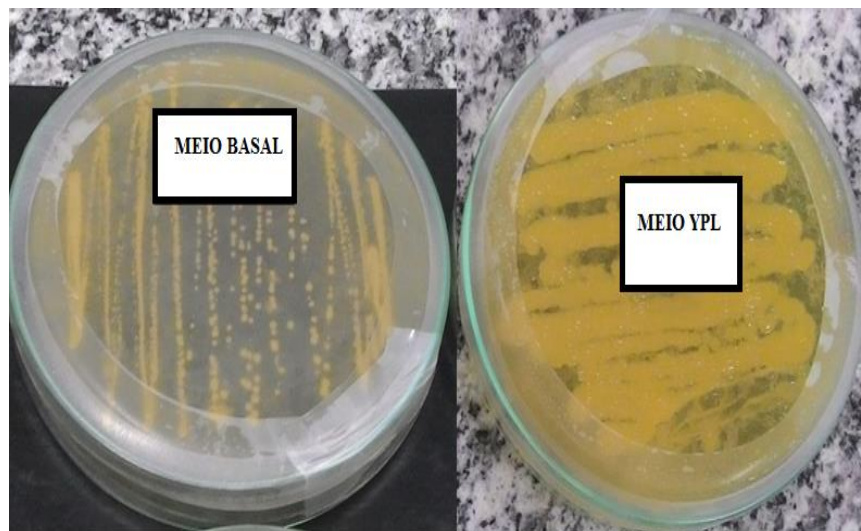


Figura 2.2. Placas com estrias simples em Meio Basal e multiplicação celular em Meio YEPL.

O crescimento de leveduras em produtos lácteos está associado à sua capacidade de assimilar e fermentar a lactose, assimilar os ácidos cítrico e láctico, produzir lipases e proteases extracelulares e tolerar alto teor de sal (FLEET 1990; FADDA et al. 2004; BORELLI et al. 2006).

A busca por novas linhagens de leveduras realizada em indústria de laticínios resultou em um total de onze microrganismos, nomeados M1, P1, PI1, PI2, PI3, P3, R2, SR, STFR, STFB e 1TE os quais foram isolados da manteiga (M1), queijo parmesão (P1, PI1, PI2, PI3 e P3), ricota (R2), soro residual da produção de queijo ricota (SR), tanque de soro destinado a produtores rurais (STFR e STFB) e do primeiro tanque de efluente (1TE). Os microrganismos prospectados foram mantidos em placas com meio YEPL e também em tubos de ensaio com glicerol e estocados a 4 °C.

Borelli et al. (2006) isolaram e identificaram várias linhagens de leveduras a partir de amostragens em leite, soro de queijo e queijos maturados de diferentes fazendas, e notaram que, a maioria das espécies isoladas representavam linhagens de *Candida (catenulata e sp)*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Torulaspota delbrueckii*, as quais foram capazes de produzir diferentes enzimas como as proteases, lipases e β -galactosidades.

Andrade et al. (2016) isolaram 145 linhagens de leveduras, entretanto, a identificação foi realizada apenas para 39 isolados devido a capacidade de fermentar a lactose. Poucos desses isolados foram obtidos a partir do leite, mas assim como o presente trabalho, a maioria foi observada em amostras de queijo e soro de queijo.

2.3.2 Micromorfologia e macromorfologia das linhagens isoladas

Como pode ser observado na Tabela 2.1, as onze linhagens de leveduras isoladas foram avaliadas quanto às suas características micro e macromorfológicas.

Tabela 2.1. Micro- e macromorfologia de onze linhagens de leveduras bioprospectadas.

Linhagens	Macromorfologia			Micromorfologia
	Pigmentação	Superfície	Borda	Formato
P1	Creme	Opaca	Regular	Circular
PI1	Creme	Lisa	Regular	Circular
PI3	Creme	Rugosa/Brilhante	Irregular	Circular
SR	Creme	Brilhante	Irregular	Circular
1TE	Creme	Lisa	Regular	Circular
STFB	Creme	Lisa	Irregular	Circular
STFR	Rosa	Rugosa/Lisa	Irregular	Circular
PI2	Creme	Brilhante	Regular	Circular
M1	Creme	Opaca	Regular	Circular
R2	Creme	Brilhante	Regular	Circular
P3	Creme	Brilhante	Regular	Circular

Observou-se que apenas a linhagem STFR apresentou colônias de coloração rosa, as demais apresentaram pigmentação creme. De acordo com Kurtzman et al. (2011), a maioria das leveduras são descritas por produzirem um crescimento que varia da coloração branco ao creme e ao bronzeado. Além disso, é possível algumas linhagens apresentarem superfície lisa quando isoladas pela primeira vez, e ao serem mantidas em ágar, sua superfície pode ser alterada. Esta mudança é, em alguns casos, acompanhada por uma mudança da textura para membranosa. E ao inocular novamente, geralmente resulta, mais uma vez, na formação de colônias lisas e ásperas.

Batistote et al. (2010) caracterizando morfologicamente linhagens de leveduras utilizadas em indústrias sucroalcooleiras, notaram que 100% das colônias analisadas apresentaram superfície (nomeada textura no presente trabalho) e borda lisa. E apenas uma levedura apresentou coloração rosa. Ademais, apontaram que todas as leveduras com borda rugosa apresentaram problemas que pode ser espuma em excesso, floculação e/ou sobra de açúcar no vinho na fermentação em indústrias de onde foram isoladas.

2.3.3 Teste bioquímico de capacidade de assimilação e fermentação em Meio Mineral (MM)

Os resultados do comportamento das linhagens de leveduras M1, P1, PI1, PI2, PI3, P3, R2, SR, STFR, STFB e 1TE no teste de assimilação e fermentação de lactose, glicose e galactose como fonte única de carbono, em Meio Mineral, estão apresentados na Tabela 2.2. A tabela mostra os resultados dos cultivos após 24 e 168 h de incubação, os tempos intermediários não são apresentados.

Tabela 2.2. Resultado do teste de assimilação e fermentação de onze linhagens de leveduras cultivadas em Meio Mineral (MM) com lactose, glicose e galactose durante 168 h.

Linhagens	Após 24 h						Após 168 h					
	Lactose		Glicose		Galactose		Lactose		Glicose		Galactose	
	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
P1	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+ ^{1/2}
PI1	-	-	-	-	-	-	+	+ ^{1/3}	+	-	+	-
PI3	+	-	+	-	+	-	+	+ ^{1/3}	+	+ ^{1/2}	+	+ ^{1/2}
SR	+	-	+	-	+	-	+	+ ^{1/3}	+	+ ^{1/3}	+	+ ^{1/2}
1TE	+	-	+	-	+	-	+	+ ^{1/3}	+	+ ^{1/2}	+	+ ^{1/3}
STFB	-	-	-	-	-	-	+	+ ^{1/3}	+	-	+	-
STFR	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
PI2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
M1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
R2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
P3	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-

Onde, A: assimilação; F: fermentação; - : negativo, não assimilou ou fermentou; +^o : tubo de Durham preenchido com uma pequena bolha de gás; +^{1/3} : 1/3 do tubo de Durham preenchido com gás; +^{1/2} : metade do tubo de Durham preenchido com gás; + : tubo de Durham totalmente (ou mais de 1/2) preenchido com gás.

A partir da Tabela 2.2, observou-se que, nas primeiras 24 h de cultivo independente do substrato utilizado como fonte de carbono, apenas as linhagens PI3, SR e 1TE conseguiram assimilar lactose, glicose e galactose. Ainda nesse período, a linhagem P1 conseguiu assimilar galactose. As demais

linhagens cultivadas em Meio Mineral não alcançaram resultado positivo de assimilação em 24 h de cultivo.

As onze linhagens de leveduras isoladas, quando cultivadas em Meio Mineral não apresentaram resultados positivos para fermentação nas primeiras 24 h de cultivo.

No tempo final de cultivo estabelecido para o teste (168 h) as linhagens PI3, SR e 1TE além de assimilarem as 3 fontes de carbono, conseguiram também fermentar. A linhagem PI3 cultivada em MM mostrou-se mais rápida fermentando glicose e galactose (metade do tubo de Durham preenchido com gás) do que lactose (1/3 do tubo de Durham preenchido com gás).

No geral, apesar de algumas linhagens apresentarem sinais de fermentação em MM, quando considera-se tempo total observa-se que a bioconversão dos substratos pelas leveduras não foi eficiente nos cultivos com MM.

2.3.4 Teste bioquímico de capacidade de assimilação e fermentação em Meio Mineral Suplementado (MMS)

Como não há um método padronizado único para muitos desses testes fisiológicos e bioquímicos, os resultados às vezes dependem das técnicas empregadas (KURTZMAN et al. 2011). Nesse sentido, investigou-se a influência da suplementação do Meio Mineral com extrato de levedura e peptona bacteriológica no desempenho das linhagens de leveduras ao assimilar e fermentar diferentes fontes de carbono. Para este fim, escolheu-se trabalhar com as seis linhagens que obtiveram destaque no teste utilizando MM (Tabela 2.2), ou seja, as linhagens nomeadas P1, PI1, PI3, SR, 1TE e STFB.

Os resultados dos cultivos com as seis linhagens de leveduras cultivadas em diferentes substratos, após 24 h e 168 h de incubação, estão apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Resultado do teste de assimilação e fermentação de seis linhagens de leveduras cultivadas em Meio Mineral Suplementado (MMS) com sete substratos durante 168 h.

Linhagens	Após 24 h													
	Lactose		Glicose		Galactose		Frutose		Maltose		Amido		Celobiose	
	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
P1	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+	-	+	+ ^o
PI1	+	-	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+	-	+	+ ^o
PI3	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+	-	+	+ ^o
SR	+	+ ^o	+	+ ^{1/3}	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+*	-	+	+ ^o
1TE	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^o	+*	-	+	-
STFB	+	-	+	-	+	-	+	+ ^o	+	+ ^o	+	-	+	-

Linhagens	Após 168 h													
	Lactose		Glicose		Galactose		Frutose		Maltose		Amido		Celobiose	
	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
P1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ^o	+	+
PI1	+	+	+	+ ^{1/2}	+	+ ^{1/2}	+	+ ^{1/2}	+	+ ^{1/3}	+	+ ^o	+	+ ^{1/2}
PI3	+	+	+	+ ^{1/2}	+	+	+	+	+	+ ^{1/3}	+	+ ^o	+	+
SR	+	+	+	+	+	+ ^{1/2}	+	+ ^{1/3}	+	+ ^{1/2}	+	+ ^o	+	+
1TE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ^o	+	+ ^o	+	+ ^{1/3}
STFB	+	+ ^{1/3}	+	+ ^{1/3}	+	+ ^{1/3}	+	+ ^{1/2}	+	+	+	+ ^o	+	+

Onde, A: assimilação; F: fermentação; - : negativo, não assimilou ou fermentou; +^o : tubo de Durham preenchido com uma pequena bolha de gás; +^{1/3} : 1/3 do tubo de Durham preenchido com gás; +^{1/2} : metade do tubo de Durham preenchido com gás; + : tubo de Durham totalmente (ou mais de 1/2) preenchido com gás; +* : traços de cor azul no meio.

Ao avaliar a capacidade de assimilação e fermentação das seis linhagens de leveduras cultivadas em Meio Mineral Suplementado (MMS), em sete substratos diferentes, observou-se uma alteração expressiva nos resultados (Tabela 2.3) tanto nas primeiras 24 h de cultivo quanto no tempo final (168 h).

Diferente dos cultivos em MM, onde nas primeiras 24 h apenas as linhagens de leveduras PI3, SR e 1TE conseguiram assimilar lactose, glicose e galactose, em cultivos com Meio Mineral Suplementado (Tabela 2.3) as seis linhagens cultivadas assimilaram lactose, glicose e galactose, além de frutose, maltose, amido e também celobiose.

A Figura 2.3 demonstra o desempenho no teste de assimilação e fermentação apresentado pela linhagem P1 após 24 h e no tempo final de cultivo em meio MMS.

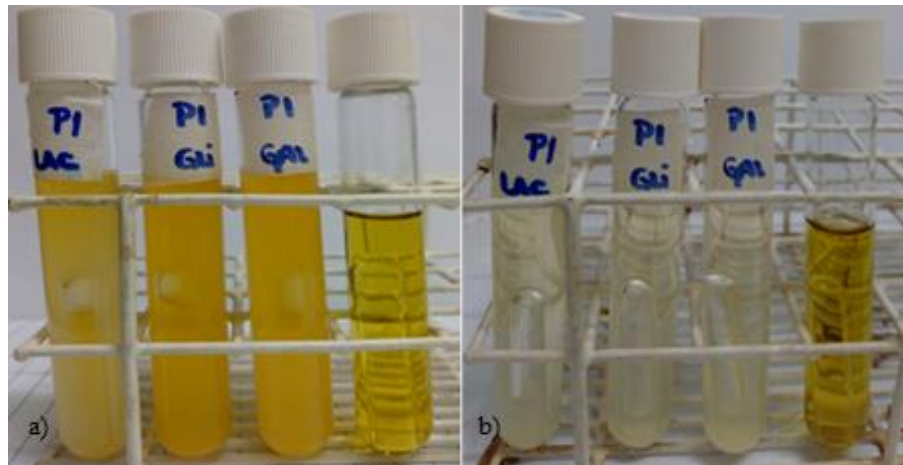


Figura 2.3. Linhagem P1 cultivada em MMS com lactose, glicose e galactose, a) após 24 h e b) no tempo final, respectivamente.

A alteração na cor do meio de cultivo mostrado na Figura 2.3 a) e b) indicou que lactose, glicose e galactose contido no MMS foram consumidos pela levedura, e o preenchimento com gás nos tubos de Durham indicaram a fermentação desses açúcares.

Em termos da capacidade dessas 6 linhagens em fermentar mono- (glicose, galactose, frutose), di- (lactose, maltose, celobiose) e polissacarídeo (amido), observou-se que, a maioria das linhagens avaliadas apresentaram início de fermentação (tubo de Durham preenchido com uma pequena

bolha de gás) nas primeiras 24 h do teste. Isso comprova que a composição do meio atuou diretamente no consumo do substrato pelos microrganismos, pois essas linhagens de leveduras quando cultivadas em MM (Tópico 2.3.3) não apresentaram resultados positivos para a fermentação nas primeiras 24 h de cultivo.

No final do teste (168 h) com MMS, notou-se que as linhagens P1, PI1, PI3, SR e ITE apresentaram fermentação vigorosa em cultivos com lactose, pois os tubos de Durham foram totalmente preenchido com gás. Além disso, nessas condições, a linhagem P1 destacou-se apresentando resultado de fermentação fortemente positivo com todos os mono e dissacarídeos testados (Tabela 2.3).

Alves-Jr et al. (2007) também notaram um melhor desempenho fermentativo pelas células de levedura quando foram cultivadas em meio suplementado com extrato de levedura e peptona, produzindo níveis significativamente mais altos de etanol. Ainda complementam que, como as células de levedura poderiam obter nutrientes necessários para o crescimento a partir dos compostos extras adicionados (peptona ou do extrato de levedura), mais da fonte de carbono possivelmente foi canalizada para a produção de etanol.

Os testes bioquímicos de assimilação e fermentação realizados com diferentes substratos elucidaram informações que permitem ampliar as possibilidades de trabalho com linhagens de leveduras prospectadas. Considerando que os microrganismos foram prospectados de indústria de queijo, que é um ambiente propício a microrganismos selvagens assimiladores de substratos de derivados lácteos, notou-se que esses microrganismos também apresentaram-se aptos a assimilarem outros substratos como amido, frutose, maltose e até mesmo celobiose que é um dissacarídeo derivado da hidrólise de materiais lignocelulósicos.

Quando a celobiose foi utilizada como fonte de carbono no teste de assimilação e fermentação, observou-se (Tabela 2.3) que nas primeiras 24 h de cultivo apenas as linhagens P1, PI1, PI3 e SR iniciaram a fermentação do substrato, entretanto, as demais linhagens também conseguiram fermentar até o tempo final estabelecido para o cultivo.

É conhecido que as enzimas glicosidases (β -glicosidases) convertem moléculas de celobiose em duas moléculas de glicose (CORAZZA et al., 2005; ZHANG et al., 2006; ZHANG e LYND, 2004), portanto as leveduras que possuem enzimas capazes de hidrolisar celobiose são promissoras para

aplicações na fermentação de materiais lignocelulósicos, pois elas possuem a capacidade de eliminar a etapa de hidrólise prévia à fermentação. O microrganismo mais frequentemente utilizado para a fermentação de etanol em processos industriais é a *Saccharomyces cerevisiae*, que fermenta materiais lignocelulósicos desde que estes sejam previamente hidrolisados.

Com relação ao processo de fermentação do amido (Tabela 2.3), nenhuma linhagem de levedura cultivada em MMS foi capaz de apresentar resultado positivo em 24 h, porém, quando foram analisadas no tempo final do teste todas as 6 linhagens haviam iniciado o processo de fermentação, pois os tubos de Durham foram preenchidos com uma pequena bolha de gás. O amido é presente em inúmeras matérias-primas agrícolas e é reportado como um substrato conveniente para produção de etanol (BASTOS et al., 2015; CASTRO et al., 2011), mas embora muitos açúcares possam ser fermentados e assimilados pelas leveduras, a capacidade para degradar amido não é uma característica comum entre elas. Nesse sentido, Bastos et al. (2015) apontaram que as leveduras capazes de degradar o amido têm sido consideradas microrganismos promissores.

A Figura 2.4, mostra que ainda em relação ao amido como substrato, após 24 h de incubação notou-se a formação de uma espécie de halo de cor azul na superfície do meio de cultivo das linhagens PI3 e SR.

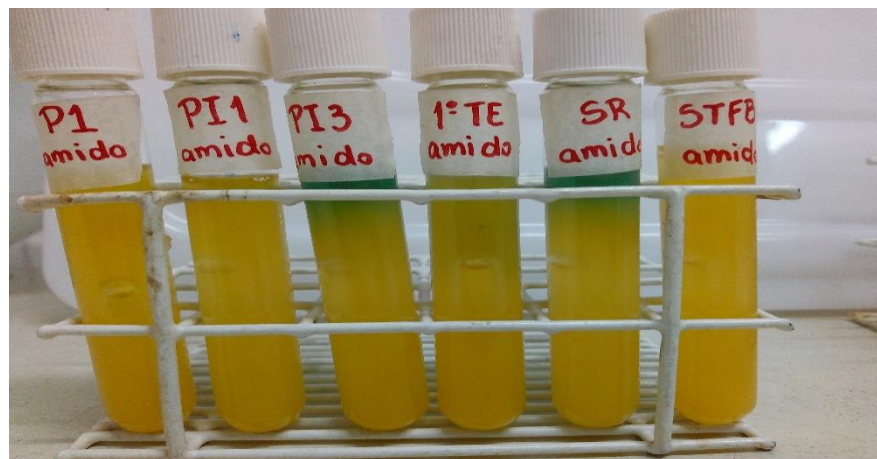


Figura 2.4. Linhagens de leveduras cultivadas em MMS com amido.

A cor azul observada nas linhagens PI3 e SR (Figura 2.4) cultivadas com amido, sugere que estas linhagens cresceram utilizando inicialmente possíveis aminoácidos presentes no meio para depois utilizar o substrato principal (KUTZMAN et al., 2011).

Em referência aos processos fermentativos de maltose por leveduras, estes tem sido objeto de muitas pesquisas. Devido a maltose possuir uma taxa de fermentação abaixo da glicose, existem esforços para melhorar essa eficiência, sendo o transporte da maltose para o interior das células o principal fator de controle sobre a taxa de fermentação (GANATSIOS et al., 2014). As linhagens de leveduras avaliadas no presente trabalho mostraram-se capazes de fermentar maltose, mas também em taxas menores quando comparado a glicose.

2.4 CONCLUSÕES

Conclui-se que a busca por novas linhagens de leveduras resultou em um total de onze isolados, onde a partir de dados de caracterizações fisiológicas e bioquímicas foram selecionadas seis linhagens que possuem potencial de assimilar e fermentar diferentes substratos, principalmente a lactose e seus monossacarídeos derivados. Além disso, é possível concluir também que os constituintes do meio de cultivo influenciaram fortemente o metabolismo de consumo de substrato dos microrganismos.

2.5 REFERÊNCIAS

AKTAŞ, N.; BOYACI, I. H.; MUTLU, M.; TANYOLAÇ, A. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2252–2259, 2006.

ALVES-JR, S. L.; HERBERTS, R. A.; HOLLATZ, C.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U.. Maltose and maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 65, n. 2, p. 99-104, 2007.

ANDRADE, R. P.; MELO, C. N.; GENISHEVA, Z.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, v. 91, p. 72-79, 2016.

BATISTOTE, M.; CARDOSO, C. A. L.; RAMOS, D. D.; ERNANDES, J. R. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana-de-açúcar. **Ciência e Natura**, v. 32, n. 2, p. 83-95, 2010.

BASTOS, C. M. S.; COSTA, S. T. C.; ABREU-LIMA, T. L.; ZUNIGA, A. D. G.; CARREIRO, S. C. Efeito das condições de cultivo na produção de amilase por duas linhagens de leveduras. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 3, p. 123-129, 2015.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; FRANCO, G. R.; ROSA, C. A. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1115–1119, 2006.

CASTRO, A. M.; ANDRÉA, T. V.; CARVALHO, D. F.; TEIXEIRA, M. M. P.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Valorization of residual agroindustrial cakes by fungal production of multienzyme complexes and their use in cold hydrolysis of raw starch. **Waste Biomass Valor**, v. 2, p. 291–302, 2011.

CORAZZA, F. C.; CALSAVARA, L. P. V.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.; NEITZEL, I. Determination of inhibition in the enzymatic hydrolysis of cellobiose using hybrid neural modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 19-29, 2005.

FADDA, M. E.; MOSSA, V.; PISANO, M. B.; DELPHANO, M.; COSENTINO, S. Occurrence and characterization of yeast isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 51–59, 2004.

FLEET, G. H. Yeasts in dairy products – a review. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 199–211, 1990.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, p. 339-354, 2008.

- FUKUHARA, H. The Kluyver effect revisited. **FEMS Yeast Research**, n. 3, p. 327-331, 2003.
- GANATSIOS, V.; KOUTINAS, A. A.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; NIGAM, P. Promotion of maltose fermentation at extremely low temperatures using a cryotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain immobilized on porous cellulosic material. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 66, p. 56–59, 2014.
- GONZALEZ-SISO, M.I.; TOURINO, A.; VIZOSO, A.; PEREIRA-RODRIGUEZ, A.; RODRIGUEZ-BELMONTE, E.; BECERRA, M.; CERDAN, M.E. Improved bioethanol production in an engineered *Kluyveromyces lactis* strain shifted from respiratory to fermentative metabolism by deletion of ND11. **Microbiology Biotechnology**, v. 8, p. 319–330, 2015.
- GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375–384, 2010.
- HOLT, S.; MUKHERJEE, V.; LIEVENS, B.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55-66, 2018.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Elsevier Science: 5th edition, 2011.
- KLUYVER, A. J.; CUSTERS, M. T. J. The suitability of disaccharides as respiratory and assimilation substrates for yeasts which do not ferment these sugars. **Antonie van Leeuwenhoek**, n. 6, p. 121-162, 1940.
- LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCAB, P. C.; GOMES, E.; SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391–395, 2008.
- VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VANDIJKEN, J. P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, p. 501–517, 1992.

ZHANG, Y-H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, n. 24, p. 452–481, 2006.

ZHANG, Y-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797–824, 2004.

3 CULTIVOS FERMENTATIVOS EM MEIO SINTÉTICO COM MICRORGANISMOS BIOPROSPECTADOS DE LATICÍNIO E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO, CONSUMO E FORMAÇÃO DE METABÓLITOS

RESUMO

Embora sejam muitas as leveduras que assimilam a lactose em aerobiose, aquelas que fermentam a lactose são bastante raras. A capacidade do microrganismo crescer em lactose como fonte única de carbono depende da hidrólise da lactose e do metabolismo da glicose e da galactose resultantes. Objetivou-se avaliar o potencial fermentativo de seis linhagens de leveduras prospectadas de indústria de queijo, cultivadas em diferentes fontes de carbono (lactose, glicose e galactose), a partir da avaliação dos parâmetros cinéticos de crescimento, consumo de substrato específico e formação de metabólitos. Observou-se que todas as linhagens de leveduras (P1, PI1, PI3, SR, 1TE e STFB) avaliadas conseguiram se desenvolver em cultivos independentes com lactose, glicose e galactose como fonte única de carbono, pois no final dos cultivos não havia substrato residual. Além disso, todas as linhagens avaliadas apresentaram crescimento menos expressivo quando a galactose foi utilizada como fonte de carbono. Conclui-se que todas as linhagens apresentaram-se aptas a bioconverter substratos como lactose, glicose e galactose como única fonte de carbono. Além disso, a característica que as linhagens de leveduras estudadas apresentaram de bioconverter lactose eficientemente, revelam seu potencial de aplicação em processos onde esse dissacarídeo esteja disponível para assimilação e fermentação.

PALAVRAS-CHAVE: Leveduras. Lactose. Glicose. Galactose. Etanol.

3.1 INTRODUÇÃO

Em laticínios pode haver geração de diferentes tipos de efluentes, sendo os principais o soro de queijo resultante da produção de queijos e produção de ricotas e o efluente oriundo das águas de lavagens. Nesse aspecto, as fontes mais relevantes de contaminação orgânica em laticínios são os efluentes gerados a partir da produção de queijos, sorvetes e manteiga (PRAZERES et al., 2012).

Nesse contexto, o soro de queijo é considerado o subproduto principal na indústria de queijos, sendo a lactose seu constituinte de maior concentração (cerca de 90% da carga orgânica). Esse carboidrato é produzido a uma taxa alta e constante pela indústria de laticínios a cada ano, nesse sentido, busca-se alternativas viáveis para converter a lactose residual em produtos de valor agregado (CHEN et al., 2018).

As aplicações realizadas com o soro de queijo podem gerar produtos de interesse e, ao mesmo tempo, efluentes com baixa carga de orgânica, assim reduzindo os impactos ambientais. Segundo Guimarães et al. (2010), a lactose pode ser utilizada diretamente por microrganismos consumidores de lactose ou, alternativamente, a partir de soluções pré-hidrolisadas de lactose (substrato para microrganismos lactose negativos).

Os microrganismos que bioconvertem a lactose podem gerar diferentes produtos, dentre estes o biogás (metano), alguns ácidos orgânicos (acético, propiônico, láctico, cítrico, glucônico, itacônico e giberélico), aminoácidos (glutâmico, lisina e treonina), vitaminas (B12 e B2), polissacarídeos (goma xantana, dextrana, fosfomanano, pululano e gelano), óleos (lípidos), enzimas (*β -galactosidase* e *poligalactonase*) e outros compostos (frutose-difosfato, 2,3-butanodiol, acetato de magnésio e cálcio, lactato de amônio, butanol e glicerol) (GUIMARÃES et al., 2010). Além disso, mais especificamente, a fermentação da lactose pode fornecer produtos como etanol, biomassa microbiana e compostos aromáticos voláteis, especialmente álcoois e ésteres responsáveis por aromas e sabores agradáveis em queijo (ANDRADE et al., 2016).

Embora sejam muitas as leveduras que assimilam a lactose em aerobiose, aquelas que fermentam a lactose são bastante raras, incluindo espécies de *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus* (FONSECA, et al., 2008b; FUKUHARA, 2006) e *Candida pseudotropicalis* (GUIMARÃES et al., 2010). Segundo Fonseca et al. (2008a), a capacidade do microrganismo crescer em lactose como única

fonte de carbono depende da hidrólise da lactose e do metabolismo da glicose e da galactose resultantes.

Nesse sentido, objetivou-se avaliar o potencial fermentativo de seis linhagens de leveduras prospectadas de indústria de laticínio, cultivadas em diferentes fontes de carbono (lactose, glicose e galactose), pela avaliação dos parâmetros cinéticos de crescimento, consumo de substrato específico e formação de metabólitos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Microrganismos e manutenção

A partir da bioprospecção realizada em laticínio, foi possível obter onze microrganismos, nomeados M1, P1, PI1, PI2, PI3, P3, R2, SR, STFR, STFB e 1TE os quais foram isolados da manteiga (M1), queijo parmesão (P1, PI1, PI2, PI3 e P3), ricota (R2), soro residual da produção de queijo ricota (SR), tanque de soro destinado a produtores rurais (STFR e STFB) e primeiro tanque de efluente (1TE), de um laticínio localizado na cidade de Guaraçaí, São Paulo, Brasil. Em seguida, realizou-se uma seleção de linhagens com potencial para assimilação e fermentação de fontes de carbono derivadas do leite, onde selecionou-se seis linhagens: P1, PI1, PI3, SR, 1TE e STFB.

Estas seis linhagens foram mantidas em meio YEPL sólido (em g L⁻¹: extrato de levedura, 20,0; peptona bacteriológica, 20,0; ágar-ágar, 15,0; lactose, 20,0) contidos em placas de Petri, e também, em tubos de ensaio com meio YEPL / óleo mineral, estocadas à 4 °C.

3.2.2 Meio de cultivo

O meio mineral (VERDUYN et al., 1992) utilizado para os pré-cultivos e para os cultivos principais eram de mesma composição, contendo, em g L⁻¹ de água destilada: (NH₄)₂SO₄, 5,0; KH₂PO₄, 3,0; MgSO₄.7H₂O, 0,5; 1 mL de uma solução de elementos-traço (em g L⁻¹: EDTA, 15,0;

ZnSO₄.7H₂O, 4,5; MnCl₂.2H₂O, 1,0; CoCl₂.6H₂O, 0,3; CuSO₄.5H₂O, 0,3; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,4; CaCl₂.2H₂O, 4,5; FeSO₄.7H₂O, 3,0; H₃BO₃, 1,0; KI, 0,1) e 1 mL de uma solução de vitaminas (em g L⁻¹: D-biotina, 0,05; pantotenato de cálcio, 1,0; ácido nicotínico, 1,0; mio-inositol, 25,0; cloreto de tiamina, 1,0; cloreto de piridoxol, 1,0; ácido para-aminobenzóico, 0,20) esterilizada por filtração. O meio mineral foi suplementado com extrato de levedura e peptona bacteriológica (em g L⁻¹: 4,5 e 7,5, respectivamente). O pH final do meio foi ajustado para 6,0 com NaOH 1 M, e em seguida, esterilizado em autoclave (121 °C, 15 min).

Os substratos testados foram lactose e seus monossacarídeos (glicose e galactose), na concentração de 10 g L⁻¹ (todos de alto grau de pureza analítica). Os três substratos foram avaliados em cultivos independentes para entender a influência da fonte de carbono no metabolismo de consumo das leveduras.

3.2.3 Condições de cultivo

Os pré-cultivos foram realizados transferindo uma amostra da linhagem de levedura contida em meio YEPL sólido, para um Erlenmeyer contendo 200 mL de meio mineral suplementado e 50 mL do substrato (lactose, glicose ou galactose) na concentração 10 g L⁻¹. Em seguida, foram incubados em condições de aerobiose, em agitador orbital (banho orbital New Lab 2201, Brasil) a 30 °C, 200 rpm, por 12 h. A multiplicação celular foi observada pela densidade óptica (DO) medida no comprimento de onda de 600 nm, em espectrofotômetro (Hach DR 2800, Brasil).

Com o propósito de avaliar o perfil de crescimento dos microrganismos prospectados, os cultivos principais iniciaram com 0,1 de densidade óptica (DO) a 600 nm, assim, o inóculo dos cultivos principais foi realizado a partir de uma quantidade determinada do pré-cultivo.

Os cultivos aeróbios, realizados em duplicata, foram incubados em agitador orbital (banho orbital New Lab 2201, Brasil) a 30 °C e 200 rpm e avaliados até o consumo total de açúcar por cromatografia líquida de alta performance. Amostras foram recolhidas no tempo inicial e em intervalos de 2 h até o final do cultivo, para determinação de massa celular seca e metabólitos extracelulares. Além disso, mediu-se indiretamente a multiplicação celular durante todo o cultivo pelas leituras de DO realizadas em espectrofotômetro (Hach DR 2800, Brasil) a 600 nm.

3.2.4 Determinação de substrato, concentração de metabólitos extracelulares e biomassa microbiana

As amostras coletadas do cultivo foram centrifugadas a 5 g durante 20 min. O sobrenadante foi filtrado (0,22 μm) e o filtrado obtido foi utilizado para determinação de substrato e metabólitos extracelulares por meio da cromatografia líquida de alta performance (HPLC, Varian 920-LC) equipada internamente com um detector de índice de refração e uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As análises foram realizadas em uma fase móvel de 5 mM de H_2SO_4 , a 60 °C, com vazão de 0,6 mL/min, por 25 min. Diferentes concentrações (0 a 10 g L⁻¹) de soluções padrão de lactose, glicose, galactose, ácido acético, succínico e etanol foram preparadas e analisadas para a preparação das curvas analíticas.

O sedimento de biomassa obtido após centrifugação da amostra foi seco em estufa (105 °C) até massa constante. A massa celular seca (g L⁻¹) foi obtida pelo quociente entre a diferença de massa por volume de meio centrifugado. A biomassa também foi determinada indiretamente pela densidade óptica (600 nm) medida com um espectrofotômetro (Hach DR 2800, Brasil) a 600 nm. Para este fim, os valores de absorvância medidos foram convertidos em valores de massa utilizando uma relação linear determinada em cada experimento.

3.2.5 Determinação de parâmetros cinéticos

De acordo com a metodologia descrita por Fonseca et al. (2007), a fase exponencial de crescimento (EGP) foi identificada como a região linear da curva de cinética de crescimento pelo tempo. E a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi determinada como a inclinação desta reta.

O fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foi determinado como a inclinação da reta obtida a partir da curva de concentração celular (X) em função da concentração de substrato (S), incluindo necessariamente pontos da EPG. O fator de conversão de substrato a produtos (acetato, succinato,

etanol) ($Y_{Ac/S}$, $Y_{Suc/S}$, $Y_{EtoH/S}$) foi determinado a partir da concentração do produto em relação à concentração do substrato (S).

A velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\mu_S = \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y_{X/S}} \quad \text{Equação 1}$$

Em que, $\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato em células ($gMCS.gS^{-1}$); MCS= massa celular seca (FONSECA et al., 2007).

O tempo de duplicação (TD), foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$TD = \frac{\ln(2)}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad \text{Equação 2}$$

A Produtividade de Etanol (P_{Eth}) e Produtividade de Biomassa (P_X) foram calculadas de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente:

$$P_{EtoH} = \frac{P_f - P_i}{t} \quad \text{Equação 3}$$

$$P_X = \frac{X_f - X_i}{t} \quad \text{Equação 4}$$

Em que, P_f = produto final ($gEtoH.L^{-1}$); P_i = produto inicial ($gEtoH.L^{-1}$); t = tempo final (h); X_f = concentração celular final ($gMCS.L^{-1}$); X_i = concentração celular inicial ($gMCS.L^{-1}$); MCS= massa celular seca.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram obtidos por meio de cinéticas de crescimento, consumo e formação de metabólitos de seis linhagens de leveduras prospectadas de um laticínio, cultivadas em lactose, glicose e galactose na concentração de 10 g L^{-1} . Dados de densidade óptica a 600 nm em função do tempo, para cada linhagem de levedura cultivada em determinada condição, consta no apêndice A.

Observou-se que todas as linhagens de leveduras avaliadas conseguiram se desenvolver em cultivos independentes com lactose, glicose e galactose como única fonte de carbono, pois no final dos cultivos todo o substrato havia sido consumido.

A Figura 3.1 demonstra as curvas da cinética de crescimento obtidas pelas linhagens de leveduras P1, PI1, PI3, SR, 1TE e STFB cultivadas em lactose, glicose e galactose.

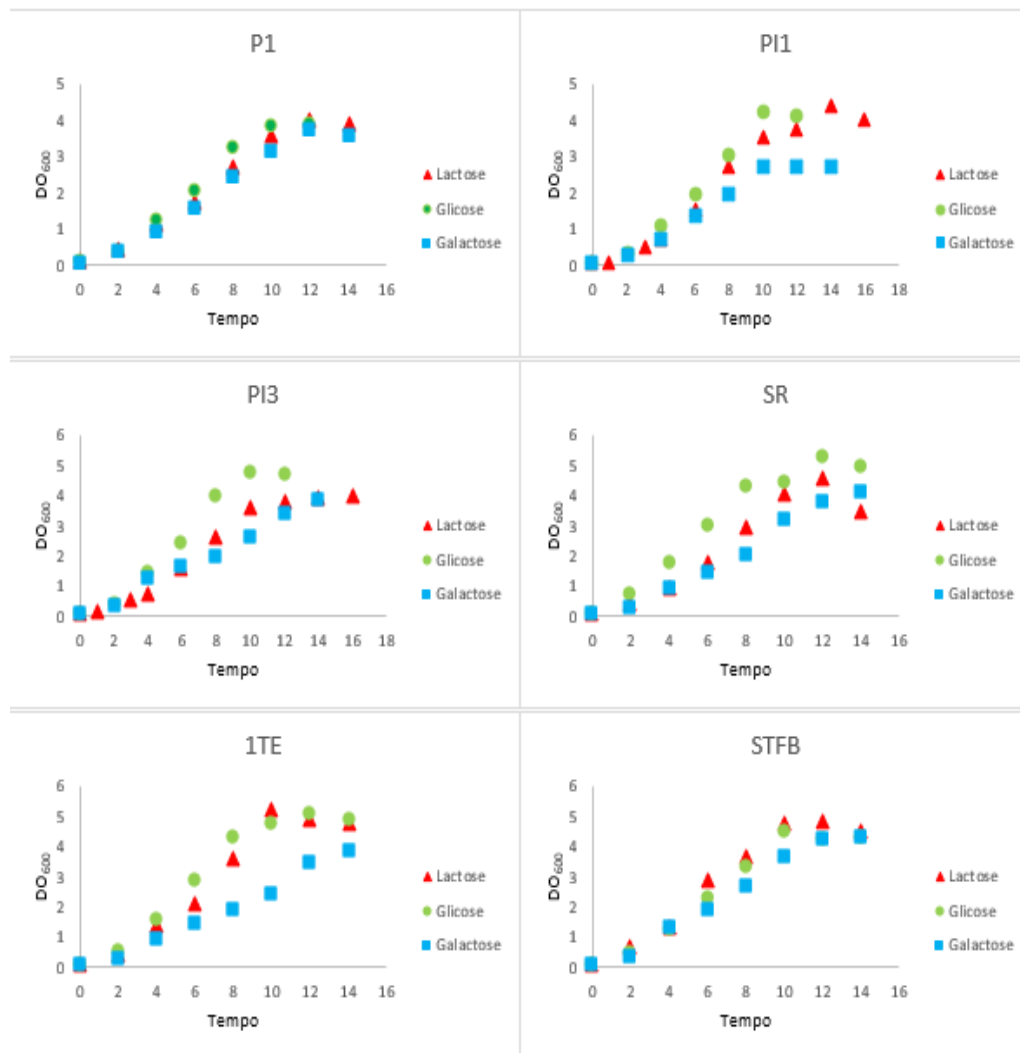


Figura 3.1 Cinéticas de crescimento de seis linhagens de leveduras (P1, PI1, PI3, SR, 1TE e STFB) em lactose, glicose e galactose como única fonte de carbono.

Comparando as curvas de crescimento (Figura 3.1) das linhagens de leveduras em lactose, glicose e galactose, observou-se que as linhagens P1 e STFB foram as que apresentaram o perfil de crescimento mais próximo para os três substratos. Além disso, de modo geral, as linhagens apresentaram crescimento menos expressivo em galactose.

Os resultados dos parâmetros cinéticos de crescimento, consumo de substrato e produtividades de etanol e biomassa obtidos nos cultivos aeróbios de seis linhagens de leveduras em lactose, glicose e galactose estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Parâmetros obtidos nos cultivos aeróbios de seis linhagens de leveduras em lactose, glicose e galactose como fonte única de carbono.

M.o.	S	μ_{\max} (h ⁻¹)	TD (h)	μ_s (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gMCS.gS ⁻¹)	$Y_{\text{EtOH}/S}$ (gEth.gS ⁻¹)	$Y_{\text{SUC}/S}$ (gSuc.gS ⁻¹)	P_{Eth} (gEth.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_x (gMCS.L ⁻¹ .h ⁻¹)	T_{s0} (h)
P1	LAC	0,20±0,02	3,35±0,42	1,91±0,40	0,11±0,00	0,07±0,00	0,03±0,00	0,06±0,00	0,11±0,00	10
PI1		0,32±0,01	2,14±0,10	1,95±0,16	0,16±0,00	0,19±0,00	0,05±0,01	0,11 ±0,01	0,15±0,00	10
PI3		0,32±0,00	2,13±0,05	2,58±0,15	0,12±0,00	0,22±0,00	0,05±0,00	0,14±0,00	0,08±0,00	10
SR		0,34±0,02	1,98±0,16	0,76±0,14	0,46±0,05	0,18±0,01	0,06±0,00	0,11±0,01	0,40±0,01	10
1TE		0,25±0,01	2,91±0,12	0,92±0,00	0,28±0,01	0,25±0,02	0,06±0,00	0,13±0,00	0,29±0,00	10
STFB		0,34±0,03	2,01±0,18	1,51 ±0,17	0,22±0,00	0,20±0,00	0,07±0,00	0,11±0,00	0,32±0,04	10
P1	GLI	0,23±0,00	2,96±0,00	1,79±0,02	0,13±0,00	0,07±0,00	0,01±0,00	0,05±0,00	0,14±0,00	10
PI1		0,25±0,03	2,73±0,41	1,22±0,07	0,20±0,01	0,09±0,01	0,03±0,00	0,07±0,01	0,20±0,04	10
PI3		0,38±0,01	2,11±0,07	1,68±0,03	0,22±0,00	0,14±0,01	0,03±0,00	0,19±0,00	0,29±0,04	08
SR		0,34±0,01	3,15±0,22	1,31±0,03	0,26±0,01	0,18±0,01	0,04±0,00	0,18±0,02	0,22±0,04	08
1TE		0,25±0,00	2,74±0,03	0,82±0,08	0,30±0,02	0,17±0,00	0,04±0,00	0,18±0,02	0,31±0,00	08
STFB		0,23±0,00	1,77±0,05	1,12±0,07	0,21±0,00	0,24±0,00	0,04±0,00	0,11±0,00	0,16±0,02	10
P1	GAL	0,23±0,01	2,90±0,18	1,17±0,02	0,20±0,01	0,12±0,00	0,02±0,00	0,07±0,00	0,14±0,01	12
PI1		0,21±0,00	3,26±0,01	0,66±0,00	0,31±0,00	0,17±0,01	0,05±0,00	0,06±0,02	0,15±0,02	14
PI3		0,13±0,01	5,34±0,65	0,64±0,07	0,20±0,00	0,11±0,01	0,06±0,00	0,08±0,00	0,16±0,01	12
SR		0,23±0,03	3,03±0,50	0,92±0,11	0,24±0,01	0,10±0,00	0,05±0,00	0,09±0,01	0,21±0,01	12
1TE		0,13±0,00	5,18±0,21	0,60±0,01	0,21±0,00	0,15±0,01	0,05±0,00	0,07±0,00	0,16±0,00	14
STFB		0,16±0,00	4,10±0,10	2,79±0,03	0,06±0,00	0,11±0,01	0,06±0,00	0,09±0,00	0,23±0,01	10

M.o.: microrganismos, seis linhagens de leveduras prospectadas; S: substrato; LAC: lactose; GLI: glicose, GAL: galactose; μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento, TD: tempo de duplicação, μ_s : velocidade específica de consumo de substrato, $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em célula, $Y_{\text{EtOH}/S}$: fator de conversão de substrato a etanol, $Y_{\text{SUC}/S}$: fator de conversão de substrato a succinato; MCS: massa celular seca, P_x : produtividade em células, P_{Eth} produtividade em etanol, T_{s0} : tempo para esgotamento de substrato. Dados apresentados com média ± desvio padrão.

Durante a fase exponencial de crescimento (EPG) de cultivos aeróbios em batelada realizados com lactose, as linhagens SR e STFB se destacaram, apresentando velocidades específicas máxima de crescimento (μ_{\max}) de $0,34 \text{ h}^{-1}$ para ambas, sendo que para estas linhagens, o fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) foi $0,46 \text{ gMCS.gS}^{-1}$ e $0,22 \text{ gMCS.gS}^{-1}$, respectivamente. E as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_s) foram calculadas como $0,76 \text{ h}^{-1}$ e $1,51 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Ainda em referência a cultivos com lactose, as linhagens PI1 e PI3 apresentaram valores de μ_{\max} ($0,32 \text{ h}^{-1}$, para ambas) próximos aos obtidos pelas linhagens SR e STFB. Além disso, as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_s) de PI1 e PI3 foram superiores ($1,95 \text{ h}^{-1}$ e $2,58 \text{ h}^{-1}$, respectivamente) às obtidas pelas demais linhagens neste substrato.

Notou-se que, quando comparados com glicose, as linhagens PI1, SR, 1TE e STFB sendo cultivadas em lactose apresentaram velocidades específicas máxima de crescimento (μ_{\max}) iguais ou maiores às apresentadas com glicose. Isso permite afirmar que estas linhagens são promissoras na utilização de lactose como fonte de carbono, visto que metaboliza eficientemente um dissacarídeo tanto quanto faz com um monossacarídeo.

Ademais, o consumo de lactose pelas linhagens de leveduras estudadas indica que essas linhagens são alternativas a serem aplicadas em processos de fermentação a etanol os quais aplicam uma hidrólise enzimática prévia da lactose pela β -galactosidase para subseqüente fermentação, tendo visto que as principais desvantagens desse tipo de pré-tratamento são o preço da enzima e o crescimento lento.

Quando a glicose foi usada como fonte de carbono alguns cultivos apresentaram tempos menores (8 h) para esgotamento de substrato. Glicose é reportada sendo um açúcar simples e de fácil assimilação pelas vias metabólicas. As linhagens que se destacaram em velocidade de crescimento e consumo de glicose foram PI3 e SR, alcançando velocidades específicas máxima de crescimento (μ_{\max}) de $0,38 \text{ h}^{-1}$ e $0,34 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. PI3 e SR mostraram um fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) de $0,22 \text{ gMCS.gS}^{-1}$ e $0,26 \text{ gMCS.gS}^{-1}$, respectivamente. Em relação às velocidades específicas de consumo de substrato (μ_s), estas linhagens alcançaram $1,68 \text{ h}^{-1}$ e $1,31 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Os cultivos realizados com galactose foram os que apresentaram maior tempo (até 14 h) para esgotamento de substrato, mostrando que, apesar de ser uma molécula mais simples (quando comparada com lactose) não é metabolizada necessariamente em tempos menores. Neste substrato, as linhagens PI1, PI3, SR, 1TE e STFB produziram os menores valores de μ_{\max} quando comparados a cultivos com lactose e glicose.

Fonseca et al. (2013) caracterizando a fisiologia da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, em termos da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), verificaram que o cultivo desta linhagem em galactose a 37 °C foi o que obteve mostrou crescimento quando comparado com os outros açúcares investigados (lactose, sacarose, frutose, glicose). Nesse sentido, sugeriram que a absorção da galactose pela levedura *K. marxianus* CBS 6556 é menos eficiente do que dos outros açúcares, corroborando com o presente trabalho.

Em referência aos dados de produtividade de etanol (Tabela 3.1), a linhagem PI3 se destacou em cultivos tanto com lactose (0,14 gEth.L⁻¹.h⁻¹) quanto com glicose (0,19 gEth.L⁻¹.h⁻¹). Já em relação à produtividade de biomassa, houve destaque pela linhagem SR em lactose (0,40 gMCS.L⁻¹.h⁻¹) e 1TE em glicose (0,31 gMCS.L⁻¹.h⁻¹).

Em relação à conversão de substrato a produtos, foi observada formação de etanol e succinato em todos os cultivos nos diferentes açúcares. A Tabela 3.2 apresenta a formação máxima de biomassa e metabólitos extracelulares de seis linhagens de leveduras cultivadas em diferentes substratos.

Tabela 3.2 Formação máxima de biomassa e metabólitos extracelulares (succinato, acetato e etanol) durante cultivos aeróbios de seis linhagens de leveduras em lactose, glicose e galactose como única fonte de carbono.

M.o.	S	Biomassa (g.L ⁻¹)	Ácido succínico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Total Metabólitos (g.L ⁻¹)
P1	LAC	1,53±0,20	0,38±0,03	0±0	0,91±0,03	1,29
PI1		2,27±0,12	0,54±0,05	0,37±0,01	1,77±0,02	2,68
PI3		1,33±0,04	0,50±0,01	0,34±0,02	1,78±0,01	2,62
SR		4,99±0,24	0,53±0,03	0,18±0,17	1,61±0,15	2,32
1TE		2,96±0,06	0,63±0,04	0,28±0,02	1,79±0,00	2,70
STFB		3,93±0,50	0,56±0,04	0,30±0,00	1,56±0,06	2,42
P1		GLI	1,48±0,07	0,17±0,01	0±0	0,68±0,07
PI1	2,14±0,09		0,37±0,07	0±0	0,93±0,22	1,30
PI3	3,30±0,12		0,38±0,00	0±0	1,54±0,07	1,92
SR	2,73±0,49		0,42±0,01	0±0	1,60±0,03	2,02
1TE	3,32±0,19		0,45±0,04	0±0	1,42±0,11	1,87
STFB	1,84±0,00		0,40±0,02	0±0	1,65±0,00	2,05
P1	GAL		1,87±0,13	0,55±0,04	0,44±0,03	0,94±0,05
PI1		1,75±0,10	0,35±0,09	0,32±0,02	0,62±0,08	1,29
PI3		0,34±0,18	0,56±0,00	0,23±0,02	1,10±0,09	1,89
SR		3,10±0,23	0,56±0,01	0,30±0,07	1,27±0,15	2,13
1TE		2,36±0,05	0,54±0,00	0,36±0,01	0,98±0,02	1,88
STFB		3,09±0,18	0,59±0,00	0,29±0,03	1,13±0,11	2,01

M.o: microrganismos, seis linhagens de leveduras prospectadas; S: substrato; LAC: lactose; GLI: glicose, GAL: galactose. Dados apresentados com média ± desvio padrão.

Observou-se (Tabela 3.2) que a formação máxima de biomassa pelas diferentes linhagens de leveduras variou de acordo com o substrato a ser assimilado. As linhagens que apresentaram a maior formação de biomassa em lactose, glicose e galactose, foram SR (4,99 g.L⁻¹), 1TE (3,32 g.L⁻¹) e SR (3,10 g.L⁻¹), respectivamente.

Fonseca et al. (2013) em seu estudo com a linhagem *K. marxianus* CBS 6556, também avaliaram a formação máxima de biomassa, nesse sentido, a linhagem referida quando cultivada a 30 °C com lactose, apresentou formação máxima de biomassa de 5,00 g.L⁻¹, valor similar ao apresentado pela

linhagem SR também a 30 °C no presente trabalho. Isso mostra que, assim como *K. marxianus* possui uma forte tendência de converter substratos em biomassa, a linhagem isolada nomeada SR também apresentou esse perfil.

Como mostrado por alguns autores, o total de carbono consumido durante a fase exponencial de um cultivo pode não ser rastreado nos principais produtos do metabolismo celular sob estas condições (biomassa, etanol e CO₂), o que significa que parte do carbono pode estar incorporado em outros compostos, como por exemplo ácidos orgânicos (acetato, lactato, piruvato e succinato, entre outros) e glicerol, bem como outros compostos não quantificados (DELLA-BIANCA e GOMBERT (2013); LOCHER et al. (1993)).

Em relação aos metabólitos extracelulares observados neste estudo, houve produção de ácido succínico em todos os cultivos, sendo que sua formação máxima variou de 0,17 g.L⁻¹ a 0,63 g.L⁻¹.

O ácido acético foi um metabólito produzido pelas linhagens de leveduras apenas em cultivos com lactose e galactose, com exceção da linhagem P1, que produziu este metabólito apenas em galactose como fonte de carbono (Tabela 3.2). A formação desse metabólito extracelular foi observada, principalmente, a partir da fase EPG até determinado tempo de cultivo, onde notou-se que a concentração desse ácido orgânico diminuiu gradativamente até concentração final zero no final dos cultivos.

Colombo et al. (2016) estudando a produção de polímeros PHA (polihidroxialcanoatos), a partir do soro de queijo fermentado com culturas microbianas mistas, observaram que a composição de ácidos orgânicos do soro de queijo fermentado inferiu na composição do polímero produzido, visto que alguns ácidos orgânicos são precursores direto de determinados polímeros. Além disso, os autores referidos também avaliaram a influência do enriquecimento do soro com ácidos orgânicos (como por exemplo, o acetato), onde foi observado que a suplementação com acetato favoreceu a produção de polímeros.

Nesse contexto, sugere-se que as linhagens avaliadas nesse trabalho utilizaram acetato como substrato alternativo conforme a concentração da principal fonte de carbono diminuía, por essa razão não foi observado concentração residual de acetato no final dos cultivos.

Em relação ao etanol, que é metabólito de maior concentração, sua geração variou de 0,62 g.L⁻¹ com a linhagem PI1 em galactose a 1,79 g.L⁻¹ com a linhagem 1TE em lactose.

As linhagens de leveduras (com exceção da linhagem P1), quando cultivadas em lactose, apresentaram valores próximos entre si de concentração máxima de etanol. Além disso, observou-se que neste substrato a maioria das linhagens estudadas apresentaram sua formação máxima de etanol, sendo em ordem decrescente a linhagem 1TE (1,79 g.L⁻¹), PI3 (1,78 g.L⁻¹), PII (1,77 g.L⁻¹) e SR (1,61 g.L⁻¹).

De forma geral, as linhagens de leveduras cultivadas com glicose apresentaram formação de etanol máxima, menores quando comparadas com as mesmas cultivadas com lactose, com exceção da linhagem STFB que mostrou formação máxima de etanol ligeiramente maior em glicose (1,65 g.L⁻¹).

Em cultivos com galactose como fonte de carbono, a formação máxima de etanol foi obtida pela linhagem SR (1,27 g.L⁻¹), entretanto, esse valor é menor do que os apresentados pela mesma linhagem em lactose e glicose. Nesse sentido, observou-se que para as leveduras estudadas neste trabalho, o emprego de galactose como única fonte de carbono não é preferível em relação aos demais substratos testados.

3.4 CONCLUSÕES

A partir dos diferentes cultivos aeróbios realizados com as 6 linhagens de leveduras prospectadas, conclui-se que todas as linhagens apresentaram-se aptas a bioconverter substratos como lactose, glicose e galactose como única fonte de carbono visto que não restaram substrato residual no final dos cultivos. Além disso, a característica que as linhagens de leveduras estudadas apresentaram de bioconverter lactose eficientemente revela seu potencial de aplicação em processos em que esse dissacarídeo esteja disponível, inclusive na forma de resíduo.

A escolha da linhagem de levedura ideal é função do objetivo de sua aplicação, neste caso pode-se considerar seus produtos (biomassa e etanol). Nesse sentido, conclui-se que as melhores opções em termos de produtividade de etanol foram a linhagem PI3 e 1TE, e em termos de produtividade de biomassa as linhagens SR e STFB.

3.5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, R. P.; MELO, C. N.; GENISHEVA, Z.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, v. 91, p. 72-79, 2016.

CHEN, Q.; HE, W.; YAN, X.; ZHANG, T.; JIANG, B.; STRESSLER, T.; FISCHER, L.; MU, W. Construction of an enzymatic route using a food-grade recombinant *Bacillus subtilis* for the production and purification of epilactose from lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, 2018.

COLOMBO, B.; PEPÈ, S. T.; REIS, M.; SCAGLIA, B.; ADANI, F. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 692–699, 2016.

DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 1083–1095, 2013.

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

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, p. 339-354, 2008b.

FONSECA, G.G.; CARVALHO, N.M.B.; GOMBERT, A.K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 5055-5067, 2013.

FONSECA, G. G.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C. Biodegradable polyesters from cheese whey. In: CERDÁN, M. E.; GONZALÉZ-SISO, M. I.; BECERRA, M. **Advances in Cheese Whey Utilization**. Transworld Research Network, p. 123-145, 2008a.

FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis* – a retrospective. **FEMS Yeast Research**, n. 6, p. 323–4, 2006.

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

LOCHER, G.; HAHNEMANN, U.; SONNLEITNER, B.; FIECHTER, A. Automatic bioprocess control. 4. A prototype batch of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 29, p. 57–74, 1993.

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

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VANDIJKEN, J. P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, p. 501–517, 1992.

4 CARACTERIZAÇÃO DO SORO COMO EFLUENTE, REDUÇÃO DA CARGA ORGÂNICA E GERAÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO PERMEADO COM MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LATICÍNIO

RESUMO

A importância ambiental do soro de queijo está relacionada ao volume gerado, ao baixo aproveitamento e ao potencial poluidor. O objetivo do trabalho foi caracterizar o soro como efluente, utilizar o permeado de soro como meio de cultivo e, avaliar os parâmetros cinéticos e de remoção de carga orgânica com três linhagens de leveduras isoladas de laticínio. O soro foi caracterizado de acordo com as medidas referentes a cor, turbidez, Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , fósforo total, SO_4^{2-} , NAT, NT, ST, SF e SV, SSD, SST, DQO, DBO e óleos e graxas. Também foi investigado a presença de coliformes totais e termotolerantes. A lactose foi quantificada por HPLC. O soro bruto foi obtido de um laticínio de produção de queijos. A técnica usada para separar e retirar a proteína do soro foi a autoclavagem (121 °C, 15 min), seguida pelo choque-térmico e filtração. Em seguida, realizou-se a esterilização do permeado de soro em autoclave (121 °C, 15 min). Para os cultivos no soro, realizados em triplicata de experimentos, 200 mL do permeado de soro (meio de cultivo) foi adicionado em um Erlenmeyer de 250 mL, no qual adicionou-se o inóculo a partir de uma quantidade determinada do pré-cultivo. O cultivo foi conduzido a 30 °C e 200 rpm. Amostras foram recolhidas no tempo inicial e em intervalos de 2 h até as 24 h de cultivo, para determinação de substrato residual, etanol, biomassa e ácidos orgânicos. Os parâmetros cinéticos avaliados foram velocidade de crescimento, consumo de substrato, tempo de duplicação celular, fator de conversão de substrato a célula e formação máxima de biomassa e metabólitos extracelulares. O soro bruto apresentou 61996,7 mg L⁻¹ de DQO e o permeado de soro, 30375,1 mg L⁻¹. A principal diferença no perfil cinético das linhagens de leveduras, foi a velocidade de consumo de substrato e a formação máxima de etanol (3,46 g L⁻¹ para a linhagem 1TE). Conclui-se que o permeado de soro possui uma fração orgânica de alta biodegradabilidade por processos aeróbicos. Assim, quando cultivado com a linhagem 1TE, apresentou a maior de eficiência de consumo de lactose (73,87 %) e a maior remoção de DQO (48,59 %). Isso mostra que essa linhagem é promissora para aplicação em processos biológicos aeróbicos, que objetivam reduzir a carga orgânica e produzir etanol.

PALAVRAS-CHAVE: Soro de queijo; Fermentação; Etanol; DQO e DBO.

4.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a Resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011).

Os efluentes da produção de queijos representam um impacto ambiental significativo na indústria de lácteos devido às suas características físico-químicas, composto por sais minerais (0,46 – 10%), sólidos suspensos totais (0,1 – 22 kg.m⁻³), pH (3,3 – 9,0 kg.m⁻³), fósforo (0,006 – 0,5 kg.m⁻³), Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) (0,01 – 1,7 kg.m⁻³), carga orgânica (0,6 – 102 kg.m⁻³). Os altos valores de matéria orgânica são ocasionados pela presença de lactose (0,18 – 60 kg.m⁻³), proteínas (1,4 – 33,5 kg.m⁻³) e altos teores de gorduras (0,08 – 10,58 kg.m⁻³) (ERGÜDER et al. 2001; PRAZERES et al., 2012).

A comparação da carga orgânica de esgoto doméstico com a de soro de queijo, leva a concluir que a mesma é equivalente à carga poluidora de cem vezes o volume de águas residuais domésticas comuns (METCALF e EDDY, 2003; MOCKAITIS et al., 2006; CARVALHO et al., 2013), onde a importância ambiental do soro está relacionada ao volume gerado, ao baixo aproveitamento e ao potencial poluidor.

A gestão de efluentes é baseada em diferentes aspectos, um desses é a aplicação de tecnologias de valorização, onde é possível recuperar compostos como proteínas e lactose. Segundo Dasa e colaboradores (2016), a recuperação de lactose e proteína pode ajudar a reduzir a carga de soro de DBO e DQO e pode ajudar amenizar o problema de poluição ambiental causado pela eliminação do soro. Outra possibilidade, depende da aplicação de tratamentos biológicos, os quais também podem ser usados como tecnologias de valorização. Por exemplo, a hidrólise de lactose e proteínas leva à geração de monossacarídeos de lactose (glicose e galactose), peptídeos e/ou aminoácidos. Além disso, processos de fermentação controlados estão sendo considerados na produção de ácido láctico, ácido butírico, butanol, ácido acético, glicerol, acetona, etanol, hidrogênio, proteínas entre outros (PRAZERES et al., 2012).

Os primeiros estudos para fermentar a lactose do soro diretamente para etanol, foram realizados na década de 1940 (BROWNE, 1941; JIN et al., 2016), enquanto a produção comercial de etanol a partir da lactose do soro remonta pelo menos aos anos 1970 (LYONS E CUNNINGHAM, 1980; GUIMARÃES et al., 2010; JIN et al., 2016).

A utilização de lactose de soro para a produção de etanol tem sido considerada uma estratégia promissora com tentativas tanto acadêmicas quanto industriais. No entanto, o baixo rendimento de etanol, baixo teor de lactose inicial de 5,0 %, e o tempo prolongado de fermentação com altas concentrações de lactose, foram os principais obstáculos da produção direta de lactose-etanol, pelas leveduras *Kluyveromyces*. Com base na literatura, a razão para essas desvantagens é provavelmente a baixa tolerância osmótica das leveduras *Kluyveromyces*, o que leva a taxas de crescimento lentas (GUIMARÃES et al., 2010; JIN et al., 2016). Por isso a importância de estudar a fisiologia de novas linhagens de leveduras.

O objetivo do trabalho foi caracterizar o soro como efluente, utilizar o permeado de soro como meio de cultivo e, avaliar os parâmetros cinéticos e de remoção de carga orgânica com três linhagens de leveduras isoladas de laticínio

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Métodos analíticos para a caracterização do soro bruto (efluente)

As medidas referentes a cor aparente e verdadeira, turbidez, nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), fósforo total (PO_4^{3-}), sulfatos (SO_4^{2-}) e nitrogênio amoniacal total (NAT) foram feitas de acordo com os métodos descritos nos manuais HACH (1996) e HACH (1998). O nitrogênio total (NT) foi medido por meio do método de decomposição oxidativa (kit Nanocolor, Marcherey-Nagel), em bloco digestor, com subsequente interferência de compensação e determinação fotométrica com 2,6-dimetilfenol, em mistura de ácido sulfúrico e ácido fosfórico.

Sólidos totais, fixos e voláteis (ST, SF e SV), sólidos dissolvidos totais e sólidos suspensos totais (SDT e SST), demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO),

óleos e graxas e cloretos (Cl⁻) foram analisados de acordo com os métodos descritos no manual APHA (1998). Lactose foi quantificada por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, Varian 920-LC).

Foi realizada análise microbiológica para coliformes totais e termotolerantes (37 e 44 ± 1 °C, respectivamente), por meio do método oficial da AOAC (1990) de Petrifilm® (3M *Company*), o qual realiza modificações na coloração da placa, composta por dois filmes estéreis reidratáveis, impregnados pelo meio de cultura que contém os nutrientes do ágar vermelho violeta bile (VRBA), um agente gelificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glucuronidase (5-bromo-4cloro-3indolil- β -D-glicuronídeo) e um indicador tetrazólico, indicando presença de unidades formadoras de colônia (UFC). As colônias de coliformes são vermelhas com gás associados.

Coliformes totais e fecais também foram analisados por meio do método Colilert®, pelo número mais provável (NMP). Esse é um método alternativo de detecção, baseado na tecnologia de substrato cromogênico da IDEXX. O método consiste na quantificação dos coliformes totais e fecais presentes em uma amostra, através da mistura entre a amostra e o reagente Colilert patentado, com posterior transferência da solução para uma cartela estéril (100ml), a qual é selada e mantida incubada a $35 \pm 0,5$ °C até a leitura. Os resultados são obtidos pela relação de valores positivos entre os quadrados maiores e menores da cartela, com aqueles verificados na tabela padrão para o teste.

4.1.2 Microrganismos e manutenção

Linhagens PI3, SR e 1TE, as quais foram isoladas do queijo parmesão, soro residual da produção de queijo ricota e primeiro tanque de efluente, respectivamente, de um laticínio localizado na cidade de Guaraçaí, São Paulo, Brasil. Os microrganismos foram mantidos em meio YEPL sólido (em g.L⁻¹: extrato de levedura, 20,0; peptona bacteriológica, 20,0; ágar-ágar, 15,0; lactose, 20,0) contidos em placas de Petri, e também, em tubos de ensaio com meio YEPL / óleo mineral, estocadas à 4 °C.

4.1.3 Permeado de soro de queijo (meio de cultivo real)

O soro de queijo, utilizado como meio de cultivo fermentativo, foi doado pelo laticínio Rancho Aliança, localizado em Nova Aliança do Ivaí, Paraná, Brasil. O soro desengordurado foi coletado, em frasco asséptico, na canaleta de saída de soro após a produção de queijo mussarela e ricota e antes de chegar no tanque de efluente. Isso foi feito em uma única batelada para todos os experimentos e repetições. Em seguida, o soro foi refrigerado e mantido congelado para evitar acidificação e alteração em sua composição química.

A técnica usada para separar e retirar a proteína do soro foi a autoclavagem (121 °C, 15 min), onde notou-se a formação de um aglomerado de proteínas, seguida pelo choque-térmico e filtração em filtro qualitativo. Em seguida, realizou-se a esterilização do permeado de soro em autoclave (121 °C, 15 min).

Não houve ajuste de pH e suplementação do permeado de soro, ou seja, não foi adicionado outra fonte de substrato, solução de vitaminas, elementos traços e reagentes.

4.1.4 Meios (sintético e real) e condições de cultivo

Os pré-cultivos foram feitos com meio sintético (VERDUYN et al., 1992), que continha em g L⁻¹ de água destilada: (NH₄)₂SO₄, 5,0; KH₂PO₄, 3,0; MgSO₄.7H₂O, 0,5; 1 mL de uma solução de elementos-traço (em g L⁻¹: EDTA, 15,0; ZnSO₄.7H₂O, 4,5; MnCl₂.2H₂O, 1,0; CoCl₂.6H₂O, 0,3; CuSO₄.5H₂O, 0,3; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,4; CaCl₂.2H₂O, 4,5; FeSO₄.7H₂O, 3,0; H₃BO₃, 1,0; KI, 0,1) e 1 mL de uma solução de vitaminas (em g L⁻¹: D-biotina, 0,05; pantotenato de cálcio, 1,0; ácido nicotínico, 1,0; mio-inositol, 25,0; cloreto de tiamina, 1,0; cloreto de piridoxol, 1,0; ácido para-aminobenzóico, 0,20) esterilizada por filtração. O meio sintético foi suplementado com extrato de levedura e peptona bacteriológica (em g L⁻¹: 4,5 e 7,5, respectivamente). O pH final do meio foi ajustado para 6,0 com NaOH 1 M, e em seguida, esterilizado em autoclave (121 °C, 15 min).

Os pré-cultivos foram realizados transferindo uma amostra da linhagem de levedura contida em meio YEPL sólido, para um Erlenmeyer contendo 200 mL de meio mineral suplementado e 50 mL

de lactose na concentração 10 g L^{-1} . Em seguida, foram incubados em condições de aerobiose, em agitador orbital (banho orbital New Lab 2201, Brasil) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 200 rpm, por 12 h. A multiplicação celular foi observada pela densidade óptica (DO) medida no comprimento de onda de 600 nm, em espectrofotômetro (Hach DR 2800, Brasil).

Haja vista que é conhecido o perfil de crescimento dessas linhagens de leveduras, durante uma cinética microbiana em meio sintético (Capítulo 3), foi determinado que os cultivos principais realizados no soro desproteinado começariam com a levedura em sua fase exponencial de crescimento, ou seja, com 1 de densidade óptica (DO) a 600 nm.

Para os cultivos no soro, realizados em triplicata de experimentos, 200 mL do permeado de soro (meio de cultivo) foi adicionado em um Erlenmeyer de 250 mL, no qual adicionou-se o inóculo a partir de uma quantidade determinada do pré-cultivo. O cultivo foi conduzido em agitador orbital (banho orbital New Lab 2201, Brasil) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm. Amostras foram recolhidas no tempo inicial e em intervalos de 2 h até as 24 h de cultivo, para determinação de substrato residual, etanol, biomassa e ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido succínico, ácido lático).

Além disso, mediu-se indiretamente a multiplicação celular durante todo o cultivo pelas leituras de densidade óptica realizadas em espectrofotômetro (Hach DR 2800, Brasil) a 600 nm. Também foi medido a turbidez de alguns pontos da cinética (tempos 0, 8, 14, 18 e 24 h de cultivo) para correlacionar com os dados de densidade óptica.

4.1.5 Determinação de substrato residual, concentração de metabólitos extracelulares e biomassa microbiana

As amostras coletadas do cultivo foram centrifugadas a 5 g durante 20 min. O sobrenadante foi filtrado ($0,22 \text{ } \mu\text{m}$) e o filtrado obtido foi utilizado para determinação de substrato e metabólitos extracelulares por meio da cromatografia líquida de alta performance (HPLC, Varian 920-LC) equipada internamente com um detector de índice de refração e uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As análises foram realizadas em uma fase móvel de 5 mM de H_2SO_4 , a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, com vazão de $0,6 \text{ mL/min}$, por 25 min. Diferentes concentrações de solução padrão

de lactose, galactose, ácido cítrico, succínico, láctico e etanol foram preparadas e analisadas para a preparação das curvas analíticas.

O sedimento de biomassa obtido após centrifugação da amostra foi seco em estufa (105 °C) até massa constante. A massa celular seca (g L^{-1}) foi obtida pelo quociente entre a diferença de massa por volume de meio centrifugado. Biomassa também foi determinada indiretamente pela densidade óptica medida com um espectrofotômetro (Hach DR 2800, Brasil) a 600 nm. Para este fim, os valores de absorbância medidos foram convertidos em valores de massa utilizando uma relação linear determinada em cada experimento.

4.1.6 Determinação de parâmetros cinéticos

De acordo com Fonseca et al. (2007), a fase exponencial de crescimento (EGP) foi identificada como a região linear da curva de cinética de crescimento pelo tempo. E a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) foi determinada como a inclinação desta reta.

O fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foi determinado como a inclinação da reta obtida a partir da curva de concentração celular (X) em função da concentração de substrato (S), incluindo necessariamente pontos da EPG.

A velocidade específica de consumo de substrato (μ_s) foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\mu_s = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \quad \text{Equação 1}$$

Em que, μ_{\max} = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato em células (gMCS.gS^{-1}); MCS= massa celular seca (FONSECA et al., 2007).

O tempo de duplicação (TD), foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$TD = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}$$

Equação 2

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização do soro bruto (efluente) e do permeado de soro

O soro de queijo bruto e o permeado foram caracterizados de acordo com os parâmetros que avaliam um efluente, e estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Características físicas, químicas e físico-químicas do soro de queijo bruto (efluente) e do permeado de soro (meio de cultivo).

Parâmetros	Classificação	Soro bruto	Permeado
pH	-	5,0	5,0
Cinzas (%)	-	0,4	0,2
Lactose (g.L⁻¹)	-	29,9	29,1
Óleos e Graxas (mg.L⁻¹)	-	2,4	-
Turbidez (NTU)	-	605,0	19,7
Cloretos (mg.L⁻¹)	Cl ⁻	999,7	499,8
Cor (mgPt-Co.L⁻¹)	Cor Aparente	4160,0	240,0
	Cor Verdadeira	540,0	40,0
Fósforo total (mg.L⁻¹)	-	241,0	340,0
Nitrito (mg.L⁻¹)	N-NO ₂	40,0	20,0
Nitrato (mg.L⁻¹)	N-NO ₃ ⁻	190,0	34,0
Sulfatos (mg.L⁻¹)	SO ₄ ²⁻	0	0
Sólidos (mg.L⁻¹)	ST	37783,3	15294,7
	SV	34236,7	13725,3
	SF	3546,7	1569,3
	SST	528,0	-
	SDT	37255,3	-
NT (mg.L⁻¹)	-	55,4	58,6
NAT (mg.L⁻¹)	-	45,4	51,7
DBO (mg.L⁻¹)	DBO	-	20300,0
DQO (mg.L⁻¹)	DQO	61996,7	30375,0

No que se refere ao teor de lactose, medido por cromatografia líquida, observou-se que sua concentração no soro bruto (efluente) e no permeado de soro foi de 29,9 e 29,1 g.L⁻¹,

respectivamente. Isso comprova que não houve perda de lactose no processo de separação da proteína e posterior esterilização, sendo mantida a concentração que remete a carga orgânica do efluente bruto.

O resíduo por incineração do leite é constituído principalmente por óxidos de potássio, sódio, cálcio, magnésio, fósforo e por cloretos. Na Tabela 4.1, observa-se que o percentual de cinzas no soro bruto foi ligeiramente maior do que no permeado, indicando que o processo para obtenção do permeado de soro, possivelmente, levou a perda de parte desses constituintes.

A quantidade de óleos e graxas no soro é função do processo e produto elaborado. O soro coletado foi de uma produção desengordurada de queijo, por esse motivo o soro bruto apresentou-se praticamente isento de óleos e graxas ($2,4 \text{ mg.L}^{-1}$). Janczukowicz et al. (2008), encontraram uma quantidade de 491,5 a $994,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de óleos e graxas em soro ácido e doce, respectivamente.

A elevada turbidez apresentada no soro bruto (605,0 NTU), junto a diminuição dessa turbidez após o processo de desnaturação e separação das proteínas do soro, mostra que as proteínas representam grande parte dessas partículas suspensas. O permeado obtido apresentou apenas 19,7 NTU.

Em relação a quantidade de cloretos (Cl^{-1}), sua concentração foi de $999,7 \text{ mg.L}^{-1}$ para o soro bruto e $499,8 \text{ mg.L}^{-1}$ para o permeado. O permeado de soro concentrado, caracterizado por Dereli et al. (2019), apresentou 2080 mg.L^{-1} de Cl^{-1} . De acordo com Kolev Slavov (2017), cloretos fazem parte dos constituintes inorgânicos e sua presença aumenta a contaminação inorgânica do efluente, isso ocorre devido a adição de NaCl durante o processo de salmoura dos queijos. A concentração de cloretos, em águas residuais de produtos lácteos, atinge de 800 a 1000 g.L^{-1} , mas o intervalo de valores médios é de 150 a 200 g.L^{-1} .

Em relação ao parâmetro de cor aparente e verdadeira, foi observado que o soro bruto apresentou uma cor muito mais concentrada (4160,0 e $540,0 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente) comparado ao permeado (240,0 e $40,0 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente). Isso mostra que o processo de desnaturação e filtração das proteínas, para obtenção do permeado de soro, removeu praticamente toda a cor do meio.

A concentração de fósforo total foi $241,0 \text{ mg.L}^{-1}$ para o soro bruto e $340,0 \text{ mg.L}^{-1}$ para o permeado. Valores próximos foram observados por Dereli et al. (2019) e Saddoud et al. (2007), que obtiveram 415,0 e 500 mg.L^{-1} , respectivamente, de fósforo total no soro.

Em relação aos parâmetros de sólidos (ST, SF e SV) (Tabela 4.1), foi observado que o soro bruto apresentou maior quantidade de sólidos do que o permeado, o que era esperado devido as operações unitárias de separação e filtração para obter o permeado. De maneira análoga aos dados de turbidez, notou-se uma redução dos valores de ST, SF e SV no permeado, quando comparados com o soro bruto. Na literatura, são encontrados valores de ST, SV e SST nas faixas de 27000 a 59000 mg.L⁻¹, 23000 a 56000 mg.L⁻¹ e 460 a 8314 mg.L⁻¹, respectivamente (DERELI et al. 2019; GANNOUN et al. 2008; JANCZUKOWICZ et al. 2008; SADDOUD et al. 2007).

Cada efluente lácteo possui, notavelmente, diferentes concentrações nitrogênio. Assim, o soro bruto e o permeado resultaram em uma concentração de NT (55,4 e 58,6 mg.L⁻¹, respectivamente) e de NAT (45,4 e 51,7 mg.L⁻¹, respectivamente), próximos a faixa encontrada na literatura.

Foi encontrado na literatura, um soro de queijo caracterizado com 2000 mg.L⁻¹ de NT, que é um valor maior do que deste presente trabalho. A concentração de nitrogênio total variou de 45,4 mg.L⁻¹ no soro bruto (Tabela 4.1) a 175,5 mg.L⁻¹ no meio de cultivo da linhagem PI3 (Tabela 4.2). Em relação ao fósforo total, os valores encontrados estão dentro do intervalo (6,0 a 500,0 mg.L⁻¹) citado na literatura. Em virtude da elevada quantidade de nitrogênio e fósforo total, os efluentes de queijo representam um risco considerável de eutrofização nos corpos receptores de água (MINHALMA et al 2007; PRAZERES et al., 2012; CARVALHO et al., 2013).

A caracterização, quanto aos parâmetros de DQO e DBO, mostrou que o efluente resultante da produção de queijo possui elevada carga orgânica. O soro bruto apresentou uma DQO de 61996,7 mg.L⁻¹, enquanto o permeado apresentou 30375,1 mg.L⁻¹ de DQO e 20300,0 mg.L⁻¹ de DBO. Saddoud et al. (2007) caracterizaram o soro (oriundo de uma fábrica de queijo) e encontraram uma concentração de DQO (68600,0 mg.L⁻¹) próxima do presente trabalho. Janczukowicz et al. (2008) encontraram valores de DQO de 73445,0 mg.L⁻¹ para o soro doce e 58549,6 mg.L⁻¹ para o soro ácido.

No trabalho de Begnini e Ribeiro (2014), várias amostras de efluente de queijo, as quais foram coletadas em dias diferentes no mesmo tanque de efluente, apresentaram concentrações de DQO e DBO oscilando na faixa de 1582 a 17895 mg.L⁻¹ e 600 a 8300 mg.L⁻¹, respectivamente.

A análise microbiológica, realizada pelo método Colilert, não detectou coliformes totais e fecais tanto no efluente (soro bruto) quanto no permeado tratado. Mas, a investigação de coliformes totais

e termotolerantes (*Petrifilm*) resultou a presença de 25 UFC.mL⁻¹ de coliformes totais (37 °C) e ausência de coliformes termotolerantes (44 °C) no efluente, e ausência de ambos no permeado.

Para entender quais foram as alterações que ocorreram nos parâmetros avaliados na Tabela 4.1, após o cultivo fermentativo do soro, o meio de cultivo, após a fermentação com as linhagens PI3, 1TE e SR, foi caracterizado novamente seguindo os mesmos parâmetros. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 4.2.

Ao comparar os valores obtidos na caracterização do permeado de soro (Tabela 4.1), com os resultados desses parâmetros após as 24 h de cultivo (Tabela 4.2), observou-se que houve um aumento na concentração de cloretos, sulfatos, nitrito, nitrato, nitrogênio total e fósforo total. Além disso, também houve um aumento significativo da turbidez e dos sólidos, pois os meios de cultivos analisados estavam com o inóculo e a biomassa gerada pelas linhagens PI3, 1TE e SR.

Tabela 4.2 Características físicas, químicas e físico-químicas do permeado de soro (meio de cultivo), após 24 h de fermentação com as linhagens PI3, 1TE e SR.

Parâmetros	Classificação	Permeado	PI3	1TE	SR
pH	-	5,0	5,1	5,2	4,4
Cinzas (%)	-	0,2	2,1	0,6	0,6
Turbidez (NTU)	-	19,7	1330,7	1318,0	1351,3
Cloretos (mg.L⁻¹)	Cl ⁻	499,8	666,5	666,5	666,5
Cor (mgPt-Co.L⁻¹)	Aparente	240,0	7940,0	8280,0	8106,7
	Verdadeira	40,0	160,0	126,7	113,3
Fósforo total (mg.L⁻¹)	-	340,0	400,7	402,0	417,3
Nitrito (mg.L⁻¹)	N-NO ₂	20,0	53,3	40,0	86,7
Nitrato (mg.L⁻¹)	N-NO ₃	34,0	51,3	35,3	39,3
Sulfatos (mg.L⁻¹)	SO ₄ ²⁻	0	366,7	300,0	233,3
Sólidos (mg.L⁻¹)	ST	15294,7	29450,0	25196,7	26840,0
	SV	13725,3	24783,3	18770,0	21106,7
	SF	1569,3	4666,6	6426,7	5733,3
	SST	-	1320,0	176,7	396,7
	SDT	-	28130,0	25020,0	26443,3
NT (mg.L⁻¹)	-	58,6	175,5	115,9	119,0
NAT (mg.L⁻¹)	-	51,7	11,9	7,6	8,2
DBO (mg.L⁻¹)	DBO	20300,0	26233,3	27833,3	27000,0
DQO (mg.L⁻¹)	DQO	30375,0	22969,7	15615,9	23527,2

4.3.2 Cinética do cultivo e produtos

O permeado de soro, utilizado como meio de cultivo fermentativo, teve seus componentes quantificados por cromatografia líquida de alta performance. As concentrações (g.L^{-1}) de cada componente encontram-se na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Concentração inicial dos componentes detectados no permeado de soro por HPLC.

Componentes	(g.L^{-1})
Lactose	30,32
Galactose	1,45
Ácido láctico	3,25

Observou-se que além de lactose, o permeado de soro continha, originalmente, galactose e ácido láctico em sua composição, os dois últimos em pequenas concentrações. A galactose é um dos monossacarídeos resultantes da hidrólise da lactose, e o ácido láctico é produzido por bactérias lácteas após consumir a lactose no soro bruto.

Os resultados dos parâmetros cinéticos de crescimento e consumo de substrato, de diferentes linhagens de leveduras, encontram-se na Tabela 4.4.

A partir da Tabela 4.4, podemos observar que as diferentes linhagens de leveduras, quando cultivadas separadamente no permeado de soro, não mostraram diferenças significativas em sua velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}). Em relação ao tempo de duplicação (TD), a linhagem que apresentou o menor tempo foi a SR, seguida pela PI3 e 1TE. O tempo de duplicação celular, é um parâmetro inversamente proporcional à velocidade de crescimento, então quanto mais rápido a levedura cresce menor é o TD.

A maior velocidade específica de consumo de substrato (μ_s) calculada, foi alcançada pela levedura 1TE ($1,6243 \text{ h}^{-1}$), seguida pela linhagem SR e PI3. E o fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$), variou de 0,0708 a 0,1043 gMCS.gS^{-1} para as linhagens 1TE e PI3, respectivamente.

Tabela 4.4 Parâmetros cinéticos dos cultivos no permeado de soro, com diferentes linhagens de leveduras, em condições de aerobiose.

Linhagens	μ_{\max} (h⁻¹)	TD (h)	μ_s (h⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gMCS.gS⁻¹)
PI3	0,1192±0,01	5,85±0,55	1,1492±0,18	0,1043±0,01
1TE	0,1151±0,02	6,10±0,80	1,6243±0,17	0,0708±0,01
SR	0,1224±0,00	5,67±0,16	1,2711±0,18	0,0974±0,01

Valores representados pela média ± desvio-padrão, da repetição em triplicata.

A levedura *Kluyveromyces marxianus* URM 7404, cultivada no permeado de soro, tem sido relatada apresentando uma taxa específica de crescimento de 0,253 h⁻¹ em condição de aerobiose, 0,208 h⁻¹ em microaerobiose e 0,164 h⁻¹ em anaerobiose (MURARI et al., 2018). Comparando com as μ_{\max} encontradas no presente trabalho (Tabela 4.4), nota-se que as leveduras PI3, 1TE e SR cresceram com uma velocidade menor.

Murari et al. (2018) também notaram que o cultivo aeróbico proporcionou uma maior concentração de biomassa, sendo 11,48 g.L⁻¹ em aerobiose, 9,17 g.L⁻¹ em microaerobiose e 7,48 g.L⁻¹ em anaerobiose, isso ocorre porque em aerobiose a levedura tem uma fase de propagação mais rápida que consome mais oxigênio e substrato.

A Tabela 4.5 apresenta dados de produção máxima de biomassa e metabólitos extracelulares, dos cultivos no permeado de soro, com as três linhagens de leveduras estudadas.

Tabela 4.5 Formação máxima de biomassa e metabólitos extracelulares (etanol e ácidos orgânicos), de três linhagens de leveduras durante a fermentação do soro.

Produto (g.L⁻¹)	Linhagens		
	PI3	1TE	SR
Biomassa	1,46±0,02	1,51±0	1,61±0
Etanol	1,83±0,14	3,46±0,60	1,71±0,06
Ácido Cítrico	0,18±0,01	0,26±0,01	0,16±0,14
Ácido Succínico	0	0,25±0,01	0,22±0,02
Ácido Láctico	3,59±0,11	3,30±0,08	3,46±0,11
Total de Metabólitos	5,73	7,28	5,55

Dados apresentados com média ± desvio padrão.

A cinética microbiana conduzida no permeado, teve como produtos a biomassa, etanol, ácido cítrico, succínico e láctico, dos quais o etanol foi o principal produto.

Haja vista que é conhecido os perfis cinéticos (Capítulo 3) das linhagens de leveduras estudadas, todos os cultivos foram programados para começar com DO de 1, pois nessa faixa a levedura está em sua fase exponencial de crescimento. Isso foi feito para eliminar o tempo gasto na fase de propagação (lag), e também, para canalizar para geração de etanol, parte da energia que seria gasta para o crescimento.

Em referência à formação máxima de biomassa, a linhagem que apresentou a maior concentração foi a SR ($1,61 \text{ g.L}^{-1}$), seguida da 1TE ($1,51 \text{ g.L}^{-1}$) e PI3 ($1,46 \text{ g.L}^{-1}$). Ainda assim, os valores obtidos são menores do que aqueles citados na literatura para cultivos em aerobiose.

A concentração máxima de ácido láctico formada (Tabela 4.5), em 24 h de cultivo, variou de 3,30 a $3,59 \text{ g.L}^{-1}$, para as linhagens 1TE e PI3, respectivamente. Isso significa que a concentração de ácido láctico, manteve-se na faixa de sua composição original do soro (Tabela 4.3).

Em relação à formação máxima de etanol, houve destaque pela linhagem 1TE, que produziu $3,46 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, seguido pelas linhagens PI3 ($1,83 \text{ g.L}^{-1}$) e SR ($1,71 \text{ g.L}^{-1}$).

Murari et al. (2018) investigando diferentes condições de cultivo com o permeado de soro ($58,90 \text{ g.L}^{-1}$ de lactose) e a levedura *K. marxianus* URM 7404, obtiveram uma concentração máxima de etanol de $4,29 \text{ g.L}^{-1}$ em aerobiose e $8,90 \text{ g.L}^{-1}$ em anaerobiose. Sabendo que os cultivos no permeado de soro do presente trabalho, foram realizados em condições de aerobiose, nota-se que a linhagem 1TE foi capaz de obter uma formação máxima de etanol próxima da apresentada na literatura.

Nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, estão apresentadas curvas de cinéticas de crescimento, consumo de substrato e formação de metabólitos, das linhagens de levedura PI3, 1TE e SR, cultivadas por 24 h no permeado de soro.

Observa-se (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3) uma boa reprodutibilidade nas repetições dos experimentos para todas as linhagens cultivadas no permeado.

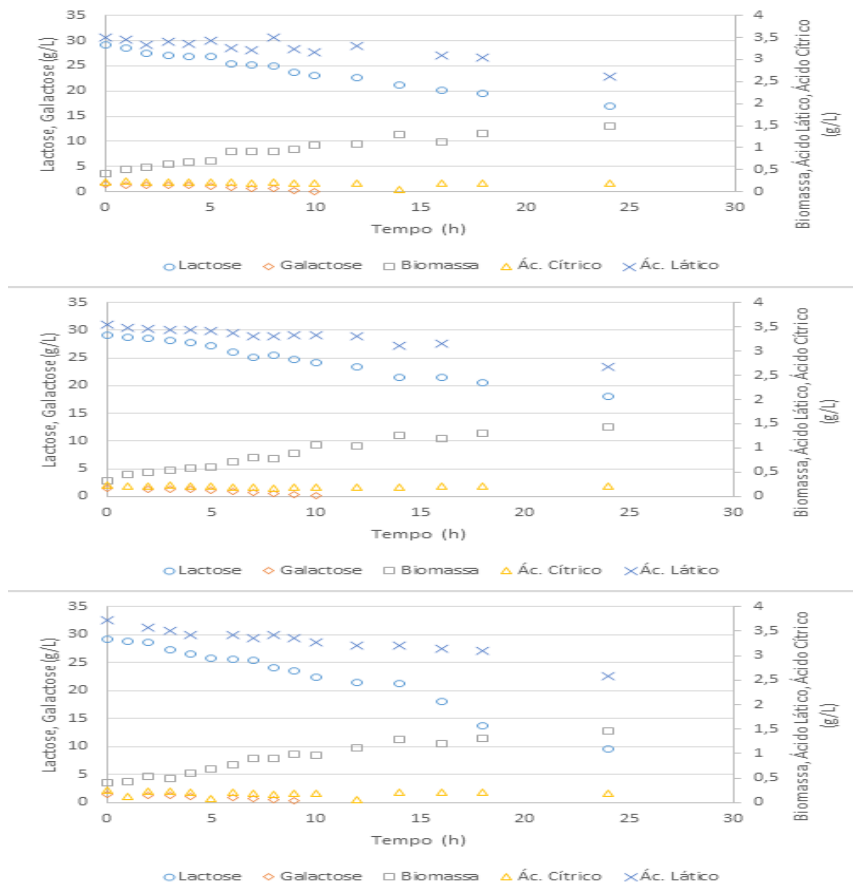


Figura 4.1 Cinéticas de crescimento, consumo de substrato e formação de metabólitos, da levedura PI3, cultivada por 24 h no permeado de soro (três repetições de cultivo).

Na Figura 4.1 é possível observar que a curva de crescimento (quadrado vazio), representada pela biomassa, aumenta de forma linear até o tempo de 7 h. Na faixa de $t = 8$ e 10 h, é verificado o início de uma fase estacionária, na qual a lactose que estava diminuindo gradativamente, começa a ser consumido com uma velocidade menor até no final da fase estacionária. A galactose, quantificada em baixas concentrações, foi totalmente consumida até $t = 10$ h. Um pequeno decréscimo de ácido láctico foi observado no decorrer da cinética.

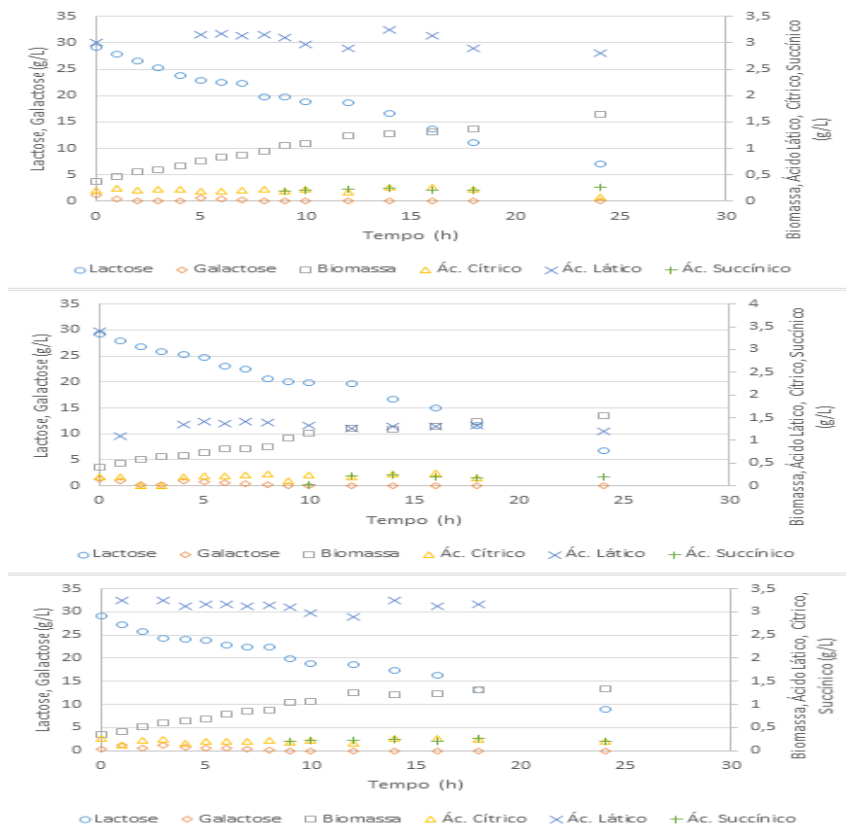


Figura 4.2 Cinéticas de crescimento, consumo de substrato e formação de metabólitos, da levedura 1TE, cultivada por 24 h no permeado de soro (três repetições de cultivo).

Em relação ao perfil cinético da linhagem 1TE (Figura 4.2), cultivada no permeado de soro, observa-se que sua curva de crescimento é linear até $t = 10$ h, onde se inicia a fase estacionária, e aumenta vagarosamente a partir de $t = 10$ h. A curva de consumo de substrato diminui significativamente até o tempo final estabelecido para o cultivo ($t = 24$ h).

As linhagens 1TE e SR tiveram sua concentração de galactose esgotada até $t = 8$ h. Essas linhagens também não produziram ácido succínico.

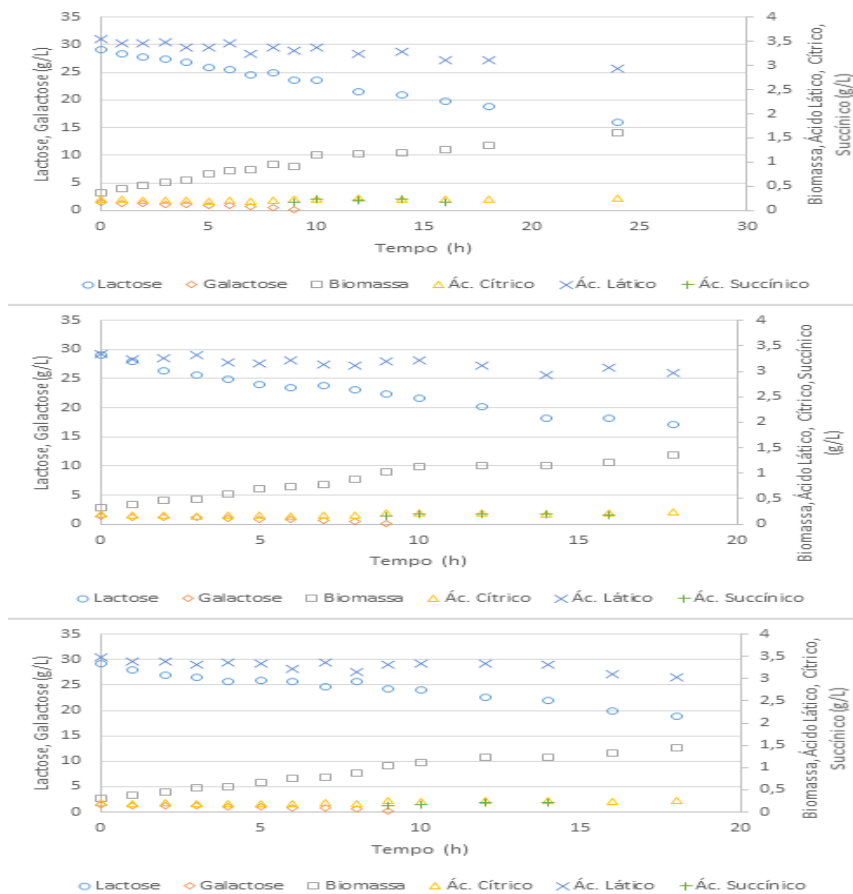


Figura 4.3 Cinéticas de crescimento, consumo de substrato e formação de metabólitos, da levedura SR, cultivada por 24 h no permeado de soro (três repetições de cultivo).

É notável (Figura 4.3) que as curvas de crescimento e consumo de substrato estão menos acentuadas, quando comparadas com a cinética das demais linhagens, o que provocou, conseqüentemente, uma menor geração de etanol (Tabela 4.5).

4.3.3 Desempenho biológico dos cultivos

A lactose foi o constituinte de maior concentração inicial no meio, representando a maior carga orgânica no permeado de soro ($29,13 \text{ g.L}^{-1}$). Esse substrato, estava disponível para ser consumido por meio de cultivos com as linhagens PI3, 1TE e SR, em condições de aerobiose.

Após 24 h de cinética microbiana realizada no permeado de soro, observou-se a presença de lactose residual no meio. Como os cultivos fermentativos no soro foram conduzidos de forma descontínua, possivelmente, as células inoculadas no início do cultivo não conseguiram consumir todo o substrato disponível.

A Tabela 4.6 mostra as eficiências de consumo de lactose e remoção de DQO alcançadas após 24 h de cultivo do permeado de soro, com as linhagens PI3, 1TE e SR em aerobiose.

Tabela 4.6 Eficiências de consumo de lactose e remoção de DQO, após 24 h de cultivos independentes no permeado de soro, com diferentes linhagens de leveduras em aerobiose.

M.o.	Lactose	Eficiência de	DQO	Eficiência de	DBO/DQO
PI3	29,13	48,71	30375,00	24,38	1,14
1TE	29,13	73,87	30375,00	48,59	1,78
SR	29,13	47,40	30375,00	22,54	1,15

M.o.: microrganismos (3 linhagens de levedura).

Na Tabela 4.6, observa-se que a eficiência de remoção de DQO foi diretamente proporcional à eficiência de consumo de lactose para todas as linhagens.

O maior percentual de eficiência de consumo de lactose foi alcançado pela fermentação com a linhagem 1TE, onde 73,87 % de lactose foi consumida durante a cinética. O cultivo com essa linhagem apresentou 48,59 % de remoção de DQO, se destacando significativamente das demais linhagens.

As linhagens PI3 e SR, apresentaram um consumo de 48,71 e 47,40 % de lactose, respectivamente, e alcançaram uma eficiência de remoção de DQO de 24,38 e 22,54 %, respectivamente.

A alta concentração inicial de lactose é responsável pela geração de maior concentração de metabólitos intermediários, levando a um menor rendimento e remoção de DQO (CRISTIANI-URBINA et al., 2000; YADAV et al., 2014).

Como pode ser observado (Tabela 4.6), os valores dos percentuais de remoção de DQO são menores do que os percentuais de consumo de lactose para a mesma linhagem. Isso mostra que apesar da lactose ser a principal responsável pela carga orgânica, existem compostos originalmente

presentes na composição do permeado de soro (Tabela 4.3), além dos metabólitos extracelulares, que são ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação, que contribuem na forma de resíduo (YADAV et al., 2014; MURARI et al., 2018).

Diferentes condições de cultivos avaliadas com a levedura *K. marxianus* URM 7404, em permeado de soro em pó, reconstituído com 50 g.L⁻¹ de lactose, apresentaram o maior consumo de lactose (99,08 %) e a maior redução de DQO (78,60 %) em aerobiose. Além disso, observaram que mesmo com uma redução significativa da lactose no meio de fermentação, quando a eficiência de redução da DQO foi avaliada, foi menor quando comparada ao consumo final de lactose (MURARI et al., 2018).

As relações DBO/DQO acima de 1 encontradas no presente trabalho (Tabela 4.6), após os cultivos com todas as linhagens, indicaram que o permeado ainda possui um alto índice de biodegradabilidade. Isso permite considerar que, possivelmente, outro processo biológico ainda possa ser empregado para otimizar a adequação do efluente final.

Tem sido reportado caracterizações de soro de queijos, com uma razão DBO/DQO acima de 0,5, o que constitui um substrato facilmente biodegradável por digestão anaeróbia ou aeróbia (PRAZERES et al., 2012; CARVALHO et al., 2013). Outros autores chegaram a encontrar uma razão DBO/DQO de 0,4 para o soro doce e 0,45 para o soro ácido (JANCZUKOWICZ et al., 2008).

A Figura 4.4 mostra a relação do perfil de crescimento das linhagens PI3, 1TE e SR no permeado de soro, representado pelos valores de densidade óptica e turbidez em função do tempo (0, 8, 14, 18 e 24 h).

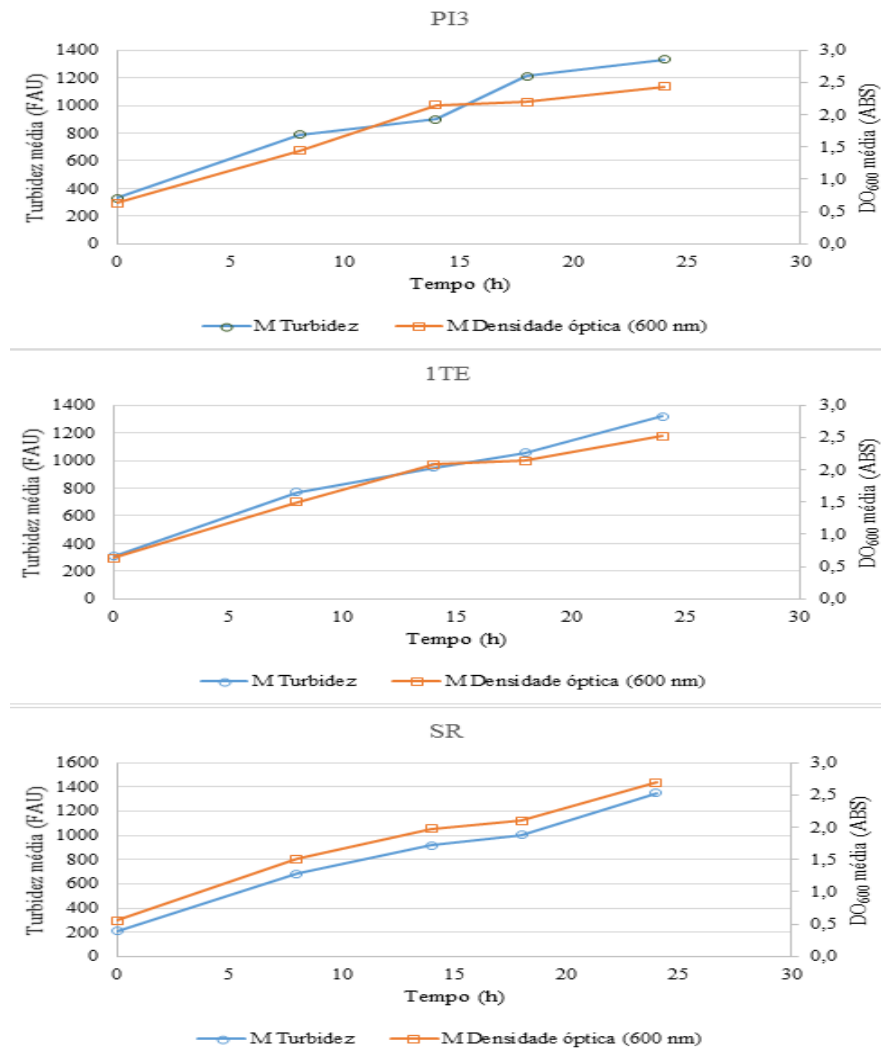


Figura 4.4 Relação do perfil de crescimento das linhagens PI3, 1TE e SR no permeado de soro, representado pelos valores de DO e turbidez em função do tempo (0, 8, 14, 18 e 24 h). O valor de cada ponto representa uma média de resultados de 3 repetições de cultivo.

Observa-se na Figura 4.4 que, no tempo zero, o permeado de soro inoculado com as linhagens PI3, 1TE e SR apresentaram valores de turbidez de 331,0, 306,33 e 210,33 NTU, respectivamente. E o permeado, antes do inóculo, tinha apenas 19,7 NTU (Tabela 4.1). No tempo final, o permeado de soro com as linhagens PI3, 1TE e SR alcançou 1330,67, 1318,00 e 1351,33 NTU de turbidez, respectivamente.

Partindo dessa comparação, é possível afirmar que no tempo inicial, o aumento de turbidez foi resultado do inóculo, e no decorrer da cinética, foi devido a multiplicação celular (aumento de

biomassa). Portanto, a elevada turbidez do permeado (Tabela 4.2 e Figura 4.4) apresentada no final dos cultivos, pode ser drasticamente reduzida a partir da recuperação da biomassa, por meio de alguma operação unitária.

4.4 CONCLUSÃO

A caracterização do soro como efluente e do seu permeado tratado, corroborou com os apontamentos da literatura de que o efluente da produção de queijos possui elevada carga orgânica. O soro bruto apresentou $61996,7 \text{ mg.L}^{-1}$ de DQO e o permeado de soro, $30375,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

A principal diferença no perfil cinético das linhagens de leveduras, foi a velocidade de consumo de substrato e a formação máxima de etanol ($3,46 \text{ g.L}^{-1}$ para a linhagem 1TE).

Em relação ao desempenho biológico dos cultivos, conclui-se que o permeado de soro possui uma fração orgânica de alta biodegradabilidade por processos aeróbicos. Assim, quando cultivado com a linhagem 1TE, apresentou maior eficiência de consumo de lactose (73,87 %) e maior remoção de DQO (48,59 %). Isso mostra que essa linhagem é promissora para aplicação em processos biológicos aeróbicos, que objetivam reduzir a carga orgânica e produzir etanol.

4.5 REFERÊNCIAS

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official MethodsSM of analysis, 15 ed., v. 1, 1990.

APHA – American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed., APHA: USA, 1998.

BEGNINI, B. C.; RIBEIRO, H. B. Plano para redução de carga poluidora em indústria de laticínios. **Saúde Meio Ambiente**, v. 3, p. 19–30, 2014.

BROWNE, H. H. Ethyl alcohol from fermentation of lactose in whey. **Chemical Eng. News**, v. 19 (22), p. 1272–1273, 1941.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 430, de 16 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445–446, p. 385–396, 2013.

CRISTIANI-URBINA, E.; NETZAHUATL-MUNOZ, A. R.; MANRIQUEZ-ROJAS, F. J.; JUAREZ-RAMREZ, C.; RUIZ-ORDAZ, N.; GALNDEZ-MAYER, J.. Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. **Process Biochem.**, v. 35, p. 649–657, 2000.

DASA, B.; SARKARA, S.; SARKARA, A.; BHATTACHARJEE, S.; BHATTACHARJEE, C. Recovery of whey proteins and lactose from dairywaste: A step towards green waste management. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 101, p. 27–33, 2016.

DERELI, R. K.; VAN DER ZEE, F. P.; OZTURK, I.; VAN LIER, J. B. Treatment of cheese whey by a cross-flow anaerobic membrane bioreactor: Biological and filtration performance. **Environmental Research**, v. 168, p. 109–117, 2019.

ERGÜDER, T.H.; TEZEL, U.; GÜVEN, E.; DEMIRER, G.N. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. **Waste Management**, v. 21, n. 7, p. 643–650, 2001.

GANNOUN, H.; KHELIFI, E.; BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; HAMDI, M. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. **Bioresource Technology**, v. 99 p. 6105–6111, 2008.

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

HACH Company. Procedures Manual of Spectrophotometer, 1996.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIŃSKI, M.; DEBOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4199–4205, 2008.

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, 2016.

KOLEV SLAVOV, A. General Characteristics and Treatment Possibilities of Dairy Wastewater – A Review. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 55, p. 14–28, 2017.

LYONS, T. P.; CUNNINGHAM, J. D.. Fuel alcohol from whey. **Am. Dairy Rev.**, v. 42 (11), p. A42–E42, 1980.

METCALF, E. **Wastewater engineering treatment and reuse**. 4th Ed. McGraw-Hill International Editions, 2003.

- MINHALMA, M.; MAGUEIJO, V.; QUEIROZ, D. P.; PINHO, M. N. Optimization of “Serpa” cheese whey nanofiltration for effluent minimization and by-products recovery. **Journal of Environmental Management**, v. 82(2), p. 200–206, 2007.
- MOCKAITIS, G.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. **J Environ Manage.**, v. 79(2), p. 198–206, 2006.
- MURARI, C. S.; SILVA, D. C. M. N.; SCHUINA, G. L.; MOSINAHTI, E. F.; DEL BIANCHI, V. L. Bioethanol Production from Dairy Industrial Coproducts. **BioEnergy Research**, v. 11, 2018.
- PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48–68, 2012.
- SADDOUD, A.; HASSAIRI, I.; SAYADI, S. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2102–2108, 2007.
- YADAV, J. S. S.; BEZAWADA, J.; AJILA, C. M.; YAN, S.; 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, 2014.

5 CONCLUSÃO GERAL

A partir da bioprospecção, seguida pela caracterização e seleção de linhagens de leveduras potenciais para utilização em processos biotecnológicos, conclui-se que a busca por novas linhagens resultou em um total de onze leveduras isoladas. Os testes bioquímicos de assimilação e fermentação de diferentes fontes de carbono permitiram esclarecer a influência do meio de cultivo no consumo de substratos.

Partindo disso, seis linhagens de leveduras são ditas com potencial de assimilar e fermentar diferentes substratos, principalmente a lactose e seus monossacarídeos derivados. Comprova-se isso a partir dos diferentes cultivos aeróbios, realizados em meio sintético, com essas seis linhagens de leveduras.

A caracterização do soro como efluente e do seu permeado tratado, corroborou com os apontamentos da literatura de que o efluente da produção de queijos possui elevada carga orgânica.

Quando cultivadas no permeado de soro, a principal diferença no perfil cinético das leveduras, foi a velocidade de consumo de substrato e a formação máxima de etanol. E em relação ao desempenho biológico, conclui-se que o permeado de soro possui uma fração orgânica de alta biodegradabilidade por processos aeróbios. E quando cultivado com a linhagem 1TE, apresenta a maior eficiência de consumo de lactose e a maior remoção de DQO, mostrando que essa linhagem é promissora para aplicação em processos biológicos aeróbios, que objetivam reduzir a carga orgânica e produzir etanol.

APÊNDICE A – Cinéticas de crescimento em lactose, representadas pela densidade óptica (DO_{600}) em função do tempo de cultivo

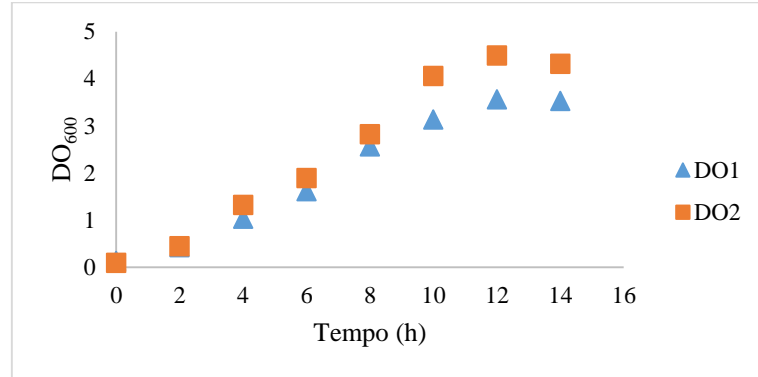


Figura A. Perfil de crescimento da linhagem P1, representada pela DO_{600} em função do tempo.

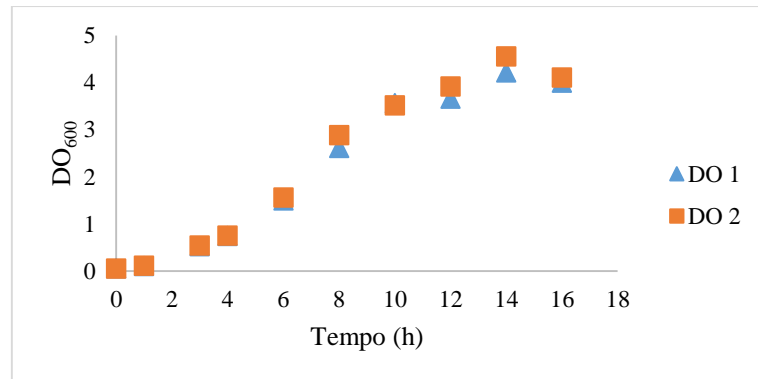


Figura B. Perfil de crescimento da linhagem PI1, representada pela DO_{600} em função do tempo.

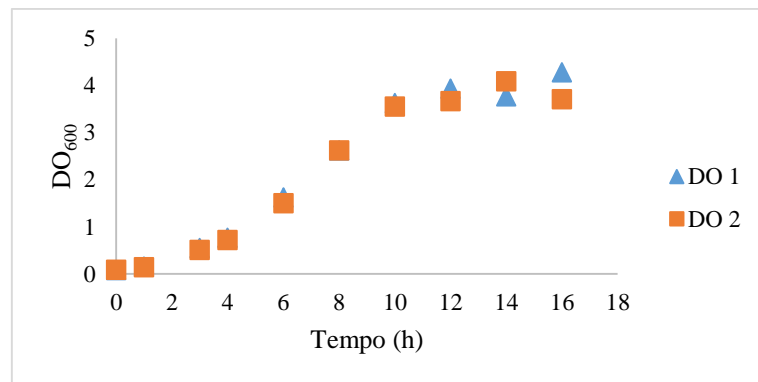


Figura C. Perfil de crescimento da linhagem PI3, representada pela DO_{600} em função do tempo.

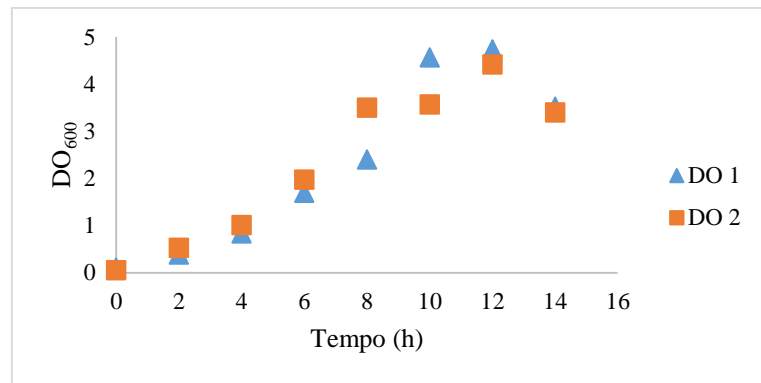


Figura D. Perfil de crescimento da linhagem SR, representada pela DO_{600} em função do tempo.

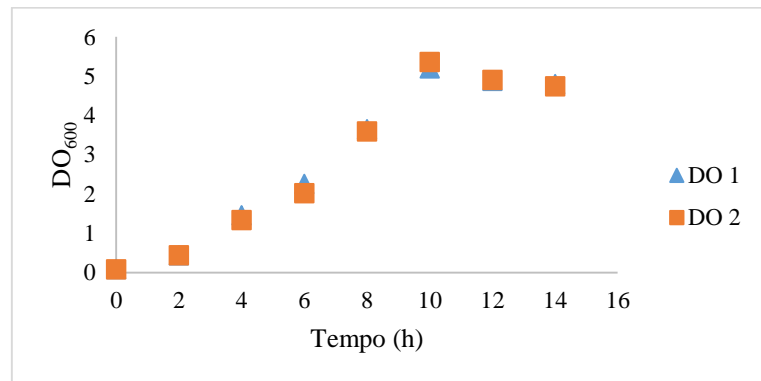


Figura E. Perfil de crescimento da linhagem 1TE, representada pela DO_{600} em função do tempo.

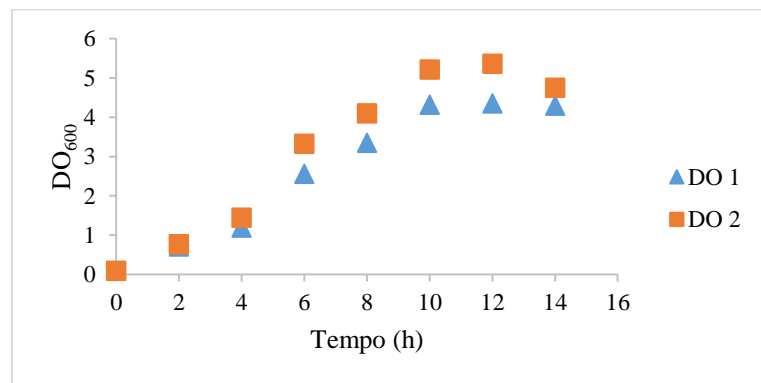


Figura F. Perfil de crescimento da linhagem STFB, representada pela DO_{600} em função do tempo.

APÊNDICE B – Cinéticas de crescimento em glicose, representadas pela densidade óptica (DO_{600}) em função do tempo de cultivo

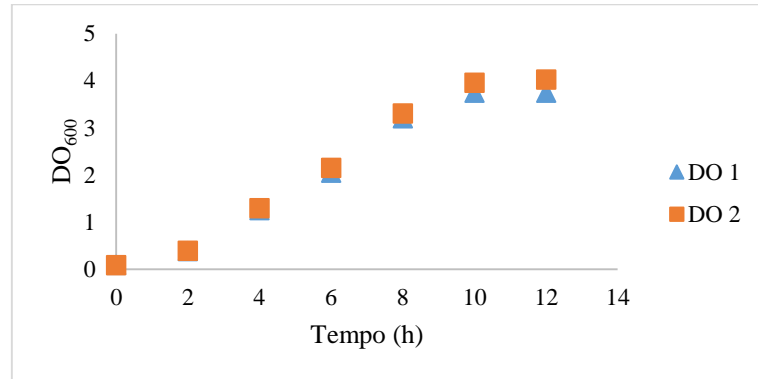


Figura A. Perfil de crescimento da linhagem P1, representada pela DO_{600} em função do tempo.

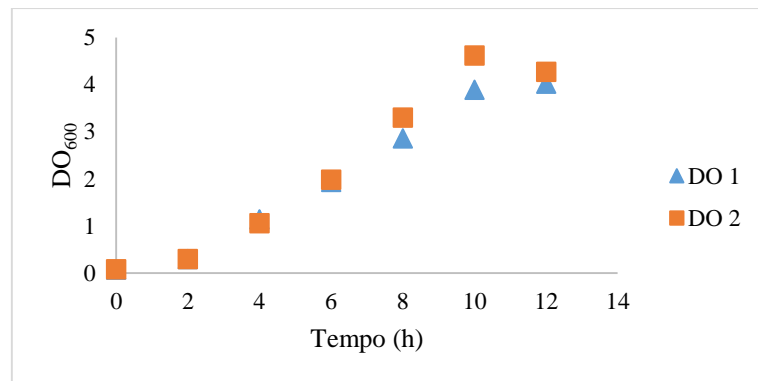


Figura B. Perfil de crescimento da linhagem PI1, representada pela DO_{600} em função do tempo.

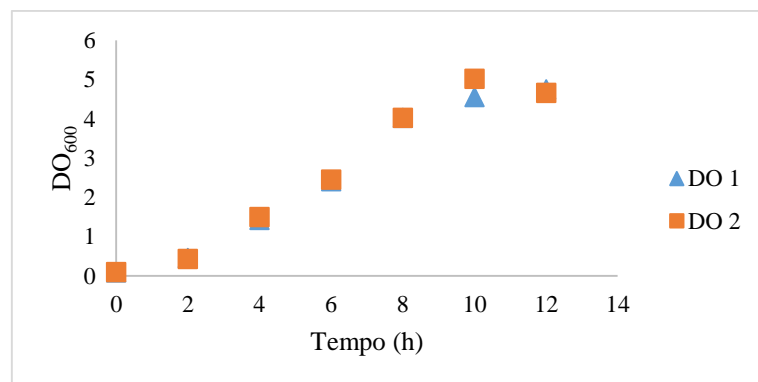


Figura C. Perfil de crescimento da linhagem PI3, representada pela DO_{600} em função do tempo.

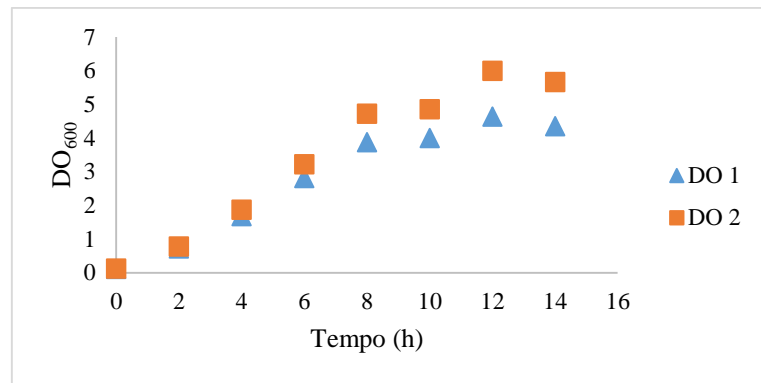


Figura D. Perfil de crescimento da linhagem SR, representada pela DO_{600} em função do tempo.

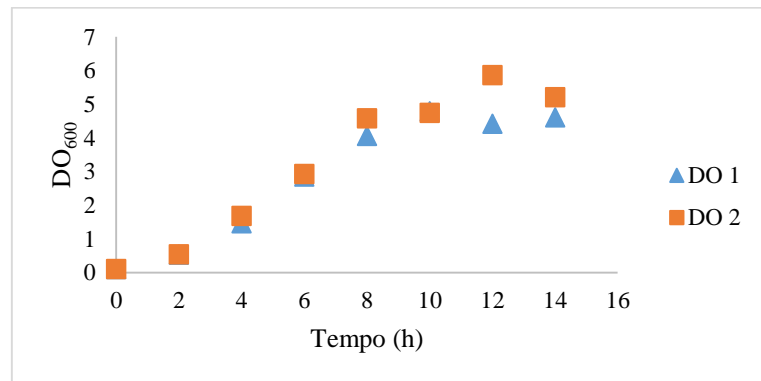


Figura E. Perfil de crescimento da linhagem 1TE, representada pela DO_{600} em função do tempo.

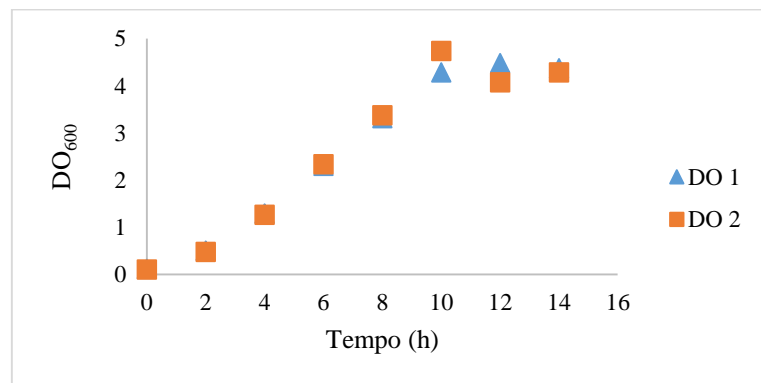


Figura F. Perfil de crescimento da linhagem STFB, representada pela DO_{600} em função do tempo.

APÊNDICE C – Cinéticas de crescimento em galactose, representadas pela densidade óptica (DO_{600}) em função do tempo de cultivo

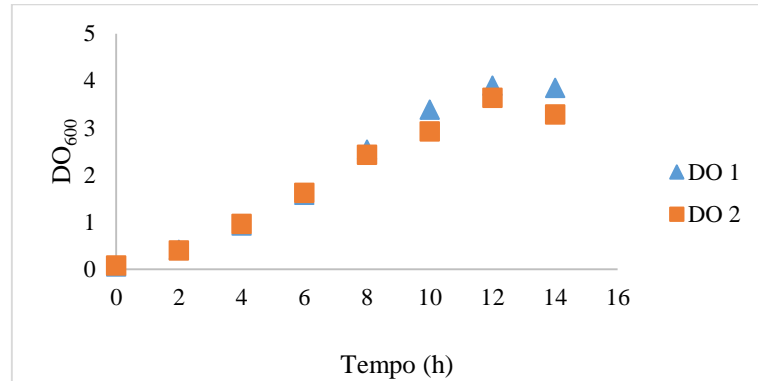


Figura A. Perfil de crescimento da linhagem P1, representada pela DO_{600} em função do tempo.

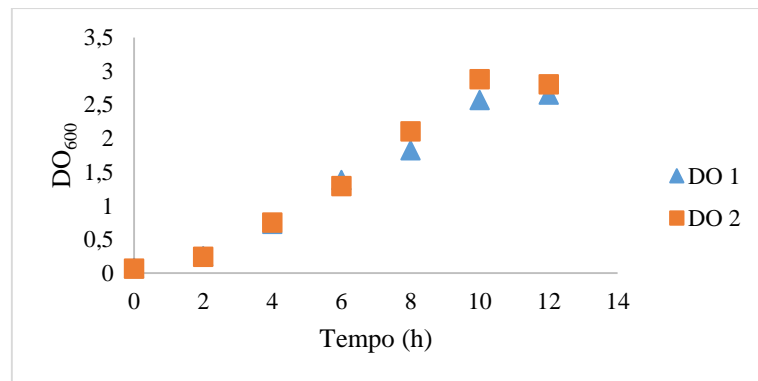


Figura B. Perfil de crescimento da linhagem PI1, representada pela DO_{600} em função do tempo.

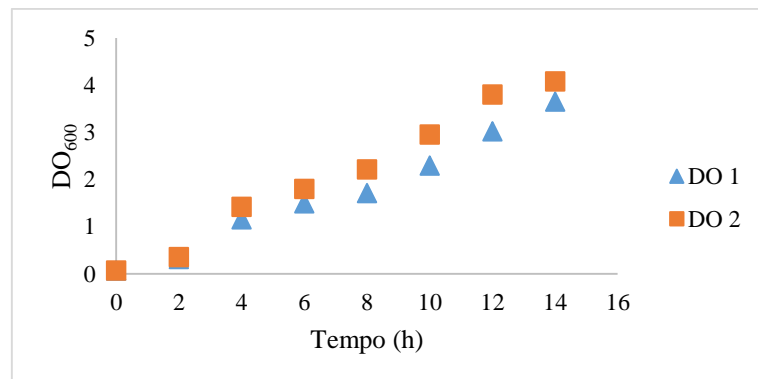


Figura C. Perfil de crescimento da linhagem PI3, representada pela DO_{600} em função do tempo.

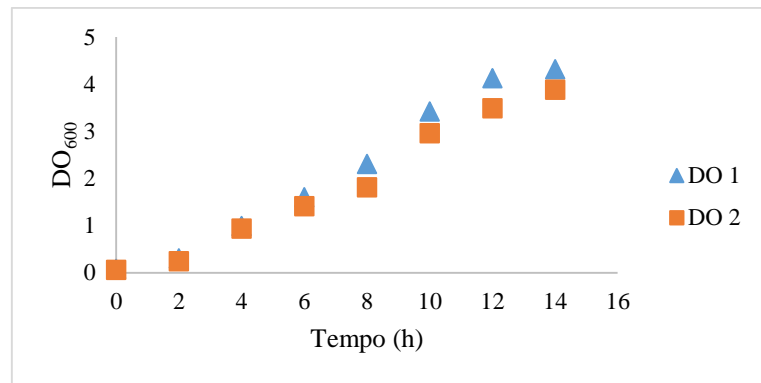


Figura D. Perfil de crescimento da linhagem SR, representada pela DO_{600} em função do tempo.

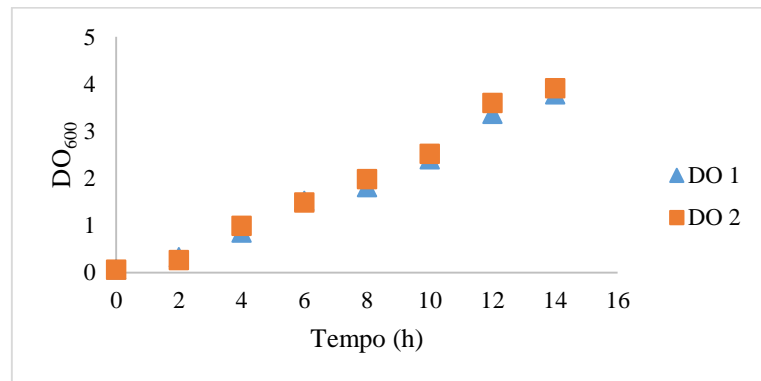


Figura E. Perfil de crescimento da linhagem 1TE, representada pela DO_{600} em função do tempo.

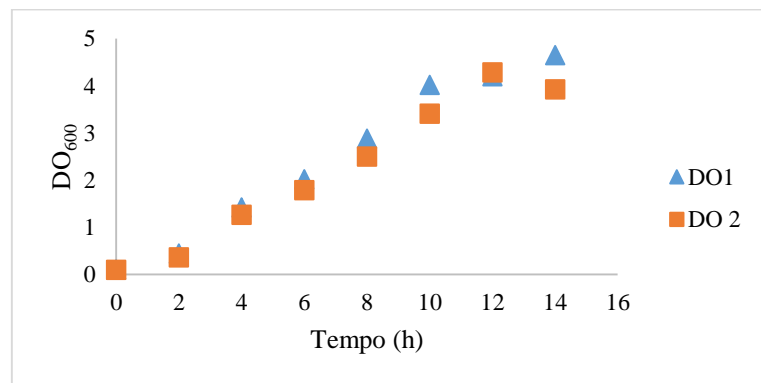


Figura F. Perfil de crescimento da linhagem STFB, representada pela DO_{600} em função do tempo.