

"CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE APROVEITAMENTO
DE SORO DE QUEIJO PARA PRODUÇÃO DE
LACTASE E ETANOL"

2.319.53

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Ranulfo Monte Alegre e aprovada pela Comissão Julgadora em 20.05.88.
Campinas, 20 de maio de 1988.

Salvador Massaguer Roig
Presidente da Banca

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE APROVEITAMENTO
DE SORO DE QUEIJO PARA PRODUÇÃO DE
LACTASE E ETANOL

RANULFO MONTE ALEGRE
Eng. Alimentos, UNICAMP, 1979

09/88

ORIENTADOR
Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig

TESE DE DOUTORADO
CAMPINAS, SP, 1988

A Deus
pela sua providência

Aos meus pais, minha esposa e
meus filhos

AGRADECIMENTOS

• Ao Prof. Dr. *Salvador Massaguer Roig* pela valiosa orientação durante o curso deste trabalho, que ultrapassou os limites do professor e orientador.

• A Prof. Dra. *Iracema de Oliveira Moraes* pela sugestão do presente tema, bem como pelo apoio prestado durante o desenvolvimento do mesmo.

• Às alunas de Pós-Graduação *Eliane Paulo Ribeiro*, *Elaise M. de Mello* e *Cristina V. Mosquim* pela colaboração na operação e limpeza da planta de ultrafiltração.

• Ao pessoal administrativo do Departamento de Engenharia de Alimentos e Departamento de Tecnologia de Alimentos.

• A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio à pesquisa-projeto "Aproveitamento de soro de queijo para produção de etanol e outros produtos", Processo nº 84/9521-6, que contribuiu para viabilizar este trabalho.

• Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo auxílio à pesquisa-projeto "Aplicação de ultrafiltração para manufatura de queijos e produtos fermentados", Processo nº 408.446/85-EA, que permitiu a aquisição, instalação e operação da unidade de ultrafiltração empregada neste trabalho.

• A Alfa-Laval Equipamentos Ltda., pelo empréstimo da membrana de ultrafiltração na fase inicial deste trabalho, previamente à viabilização de recursos pelo CNPq para a compra da mesma.

• Ao Prof. Dr. *Frank V. Kosikowski* pela cessão das culturas: *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612, *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635, *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045, *Saccharomyces fragilis* ATCC

100220 e *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415.

- A Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação -
- ABIA, pelas cópias xerográficas.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO	i
SUMMARY	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Aproveitamento de soro e permeado de soro de queijo por fermentação	3
2.2. Obtenção de etanol a partir de soro e permeado de soro de queijo	14
2.3. Obtenção e usos de β -galactosídase	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1. Equipamentos	48
3.2. Reagentes	49
3.3. Microrganismos	50
3.3.1. Microrganismos utilizados	50
3.3.2. Conservação das culturas	50
3.4. Metodologia	50
3.4.1. Pré-fermentação	50
3.4.2. Fermentação estática em meio sintético	51
3.4.3. Fermentação de meio sintético em minifermentador com pH controlado automaticamente	51
3.4.4. Esterilização dos meios de cultura	51
3.5. Obtenção e caracterização de permeado de soro de queijo	51
3.5.1. Obtenção do permeado de soro de queijo	51
3.5.2. Determinação de sólidos totais de permeado	53
3.5.3. Determinação de cinzas de permeado	53

PÁGINA

3.6. Fermentação de permeado	53
3.6.1. Adaptação das cepas de levedura em permeado concentrado	53
3.6.2. Conservação das cepas adaptadas	53
3.6.3. Fermentações não aeradas de permeado	54
3.6.4. Fermentações de permeado aeradas na fase inicial ..	54
3.6.5. Fermentações de permeado tratado com protease fúngica e aeradas na fase inicial	54
3.6.6. Fermentações aeradas de permeado suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4	54
3.6.7. Fermentação em escala piloto	55
3.7. Determinação da concentração de lactose	55
3.7.1. Centrifugação das amostras	55
3.7.2. Determinação da concentração de lactose pelo método de Fehling	55
3.7.3. Determinação da concentração de lactose pelo método de Somogyi-Nelson	56
3.8. Determinação do pH	56
3.9. Determinação da concentração de etanol	56
3.10. Determinação da massa seca de microrganismos	56
3.11. Obtenção e ensaios com lactase	56
3.11.1. Separação das células de levedura	57
3.11.2. Autólise das células de leveduras	57
3.11.3. Obtenção do extrato enzimático de lactose	57
3.11.4. Determinação da percentagem de células autolisadas.	57
3.11.5. Determinação da velocidade inicial de hidrólise de lactose	58
3.11.6. Determinação da atividade de lactose através da dosagem de glicose liberada pela ação da lactase	58

	PÁGINA
3.12. Separação das células da fermentação de 140L de permeado ..	58
3.12.1. Separação das células com uso de ultrafiltração ...	59
3.12.2. Lavagem das células	59
3.12.3. Autólise das células da fermentação de escala piloto	59
3.13. Determinação da atividade de lactase com ONPG (0-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo)	59
3.14. Método de cálculo da taxa de consumo máxima de substrato, taxa de crescimento máxima e produtividade máxima	60
3.15. Método de cálculo da taxa de consumo específica máxima de substrato, taxa de crescimento específico máxima e produtividade específica máxima	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Fermentações estáticas em meio sintético	61
4.2. Fermentações de meio sintético em minifermentador com pH controlado automaticamente	63
4.3. Fermentações em permeado de soro de queijo concentrado a 22,5% de lactose	80
4.4. Produção de etanol por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415 em função da concentração de lactose no permeado	95
4.5. Obtenção de β -galactosídase	120
4.5.1. Obtenção de β -galactosídase de células em minifermentador	120
4.5.2. Caracterização de extrato enzimático de β -galactosídase a partir de células de <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415 obtidas em fermentação escala piloto	123
4.5.3. Determinação de K_m e V_m para a β -galactosídase de <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415	127
5. CONCLUSÕES	131
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
7. APÊNDICE	144

ÍNDICE DE TABELAS

	PÁGINA
TABELA 4.1. Fermentações estáticas em meio sintético	62
TABELA 4.2. Produção de etanol em meio sintético com lactose (10%) co mo fonte de carbono e pH controlado automaticamente com KOH 0,16N	65
TABELA 4.3. Produtividade máxima, taxa de crescimento máxima e taxa de consumo máxima de lactose máxima em meio sintético com pH a 4,5 controlado automaticamente com KOH 0,16N	66
TABELA 4.4. Produtividade específica, crescimento específico e consu- mo específico de lactose em meio sintético com pH a 4,5 controlado automaticamente com KOH 0,16N	67
TABELA 4.5. Produção de etanol a partir de permeado de soro de queijo concentrado a 22,5% de lactose	82
TABELA 4.6. Fermentação não aerada de permeado de soro de queijo com 10, 15 e 22,5% de lactose por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415	96
TABELA 4.7. Fermentação por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415, aera- das com 1 VVM na fase inicial, de permeado de soro de queijo com 15 e 22,5% de lactose e permeado com 15% de lactose suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4	103
TABELA 4.8. Fermentação de permeado de soro de queijo com 17 e 22,5% de lactose, tratado com protease fúngica e aeração de 1 VVM, por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415	111
TABELA 4.9. Parâmetros cinéticos da fermentação de permeado de soro de queijo com 10% de lactose sem aeração, 15 e 22,5% de lactose e aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415.	117
TABELA 4.10. Parâmetros cinéticos das fermentações de permeado de soro de queijo, com 15% de lactose, suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 , e com 22,5% e 17% de lactose tratado com pro- tease fúngica, por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415 ...	118

TABELA 4.11. Atividade de lactase de <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415 em função do tempo de autólise - Extratos enzimáticos I, II e III	122
TABELA 4.12. Atividade de lactase de <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415 em função do tempo de autólise - Extratos enzimáticos IV, V e VI	125
TABELA 4.13. Atividade de lactase de <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415 em função do tempo de autólise - Extratos enzimáticos VII, VIII e IX	126
TABELA 4.14. Velocidade inicial de hidrólise de lactose por lactase de <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415 para os extratos enzimáticos IV, V e VI	129
TABELA 4.15. Velocidade inicial de hidrólise de lactose por lactase de <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415 para os extratos enzimáticos VII, VIII e IX	130

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 4.1. Fermentação de meio sintético por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8612, pH controlado automaticamente: 1º experimento..	68
FIGURA 4.2. Fermentação de meio sintético por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8612, pH controlado automaticamente: 2º experimento ..	69
FIGURA 4.3. Fermentação de meio sintético por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8635, pH controlado automaticamente: 1º experimento ..	70
FIGURA 4.4. Fermentação de meio sintético por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8635, pH controlado automaticamente: 2º experimento ..	71
FIGURA 4.5. Fermentação de meio sintético por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 16045, pH controlado automaticamente: 1º experimento..	72
FIGURA 4.6. Fermentação de meio sintético por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 16045, pH controlado automaticamente: 2º experimento..	73
FIGURA 4.7. Fermentação de meio sintético por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 100220, pH controlado automaticamente: 1º experimento.	74
FIGURA 4.8. Fermentação de meio sintético por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 100220, pH controlado automaticamente: 2º experimento.	75
FIGURA 4.9. Fermentação de meio sintético por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415, pH controlado automaticamente: 1º experimento.	76
FIGURA 4.10. Fermentação de meio sintético por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415, pH controlado automaticamente: 2º experimento.	77
FIGURA 4.11. Fermentação de meio sintético por <i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8659, pH controlado automaticamente: 1º experimento ..	78
FIGURA 4.12. Fermentação de meio sintético por <i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8659, pH controlado automaticamente: 2º experimento ..	79
FIGURA 4.13. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8612: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	83

FIGURA 4.14. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8612: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	84
FIGURA 4.15. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8635: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	85
FIGURA 4.16. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8635: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	86
FIGURA 4.17. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 16045: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	87
FIGURA 4.18. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 16045: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	88
FIGURA 4.19. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 100220: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	89
FIGURA 4.20. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 100220: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	90
FIGURA 4.21. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	91
FIGURA 4.22. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	92
FIGURA 4.23. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8659: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	93

FIGURA 4.24. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Candida pseudo tropicalis</i> ATCC 8659: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	94
FIGURA 4.25. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 10%	97
FIGURA 4.26. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 10%	98
FIGURA 4.27. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 15%	99
FIGURA 4.28. Fermentação de permeado de soro de queijo por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 15%	100
FIGURA 4.29. Fermentação de permeado de soro de queijo com aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	104
FIGURA 4.30. Fermentação de permeado de soro de queijo com aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	105
FIGURA 4.31. Fermentação de permeado de soro de queijo com aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 15%	106
FIGURA 4.32. Fermentação de permeado de soro de queijo com aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 15%	107
FIGURA 4.33. Fermentação de permeado de soro de queijo suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 e aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 15%	108

FIGURA 4.34. Fermentação de permeado de soro de queijo suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 e aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 15%	109
FIGURA 4.35. Fermentação de permeado de soro de queijo tratado com protease fúngica e aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 17%	112
FIGURA 4.36. Fermentação de permeado de soro de queijo tratado com protease fúngica e aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 17%	113
FIGURA 4.37. Fermentação de permeado de soro de queijo tratado com protease fúngica e aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	114
FIGURA 4.38. Fermentação de permeado de soro de queijo tratado com protease fúngica e aeração por <i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%	115

RESUMO

Foram estudadas as leveduras *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612, *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635, *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045, *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220, *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659 e *Candida pseudotropicalis* IOC 2697, com o objetivo de selecionar aquela que apresentasse o melhor desempenho em metabolizar lactose e produzir β -galactosídase.

Das leveduras ensaiadas seis demonstraram ser hábeis para fermentar lactose em meio sintético, com exceção da *Candida pseudotropicalis* IOC 2697, que utiliza lactose de forma muito lenta. Houve necessidade de controlar o pH da fermentação de meio sintético, uma vez que ocorreu a produção de ácidos pelas leveduras, o que causou diminuição do pH até a inibição das mesmas.

A fermentação de permeado de soro de queijo concentrado a 22,5% de lactose, após a adaptação das leveduras, mostrou que a *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 foi a levedura que mais consumiu lactose, chegando a produzir cerca de 47g/l de etanol.

A *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 consumiu toda a lactose do permeado quando a concentração inicial desta era de 10%, sendo que o consumo total da lactose do permeado concentrado a 15% de lactose também foi possível quando a cultura foi aerada na sua fase inicial, com uma produção de cerca de 57g/l de etanol.

Da autólise das células de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, obtidas da fermentação de permeado com 15% de lactose e aeração na fase inicial, resultou um extrato de β -galactosídase. Para o menor tempo de autólise (17 horas) obteve-se uma atividade de cerca de 41,98 μ mol de glicose liberada por miligrama de células autolisadas e por minuto, quando testada em solução 5% de lactose. A medida em que o tempo de autólise aumentou, aumentou também o número

de células rompidas, bem como a atividade de lactose medida em μmol de glicose liberada por mililitro de extrato enzimático. Contudo, a atividade medida em μmol de glicose liberada por milígrama de células autolisadas e por minuto diminuiu.

Esta enzima quando testada em soluções de lactose, apresentou um K_m médio de 60,32mM de lactose.

SUMMARY

The following yeasts: *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612, *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635, *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045, *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220, *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659 and *Candida pseudotropicalis* 10C 2697 were studied with the objective of to select the best lactose fermentative as well lactase producer.

From these yeasts six demonstrated to be able to ferment lactose in sintetic media, with exception of *Candida pseudotropicalis* 10C 2697 which is a slow lactose metabolizer. It was necessary to control the pH on the sintetic media fermentation since there was acid production by the yeasts which caused the pH decrease and the yeasts inhibition.

Saccharomyces fragilis NRRL Y-2415 showed to be the best lactose metabolizer on the fermentation of cheese whey permeate concentrated at 22.5% lactose, producing up to 47g/l of ethanol.

Saccharomyces fragilis NRRL Y-2415 consumed all the lactose present on the whey permeate when the initial concentration was 10%. The total consumption of lactose also was possible with 15% lactose whey permeate when the culture was aerated on the initial phase obtaining up to 57g/l ethanol.

A β -galactosidase extract was obtained from the autolised cells of *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 obtained from fermentation of 15% lactose whey permeate with aeration on the initial phase. For the lowest autolysis time (17 hours) it was obtained an approximated activity of 41.98 μ mol of glucose liberated per milligram of autolised cells-minute, when it was tested in a 5% lactose solution. The increase of autolysis time resulted in an increase on disrupted cells as well as in an increase of lactose activity expressed in μ mol liberated glucose per milliliter of

enzymatic extract, however the enzymatic activity expressed as μmol of liberated glucose per miligram of autolysed cells-minute decreased.

This enzyme when tested on lactose solution presented an average K_m of 60.32mM of lactose.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem sido dada atenção especial ao aproveitamento de soro de queijo, devido os problemas que são causados com seu despejo. Sua carga poluidora e seu volume são grandes, o que torna este problema sério e delicado.

Dentre as propostas de uso para o soro de queijo, muitos processos fermentativos têm sido estudados, uma vez que o soro é um meio natural de crescimento de microrganismos, pois contém os minerais e vitaminas hidrossolúveis do leite, bem como cerca de 4,9% de lactose, fonte de carbono e energia para os microrganismos que nele proliferam.

Dentre as propostas para o aproveitamento de soro de queijo via fermentação, a produção de etanol por leveduras lactose fermentativas tem sido investigada nos últimos anos, embora este processo já tenha sido estudado desde a década de 1940.

Com a implantação da ultrafiltração de soro de queijo em escala industrial, para recuperação das proteínas do mesmo, as pesquisas têm se voltado para o uso do permeado do soro, uma vez que ele apresenta problemas semelhantes aos do soro, com exceção da carga poluidora que é um pouco menor.

Da mesma forma que a fermentação do soro de queijo por leveduras lactose fermentativas, a fermentação do permeado por leveduras lactose fermentativas pode minimizar os problemas referentes à poluição, causada pelo despejo do permeado em solos ou corpos de água.

Embora a fermentação alcoólica do soro de queijo ou do permeado obtido por ultrafiltração tenha rendimentos inferiores ao da fermentação de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*, é possível a recuperação do etanol produzido por destilação.

Da massa celular de leveduras obtida durante esta fermentação, é possível extrair β -galactosídase. Esta enzima encontra inúmeras aplicações na indústria de laticínios, tais como controle da cristalização de lactose em doce de leite e sorvetes, tratamento de leite fluido destinado ao consumo por populações lactose intolerantes, etc.

No presente trabalho, pretendeu-se selecionar cepas de leveduras lactose fermentativas que produzem etanol em meio sintético, submetendo-se, em seguida, estas cepas a um processo de adaptação a altas concentrações de lactose em permeado de soro de queijo concentrado. A seguir, selecionar a melhor produtora de etanol e otimizar a produção de etanol em função da concentração inicial de lactose no permeado e tempo de fermentação. Após estabelecer as condições mais apropriadas de produção de etanol, pretendeu-se estudar a obtenção de β -galactosídase das células obtidas no final da fermentação e quantificar a atividade enzimática obtida, bem como determinar a constante de Michaelis-Menten para a enzima obtida. Finalmente pretendeu-se, também, comparar o uso de membranas de ultrafiltração para separação das células obtidas na fermentação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aproveitamento de soro e permeado de soro de queijo por fermentação

Nos últimos anos muita atenção tem sido dada à utilização do soro de queijo, não só devido à grande quantidade gerada durante a fabricação de queijos, mas também devido à sua carga poluidora e seu crescente aumento. São poucos os países, como a Dinamarca e Holanda, que utilizam todo o soro de queijo que produzem (Reesen e Strube, 1978).

A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) do soro de queijo apresenta valores altos, de 32.000 a 60.000 p.p.m., dependendo do tipo de queijo fabricado (Barraquio e col., 1979), sendo que nos Estados Unidos, em 1978, o seu volume atingiu 16.268 milhões de quilogramas, o que corresponde a 5.000kg de DBO por 100.000 litros de soro (Kosaric e Wieczorec, 1982b) e 36,5% deste total foi disposto como resíduo líquido; no Brasil, a produção de soro de queijo em 1982 foi de 2.037 milhões de quilogramas (Anuário Estatístico do Brasil, 1982).

O tratamento deste resíduo líquido implica em gastos elevados, sendo necessário construir plantas para fazer seu tratamento isolado de outras correntes líquidas, uma vez que sua elevada carga poluidora pode desequilibrar os tratamentos municipais de esgoto, chegando os custos fixos à ordem de US\$ 2.000 por kg DBO removida por dia e custo operacional da ordem de US\$ 6.250 por ano para efetuar a remoção de 1kg DBO/dia (Kosaric e Wieczorek, 1982b).

O soro de queijo contém cerca de 4,9% de lactose, 0,9% de proteínas, sais minerais e vitaminas do leite (Griswold, 1962; Kosaric e Asher, 1982a; Vinne e von Stockar, 1984), o que o torna um bom meio para o crescimento de vários microrganismos (Barraquio, 1979).

Reesen e Strube (1978) operaram uma planta para produção de etanol a partir de soro de queijo obtido por ultrafiltração. O microrganismo usado foi *Kluyveromyces fragilis* e a fermentação foi feita de forma contínua em dois estágios. A centrifugação das células foi feita de tal forma que o vinho carregou o excedente de células, sendo que o vinhoto proveniente da destilação foi digerido anaerobiamente, o que resultou numa redução de 85% da carga poluidora inicial do permeado. O gás produzido ($0,3\text{m}^3$ de gás por kg de DBO removida) continha 63% de metano, que se usado para a destilação, resultaria numa economia de 30% de energia, havendo, ainda, uma sobra de 17 a 20% em relação à energia requerida.

Barford e col. (1986), estudaram a digestão anaeróbia de soro de queijo suplementado com sais ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, MgSO_4 , MgCl_2 , KCl e FeCl_3), obtendo um líquido com Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 69.000 p.p.m., com o qual alimentaram de forma semi-contínua um pequeno reator (1,8ℓ) durante 478 dias. Durante este período fizeram várias medidas, sempre tendo o cuidado de aclimatar o lodo às novas condições do meio. O melhor resultado que obtiveram foi a remoção de $16,1\text{kg DQO/m}^3$ dia, mais de 99% de remoção da DQO solúvel, quando se usou agente floculante (polieletrólito Zetag 88N) e pH controlado automaticamente em 6,8, obtendo um gás com 50 a 60% de metano.

Devido às suas características peculiares, o soro de queijo tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores, visando seu aproveitamento por fermentação para obtenção de diversos produtos, tais como óleo (Moon e Hammond, 1979a), ácido láctico (Cox e Mac Bean, 1977), proteína microbiana (Wasserman e col., 1961), etc.

Wasserman e col. (1961), visando a produção de proteína microbiana, estudaram o crescimento de *Saccharomyces fragilis* em soro de queijo suplementado com 0,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5% KH_2PO_4 , 0,5% de levedura seca de cervejaria e pH 5,5. Valendo-se de um

fermentador de escala piloto de 3.028 litros, cuja geometria e condições de operação permitiam transferir 72% do oxigênio requerido pela levedura, obtiveram um rendimento de 0,42kg de levedura por kg de lactose consumida, isto é, um rendimento de 75% do teórico em 4 horas de fermentação e concentração de lactose de 4,8%.

Bernstein e col. (1977) trabalharam em escala industrial, usando um fermentador de 56.775 litros (15.000 gal) para produção de proteína microbiana (*Saccharomyces fragilis*), sendo o meio constituído de soro de queijo suplementado com amônia, extrato de levedura e ácido fosfórico (pH ajustado em 4,5). O fermentador foi operado de formas descontínua, semi-contínua e contínua. Neste último caso, a taxa de diluição usada foi de $0,125h^{-1}$ e conseguiu-se uma contagem de 1.10^9 células por ml e concentração remanescente de lactose da ordem de 0,5 a 0,75% (p/v). Após a centrifugação, a massa celular apresentou um teor de proteína de 35 a 50% (material com 3 a 4% de umidade) e 45 a 55% de proteína quando a massa celular foi lavada após a centrifugação.

Testes com cobaias para verificar o Coeficiente de Eficiência Protéica (PER), mostraram que a massa celular lavada apresenta uma percentagem de 91% e a massa celular não lavada, apenas 61%, quando comparadas com um padrão de caseína. Estes autores (Bernstein e col., 1977) fizeram, ainda, um estudo da produção de etanol a partir de soro concentrado em processo semi-contínuo, chegando a produzir 9% (v/v) de etanol, concluindo ser possível produzir etanol e proteína a partir de soro de queijo, embora fizessem algumas ressalvas quanto à economia do processo.

Giec e col. (1978) estudaram a obtenção simultânea de proteína microbiana e cobalamina (vitamina B_{12}) a partir de permeado de soro de queijo. Para a produção de proteína, suplementaram o permeado (4% de lactose) com 5% de $(NH_4)_2SO_4$, 0,5% de KH_2PO_4 e pH 5,7. O agente da fermentação foi *Kluyveromyces fragilis* CBS 397,

sendo que conseguiram uma concentração de massa celular de 5g/l. Para a produção de cobalamina o agente de fermentação foi *Propionibacterium shermanii*. Neste caso, além da suplementação citada anteriormente, o permeado recebeu ainda, 16mg/l de CoSO_4 e teve seu pH ajustado em 7,0, tendo obtido no final da fermentação uma massa celular de 7g/l de bactéria. Numa terceira etapa, o permeado foi suplementado como descrito acima, inoculado com levedura, deixando-se que a fermentação ocorresse por 4 horas. Após isto, o meio sofreu um tratamento térmico (100°C por 30 minutos) e após o resfriamento teve seu pH ajustado em 7,0, quando recebeu outro inóculo de bactéria. A fermentação, nesta segunda fase, prosseguiu até 48 horas (tempo total), sendo que 2,7% da lactose restante no permeado após o tratamento térmico, foi consumida. Como resultado final, obtiveram (Giec e col., 1978), $3,29\mu\text{g/ml}$ de cobalamina e 9 a 11g/l de massa celular.

Meiering e col. (1978) construíram vários fermentadores, semelhantes entre si, mas diferindo ligeiramente do modelo padrão de Rushton, uma vez que utilizaram uma relação $D_i/D_t = 0,36$, tendo também sido concebido modelos diferentes de defletores. Estes pesquisadores fizeram vários testes com soro de queijo (5% de lactose) suplementado com 5g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1g/l de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, para produção de proteína microbiana. O agente de fermentação utilizado foi *Kluyveromyces fragilis*, que teve sua temperatura e pH ótimos determinados como sendo 32°C e 4,5, respectivamente. Com um fermentador de 120 litros de meio, velocidade do agitador de 1.400 r.p.m., K_{1a} da ordem de 200 a 350h^{-1} e um inóculo de 3% do volume, Meiering e col. (1978) obtiveram uma concentração celular de 21g/l (massa total de 2,52kg de células) em 8 horas de fermentação.

Mignone e col. (1979) obtiveram a partir de soro de queijo proteína microbiana de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-1109, *Saccharomyces*

fragilis NRRL Y-1171, *Candida pseudotropicalis* NRRL Y-167 e *Candida pseudotropicalis* NRRL Y-900. Para isto eles usaram um fermentador de 10.000 litros contendo 7.000 litros de soro, velocidade do agitador de 80 r.p.m. e taxa de aeração de 0,5 a 1 VVM (volume de ar por volume de meio por minuto). Verificaram que os quatro microrganismos eram hábeis em converter soro de queijo com 40g/l de lactose em biomassa protéica, contudo, o melhor resultado obtido foi com *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-1109. A lactose do meio encontrou-se totalmente degradada em 11 horas de fermentação, tendo sido obtido no final uma densidade óptica de 22 unidades de absorbância. A massa celular resultante da fermentação apresentou 47,8% de proteína com uma composição de aminoácidos semelhante à composição da proteína de soja, com exceção do conteúdo de metionina e lisina, pouco menores que em farinha de soja.

Barraquio e col. (1979) também pesquisaram a produção de proteína microbiana de *Candida pseudotropicalis* a partir de soro de queijo. Em processo descontínuo conseguiram produzir 5,56g de células por litro, massa esta que apresentou um teor de 11,8% de proteína, para uma concentração inicial de lactose de 3,93% e final de 0,56%, aeração de 1 VVM (volume de ar por volume de meio por minuto) e 48 horas de fermentação. Em processo semi-contínuo conseguiram uma concentração celular de 15,96g de células por litro (21,4% de proteína), para um teor inicial de lactose no soro de 4,75% e residual de 0,42%, num tempo médio de 14 horas de fermentação. Estes autores verificaram, também, que a suplementação do soro com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não aumenta a produção de células de maneira sensível, produzindo 12,47g/l de células em 12 horas de processo.

Cox e MacBean (1977) produziram ácido láctico por fermentação contínua de permeado de soro de queijo, suplementado com água de maceração de milho e extrato de levedura, usando como agente de fermentação *Lactobacillus bulgaricus*. Obtiveram uma produtividade

de 10,8g/l.h de lactato quando o permeado foi suplementado com 1,2% de extrato de levedura e 7,0g/l.h quando o permeado foi suplementado com 1,7% de água de maceração de milho. A taxa de diluição usada foi de $0,3h^{-1}$, pH 5,6 controlado automaticamente com injeção de NH_4OH e temperatura de $46^{\circ}C$. Para o permeado suplementado com 1,5% de mistura 1:1 (base em sólidos) de água de maceração de milho e extrato de levedura, a produtividade foi de 13,6g/l.h.

Stieber e Gerhardt (1979) também estudaram a produção de lactato de amônio por *Lactobacillus bulgaricus* em permeado de soro de queijo. A fermentação foi feita de forma contínua, sendo que a alimentação do fermentador tinha uma concentração de 62g/l de lactose, suplementada com 2g/l de extrato de levedura; o pH do meio foi controlado em 5,5 e a temperatura em $44^{\circ}C$. Estes autores desenvolveram um modelo matemático para esta fermentação e o comprovaram experimentalmente. Usando apenas um estágio, a produtividade máxima de células (aproximadamente 2,5g/l.h), foi obtido para o tempo de retenção das células de 6,4 horas, sendo 36,8% do substrato consumido na manutenção do metabolismo. A produção de lactato foi máxima para o tempo de retenção de 26,7 horas (cerca de 60g/l), sendo 29,1% da energia do catabolismo utilizada no crescimento celular e 70,9% na manutenção. Quando estes autores utilizaram dois estágios, o tempo de retenção das células foi reduzido para 17 horas, obtendo-se resultados similares.

Os mesmos autores citados acima (Stieber e Gerhardt, 1980), um ano mais tarde, idealizaram um fermentador onde o meio pode ser reciclado através de um dializador, voltando em seguida ao fermentador. Com os dados experimentais da fermentação de permeado de soro de queijo por *Lactobacillus bulgaricus*, desenvolveram um modelo matemático para esta fermentação em permeado concentrado com 242g/l de lactose. O modelo que propuseram previa um máximo de massa celular para o tempo de retenção das células igual a 10 horas,

mas, neste caso, a massa celular também é função da razão da vazão de saída do dializador pela vazão da saída do fermentador, aumentando quando esta relação aumenta de 0,1 a 0,4. Este modelo matemático também foi comprovado, chegando a produzir 5,8g/l de células com uma produtividade de 0,58g células/l.h para tempo de retenção de 10,4 horas, contra 1,9g/l de células e produtividade celular de 0,12g/l.h do processo contínuo convencional. Os autores justificaram o uso do dializador através da necessidade de se eliminar ácido láctico e subprodutos de fermentação do meio.

Moon e Hammond (1978a) isolaram duas linhagens de *Candida curvata* e duas de *Trichosporon cutaneum* de drenos de uma planta de laticínios, que foram ensaiadas quanto ao seu potencial de produção de óleo a partir de soro de queijo e permeado de soro de queijo. Durante as suas pesquisas notaram que a composição de ambas as células variava com a temperatura e composição do meio. Das quatro cepas que tinham isolado, selecionaram uma das *Candida curvata* por ter produzido cerca de 9g/l de óleo em soro de queijo e cerca de 15g/l em permeado de soro de queijo durante 72 horas de fermentação. Desta maneira, conseguiram reduzir a DQO do soro e do permeado, mas o permeado de soro apresentou um menor valor de DQO que o soro integral após a fermentação, e isto deveu-se ao fato do soro conter proteínas. Com os dados de seu trabalho, estes autores fizeram um estudo econômico, chegando à conclusão que produzir óleo a partir de soro de queijo e permeado, com a cepa selecionada por eles, é menos dispendioso que tratar estes resíduos biologicamente para remover sua carga poluidora, mas a dispersão geográfica de produção de soro torna inatrativa a produção de óleo.

Moon e col. (1978b) estudaram a obtenção de óleo a partir de soro de queijo e permeado de soro, reconstituído a 6,5% de sólidos, utilizando como agente de fermentação *Candida curvata* R e D e *Trichosporon cutaneum* 24 e 40. Otimizaram a composição do meio e

condições de operação da fermentação para a máxima produção de óleo. Assim, para a máxima produção de células, usaram uma aeração de 0,25 VVM (volume de ar por volume de meio por minuto), suficiente para manter o oxigênio dissolvido a 80% da saturação, em um fermentador de 14 litros, enquanto que para a produção do óleo, fase de crescimento estacionário, foi necessário usar 0,7 VVM para arrastar os voláteis produzidos durante a fermentação. Para ambas as leveduras, a temperatura ótima de crescimento coincide com a temperatura ótima de produção de óleo, cerca de 30°C. O pH ótimo de crescimento já não coincide com o pH ótimo de produção de óleo, sendo 5,8 o ótimo para o crescimento de *Candida curvata* R e 5,2 para a produção máxima de óleo para este mesmo microrganismo, sendo esta a maior diferença de pH encontrada. Para a produção ótima de óleo foi ainda necessário acrescentar minerais ao soro e ao permeado, em quantidades da ordem de alguns miligramas de: $MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, KH_2PO_4 e 1ml de NH_4OH (15,5%) por litro de meio. No caso da *Candida curvata* R, a redução de DQO do soro foi da ordem de 85% em 60 horas de fermentação e 90% de redução da DQO do permeado, valores estes que não diferem muito para as outras leveduras. O tempo de fermentação foi cerca de 12 horas maior, quando o meio era constituído de permeado e minerais, do que quando o meio era soro e minerais. Este fato permitiu aos autores concluir que algum componente da fração protéica do soro, que é retida durante a ultrafiltração, foi utilizada pela levedura durante a fermentação do mesmo. A Tabela 2.1 mostra a produção de óleo que obtiveram.

TABELA 2.1. Produção de óleo por *C. curvata* e *T. cutaneum*.

	Óleo produzido g/l de meio	
	Soro integral	Permeado de soro
<i>Candida curvata</i> R	7,3	13,0
<i>Candida curvata</i> D	9,3	15,6
<i>Trichosporon cutaneum</i> 24	6,3	4,0
<i>Trichosporon cutaneum</i> 40	7,8	10,8

Fonte: Moon e col. (1978b).

Hammond e col. (1981) produziram um trabalho onde mostram os resultados de um estudo sobre a produção de óleo por *Candida curvata* a partir de permeado de soro de queijo, visando reduzir a carga poluidora do permeado. Assim, estudaram a produção de óleo e redução da carga poluidora em função da relação N:C (nitrogênio/carbono) no permeado, sendo que para se obter a relação desejada foi acrescentado ao permeado hidróxido de amônio ou lactose e/ou ainda, diluindo-se ou concentrando-se o permeado. Para as várias relações N:C testadas, a que produziu melhores resultados foi N:C igual a 0,52, com uma produção de 25,2 gramas de células por litro, 62% do peso das células em óleo (15,81g/l de óleo), num tempo de 72 horas. Observaram também que a produção de óleo é ótima para N:C igual a 0,52, enquanto que a redução da carga poluidora é maior quanto maior for a relação N:C.

Lenz e Moreira (1980) fizeram um estudo econômico da fermentação de soro de queijo por *Clostridium saccharo-acetobutylicum* para produção de butanol, acetona e etanol. Calcularam o custo de

uma planta com 16 fermentadores descontínuos, tempo de 48 horas para fermentar cada batch e uma distância média de 80Km para transportar o soro. Levando em conta o lucro que pode ser obtido da recuperação das proteínas do soro, mas não o custo da planta de ultrafiltração, os cálculos para uma produção anual (Sudeste dos EUA) de 45 milhões de quilogramas de solvente, mostraram um retorno líquido do investimento de 30,8%.

Maddox (1980) trabalhando também com produção de butanol, acetona e etanol por *Clostridium acetobutylicum* a partir de permeado de soro de queijo, suplementado com 0,5% de extrato de levedura e pH ajustado em 6,5 com NH_4OH , para uma concentração inicial de 5,3% de lactose (p/v), conseguiu uma produção de 15g/l de butanol, 1,2g/l de etanol e 0,8g/l de acetona em 7 dias de fermentação, restando ainda, 3,5g/l de lactose no meio. Esta alta quantidade de butanol produzida em relação à acetona e etanol, facilita o processo de destilação, o que reduz o custo do processo.

Marwaha e col. (1983) estudaram a produção de vitamina B_{12} pela fermentação de soro de queijo por *Propionibacterium shermanii* PS 566. A fermentação teve duração de 168 horas, sendo que durante as 84 horas iniciais, o processo foi anaeróbio e nas 84 horas finais, aeróbio. Desta forma, otimizaram a produção de vitamina B_{12} , sendo que em todos os experimentos o soro foi suplementado com 5mg/l de nitrato de cobalto e 15mg/l de 5,6-dimetilbenzimidazol, no final de 144 horas de fermentação e pH ajustado em 7,0 com NH_4OH 5N. Quanto à idade do inóculo, observaram que a máxima produção da vitamina ocorreu quando o inóculo tinha 24 horas de idade, sendo obtidos 3,05µg/ml de vitamina e utilização de 26,6g/l de lactose para uma concentração inicial de lactose de 32,8g/l. Quando o soro foi suplementado com $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ou $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, além da suplementação citada acima, conseguiram produzir 4,32 e 5,09µg/ml de vitamina, respectivamente. Noutra etapa, pesquisaram a fonte de carbono,

tendo conseguido uma produção máxima de vitamina de $4,88\mu\text{g/ml}$ quando usaram 3,6% de lactose e 0,4% de glicose.

Schoutens e Groot (1985) fizeram um estudo econômico da produção de iso-propanol, acetona e butanol; na proporção 6:3:1, a partir da fermentação contínua, um só estágio, de soro de queijo por *Clostridium beyerinckii*. Para isto, usaram dados da literatura e de experimentos de laboratório. Supondo uma fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, permeado de soro concentrado a 27,5% de sólidos e suplementado com 0,3% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,25% de CaCl_2 , e uma planta onde o meio pudesse ser reciclado através de um pré-evaporador, voltando em seguida ao fermentador. Não computando o custo do permeado (custo zero), mas computando o custo da sua concentração até 27,5% de sólidos e custo do transporte por uma distância média de 100Km, a mistura final de solventes tem seu custo aumentado de 15%. A suplementação do permeado também aumenta o custo final da unidade do produto de 15 a 20%, mesmo assim, o seu valor é de US\$ 0,27 por unidade, contra US\$ 0,30 da gasolina obtida de petróleo, mas isto, supondo um rendimento de 33% na fermentação. Estes autores afirmaram que a mistura de solventes obtida desta fermentação pode substituir ou ser usada como aditivo da gasolina.

Van Huynh e col. (1986) utilizaram permeado de soro de queijo, com uma concentração média de 4% de lactose, para produzir ácido glucônico. Para tanto, a lactose foi hidrolisada (80%) com células de *Kluyveromyces fragilis*, imobilizadas em alginato de cálcio. A solução assim obtida foi suplementada com 1% de extrato de levedura e inoculada com uma cultura de *Gluconobacter oxydans* ATCC 621, crescida em meio com 1% de glicose. A glicose presente no meio foi consumida em 24 horas de fermentação, sendo que após isto, fez nova inoculação de células de *Gluconobacter* adaptadas para consumir galactose. A galactose presente no meio foi consumida

nas 72 horas seguintes, com uma produção final de 13,9% de ácido glucônico.

Kosaric e Miyata (1981) pesquisaram o crescimento de bolores em soro de queijo integral, parcialmente desproteínizado e permeado obtido pela filtração do soro em Millipore. Nos três casos, a concentração de lactose era de 5%, sendo que todos os meios foram suplementados com extrato de levedura (5%), peptona (1%) e traços de K e Fe. As fermentações foram conduzidas em Erlenmeyers de 500ml, sendo testadas oito linhagens diferentes de bolores. A melhor produção de biomassa foi obtida por *Morchella crassipes* ATCC 3227 que tem pH ótimo ao redor de 5,0 e temperatura ótima de 28°C. Eles obtiveram a produção máxima de biomassa de 23 a 25g/l de massa celular quando usaram de 5 a 7ml de inóculo (33g massa seca/l) para cada 100ml de meio.

2.2. Obtenção de etanol a partir de soro e permeado de soro de queijo

A produção de etanol a partir de soro de queijo teve início em 1941 com Browne, conforme citado por Rogosa e col. (1947), e já em 1947, Rogosa e col. selecionaram uma linhagem de *Torula cremoris* entre dez espécies de leveduras lactose fermentativas, por ser a mais hábil a fermentar lactose.

Rogosa e col. (1947) utilizaram soro de queijo desproteínizado por acidificação e concentração de 5% de lactose. Otimizando a temperatura e pH de fermentação para a cepa selecionada, conseguiram a exaustão completa do açúcar em 55 horas de fermentação, a 30°C e pH inicial do meio entre 4,8 e 5,2. Embora tivessem feito experimentos em escala piloto, não mediram o etanol produzido, uma vez que parte dele foi perdida por evaporação e, apesar da temperatura ter subido de 30°C a 34°C, obtiveram uma degradação de

90,73% da lactose presente no meio.

O'Leary e col. (1977a) estudaram a obtenção de etanol a partir de soro de queijo "Cottage", cujo leite fora tratado com β -galactosídase. O soro assim produzido tinha no mínimo 70% da lactose hidrolisada, e para sua fermentação utilizaram dois microrganismos: *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-1109 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 834. Quando utilizaram *Saccharomyces fragilis*, a fermentação foi mais rápida quando o soro não havia sido tratado com lactase, cerca de 72 horas, enquanto que com soro tratado com a enzima, a taxa de consumo de açúcar foi menor, contudo o etanol produzido foi de 2,1% (p/p) em 150 horas de fermentação, contra 1,8% (p/p) do soro não tratado com lactase. Uma análise de monossacarídeos mostrou que a glicose é consumida nas primeiras 48 horas, enquanto que a taxa de consumo de galactose aumenta sensivelmente quando toda a glicose foi consumida. Já na fermentação do soro tratado com lactase por *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram que esta levedura consumia apenas a glicose, se ela fosse crescida em meio com glicose como única fonte de carbono e que a glicose era consumida em primeiro lugar, e posteriormente a galactose quando era proveniente de meio com galactose como única fonte de carbono. No primeiro caso (células provenientes de meio com glicose), a fermentação cessou em 24 horas, enquanto que no segundo caso (células provenientes de meio com galactose), a glicose foi consumida nas primeiras 24 horas e, só após 72 horas, a fermentação foi reiniciada, sendo a galactose consumida nesta segunda fase, quando se obteve uma produção de 1,65% de etanol, num tempo total de 168 horas.

No mesmo ano, O'Leary e col. (1977b) publicaram outro trabalho sobre produção de etanol a partir de permeado de soro de queijo, pelos mesmos microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 834 e *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-1109). Desta feita, conseguiram produzir 6,5% de etanol com *Saccharomyces cerevisiae* em permeado

tratado com lactase (80% da lactose hidrolisada) e concentrado a 30-35% de sólidos totais. Já a *Kluyveromyces fragilis* produziu 4,5% de etanol em permeado tratado com lactase e concentrado a 20% de sólidos totais e 3,8% de etanol em permeado concentrado a 11% de sólidos totais, todos os experimentos com 13 dias de duração. De maneira geral, estes autores observaram que o rendimento é cerca de 50% do teórico para concentração de sólidos totais até 30%, quando o microrganismo é a *Saccharomyces cerevisiae*. Já a *Kluyveromyces fragilis* apresenta rendimentos decrescentes, máximo de 133% e mínimo de 4% do teórico, quando a concentração de sólidos totais cresce de 5% a 40%, respectivamente, em permeado tratado com lactase. Quando o permeado não foi tratado com lactase, a *Kluyveromyces fragilis* apresentou rendimentos de 90% e 12%, quando a concentração de sólidos totais era de 5% e 25%, respectivamente.

Gawel e Kosikowski (1978a) estudaram o comportamento de cinco espécies de leveduras lactose fermentativas em permeado de soro de queijo concentrado e em meio sintético. Para isto, adaptaram as leveduras em meios com 22,5% de lactose. As fermentações que fizeram em permeado de soro de queijo (22,5% de lactose), mostraram que a *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 foi a que mais degradou lactose em 30 dias de fermentação a 30°C e pH inicial de 4,5, restando 2,6% de lactose residual e produção de 10,14% de etanol (v/v) (rendimento de fermentação de 73,4% e consumo de 89,4% da lactose presente no permeado).

No mesmo ano, estes mesmos autores (Gawel e Kosikowski, 1978b) publicaram outro artigo sobre produção de vinho a partir de permeado de soro de queijo concentrado a 24,04% de lactose e *Saccharomyces cerevisiae*. Inicialmente estudaram a hidrólise da lactose por lactase ácida em permeado concentrado a 24% de lactose, contendo 5 e 10% de etanol (adicionado ao permeado). O pH foi mantido em 4,5 e a temperatura em 30°C por 10 dias, conseguindo

80% de hidrólise com 5% de etanol adicionado ao permeado e quase 80% de hidrólise com 10% de etanol. A seguir, fizeram várias fermentações onde, juntamente com o inóculo de levedura, adicionaram também 0,25, 0,5 e 1g/l de lactase ao permeado, determinando os valores listados na Tabela 2.2 para 15 dias de fermentação.

TABELA 2.2. Características do permeado de soro de queijo após 15 dias de fermentação por *Saccharomyces cerevisiae** e lactase ácida.

Lactase adicionada (g/l)	Etanol (%)	Lactose fermentada (%)	Eficiência de fermentação (%)	pH final
0,25	8,79	94,3	75,8	3,85
0,5	9,60	97,0	80,6	3,85
1,0	9,67	98,7	81,1	3,84

* Inóculo: 2% de massa úmida de células em relação à lactose.

Fonte: Gawel e Kosikowski (1978b).

Friend e Shahani (1979) produziram etanol de permeado de soro de queijo (5% de lactose) com *Kluyveromyces fragilis*, obtendo uma percentagem de lactose residual de 0,2% e 2% de etanol em 24 horas de fermentação. Estes autores mostraram o resultado de um estudo de produção de etanol a partir de açúcares obtidos de grãos de trigo, onde metade da água usada tradicionalmente no processo de bebidas alcoólicas foi substituída por permeado de soro de queijo. A cultura inóculo tinha células de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces fragilis*; o final da fermentação foi atingido após

36 horas, tendo sido observado um aumento de 1% no teor alcoólico, o que resultou em economia de grãos, para uma concentração final de 12% de etanol.

Moulin e col. (1980a) estudaram a produção de etanol a partir de permeado de soro de queijo, usando *Saccharomyces fragilis* CBS 397 e *Candida pseudotropicalis* IP 513 como agentes de fermentação. Durante seus experimentos, mantiveram uma atmosfera de nitrogênio sobre o meio, uma vez que o permeado contém esteróides, fatores de crescimento anaeróbico, e todas as vitaminas requeridas para o crescimento de *Saccharomyces fragilis*. Variaram a concentração de lactose no permeado desde 5% até 30%, sempre encontrando rendimentos abaixo de 85% quando a concentração de lactose era maior ou igual a 20%. Estes autores verificaram que a viabilidade das células diminuiu abruptamente quando a concentração de etanol atinge 12% (v/v) em 65 horas de fermentação, para concentração inicial de lactose de 20%, no caso da *Candida pseudotropicalis* IP 513 e 11% de etanol (v/v) em 85 horas de fermentação, na mesma concentração inicial de lactose, no caso da *Saccharomyces fragilis* CBS 397. Moulin e col. (1980a) notaram que para ambos os microrganismos, as cinéticas são bastante similares, apresentando uma taxa de crescimento específico igual a $0,71 \text{ h}^{-1}$ e 12% de etanol produzido (v/v).

No mesmo ano, Moulin e col. (1980b) estudaram a inibição de *Candida pseudotropicalis* por etanol e substrato (glicose e lactose), chegando à conclusão que a inibição da fermentação pode ser descrita pela equação:

$$v = V_{\max} \cdot \exp(-KG_1P)$$

onde: v = velocidade de fermentação (g/l.h)

$V_{\max}$ = velocidade máxima de fermentação (g/l.h)

KG_1 = constante de inibição pelo etanol produzido pela levedura (l/g)

P = concentração de etanol adicionado ao meio (g/l)

Quando utilizaram lactose como substrato, observaram que ela inibe a levedura quando está presente em concentrações acima de 175g/l, enquanto que a glicose inibe a levedura em concentrações acima de 100g/l. Este fato foi explicado pelos autores por ser a lactose um dissacarídeo que tem metade do poder osmótico (pressão osmótica) em solução de mesma concentração de glicose, sendo o valor da constante de inibição para lactose (KL_1) de 0,0675l/g e, para glicose (KG_1) de 0,0359l/g, sendo bastante pronunciada a inibição da levedura em presença de 175g/l de lactose e 64g/l de etanol (Moulin e col., 1980b).

Chen e Zall (1982) pesquisaram a produção de etanol a partir de soro de queijo, utilizando *Saccharomyces fragilis* como agente de fermentação. Em fermentação descontínua, encontraram temperatura ótima na faixa de 32 a 37°C e pH ótimo entre 4,7 e 5,0, para o soro concentrado a 10% de lactose. Eles pesquisaram também o efeito da suplementação do soro com extrato de levedura, tendo conseguido produção de etanol de 24,3, 28,7 e 31,6g/l com suplementação de 0,3, 0,5 e 0,7%, respectivamente, de extrato de levedura em 59,5 horas de fermentação. Quanto ao efeito da adição de ergosterol ao soro, obtiveram uma massa celular de 2,7g/l com adição tanto de 10 como de 20mg/l de ergosterol e uma produção de etanol de 28,7, 36,5 e 28,1g/l com adição de 0,0, 10 e 20mg/l, respectivamente, de ergosterol em 44 horas de fermentação. Estes resultados indicam um aumento de 33% na produção de etanol e 54% mais massa celular quando se adicionou 10mg/l de ergosterol ao soro. Com os dados acima, estes pesquisadores fizeram uma fermentação contínua onde o meio tinha a seguinte composição: 10% de lactose (soro de queijo), 0,7% de extrato de levedura, 0,5% de $(NH_4)_2SO_4$, 0,25% de KH_2PO_4 , 10mg/l de ergosterol e pH 5,0. O fermentador consistia de um tanque em comunicação com um decantador, onde as células eram separadas do vinho e retornavam ao fermentador. Nestas condições,

conseguiram 7,6g de etanol por litro no efluente e uma produtividade de 6,9g/l.h a uma taxa de diluição de $1,1h^{-1}$ (quase quatro vezes a taxa de crescimento específico da fermentação descontínua). Resultados semelhantes a estes foram obtidos quando o meio circulou através de um ultrafiltro, que separou as células e estas retornaram ao fermentador.

Em 1983, King e Zall investigaram a produção de etanol a partir de soro de queijo e células de *Kluyveromyces fragilis* imobilizadas em alginato de cálcio. Para a imobilização das células, usaram uma solução de 2% (p/v) de alginato de sódio, que misturada na proporção 1:1 com uma suspensão de células, foi extrudada numa solução 0,2M de $CaCl_2$. Uma coluna de vidro, 4cm de diâmetro e 28,5cm de altura, foi preenchida com as esferas de alginato (1,5mm de diâmetro) que foi alimentada com soro concentrado a 100g/l de lactose. Estes autores observaram que o pH ótimo de produção de etanol é 5,0, tanto para células livres quanto imobilizadas, o mesmo acontecendo com a temperatura, $32^{\circ}C$. Para a fermentação contínua com células imobilizadas, conseguiram uma produtividade máxima de etanol de 6,3g/l.h, para uma taxa de diluição de $0,69h^{-1}$, contra uma produtividade de 1,9g/l.h para uma taxa de diluição de $0,158h^{-1}$ do processo contínuo convencional (um só estágio), isto é, um aumento de três vezes na produtividade.

Izaguirre e Castillo (1982) ensaiaram nove linhagens de leveduras lactose fermentativas e selecionaram a *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619 como sendo a melhor produtora de etanol. O meio que usaram em seus experimentos consistiu de soro de queijo desproteínizado por acidificação, com ácido sulfúrico, 2M, e teve sua concentração de sólidos solúveis variada nos níveis 7%, 14%, 21%, 28% e 35% (p/v). Quatro das linhagens que ensaiaram, consumiram toda a lactose em 72 horas de fermentação, quando o soro tinha concentração de 7% de sólidos solúveis, apresentando um rendimento de

90%. Com as quatro cepas selecionadas, eles fizeram fermentações com as mesmas em meios com os teores de sólidos citados anteriormente, observando que a *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619 apresentou o melhor rendimento, ou seja, 12,46% de etanol (v/v) em meio com 28% de sólidos (20,12% de lactose), apresentando um consumo de 88% da lactose presente. Esta mesma levedura, em 192 horas de fermentação, apresentou um rendimento de quase 100% no mesmo meio, com 28% de sólidos. Para o meio contendo 35% de sólidos solúveis, esta levedura apresentou um consumo de 51,4% da lactose e rendimento em etanol de 4% apenas.

Marwaha e Kennedy (1984) pesquisaram a produção de etanol a partir de soro de queijo, utilizando *Kluyveromyces fragilis* NCYC 179 imobilizada em alginato de cálcio e "K-Carragenato". Utilizando soro com 5% de lactose, conseguiram obter 20,9 e 20,2g/l de etanol, respectivamente, com células livres e imobilizadas. Para uma massa celular equivalente a 40g de peso seco, otimizaram a percentagem de alginato e K-carragenato para a máxima produção de etanol, chegando à conclusão que o ótimo é 2%, uma vez que em concentrações acima desta a produção de etanol diminui. O uso de concentrações de CaCl_2 da ordem de 0,1M também reduz a produção de etanol, o que não acontece quando se usa concentrações de CaCl_2 da ordem de 0,01 a 0,05M durante o processo de imobilização das células. Assim, Marwaha e Kennedy (1984) concluíram que as condições ótimas para imobilização das células é 2% de alginato de sódio e solução 0,05M de CaCl_2 , uma vez que as esferas de K-carragenato desmancham-se com certa facilidade, liberando as células. A temperatura e pH ótimos foram encontrados como sendo 30°C e 5,5, respectivamente e concentração de lactose de 9,8%. Com estas condições ótimas estabelecidas, estes autores operaram durante 23 dias uma coluna (5cm de diâmetro e 10,6cm de altura) carregada com esferas de alginato, tendo conseguido uma produtividade de 44,4g/l.h

de etanol, para uma taxa de diluição de $0,15h^{-1}$, obtendo 87% de conversão da lactose.

Janssens e col. (1984) reportam um estudo de fermentação contínua de soro de queijo desproteínizado com reciclagem de células. Estes autores usaram *Kluyveromyces fragilis* CBS 397 como agente de fermentação e o meio constituído de permeado de soro de queijo suplementado com 0,5% de peptona, ergosterol, ácido oléico e linolênico nas concentrações de 5, 10 e 45mg/l, respectivamente. A concentração de lactose foi variada nos níveis de 10, 12, 15 e 20%. Foi utilizado um fermentador com volume útil de 3 litros e o circuito de separação das células, constituído de um ultrafiltro com volume útil de 150ml. O reciclo das células sempre foi de 100%, temperatura da fermentação de $30^{\circ}C$, pH 4,5 e velocidade do agitador de 350 r.p.m. Para a concentração de lactose na alimentação de 100g/l, taxa de diluição de $0,15h^{-1}$, houve uma produção de 47,3g/l de etanol e uma produtividade de 7,1g/l.h, zero de lactose residual e eficiência de 88%. Para a concentração de lactose na alimentação de 120g/l, conseguiram os mesmos valores, com exceção da lactose no efluente, 15g/l. O reciclo das células de 100%, causou dificuldades para se manter o estado estacionário após 10 dias de operação, provavelmente devido ao acúmulo de células não viáveis, concluíram os pesquisadores.

Maioresella e Castillo (1984) selecionaram a *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619, entre nove cepas de leveduras lactose fermentativas, como sendo a melhor produtora de etanol, uma vez que produziu 9,7% de etanol em permeado de soro de queijo concentrado a 20,1% (p/v) de lactose nas suas condições ótimas de trabalho, temperatura de $30^{\circ}C$ e pH 4,5. Quanto à produção de biomassa, selecionaram a *Kluyveromyces fragilis* NCYC 587, uma vez que este microrganismo produziu a maior quantidade de células em permeado suplementado com 0,3% de extrato de levedura, 0,6% de $(NH_4)_2SO_4$ a $40^{\circ}C$

e pH 5,0, conseguindo uma produção de 0,4 gramas de célula por grama de lactose utilizada. Esta massa celular apresentou 55% de proteína, 9,5% de ácidos nucleicos, 42% de carboidratos e 1,1% de fósforo. Quanto à produção de lactase, selecionaram a *Candida pseudotropicalis* NCYC 744, que produziu 4,4 unidades da enzima por miligrama de célula, quando cresceu a 30°C e pH 3,5 em soro de queijo com 2% de lactose, suplementado com 0,1% de extrato de levedura e 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Estes autores (Maiorella e Castillo, 1984), fizeram um estudo econômico para os três processos: produção de etanol a partir de permeado concentrado a 127g/l de lactose (16 horas de fermentação), produção de biomassa e produção de lactase. Para os três processos, chegaram à conclusão que qualquer um deles é menos dispendioso que o tratamento do permeado com resíduo líquido (US\$ 7.300 por 1.000kg de permeado a ser tratado). Os custos e redução de DBO para os três processos estão resumidos na Tabela 2.3.

TABELA 2.3. Custos da redução de DBO de permeado de soro de queijo utilizado para produção de etanol, biomassa e lactase.

	Custo US\$/1.000kg de permeado	Redução de DBO
Produção de etanol	13,7	90%
Produção de biomassa	24,4	95%
Produção de lactase	*	90%-95%

* A produção de lactase apresenta um lucro de US\$ 534,90/1.000kg de permeado.

Fonte: Maiorella e Castillo (1984).

Mehaia e Cheryan (1984) utilizaram um módulo de ultrafiltração (marca Romicon, modelo HF 22-20-PM 10) para fazer uma fermentação alcoólica contínua com células imobilizadas. Fizeram três experimentos, dois utilizando meio sintético (50 e 150g/l de lactose, 5g/l de peptona, 3g/l de extrato de levedura e 3g/l de extrato de malte) e um outro utilizando permeado de soro de queijo. O microrganismo utilizado foi *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415, temperatura de 28 a 30°C e pH inicial de 5,1 a 5,4. A Tabela 2.4 a seguir mostra os resultados que obtiveram.

TABELA 2.4. Produção contínua de etanol em meio sintético contendo lactose e permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415.

	Lactose (g/l)	Produtividade (g/l.h)	Taxa de diluição (h ⁻¹)	Conversão (%)
Meio sintético	50	60	4	95
Meio sintético	150	120-135	3-6	30-60
Permeado de soro	45	34	2,7	55

Fonte: Mehaia e Cheryan (1984).

A massa celular presa no interior da unidade de ultrafiltração era de 85g/l quando se usou meio sintético e 100g/l quando se usou permeado. Para obter uma conversão de 99% da lactose presente no permeado em etanol, foi necessário reduzir a taxa de diluição para 1,3h⁻¹, o que resultou numa produtividade de 30g/l.h. Estes autores justificaram o aumento de massa no interior da unidade de ultrafiltração quando usaram permeado, com base no fato que

neste meio a produtividade é menor (cerca da metade) que em meio sintético, terminando por sugerir que o permeado deva ser suplemen- tado para se obter um rendimento melhor e sugeriram, ainda, que o permeado possa ter algum componente que inibe a *Kluyveromyces fragilis*.

Vienne e von Stockar (1985a) estudaram a inibição de *Kluyveromyces fragilis* NRRL 565 por etanol e fizeram várias tentativas para diminuir ou eliminar estes efeitos de inibição da levedura pe- lo etanol. Para isto, utilizaram permeado de soro de queijo con- centrado a 90g/l de lactose e suplementado com 8,2g/l de extrato de levedura (meio básico), 38°C e pH 4,0 e um fermentador de volume útil de 1.350ml, tendo realizado várias fermentações contínuas. Observaram que ao dobrar a concentração da lactose de 46 para 90g/l, o rendimento celular em g células/g lactose (g/g) é reduzido de 0,071g/g para 0,042g/g. A adição de 20g/l de etanol na ali- mentação reduziu, respectivamente, a taxa de crescimento específico e o rendimento celular de 42% e 50%. A maior taxa de crescimento específico obtida ($0,21h^{-1}$) foi quando acrescentaram vitaminas ao meio básico (biotina e ácido fólico, ambos em concentração de 0,01mg/l, 10mg/l de inositol, ácido nicotínico, vitamina B₂, vitamina B₆ e tiamina, todos em concentração de 1,6mg/l) e o maior ren- dimento celular (0,071g/g) quando adicionaram ao meio básico (alanina, cistina, triptofano, tirosina e treonina, todos em concen- tração de 50mg/l), mesmo com adição de 21,5g/l de etanol na ali- mentação. Finalmente, observaram que o rendimento $Y_{p/s}$ reduziu de 53% (0,23g/g) e o rendimento celular caiu a 0,05g/g quando a con- centração de etanol na alimentação aumentou de 18-20g/l para 31g/l.

Zertuche e Zall (1985) produziram etanol a partir de soro de queijo desproteínizado e *Kluyveromyces fragilis*. As fermenta- ções foram feitas de forma descontínua em Erlenmeyers e contínuas em fermentador de 2,9 litros útil, sendo que ensaiaram vários meios:

soro suplementado com ergosterol (0,01g/l); soro suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5,0g/l), KH_2PO_4 (2,5g/l), extrato de levedura (5,0g/l) e ergosterol (0,01g/l) e solução de lactose com a mesma composição de sais e ergosterol deste último meio. Com o objetivo de otimizar a produção de etanol, conseguiram os resultados expostos na Tabela 2.5.

TABELA 2.5. Fermentação anaeróbia de diferentes meios por *Kluyveromyces fragilis*.

	Tempo de duplicação das células (h)	Produção de etanol % do rendimento teórico
Permeado	24	31,8
Permeado + Ergosterol	12	45,5
Permeado suplementado	3,8	70,0
Lactose suplementada	5,8	57,0

Fonte: Zertuche e Zall (1985).

Em fermentações aeradas (Zertuche e Zall, 1985), chegaram à conclusão que a taxa de aeração ótima (2,9 litros de meio) é de 0,55 VVM, quando foi obtida uma produção de 0,51 gramas de etanol por grama de células e 0,15 gramas de células por grama de lactose consumida. No transcorrer da fermentação contínua, observaram que a concentração final de etanol aumentou de 16,5 para 26,5g/l quando o pH variou de 7,0 a 4,0, para uma concentração de 50g/l de lactose. Durante o processo contínuo, otimizaram a produção de etanol, obtendo uma produção de 80% do teórico em meio com 100g/l de lactose,

taxa de diluição de $0,8h^{-1}$ e taxa de aeração de 0,14 a 0,75 VVM, contra 70% do rendimento teórico para o processo descontínuo.

Hahn-Hägerdal (1985) estudou a produção de etanol a partir de permeado de soro de queijo, concentrado em diversos níveis, com células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas com β -galactosídase, *Saccharomyces cerevisiae* adaptada a consumir galactose e *Kluyveromyces fragilis*. A imobilização foi feita em esferas de alginato de cálcio, com as quais foram recheadas três colunas de 7ml, contendo 7,33g de esferas de alginato. As fermentações foram conduzidas de forma contínua, com uma vazão de 0,6ml/h de meio, o que correspondeu a uma taxa de diluição de $0,09h^{-1}$. Quando utilizou a coluna com *Kluyveromyces fragilis*, o melhor resultado obtido foi com permeado concentrado a 45g/l de lactose, obtendo uma produtividade de 1,1g/l.h e rendimento de 57% de teórico. Com a coluna de *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizada com β -galactosídase, obteve rendimento igual ao teórico, quando o permeado tinha concentração de 100g/l de lactose e uma produtividade de 4,5g/l.h. Para permeado concentrado a 150g/l de lactose, a degradação total do açúcar só foi possível com a passagem do meio através da coluna com *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizada com β -galactosídase, seguida da coluna com *Saccharomyces cerevisiae* adaptada a consumir galactose, tendo conseguido uma produtividade de 2,5g/l.h.

A Tabela 2.6 resume os resultados obtidos por Hahn-Hägerdal (1985).

TABELA 2.6. Fermentação de permeado de soro de queijo por *K. fragilis* e *S. cerevisiae*.

	Lactose (g/l)	Produtividade (g/l.h)	Etanol (g/l)
<i>K. fragilis</i>	45,0	1,1	13
<i>S. cerevisiae</i> + lactase	100	4,5	52
<i>S. cerevisiae</i> + lactase + <i>S. cerevisiae</i> adaptada a consumir galactose	150	2,5	71

pH = 4,5 e temperatura 30°C.

Fonte: Hahn-Hägerdal (1985).

Bothast e col. (1986) estudaram a produção de etanol em meio sintético contendo lactose como única fonte de carboidrato (5g/l de peptona e 3g/l de extrato de levedura). Ensaíram 107 linhagens de leveduras lactose fermentativas, sendo 73 linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, 26 de *Kluyveromyces lactis*, 2 de *Candida pseudotropicalis*, 1 de *Candida versatilis*, 3 de *Bettanomyces anomalus*, 1 de *Triscoporon melibiosaceum* e 1 de *Bettanomyces claussenii*. Como resultado, obtiveram uma produtividade específica média de 0,43g/l.h para as 107 linhagens, sendo que a produtividade específica média das 13 linhagens que melhor desempenho mostraram foi de 0,69g/l.h em meio contendo 5% de lactose. Quando o meio tinha 10% de lactose, a média geral de produtividade específica foi de 0,31g/l.h e a produtividade específica média das 10 que apresentaram melhor desempenho foi de 0,45g/l.h. Para a concentração de 20%, os valores acima diminuíram para 0,18g/l.h e 0,31g/l.h (média das cinco que apresentaram melhor desempenho), fato que levou estes

pesquisadores a concluírem que a produtividade específica diminui com o aumento da concentração de lactose.

Vienne e von Stockar (1985b) produziram etanol a partir de permeado de soro de queijo, usando como agentes de fermentação *Kluyveromyces fragilis* NRRL 665 e *Kluyveromyces lactis* NCYC 571. Em fermentação descontínua, fermentador de 1.350ml (volume útil), com *Kluyveromyces fragilis* NRRL 665, conseguiram uma taxa de crescimento específico de $0,276 \text{ h}^{-1}$, rendimento em etanol de 91,1% do teórico e rendimento celular de 0,042g/g em permeado concentrado a 106g/l de lactose. Em cultura contínua, com o mesmo microrganismo e permeado com 86g/l de lactose e suplementado com 8,15g/l de extrato de levedura, obtiveram uma concentração residual de lactose de 45g/l, produtividade máxima de 4,6g/l.h a uma taxa de diluição de $0,05 \text{ h}^{-1}$. Quando o permeado tinha 150g/l de lactose, o rendimento em etanol caiu a 46% do teórico, com taxa de diluição igual a $0,083 \text{ h}^{-1}$. A faixa de concentração máxima de etanol conseguida, com *Kluyveromyces fragilis*, foi de 50 a 70g/l, que resultou da conversão de 100 a 150g/l de lactose em fermentação contínua com reciclo de células, separadas por uma membrana de ultrafiltração (PM 10.000), concentração celular de 20 a 25g/l. Para a *Kluyveromyces lactis* NCYC 571, usou-se um decantador para reciclar as células devido à sua característica de formar flocos. Desta forma, conseguiram uma concentração celular de 21g/l, produtividade de 9,3g/l.h, 45g/l de etanol com uma taxa de diluição de $0,2 \text{ h}^{-1}$ em permeado concentrado a 95g/l de lactose.

2.3. Obtenção e usos de β -galactosídase

Jasewicz e Wasserman (1961) quantificaram a atividade de lactase de alguns microrganismos que cresceram em soro de queijo suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1% p/v), KH_2PO_4 (0,5% p/v), extrato de levedura (0,1% p/v) e pH 7,0 (ajustado com KOH). A Tabela 2.7 mostra

os resultados que obtiveram.

TABELA 2.7. Atividade de lactase de vários microrganismos.

	Atividade Unidades/mg peso seco de células
Bactéria A	7,56
Bactéria B	13,4
Levedura A	14,25
Levedura B	19,80
<i>Aerobacter cloacae</i>	2,89
<i>Escherichia coli</i>	5,0
<i>Saccharomyces fragilis</i>	2,2

1 unidade = 1µmol glicose liberada por minuto.

Fonte: Jasewicz e Wasserman (1961).

A lactase exibiu temperatura ótima de 37°C e pH ótimo na faixa 5,9-6,8.

Mustranta e col. (1979) selecionaram uma linhagem de *Aspergillus niger* que produz lactase extracelular. Para este microrganismo fizeram um estudo qualitativo da composição do meio para se obter o melhor rendimento de lactase. Viram que a lactose é a melhor fonte de carbono, porém, é possível produzir a enzima a partir de farelo de trigo. A excreção de lactase pelo *Aspergillus niger* tem início após a fase de crescimento exponencial, sendo a atividade máxima encontrada 3 a 4 dias após. Seu pH ótimo é 4,0 e temperatura ótima 62°C, mas a 45°C o pH ótimo é 3,0, sendo sua

estabilidade à temperatura ambiente considerada alta por estes autores.

Park e col. (1979) obtiveram β -galactosídase extracelular de uma linhagem de *Aspergillus oryzae* cultivada em meio semi-sólido (farelo de trigo) e em meio líquido (amido solúvel de batata). A enzima foi precipitada com solução de sulfato de amônio (80% saturada) seguida de purificação por cromatografia em colunas de DEAE-celulose, carboximetil celulose e DEAE-sefadex A-50. A lactase obtida da cultura em farelo de trigo apresentou atividade de 0,9 unidades por mg de proteína (60 horas de fermentação), e a de meio líquido 0,5 unidades por mg de proteína (120 horas de fermentação). O pH ótimo foi determinado como sendo 5,0 e a temperatura ótima 55°C; o extrato cru tem maior resistência térmica que a enzima purificada, sendo que também não perdeu atividade quando pernoitou em solução de pH 3,6 a 8,0, inclusive. Ela não apresentou inibição em presença de sais: $MgSO_4$, $MnSO_4$, $CaCl_2$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ e KCl , todos em concentração de 1mM, não sendo também inibida por glicose até concentração de 400mM, mas perdeu 15% de atividade em presença de galactose (0,25mM). As constantes da equação de Michaelis-Menten da enzima para ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) e lactose estão na Tabela 2.8.

TABELA 2.8. Constantes cinéticas de lactase de *Aspergillus oryzae*.

	ONPG	Lactose
V_{max} ($\mu g/min \cdot mg$ proteína)	55,6	2,4
K_m (mM)	0,77	50

Fonte: Park e col. (1979).

Ensaio em soro de queijo com a enzima resultaram em: 83% de hidrólise de lactose a 55°C e 72 horas, 76% de hidrólise a 50°C (72 horas), sendo que a 60°C a atividade foi grandemente reduzida.

Pastore e Park (1980) isolaram uma linhagem de *Scopulariopsis* sp de solo que produz β -galactosídase extracelular. Produziram esta enzima em cultura de *Scopulariopsis* em farelo de trigo e a purificaram por precipitação com sulfato de alumínio (80%), seguida de cromatografia em DEAE-celulose e CM-celulose. Após a purificação obtiveram uma atividade de 142 unidades de ONPG por mg de proteína, mas um rendimento de 4% apenas, sendo que o seu pH ótimo está na faixa de 3,6 a 5,0 e temperatura ótima de 65°C.

Wierzbicki e col. (1974b) trabalharam com β -galactosídeses de *Aspergillus niger*, *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces lactis*, imobilizadas em esferas de vidro tratadas com ácido e tolueno a 110°C ou acetona a 45°C por 24 horas. A Tabela 2.9 mostra a temperatura e pH ótimos para as três lactases imobilizadas.

TABELA 2.9. Temperatura e pH ótimos de lactase de *Aspergillus niger*, *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces lactis*.

	<i>A. niger</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>S. lactis</i>
pH ótimo	3,5-4,5	6,7	6,7
Temperatura ótima (°C)	55	55	35

Fonte: Wierzbicki e col. (1974b).

A lactase de *Aspergillus niger* mostrou boa estabilidade a 55°C, apresentando bastante atividade após 165 dias, cujas esferas

foram colocadas em uma coluna de vidro de 1,6cm de diâmetro e cerca de 2ml (volume útil). Para esta coluna, os autores determinaram para soro ácido de queijo, a relação:

$$X = 1,72 (v/f) + 12,5$$

onde: X = concentração de lactose hidrolisada (%)

v = volume da coluna (2,0ml)

f = vazão de soro (ml/min)

Mahoney e col. (1975) extraíram lactase de 41 linhagens de leveduras cultivadas em meio sintético e em soro de queijo desproteínizado por acidificação e aquecimento e suplementado com 0,3% de K_2HPO_4 , 0,5% de extrato de levedura e 0,3% de NH_4OH 5N (v/v), pH 5,0 e 30°C. Para a *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-1109, nas condições ótimas de produção da enzima em meio sintético, 15% de lactose e aeração de 0,2µmol O_2 /l.min, encontraram uma atividade de 2,46 unidades por mg de peso seco de células (1 unidade de atividade é igual à quantia de enzima que libera 1µmol de glicose em 1 minuto em condições estabelecidas) em solução 15% de lactose e 37°C. Quando usaram soro desproteínizado e concentrado a 15% de lactose, encontraram 5,13 unidades de atividade enzimática por mg de peso seco de células. Estes autores induziram a produção de lactase adicionando ao meio 0,5mM de isopropiltiogalactopiranosídeo, 1% de glicerol ou 1% de succinato de sódio, porém não observaram aumento na produção de lactase, contrariamente ao que ocorre com *Escherichia coli*. As condições de autólise das células para a extração da lactase determinada por Mahoney e col. (1975) foram: tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0, 22°C por 40 horas, sendo que a adição de tolueno, de 2 a 5%, na suspensão celular não aumenta o rendimento de extração. O melhor rendimento de extração foi obtido quando as células foram secadas ou liofilizadas antes da extração, obtendo-se

11,4 e 12,5 unidades por milígrama de proteína, respectivamente, sendo que a precipitação com acetona concentra a lactase de 2 a 5 vezes.

Pomar e col. (1977) produziram β -galactosídase de *Saccharomyces fragilis* em meio de cultura contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,0%, autolisado de levedura de cervejaria - 0,2%, pH 4,5 a 4,7 controlado com NH_4OH 25%, aeração de 0,75 a 0,9 VVM em quimiostato de 1.000ml. As células obtidas foram divididas em dois lotes, sendo um lote se cado em spray e o outro em estufa a vácuo a 38-40°C e 750-755mm Hg. As células secas foram trituradas e sua atividade de lactase ensaiada em solução 5% de lactose, pH 6,5 e leite pasteurizado, cujos resultados estão na Tabela 2.10.

TABELA 2.10. Percentagem de lactose hidrolisada por lactase de *Saccharomyces fragilis*.

Tempo (h)	Solução de lactose		Leite pasteurizado	
	Enzima I	Enzima II	Enzima I	Enzima II
1	37	60	60	36
2	72	100	100	76
3	—	—	100	100

Temperatura de hidrólise = 37°C.

Enzima I = células secadas em spray.

Enzima II = células secadas em estufa a vácuo.

Fonte: Pomar e col. (1977).

Mahoney e Whitaker (1978) purificaram β -galactosídase de *Kluyveromyces fragilis* cultivada em soro de queijo concentrado a 15% de lactose. Após precipitação com acetona do autolizado das células, a enzima foi purificada por cromatografia, inicialmente eluída em coluna de p-aminofenil- β -D-tiogalacopiranosídeo (PAPTG) e sefarose 4B, seguida de outra cromatografia em coluna de hidroxiapatita e duas outras em DEAE-Sefadex A-50. A atividade da lactase após cada etapa de purificação está na Tabela 2.11.

TABELA 2.11. Sumário da purificação da β -galactosídase de *Kluyveromyces fragilis*.

Etapas	Volume (ml)	Atividade - unidades (μ mol ONPG por ml)	Proteína (mg/ml)
Extrato celular	500	225	14,80
PAPTG	100	738	3,81
Hidroxiapatita	174	403	1,98
DEAE-Sefadex A-50	220	310	1,39
DEAE-Sefadex A-50	103	659	2,91

ONPG = o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo.

Fonte: Mahoney e Whitaker (1978).

Mahoney e Whitaker (1978) determinaram, a seguir, as características físico-químicas para a enzima purificada, tendo obtido: peso molecular das duas maiores subunidades 90.000 e 120.000, ponto isoelétrico 5,1 e a microscopia eletrônica revelou um diâmetro de 160⁰Å com 9 a 10 subunidades.

Toda e col. (1979) estudaram a produção de β -galactosídase por células de *Saccharomyces fragilis* cultivadas em cultura contínua, tendo como variável a taxa de diluição. As condições de fermentação foram: galactose (1g/l), 30°C, pH 5,0, taxa de aeração de 1 VVM e reator de 2.000ml. A produção máxima de β -galactosídase foi de 8 unidades (μ mol ONPG hidrolisado por ml e por minuto) na taxa de diluição de 0,1 h⁻¹.

Bales e Castillo (1979) produziram β -galactosídase de *Candida pseudotropicalis* NCYC 744, cultivada em soro de queijo com 2% de lactose e suplementado com (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, extrato de levedura, pH inicial igual a 3,5, 30°C e 24 horas de fermentação. Na Tabela 2.12 estão os resultados que obtiveram.

TABELA 2.12. Atividade de lactase de *Candida pseudotropicalis* em função da complementação do soro de queijo.

	Concentração (%)	Lactase (unidades ONPG/mg de célula)
Extrato de levedura	0,20	2,27
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10	2,68
KH ₂ PO ₄	0,05	1,80

$$K_m = 3,06 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

$$V_{\max} = 6,63 \cdot 10^{-8} \text{ M/min.}$$

Fonte: Bales e Castillo (1979).

Ensaíos com soro de queijo e leite mostraram que é possível obter 100% de hidrólise em 4 a 5 horas a 37°C. Esta enzima

quando precipitada com acetona e liofilizada reteve 95% de atividade de a -20°C , 85% de atividade a 5°C e 40% a 26°C , durante três meses de estocagem, em todos os casos.

Gonzales e Berry (1982) produziram β -galactosídase por fermentação de *Saccharomyces lactis* NCYC 416 em quatro substratos: succinato, glicose, lactose e β -metil-tio-D-galactopiranosídeo. Quando usaram lactose 0,03M, obtiveram uma atividade de 152 unidades de ONPG (1 unidade = 1 μ mol de ONPG hidrolisado por mL e por minuto nas condições do seu experimento) e 642 unidades quando usaram β -metil-tio-D-galactopiranosídeo, que é um indutor gratuito da enzima, na concentração de 0,02M, enquanto que a glicose reprimiu a síntese da enzima em concentrações acima de 10^{-4}M .

Barbosa e col. (1985) selecionaram uma linhagem de *Kluyveromyces fragilis* como a melhor produtora de lactase entre outras leveduras. Uma cultura desta levedura em soro de queijo desproteínizado e suplementado com sulfato de amônio (0,3%), extrato de levedura (0,1%) e lactose (3%), mostrou que a máxima produção de lactase ocorre na metade da fase de crescimento exponencial, quando obtiveram uma atividade de $0,5 \cdot 10^{-11}$ μ mol de ONPG hidrolisado por célula e por minuto. As condições em que fizeram a cultura foram: fermentador de 15 litros, agitação de 700 r.p.m., taxa de aeração de 1 VVM, temperatura de 35°C , 16 horas de fermentação e taxa de crescimento específico máximo de $0,58 \text{ h}^{-1}$.

Banerjee e col. (1982) cultivaram *Saccharomyces anamensis* em meio contendo glicose e, logo após a exaustão deste substrato, adicionaram lactose ao meio para estimular a produção de lactase. As condições ótimas de crescimento foram: pH 5,0 e temperatura 26°C , 0,25% de glicose e adição de 0,75% de lactose após 24 horas de fermentação. Testes de imobilização desta enzima em ágar, revelaram que a concentração ótima de ágar é 2%. O pH ótimo, tanto quando livre ou imobilizada é 7,0, sendo este o pH em que apresentou

maior estabilidade (20 horas), enquanto que a temperatura ótima da enzima imobilizada é 50°C e da enzima livre, 45°C, porém, ela apresentou termoestabilidade em temperaturas menores ou igual a 26°C, sendo a perda de atividade desprezível a 4°C durante 28 dias. Para células imobilizadas e células livres, encontraram K_m de 148mM e 102mM, respectivamente. A Tabela 2.13 mostra a atividade enzimática máxima em presença de sais de Mg e Ca.

TABELA 2.13. Atividade de lactase de *Saccharomyces anamensis* em função da concentração de sais de Mg e Ca.

Ions	Concentração (10 ⁻³ M)	Células livres	Células imobilizadas
Mg	10,50	0,266	0,218
Ca	3,50	0,240	0,191

Atividade enzimática expressa em μ mol de galactose por minuto por mg de células secas.

Fonte: Banerjee e col. (1982).

Sabioni e col. (1984a) fizeram um crescimento de *Kluyveromyces lactis* em leite, e trataram as células com álcool etílico, seguindo-se uma secagem a 40°C por uma hora e estocagem a 4°C. As células assim tratadas eram permeáveis a lactose com atividade máxima de lactase a 45°C. Com adição de 400 a 800mg de células tratadas por litro de leite, temperatura de 35°C durante 2,5 a 3,5 horas, obteve-se de 45 a 69% de hidrólise da lactose do leite. A seguir, fabricou-se doce de leite com o leite obtido acima, não sendo determinado qualquer sabor estranho pela análise sensorial, nem

tampouco cristais de lactose, por esta encontrar-se em concentração bem abaixo do seu limite de solubilidade. Testes de estocagem das células permeáveis à lactose revelaram que não houve perda de atividade durante 7 meses, quando mantidas a temperaturas de 25, 5 e -20°C .

Silva e col. (1984) produziram doce de leite pasteurizado e tratado com β -galactosídase comercial (Maxilact-R) com atividade de 40.000 unidades de ONPG. Para concentrações da enzima de 0, 20, 30, 40 e 60mg/l de leite, temperatura de 8°C e agitação lenta durante 15 horas, obtiveram 0, 7,1, 11,03, 18,23 e 28,09% de hidrólise da lactose presente no leite, respectivamente. Como resultado final, observaram que a cristalização da lactose no doce de leite é tanto menor quanto maior a quantia de enzima utilizada, mas quanto maior o tempo de estocagem, maior a cristalização.

No mesmo ano (1984b), Sabioni e col. produziram leite delactosado por ação fermentativa de *Kluyveromyces lactis*. O leite foi inoculado com a levedura, em fermentador de 200 litros, a 28°C e aeração por 24 horas, até consumo total da lactose. O leite assim obtido foi misturado com leite normal pasteurizado em diversas proporções para a confecção de doce de leite.

Chen e col. (1985) fizeram um crescimento de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-1109 em meio sintético contendo lactose como fonte de carbono. As células obtidas foram tratadas com acetona gelada, tornando permeável a lactose, apresentando uma atividade de β -galactosídase de $0,4\mu\text{mol}$ de lactose hidrolisada por mg de célula e minuto. As condições do seu experimento de hidrólise foram: solução de lactose a 5% em tampão tris-malato- NaOH 0,2M, pH 7,0, 37°C por 20 minutos. Não se observou perda de atividade quando as células tratadas foram estocadas a -27°C por 60 dias e uma perda de 12% de atividade quando elas foram estocadas à temperatura ambiente por 60 dias. Estes autores propuseram um modelo matemático

complexo para descrever a inibição da lactase por glicose (inibidor competitivo) e galactose (inibidor não competitivo), que são inibidores mutuamente exclusivos.

Pomeranz e col. (1962) empregaram lactase de seis fontes diferentes na fabricação de pão e observaram que a lactase de levedura tem pH ótimo acima do pH da massa, apresentando, por isso, uma atividade baixa, fato que também ocorre com a lactase de bactérias mas não com a de fungos. Assim, os autores sugeriram que o leite ou o soro sejam tratados com lactase antes de ser acrescentados à massa.

Kosikowski e Wierzbicki (1973) ensaiaram uma lactase comercial de *Saccharomyces lactis* em leite cru e pasteurizado, sem fazer qualquer alteração de pH. Com uma concentração da enzima de 25mg/l, a 4°C, conseguiram 75% de hidrólise de lactose do leite e 100% de hidrólise com 100mg/l, ambos os experimentos durante 48 horas. Quando alteraram a temperatura para ambas as concentrações de enzima, obtiveram 100% de hidrólise em 5 horas, mas observaram o aparecimento de sabor estranho, o que não aconteceu quando a temperatura era de 4°C.

Thompson e Brower (1976) fizeram queijo "Cheddar" de leite tratado com lactase comercial de *Saccharomyces lactis*, obtendo uma redução no tempo de produção de ácido láctico pela cultura usada, 40 minutos contra 2 a 2,5 horas do processo tradicional. O tempo de cura também foi reduzido para 3 a 4 meses (6 meses de cura no processo tradicional), fato que reduz o custo de produção, tendo os autores sugerido que o soro doce obtido possa ser usado na fabricação de sorvetes. As condições e resultados obtidos na hidrôlise da lactose do leite estão na Tabela 2.14.

TABELA 2.14. Hidrólise de lactose em leite por lactase de *Saccharomyces lactis*.

Concentração de lactase (mg/l)	Tempo de hidrólise (h)	Lactose hidrolisada (%)	Temperatura (°C)
0,30	2,5	75	30
0,60	2,5	90	30
0,13	16-18	70	4

Fonte: Thompson e Brower (1976).

Viskari e col. (1978) publicaram uma nota onde afirmam ser a imobilização de lactase viável econômica e tecnicamente em escala industrial. Para vários métodos de imobilização que testaram, o que melhor resultado produz é a adsorção da enzima em resina fenol-formaldeído. A estabilidade da enzima é afetada pela temperatura e substrato, mas é quase independente do pH na faixa de 3,5 a 4,5. Aparentemente, os sais do soro estabilizam a enzima, sendo permeado de soro de queijo pré-concentrado o melhor substrato, e a estabilidade a pH baixo permite manter os reatores microbiologicamente limpos, com controle adequado de temperatura e pH.

Wierzbicki e Kosikowski (1973) fermentaram soro de queijo em pó, reconstituído a 6% de sólidos e desproteínizado por acidificação e aquecimento, com 33 linhagens de microrganismos, entre fungos, bactérias e leveduras, para produção de β -galactosídase. No extrato cru de cada célula determinaram o pH ótimo das lactases, cujos resultados estão resumidos na Tabela 2.15.

TABELA 2.15. Temperatura ótima e pH ótimo de lactase de vários microrganismos.

	pH ótimo	Temperatura ótima
Fungos	3,5 - 7,5	35 - 55
Bactérias	5,5 - 6,5	30 - 50
Leveduras	6,0 - 7,5	30 - 55

Fonte: Wierzbicki e Kosikowski (1973).

Estes autores ressaltaram a vantagem das lactases com atividade máxima em pH 4,5-7,5, produzidas por *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* na produção de iogurte e leites fermentados com baixo teor de lactose.

Mahoney e Adamchuck (1980) fizeram vários ensaios com β -galactosídase de *Kluyveromyces fragilis* produzida por eles mesmos. Nos seus resultados, relataram que a enzima teve maior atividade em leite desnatado, mas sua atividade não diferiu em leite pasteurizado ou não, fato que não ocorre com soro de queijo, uma vez que ela apresentou maior atividade em soro pasteurizado. Por outro lado, ela apresentou redução de 30% de atividade quando o soro foi neutralizado com NaOH, fato que não ocorreu quando usaram KOH. O magnésio ativou a lactase em qualquer concentração, enquanto que o sódio e cálcio a inibiram, mesmo em concentrações baixas, com exceção quando o substrato era leite adicionado de cálcio, enquanto que o potássio só a inibiu em concentrações acima de 100mM.

Flaschel e col. (1982) fizeram um estudo da cinética de

hidrólise de lactose por lactase de *Aspergillus niger*, levando em conta a mutorrotação da galactose, tendo concluído que a α -galactose atua como inibidor competitivo e incompetitivo, enquanto que a β -galactose é um inibidor competitivo, chegando a um modelo matemático complexo.

Weetall e col. (1974) estudaram as propriedades de duas β -galactosídases comerciais, uma de bolor e outra de levedura, imobilizadas em esferas de vidro. A lactase de bolor exibiu um pH ótimo de 4,0 quando livre e de 3,5 quando imobilizada, a de levedura, pH 6,25 quando livre e 3,0 quando imobilizada, sendo que a lactase de levedura apresentou maior atividade em presença de íons manganês e cobalto, ambos em concentração de $25 \cdot 10^{-5}M$. A Tabela 2.16 resume os parâmetros determinados por estes autores.

TABELA 2.16. Parâmetros cinéticos de lactase solúvel e imobilizada.

	K_m aparente (M)	K_i aparente (M)	E_a (Kcal/mol)
Lactase solúvel de levedura	0,1120	0,666	10,50
Lactase imobilizada de levedura	0,0714	3,270	11,30
Lactase solúvel de bolor	0,0400	1,250	n.d.
Lactase imobilizada de bolor	0,0500	3,220	6,54

Substrato: soro de queijo.

K_i determinado em presença de galactose (0,02M).

Fonte: Weetall e col. (1974).

Paine e Carbonell (1975) pesquisaram a imobilização de lactase comercial de *Escherichia coli* em microcápsulas de "Colloidion". Para isto, valeram-se de um método de precipitação interfacial, precipitando a enzima em microcápsulas, cuja membrana tinha 400 Å de espessura. Testes com solução de ONPG 0,625M mostraram 23% de hidrólise em tempo de residência de 100 segundos, conversão esta considerada alta pelos autores.

Okos e col. (1978) fizeram um estudo sobre hidrólise de lactose por lactase comercial de *Aspergillus niger* adsorvida em duolite ES-762. Notaram que para haver o equilíbrio entre a enzima livre e a adsorvida ao suporte, na temperatura ambiente e pH 4,0, é necessário que a resina esteja carregada de prótons (H^+). Eles montaram uma coluna de 1,5cm de diâmetro e 10cm de altura, contendo duolite com enzima imobilizada (0,23g de enzima para 1g de peso seco de duolite), que foi operada por 120 dias com soro ácido de queijo, pH 4,0 e 40°C, tendo sido observada uma pequena perda de atividade durante este tempo, fato que permitiu aos autores concluir que a adsorção da enzima ao suporte é irreversível. Fizeram, também, um estudo econômico para 40% de hidrólise da lactose presente no soro, para as condições do seu experimento, que revelou um custo de US\$ 0,17 por libra de lactose hidrolisada.

Pastore e Park (1981) ensaiaram o efeito de glutaraldeído na imobilização de β -galactosídase de *Scopulariopsis* sp em duolite (resina fenol-formaldeído) e em DEAE-celulose. O glutaraldeído exerce efeito na ligação da enzima com DEAE-celulose, aumentando a atividade ligada, que não é removida mesmo quando o suporte (com enzima) é colocada em solução 1,5M de NaCl, indicando que a enzima encontra-se fortemente ligada ao suporte. A enzima imobilizada é estável em temperaturas de 50 a 55°C, mas a 60°C perdeu 55% da atividade em 52 horas de incubação. Na comparação dos dois suportes, os autores constataram que duolite retém mais enzima, porém

em DEAE-celulose, a atividade imobilizada foi quase seis vezes maior. Isto significa que pode ter ocorrido um comprometimento de algum sítio de ação ou inativação parcial, causada por uma mudança conformacional da enzima durante o processo de imobilização em duolite. Estes autores montaram uma coluna com a enzima imobilizada em duolite, que foi alimentada com soro de queijo, vazão de 1,5 a 2,0 ml/h, obtendo de 50 a 60% de hidrólise da lactose, sendo que após 1.280 horas de uso, houve uma perda de 6% da atividade inicial, enquanto que a lactase imobilizada em DEAE-celulose retinha 22,5% de atividade após 256 horas de uso.

Em outra publicação de 1981, Park e Pastore (1981b) relataram ter imobilizado 58,5% de lactase (solução com 20 unidades ONPG/ml) de *Scopulariopsis* sp em DEAE-celulose. Estudando o efeito de NaCl sobre a enzima imobilizada, registraram uma perda de atividade de 92% quando a enzima está imobilizada em DEAE-celulose, após tratamento em solução 0,3M de NaCl a 50°C. Para a lactase imobilizada em duolite, registraram uma perda de 40% após tratamento com solução de NaCl 0,7M nas mesmas condições anteriores. Para a enzima imobilizada em DEAE-celulose, não houve perda de atividade durante 80 horas a 50°C, uma atividade remanescente de 80% a 55°C e atividade remanescente de 14% a 60°C durante 80 horas. A enzima imobilizada em DEAE-celulose exibiu uma atividade de 40% em pH 6,5, em relação à atividade em seu pH ótimo (4,0 a 5,0), tendo apresentado apenas 20% de atividade após 30 dias de uso com soro ácido de queijo.

Weetall (1976) fez referência ao uso de β -galactosídase imobilizada para hidrólise de lactose em soro de queijo, sendo que vários suportes foram estudados e macroescalados para escala piloto, com o objetivo de estudar a economia do processo. Embora a enzima tenha uma meia vida razoável, quando imobilizada em certos suportes, o custo da enzima é alto e o mercado para o xarope de

soro, como substituto do xarope de glicose de milho, era desconhecido, disse Weetall.

Bedows e col. (1980) imobilizaram β -galactosídases de *Saccharomyces fragilis* e de *Escherichia coli* em CTAC (celulose tri (p-amino-carbanilato)), CDAC (celulose di (p-amino-carbanilato)) e MCTAC (metil celulose tri (p-amino-carbanilato)). Após o tratamento adequado destes suportes, observaram que as condições ótimas de acoplamento de lactase de *Saccharomyces fragilis* ao suporte ocorre em pH entre 7,0 e 7,5 e em presença de íons Mg^{++} ($2 \cdot 10^{-3}$ a $3 \cdot 10^{-3}M$). No caso da imobilização da lactase de *Saccharomyces fragilis* em CTAC, a atividade da enzima foi observada três horas após a imobilização. A atividade máxima (após 5 horas) era baixa, apenas 4 unidades ONPG/g, indicando a possibilidade do sítio ativo estar envolvido no acoplamento da enzima com o suporte, mas quando o substrato era lactose (solução 0,1%), a atividade aumentou. Enquanto o pH ótimo da enzima livre é 6,8, o seu pH ótimo, quando ela se encontra imobilizada, é cerca de 7,1. A Tabela 2.17 mostra os resultados obtidos por estes autores.

TABELA 2.17. Atividade relativa de lactase imobilizada em vários suportes.

Fonte de lactase	Suporte	Atividade relativa (unidades ONPG/g)
<i>S. fragilis</i>	CTAC	3
	CDAC	0,4
	MCTAC	0,4
<i>E. coli</i>	CTAC	93

Fonte: Bedows e col. (1980).

Greenberg e Mahoney (1981) publicaram uma revisão sobre imobilização e usos de β -galactosídase. Dos artigos revisados, viram que o suporte que apresenta maior eficiência de imobilização de lactase de *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* é poli(acrilamida), mas a maior atividade por grama de suporte obtém-se com fibras celulósicas. Estas lactases mantêm seu pH e temperatura ótimos após a imobilização, enquanto K_m sofre pequena ou nenhuma alteração, apresentam mais estabilidade ao longo do tempo quando imobilizadas do que quando livres, embora os processos de imobilização de célula integral (permeável) dão melhores resultados que a enzima livre ou imobilizada. Para a enzima livre, estes autores encontraram os dados apresentados na Tabela 2.18.

TABELA 2.18. Propriedades de lactase microbiana.

	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	K_m (mM lactose)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0-4,0	55-60	85
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	50-55	50
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	37	14
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9-7,3	35	12-17
<i>Escherichia coli</i>	7,2	40	2
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2	55	6
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	6,5	60	7,8

Fonte: Greenberg e Mahoney (1981).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

3.1.1. Minifermentador marca Fermentation Design Inc., modelo M-1.000.

3.1.2. Fermentador de 250 litros de capacidade, marca Fermentation Design Inc., USA, modelo 250L.

3.1.3. Balança semi-analítica marca Mettler, modelo P210N.

3.1.4. Balança analítica marca Mettler, modelo H34.

3.1.5. Autoclave de bancada marca Electric Steroclave, modelo 25X, de fabricação de Wisconsin Aluminium Foundry Co. Inc., USA.

3.1.6. Estufa a vácuo, marca Fanen, modelo 099/A-1.

3.1.7. Banho-maria marca Fanen, modelo 120/2.

3.1.8. Banho-maria de circulação Micronal, modelo B110.

3.1.9. Concentrador de capacidade de 3 litros, de fabricação de Precision Scientific, série 10-AB-2, USA, modelo 3 litros.

3.1.10. Controlador automático de pH marca Metrohm Herissau, modelo E 450.

3.1.11. Planta-piloto de ultrafiltração marca Alfa-Laval modelo UF-1, dotada de cartucho de ultrafiltração HF 26,5-43 PM 50.

3.1.12. Mesa rotatória marca Fermentation Design Inc., modelo Rotary Shaker, USA, modelo 0513.

3.1.13. Cromatógrafo a gás marca Comercial Gonçalves, modelo 37-D.

3.1.14. Mesa rotatória marca Psycrotherm.

3.1.15. Centrífuga para tubos marca Fanen Excelsa 2, modelo 205N.

3.1.16. Centrífuga para frascos de 250ml marca Fanen, modelo 209.

3.1.17. Estufa marca Fanen.

3.2. Reagentes

3.2.1. Lactose P.A. Carlos Erba do Brasil S.A.

3.2.2. Sais minerais; KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , MnSO_4 , KOH , NaOH , KCl , CuSO_4 , todos grau P.A. de Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda - CETUS (ECIBRA).

3.2.3. Extrato de levedura Bioquímica do Brasil S.A. Biobrás.

3.2.4. Meio PDA Division Becton, Dickinson & Co. - BBL.

3.2.5. Reagente Enzy-Color Bio-Diagnóstico Indústria Química Clínica Ltda.

3.2.6. Protease fúngica: amostra grátis gentilmente cedida pela Miles do Brasil - Atividade de 31.000HU/g, pH ótimo entre 6,0 e 7,0.

3.2.7. ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) Feinubiochemica GMBH & Co. Aeidelberg, SERVA.

3.2.8. $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, tartrato de sódio e potássio e $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - Casa da Química Ltda. - CAQ.

3.2.9. Soro de queijo em pó das marcas Glória da Fleischmann - Royal Produtos Alimentícios Ltda.; Paulista da Cooperativa

Central de Laticínios do Estado de São Paulo e soro líquido do processamento de queijo Minas frescal na planta-piloto de laticínios da FEA.

3.3. Microrganismos

3.3.1. Microrganismos utilizados

Os microrganismos testados quanto à produção de etanol foram: *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612, *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635, *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220, *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, *Saccharomyces bulgaricus* ATCC 16045, *Candida pseudo-tropicalis* ATCC 8659 e *Candida pseudotropicalis* IOC 2697.

3.3.2. Conservação das culturas

As culturas dos microrganismos foram conservadas em BDA (Batata Dextrose Ágar) inclinado em tubo de ensaio, a 4°C, sendo repicadas periodicamente.

3.4. Metodologia

3.4.1. Prê-fermentação

As pré-fermentações foram feitas em Erlenmeyers de 500ml, contendo 100ml de meio estéril (pH 4,5), que após inoculação, foram incubados a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, agitados em mesa rotatória a 200 r.p.m. O meio de pré-fermentação tinha a seguinte composição:

Lactose	50,0g/l
Extrato de levedura	1,0g/l
KH ₂ PO ₄	1,5g/l
NH ₄ Cl	1,5g/l
KCl	0,15g/l
MgSO ₄ . 7 ₂ H ₂ O	0,65g/l

3.4.2. Fermentação estática em meio sintético

As fermentações foram feitas em Erlenmeyers de 250ml, contendo 50ml de meio estéril a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 14,5 dias. O meio de cultura foi o mesmo da pré-fermentação (item 3.4.1), com exceção do teor de lactose, que foi alterado para 100g/l.

3.4.3. Fermentação de meio sintético em minifermentador com pH controlado automaticamente

As fermentações foram feitas em minifermentador com 700ml de meio estéril a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e pH inicial do meio 4,5. O meio de cultura foi o mesmo da pré-fermentação, com exceção do teor de lactose, que foi alterado para 100g/l. O pH inicial e durante a fermentação foi controlado com KOH 0,16N estéril.

3.4.4. Esterilização dos meios de cultura

Todos os meios foram esterilizados em autoclave a $108,4^{\circ}\text{C}$ (51b/pol²) por 30 minutos.

3.5. Obtenção e caracterização de permeado de soro de queijo

3.5.1. Obtenção do permeado de soro de queijo

O permeado de soro de queijo foi preparado pela ultrafiltração dos soros de queijo descritos no item 3.2.9, na planta-piloto de ultrafiltração descrita no item 3.1.11. O processo de ultrafiltração foi realizado a 55°C com pressão de entrada de 1,7kg/cm² e pressão de saída de 0,7kg/cm². A Tabela 3.1 apresenta as composições dos permeados assim obtidos.

TABELA 3.1. Composição dos permeados de soro de queijo obtidos por ultrafiltração.

Permeado	1	2	3
pH	6,05	6,12	5,97
Lactose (p/v) (%)	15,00*	10,92	15,81
Sólidos totais (%)	16,73*	11,46	17,86
Cinzas (%)	1,25*	0,71	1,50

* Valores estimados a partir da análise de um concentrado.

Os permeados 1 e 3 foram preparados pela rehidratação dos soros em pó Glória e Paulista, respectivamente, em concentrações apropriadas para se obter as concentrações desejadas de lactose. O permeado 2 foi preparado pela ultrafiltração de soro de queijo "in natura", recém produzido.

O permeado assim obtido, foi estocado em freezer a -20°C , sendo diluído com água destilada ou concentrado no concentrador descrito no item 3.1.9 à temperatura média de 60°C . O permeado 1 foi utilizado nos experimentos de adaptação das leveduras a permeados concentrados e nos experimentos de fermentação de permeado de soro de queijo (sem aeração) a 22,5% de lactose, com todas as leveduras. O permeado 2 foi utilizado no restante dos experimentos, com exceção da fermentação em escala piloto. O permeado 3 foi utilizado apenas na fermentação em escala piloto.

O pH dos permeados foram determinados conforme o item 3.8, o teor de lactose conforme item 3.7.2, o teor de sólidos totais conforme o item 3.5.2 e o teor de cinzas conforme o item 3.5.3.

3.5.2. *Determinação de sólidos totais de permeado*

A determinação de sólidos totais dos permeados obtidos foi feita segundo o método 16.032, descrito pela Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1975).

3.5.3. *Determinação de cinzas de permeado*

A determinação de cinzas dos permeados obtidos foi feita segundo o método 16.035, descrito pela Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1975).

3.6. *Fermentação de permeado*

3.6.1. *Adaptação das cepas de levedura em permeado concentrado*

As cepas foram inoculadas em permeado contendo 2,5% de lactose e incubadas a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sobre mesa rotatória a 200 r.p.m. por 72 horas. Em seguida, passou-se um inóculo desta fermentação a outro Erlenmeyer contendo permeado concentrado a 5% de lactose, desta forma a concentração de lactose no permeado foi incrementada de 2,5% em 2,5%, até 22,5%.

3.6.2. *Conservação das cepas adaptadas*

As cepas adaptadas em permeado concentrado a 22,5% de lactose foram conservadas em tubo de ensaio contendo meio semi-sólido inclinado, cuja composição era: permeado concentrado a 22,5% de lactose e 2,5% de ágar.

3.6.3. Fermentações não aeradas de permeado

As fermentações com permeado foram feitas em mini-fermentador (700ml de permeado) e as respectivas pré-fermentações foram feitas em permeado contendo a mesma concentração de lactose do permeado a ser fermentado.

As pré-fermentações foram incubadas a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em mesa rotatória a 200 r.p.m. durante 36 horas.

3.6.4. Fermentações de permeado aeradas na fase inicial

As fermentações de permeado aeradas foram feitas de forma idêntica ao descrito no item anterior (3.6.3), mas o meio foi aerado com uma taxa de aeração de 1 VVM (volume de ar por volume de meio por minuto) na fase inicial das fermentações.

3.6.5. Fermentações de permeado tratado com protease fúngica e aeradas na fase inicial

Após a esterilização dos mini-fermentadores com permeado de soro de queijo, conforme item 3.4.4, eles tiveram sua temperatura ajustada em 35°C , quando receberam uma alíquota de 20ml de uma solução de protease (1g de pó em 100ml de água destilada). A temperatura de 35°C foi mantida por 3 horas, sendo, após isto, reduzida para 30°C , quando foi feita a inoculação com *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415. Estas fermentações também foram aeradas como descrito no item 3.6.4.

3.6.6. Fermentações aeradas de permeado suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4

Permeado de soro de queijo suplementado com 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

e 0,05% de KH_2PO_4 antes da esterilização, sendo que estas fermentações foram aeradas como descrito no item 3.6.4.

3.6.7. Fermentação em escala piloto

Para a fermentação em escala piloto, foram obtidos 140 litros de permeado na planta de ultrafiltração. Este permeado tinha uma concentração de 158,10g/l de lactose, sendo que sua esterilização foi feita no próprio fermentador, a 120°C por 20 minutos e velocidade do agitador de 100 r.p.m.

Para esta fermentação foi usado um inóculo de 7 litros (5%) de uma cultura aerada de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415.

3.7. Determinação da concentração de lactose

3.7.1. Centrifugação das amostras

Todas as amostras foram centrifugadas a 5.230g por 15 minutos em centrífuga marca Fanen - Excelsa 2, modelo 205N. Após separação do precipitado, o sobrenadante foi clarificado com ácido wolfrâmico, conforme procedimento descrito por Wolfschoon-Pombo e Casagrande (1982).

3.7.2. Determinação da concentração de lactose pelo método de Fehling

Uma alíquota do sobrenadante de cada amostra (item 3.7.1) foi convenientemente diluída em balão volumétrico, sendo que esta veio a ser a solução titulante da solução de Fehling.

A solução de Fehling foi preparada segundo procedimento descrito por Morita e Assumpção (1976).

3.7.3. Determinação da concentração de lactose pelo método de Somogyi-Nelson

Um ml do sobrenadante obtido no item 3.7.1 foi convenientemente diluído e determinou-se a concentração de lactose, segundo o procedimento descrito por Somogyi (1945).

3.8. Determinação do pH

A determinação do pH de cada amostra foi feita com uso de pHmetro.

3.9. Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol de cada amostra foi determinada por cromatografia gasosa.

3.10. Determinação da massa seca de microrganismos

O precipitado obtido no item 3.7.1 foi ressuspenso em 10ml de água destilada e novamente centrifugado em centrífuga Farnen Excelsa 2, modelo 205N, a 5.230g por 15 minutos. Após descartado o líquido sobrenadante, as células foram lavadas outra vez, nas condições acima, seguindo-se a secagem em estufa a vácuo a 60°C por 16 horas.

Desta forma, a massa seca de células foi determinada pela diferença de pesos do tubo com células secas e vazio.

3.11. Obtenção e ensaios com lactase

3.11.1. Separação das células de levedura

As células do final da fermentação foram centrifugadas a 4.530g por 20 minutos em frascos de 200ml em centrífuga marca Fann, modelo 209.

O vinho sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em água destilada e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Desta forma, as células foram lavadas por três vezes.

3.11.2. Autólise das células de levedura

As células foram ressuspendidas em tampão fosfato de potássio 0,1M, contendo 0,1mM de $MnCl_2$ e 0,5mM de $MgSO_4$, pH = 6,6.

A suspensão de células assim obtida foi colocada em Erlenmeyers (100ml de suspensão em Erlenmeyer de 500ml) sendo que em cada frasco adicionou-se, ainda, 2% de clorofórmio. Estes frascos foram incubados a 37°C sobre mesa rotatória, com agitação de 200 r.p.m., por tempo variável.

3.11.3. Obtenção do extrato enzimático de lactase

Após a autólise, a suspensão de células foi centrifugada a 4.530g por 20 minutos em frascos de 200ml em centrífuga marca Fann, modelo 209.

O sobrenadante foi separado para teste de atividade de lactase, enquanto que o precipitado foi descartado.

3.11.4. Determinação da percentagem de células autolisadas

Tomou-se duas amostras da suspensão de células, uma antes e outra após a autólise, fazendo-se a contagem do número de células

em ambas as amostras em câmara de Neubauer, determinando-se, desta forma, a percentagem de células autolisadas.

3.11.5. *Determinação da velocidade inicial de hidrólise de lactose*

Tomaram-se alíquotas de 1ml do sobrenadante (item 3.11.3) e juntou-se às outras alíquotas de 30ml de soluções de lactose em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,6, de maneira a resultarem soluções de 1,25%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10,0% de lactose, as soluções iniciais estavam a 37°C, temperatura esta da reação de hidrólise. Amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados. Após a coleta, as amostras permaneceram em banho-maria, água fervente, por cinco minutos para inativar a lactase.

3.11.6. *Determinação da atividade de lactase através da dosagem de glicose liberada pela ação da lactase*

Para os extratos enzimáticos I, II e III, juntou-se 10ml do extrato enzimático correspondente, obtido no item 3.11.3, a 15ml de solução de lactose em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,6, de forma que a solução resultante tinha 5% de lactose. A reação ocorreu a 37°C por 5 minutos, sendo interrompida por aquecimento em banho-maria de água fervente. Para os extratos enzimáticos IV a IX, utilizaram-se os dados obtidos na determinação da velocidade inicial com 5% de lactose (item 3.11.5).

A glicose liberada na reação foi determinada segundo o método de Dalhgviist (1964).

3.12. Separação das células da fermentação de 140l de permeado

3.12.1. Separação das células com uso de ultrafiltração

O meio fermentado foi ultrafiltrado na planta-piloto de ultrafiltração, à temperatura ambiente, pressão de entrada de 1,7kgf/cm² e pressão de saída de 0,7kgf/cm².

3.12.2. Lavagem das células

Após a redução do volume de meio na planta de ultrafiltração até cerca de 20 litros, adicionou-se 8l litros de água filtrada sem que o processo fosse interrompido. Esta operação repetiu-se ainda por mais quatro vezes, ou seja, no total foram utilizados cerca de 405 litros de água em cinco etapas, com duração total de 9 horas.

3.12.3. Autólise das células da fermentação de escala piloto

Tomou-se duas partes das células separadas por ultrafiltração e, com uma delas, procedeu-se como descrito nos itens 3.11.2 a 3.11.6, e a outra foi ressuspendida em água destilada e centrifugada a 4.530g por 20 minutos em centrífuga marca Fanen, modelo 209, e a seguir procedeu-se também como descrito nos itens 3.11.2 a 3.11.6.

3.13. Determinação da atividade de lactase com ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo)

As atividades de lactase dos diversos autolisados foram também determinadas com ONPG segundo procedimento descrito por Mahoney e col. (1975), com algumas modificações.

Dissolveu-se 0,1885g de ONPG em 500ml de solução tampão

fosfato de potássio (0,1M, pH 6,6), que resultou numa solução $1,25 \cdot 10^{-3}$ mM ONPG.

Quatro mL desta solução de ONPG foram misturados em tubo de ensaio com 1mL de cada autolisado, sendo a mistura incubada a 37°C por cinco minutos, após o que, acrescentou-se 1mL de solução 0,5M de Na_2CO_3 ao tubo para parar a reação. A cor resultante da liberação de 0-nitrofenol foi quantificada em espectrofotômetro a 420nm.

3.14. Método de cálculo da taxa de consumo máxima de substrato, taxa de crescimento máxima e produtividade máxima

A taxa de consumo máxima foi obtida traçando-se pela curva de consumo de lactose uma tangente, que forneceu a maior inclinação. Este mesmo procedimento foi feito para a taxa de crescimento máxima e produtividade máxima, utilizando-se as curvas de crescimento celular e produção de etanol respectivamente.

3.15. Método de cálculo da taxa de consumo específica máxima de substrato, taxa de crescimento específico máxima e produtividade específica máxima

Para cada curva de consumo de lactose, a taxa de consumo máxima obtida foi dividida pelo valor da massa celular seca existente no ponto de intersecção da curva de massa celular seca com a vertical, passando pelo ponto de tangência determinado na curva de consumo de lactose. A taxa de crescimento específico máxima e produtividade específica máxima foram calculadas da mesma maneira, utilizando-se as curvas de crescimento celular e produção de etanol, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fermentações estáticas em meio sintético

O primeiro teste feito com as culturas foi em meio sintético, conforme formulação do item 3.4.2 de "Materiais e Métodos", com o objetivo de selecionar as cepas mais adaptadas a consumir lactose. Os resultados finais destas fermentações encontram-se na Tabela 4.1.

Observa-se que as leveduras que menos consumiram lactose foram a *Candida pseudotropicalis* 10C 2697, que apresentou um consumo de apenas 4,16g/l de lactose, *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612 (consumo de 20,52g/l), seguida da *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659 (consumo de 20,59g/l).

As que mais consumiram lactose em meio sintético foram a *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045 e *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635 (respectivamente 58,33 e 52,29g/l).

Os resultados expostos na Tabela 4.1 forneceram subsídios apenas para eliminar a *Candida pseudotropicalis* 10C 2697, por apresentar baixo consumo de lactose.

Durante estes experimentos pode-se notar que as leveduras estavam inibidas, pois, durante as fermentações, houve produção de ácidos, o que ocasionou um abaixamento do pH, inibindo as leveduras.

TABELA 4.1. Fermentações estáticas em meio sintético.

	Consumo de lactose* (g/l)	pH final da fermentação*
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8612	20,52	3,20
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8635	52,29	2,96
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 16045	58,33	3,03
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 100220	30,47	2,90
<i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415	45,98	3,03
<i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8659	20,59	2,90
<i>Candida pseudotropicalis</i> IOC 2697	4,16	3,40

*Estes resultados são médias de duplicatas.

Concentração inicial de lactose no meio = 100g/l.

pH inicial do meio antes da inoculação = 4,5.

Temperatura de incubação = $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tempo de incubação = 14,5 dias.

4.2. Fermentações de meio sintético em minifermentador com pH controlado automaticamente

Nas Figuras 4.1 a 4.12 estão apresentados os resultados das fermentações em meio sintético realizadas de acordo com metodologia do item 3.4.3 de "Materiais e Métodos". De maneira geral, verificou-se que a fermentação em pH controlado resultou em um maior consumo de lactose para todas as cepas quando comparadas com a fermentação estática, que não teve seu pH controlado (Tabelas 4.1 e 4.2). Em todos os casos, a fermentação cessou em dois a três dias de incubação, com exceção das fermentações com *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 (Figuras 4.9 e 4.10) e *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045 (Figuras 4.5 e 4.6), cujas fermentações duraram cerca de três dias.

Os resultados destas fermentações (média de dois experimentos) estão na Tabela 4.2. Pela coluna de consumo de lactose, verifica-se que as leveduras que mais consumiram lactose foram a *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045 e *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415. Embora a *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612 tenha apresentado uma conversão de 70,83% da lactose metabolizada em etanol, ela apresentou uma concentração de etanol baixa no final da fermentação (15,70g/l), sendo que a *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220 também teve um comportamento semelhante, apresentando uma conversão de 60,15%, mas uma concentração baixa de etanol (16,72g/l). Após esta levedura, temos a *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, que apresenta uma conversão de 59,29%, a *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045 com uma conversão de 58,66% e a *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659 com 58,08%, sendo estas as leveduras que apresentaram as maiores concentrações de etanol no final das respectivas fermentações.

As Tabelas 4.3 e 4.4 mostram os parâmetros cinéticos de cada fermentação, calculados conforme itens 3.14 e 3.15 de "Materiais

e Métodos", onde se verifica que a *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659 e a *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 (Tabela 4.3) apresentaram valores altos de produtividade máxima. Contudo, a *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659 produziu 20,48g/l de etanol (média de 20,66 e 20,30g/l, Figuras 4.11 e 4.12), cerca de 6g/l menos que a *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 e *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045, que produziram 25,82 e 27,07g/l de etanol em média, respectivamente, como mostra a Tabela 4.2.

A *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 apresentou os maiores valores de taxa de crescimento máxima (Tabela 4.3), com uma produção de 24,78 e 26,86g/l de etanol nos experimentos 1 e 2, respectivamente (Figuras 4.9 e 4.10), enquanto que a *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045 apresentou as maiores taxas de consumo máxima (Tabela 4.3), com uma produção de etanol de 25,48 e 28,66g/l de etanol nos experimentos 1 e 2, respectivamente (Figuras 4.5 e 4.6).

Embora a *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220 tenha apresentado uma produtividade máxima de $8,95 \cdot 10^{-1} \text{g/l.h}$ (Tabela 4.3) e produtividade específica de $7,07 \cdot 10^{-1} \text{h}^{-1}$ (Tabela 4.4) no primeiro experimento (Figura 4.7), ela apresentou uma produção de 18,26 e 15,18g/l de etanol no primeiro e segundo experimento, respectivamente (Figuras 4.7 e 4.8), quantias menores que a produzida pela *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 (Figuras 4.9 e 4.10) e pela *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045 (Figuras 4.5 e 4.6).

Nas condições deste experimento, a *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045 apresentou os maiores valores de taxa de consumo máxima de substrato (Tabela 4.3), bem como a maior produção de etanol (Tabela 4.2), embora a diferença da produção de etanol por esta levedura e a *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, seja de apenas 1,25g/l (Tabela 4.2).

TABELA 4.2. Produção de etanol em meio sintético com lactose (10%) como fonte de carbono e pH controlado automaticamente com injeção de KOH 0,16N.

	Consumo de lactose *	Etanol produzido* - **	Rendimento Y _{p/s} (expresso em percentagem do rendimento teórico)*
	(g/l)	(g/l)	
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8612	41,20	15,70	70,83
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8635	59,38	14,59	45,67
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 16045	85,78	27,07	58,66
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 100220	51,67	16,72	60,15
<i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415	80,95	25,82	59,29
<i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8659	65,55	20,48	58,08

* Resultados médios de duplicatas.

** Etanol produzido calculado como a diferença entre a concentração final e a inicial logo após a adição do inóculo.

TABELA 4.3. Produtividade máxima, taxa de crescimento máxima e taxa de consumo de lactose máxima em meio sintético com pH a 4,5 controlado automaticamente com KOH 0,16N.

	Produtividade máxima* (dP/dt) (g/l.h)		Taxa de crescimento má- xima**(dX/dt) (g/l.h)		Taxa de consumo máxíma de substrato (dS/dt) (g/l.h)	
	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8612	5,20	2,71	4,87	3,16	1,60	0,80
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8635	4,95	2,09	4,90	4,87	1,45	2,07
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 16045	5,04	6,60	6,60	6,04	3,26	2,76
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 100220	8,95	4,61	4,83	7,44	1,42	1,73
<i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415	6,23	7,45	8,17	8,83	3,19	2,13
<i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8659	8,18	8,50	1,11	6,73	2,41	1,32

* Os valores de produtividade máxima encontram-se multiplicados por 10.

** Os valores da taxa de crescimento máxima encontram-se multiplicados por 100.

P = Concentração de etanol (g/l).

X = Concentração celular (g/l).

S = Concentração de lactose (g/l).

t = Tempo (h).

TABELA 4.4. Produtividade específica, crescimento específico e consumo específico de lactose em meio sintético com pH a 4,5 controlado automaticamente com KOH 0,16N.

	Produtividade específica* (g _p)		Crescimento específico** (μ)		Consumo específico de substrato (g _s) (h ⁻¹)	
	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8612	4,39	2,05	6,08	3,33	1,54	1,35
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8635	3,23	1,55	4,86	6,59	1,12	1,81
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 16045	2,86	3,51	3,85	4,77	2,37	1,53
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 100220	7,07	4,84	4,98	9,08	1,17	2,25
<i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415	3,79	4,11	7,42	7,35	2,22	1,18
<i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8659	4,81	8,50	11,10	12,30	1,97	1,21

* Os valores de produtividade específica encontram-se multiplicados por 10.

** Os valores de crescimento específico encontram-se multiplicados por 100.

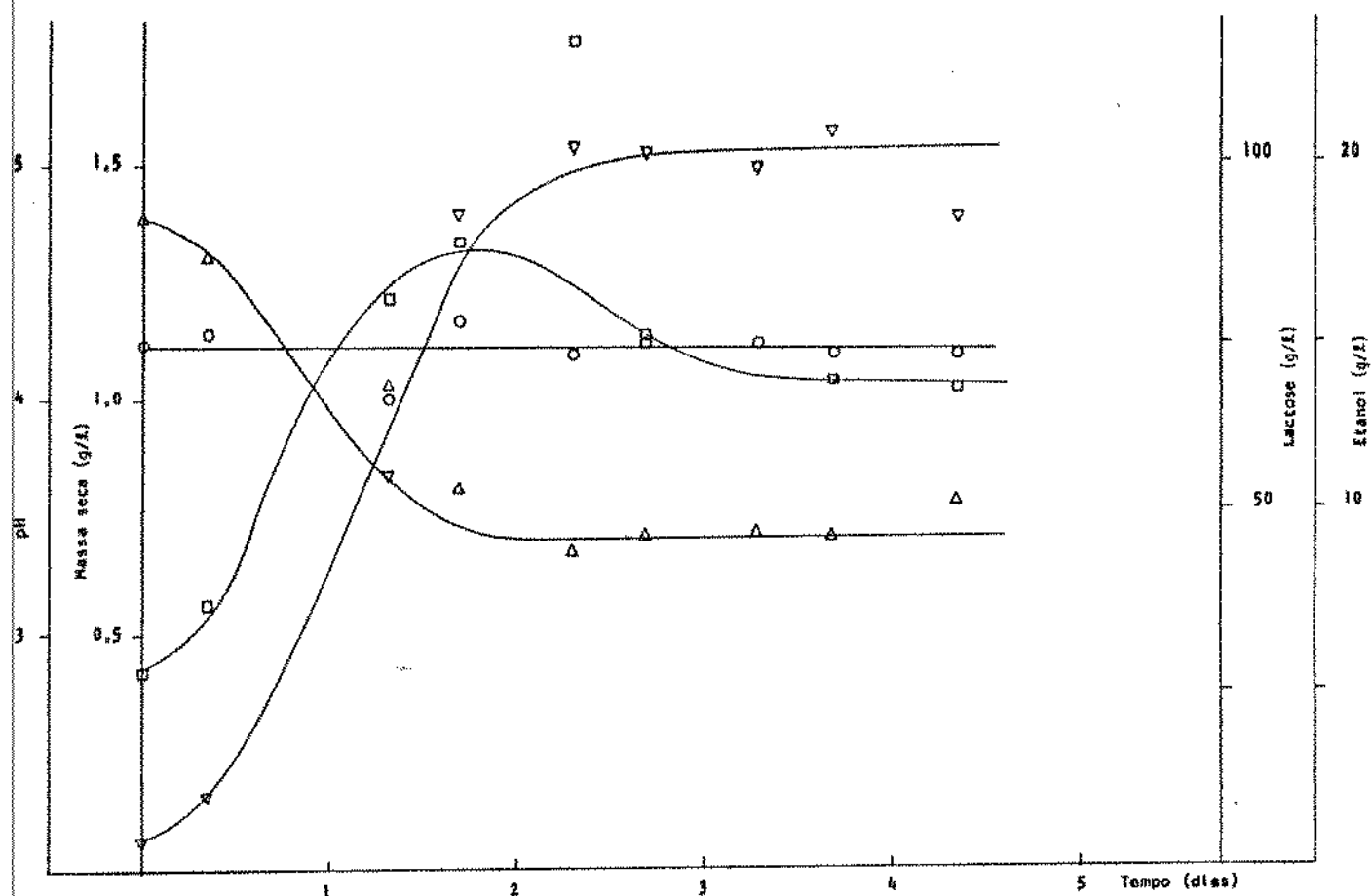


FIGURA 4.1. Fermentação de meio sintético por *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612, pH controlado automaticamente: 1º experimento.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

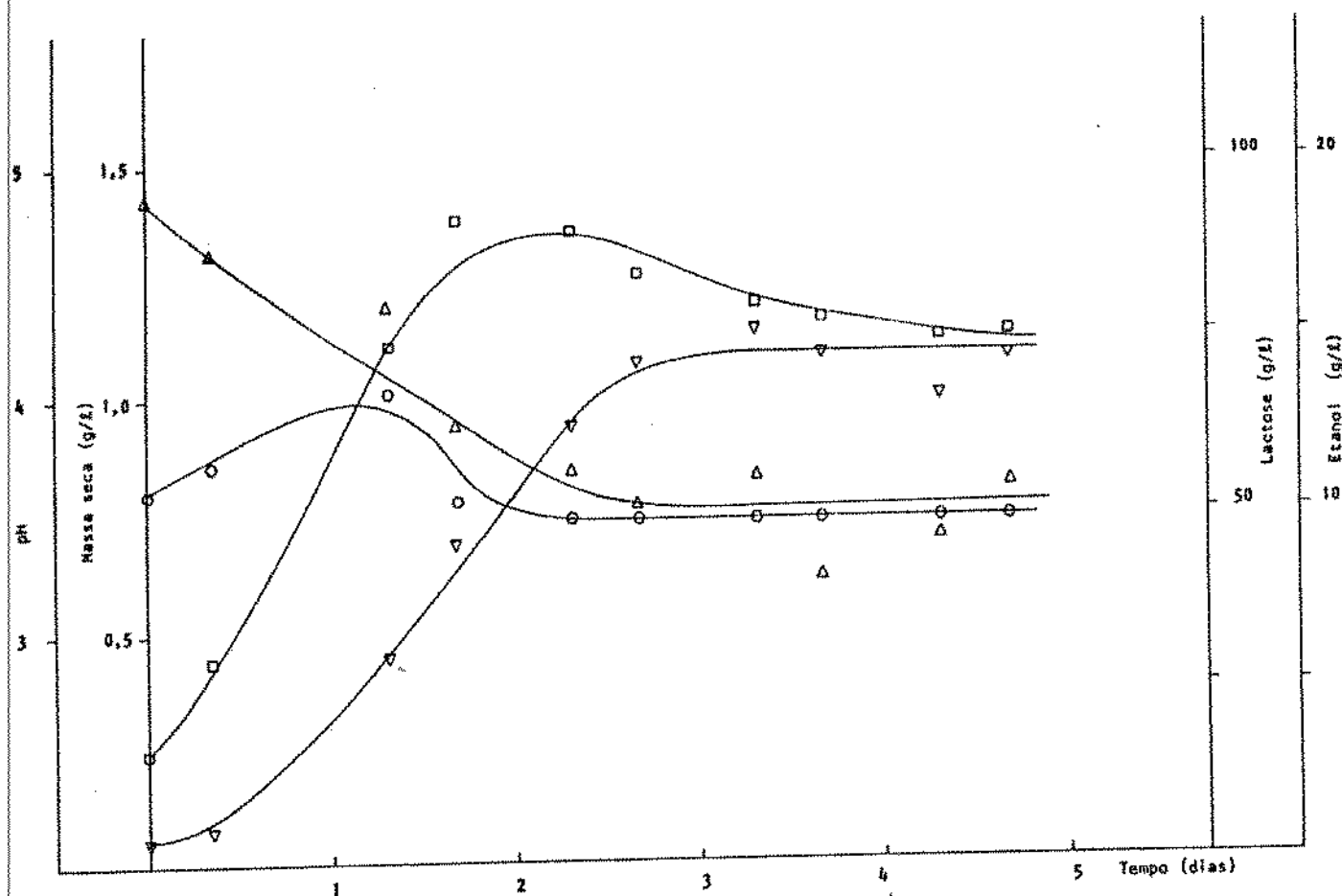


FIGURA 4.2. Fermentação de meio sintético por *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612, pH controlado automaticamente; 2º experimento.

○ - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

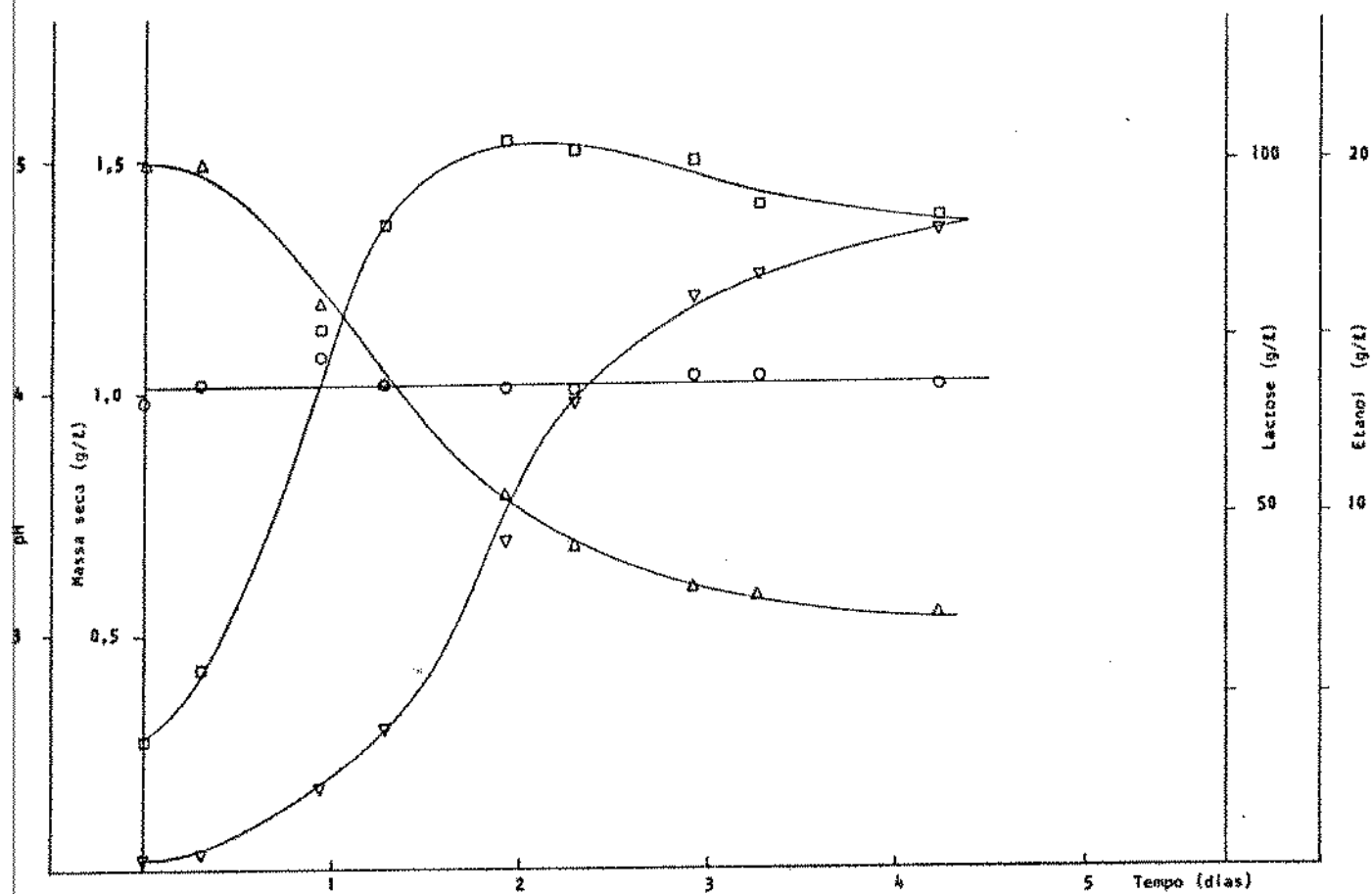


FIGURA 4.3. Fermentação de meio sintético por *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635, pH controlado automaticamente: 1º experimento.

○ - pH □ - Massa seca
 △ - Lactose ▽ - Etanol

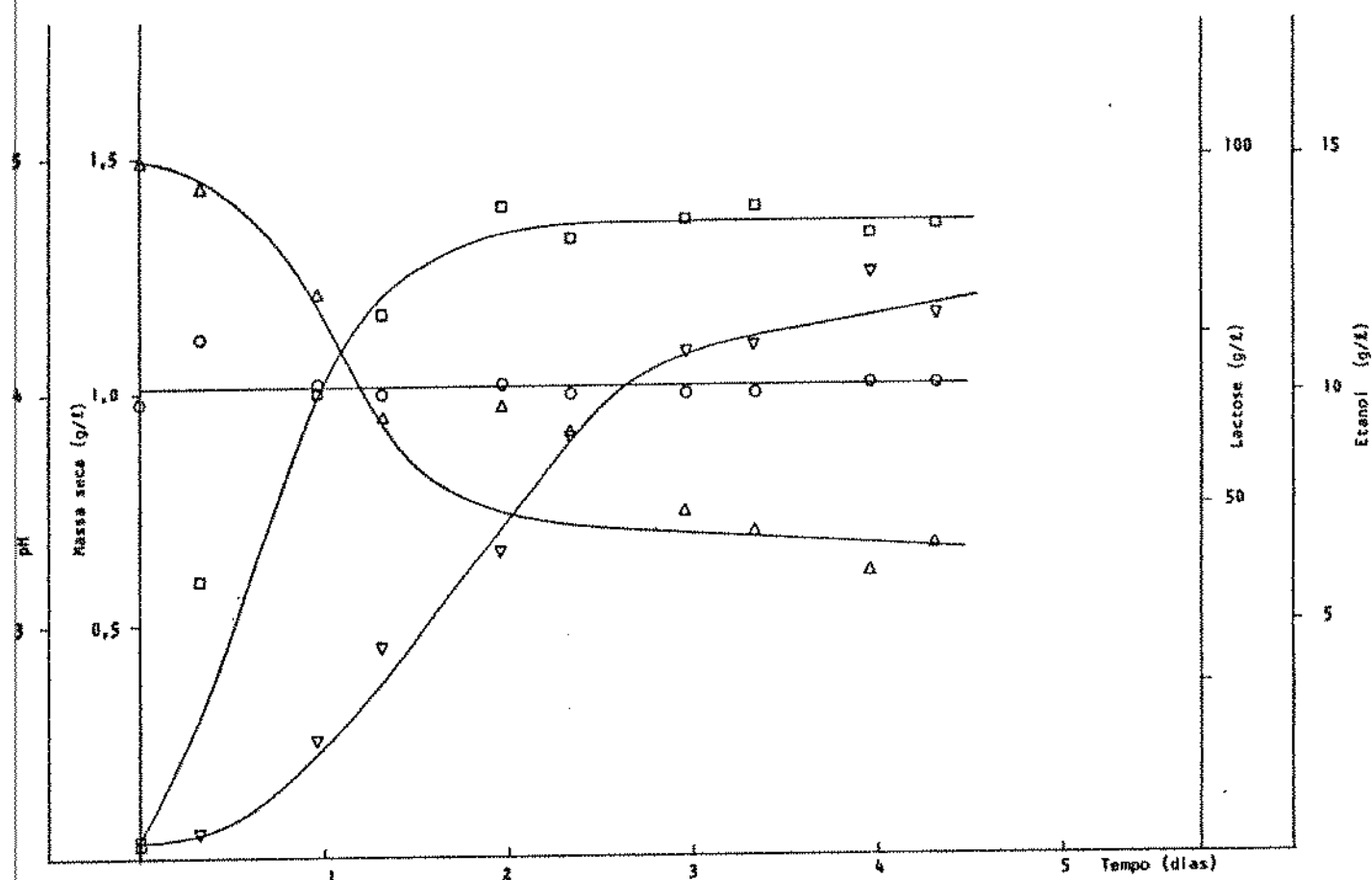


FIGURA 4.4. Fermentação de meio sintético por *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635, pH controlado automaticamente: 2º experimento.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

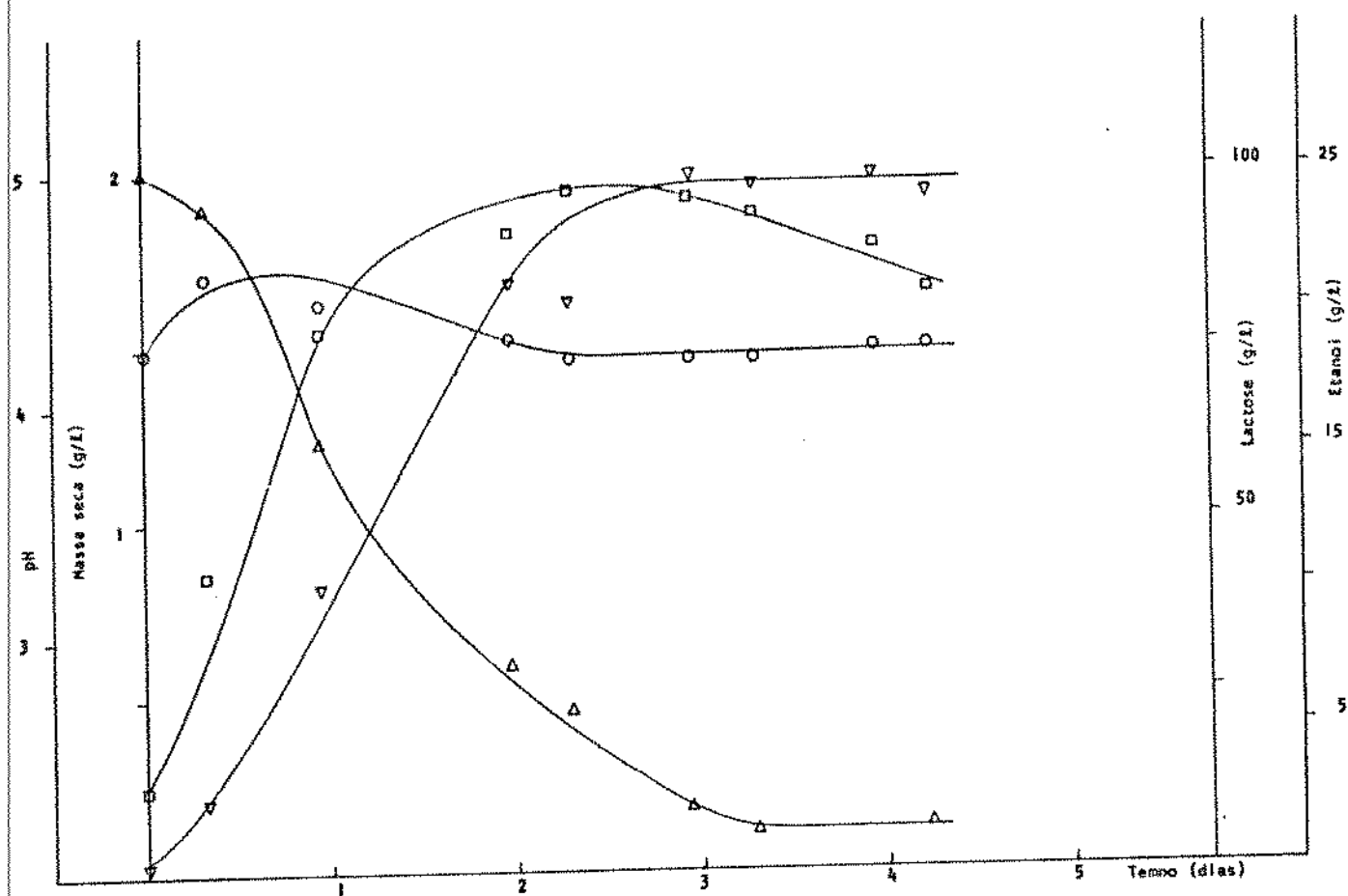


FIGURA 4.5. Fermentação de meio sintético por *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045, pH controlado automaticamente: 1º experimento.

O - pH

□ - Massa seca

Δ - Lactose

▽ - Etanol

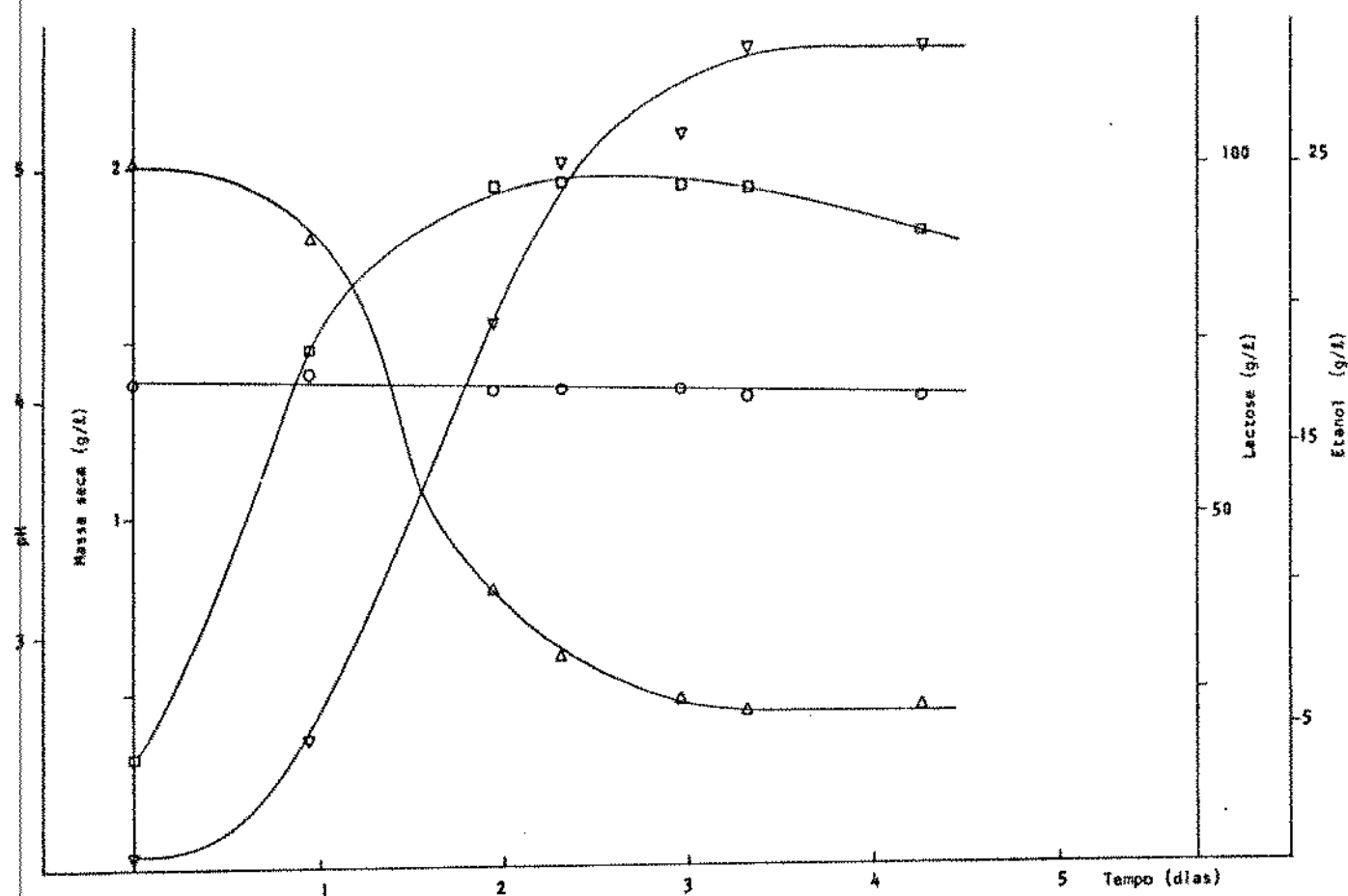


FIGURA 4.6. Fermentação de meio sintético por *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045, pH controlado automaticamente: 2º experimento.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

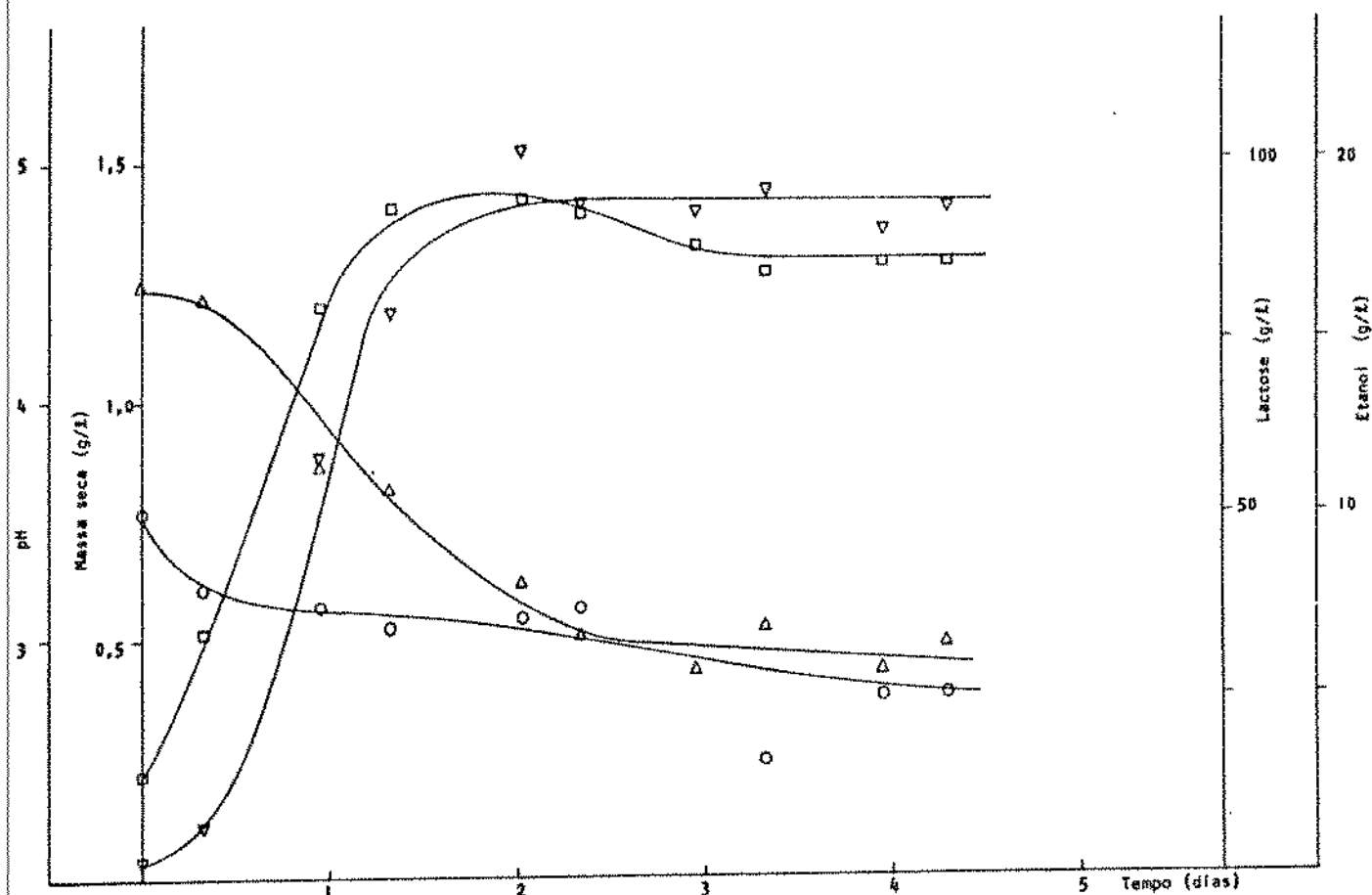


FIGURA 4.7. Fermentação de meio sintético por *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220, pH controlado automaticamente: 1º experimento.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

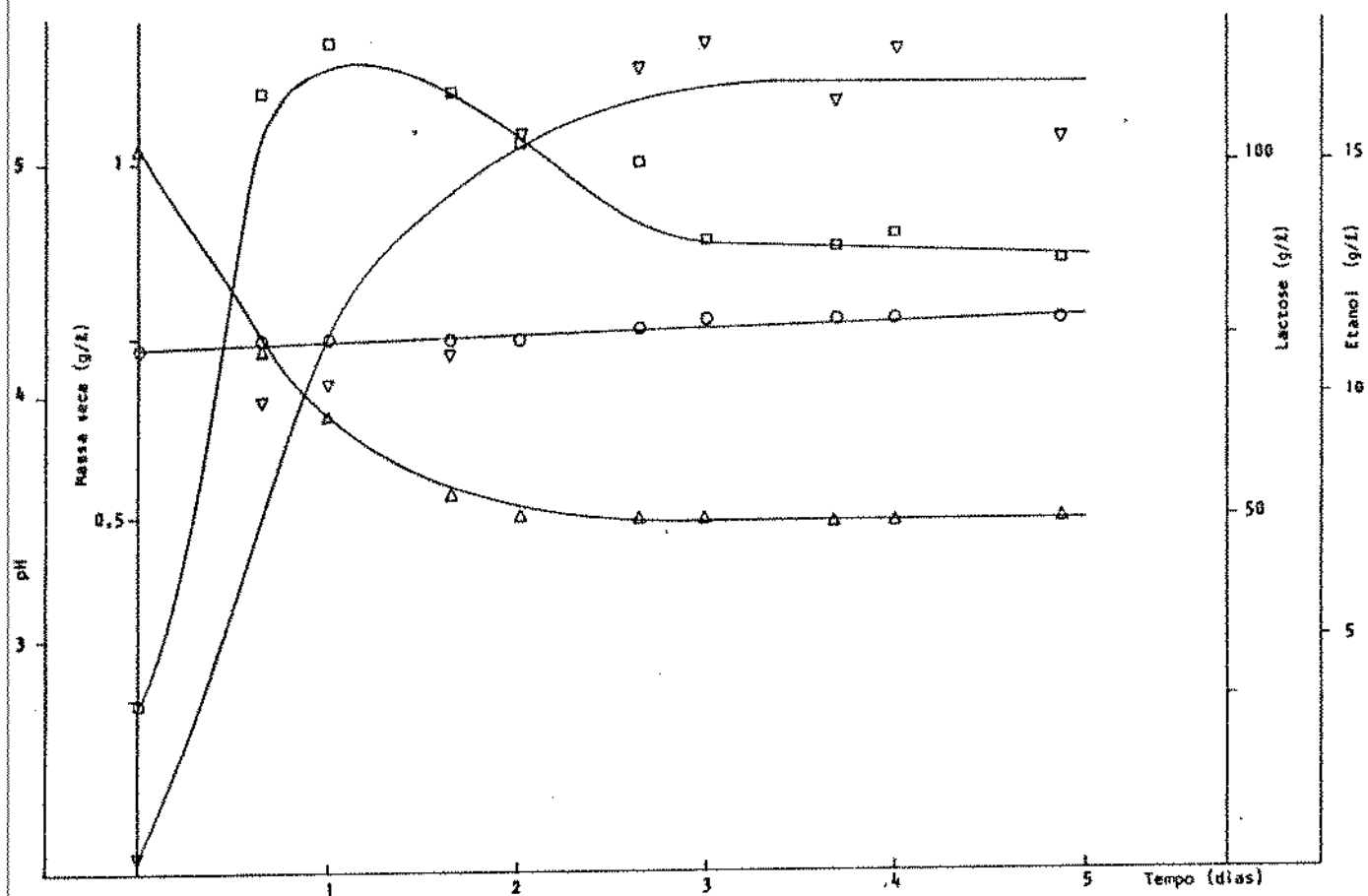


FIGURA 4.8. Fermentação de meio sintético por *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220, pH controlado automaticamente: 2º experimento.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

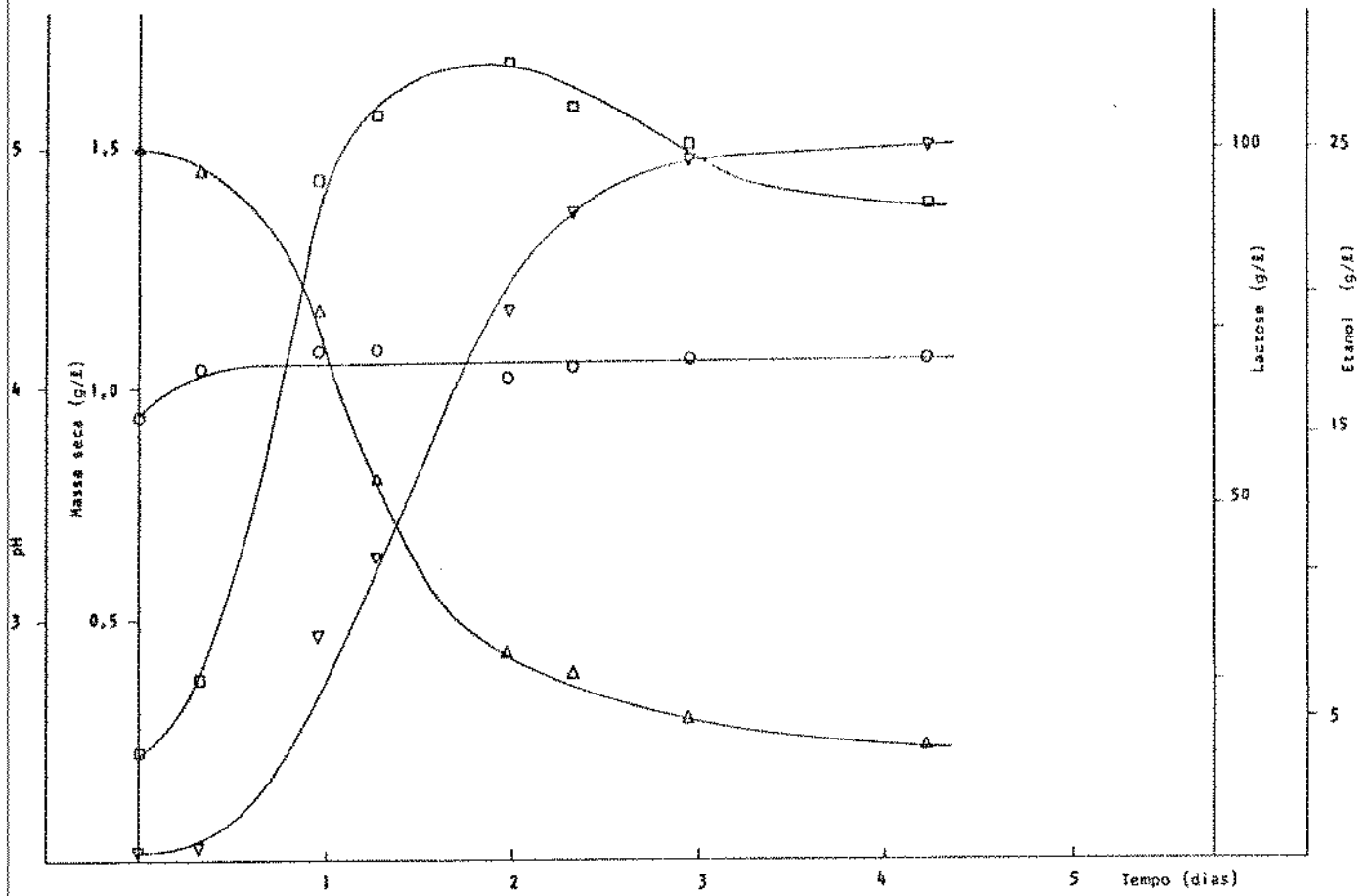


FIGURA 4.9. Fermentação de melo sintético por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, pH controlado automaticamente: 1º experimento.

○ - pH □ - Massa seca
 △ - Lactose ▽ - Etanol

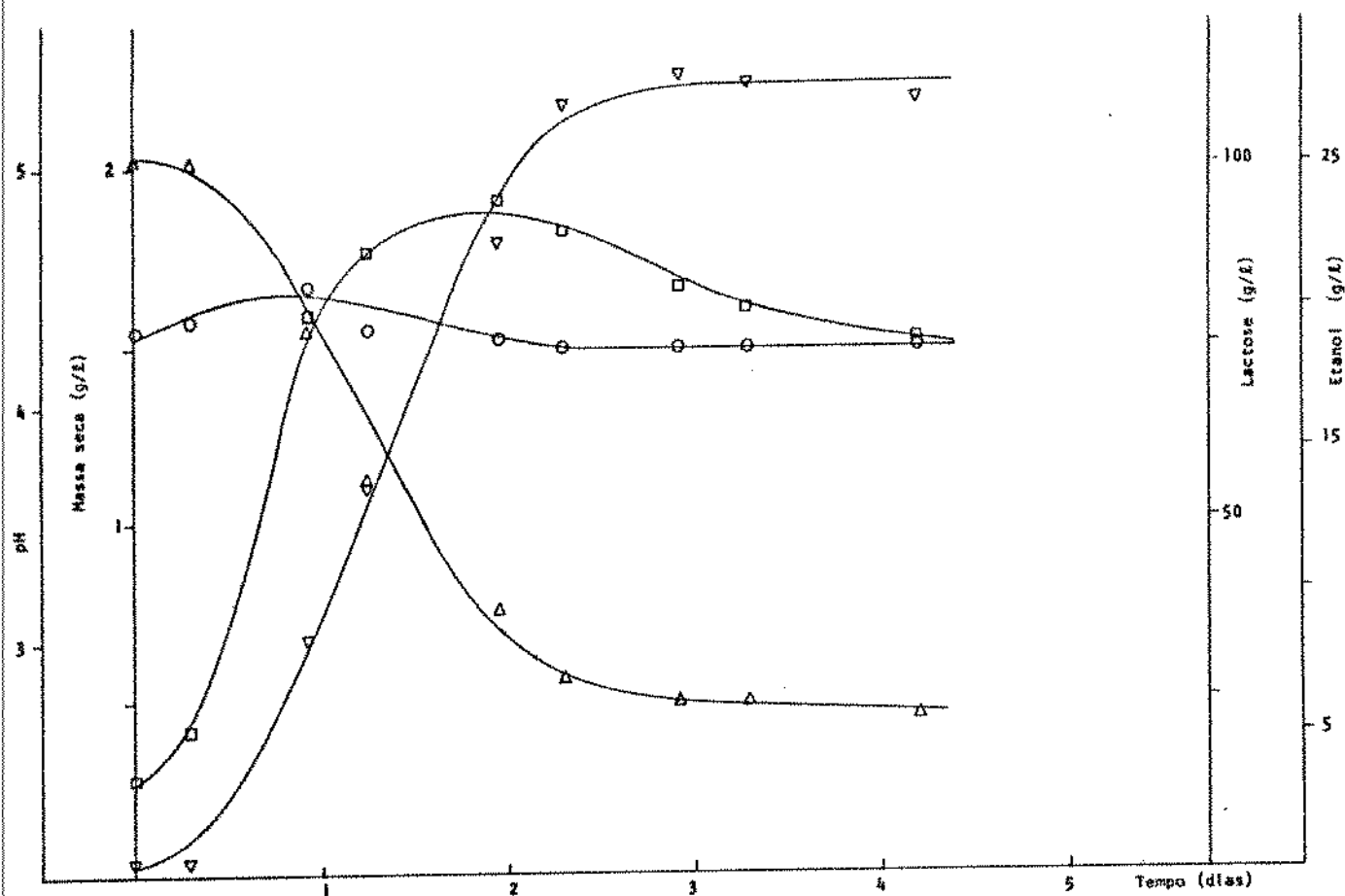


FIGURA 4.10. Fermentação de meio sintético por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, pH controlado automaticamente: 2º experimento.

O - pH

□ - Massa seca

Δ - Lactose

▽ - Etanol

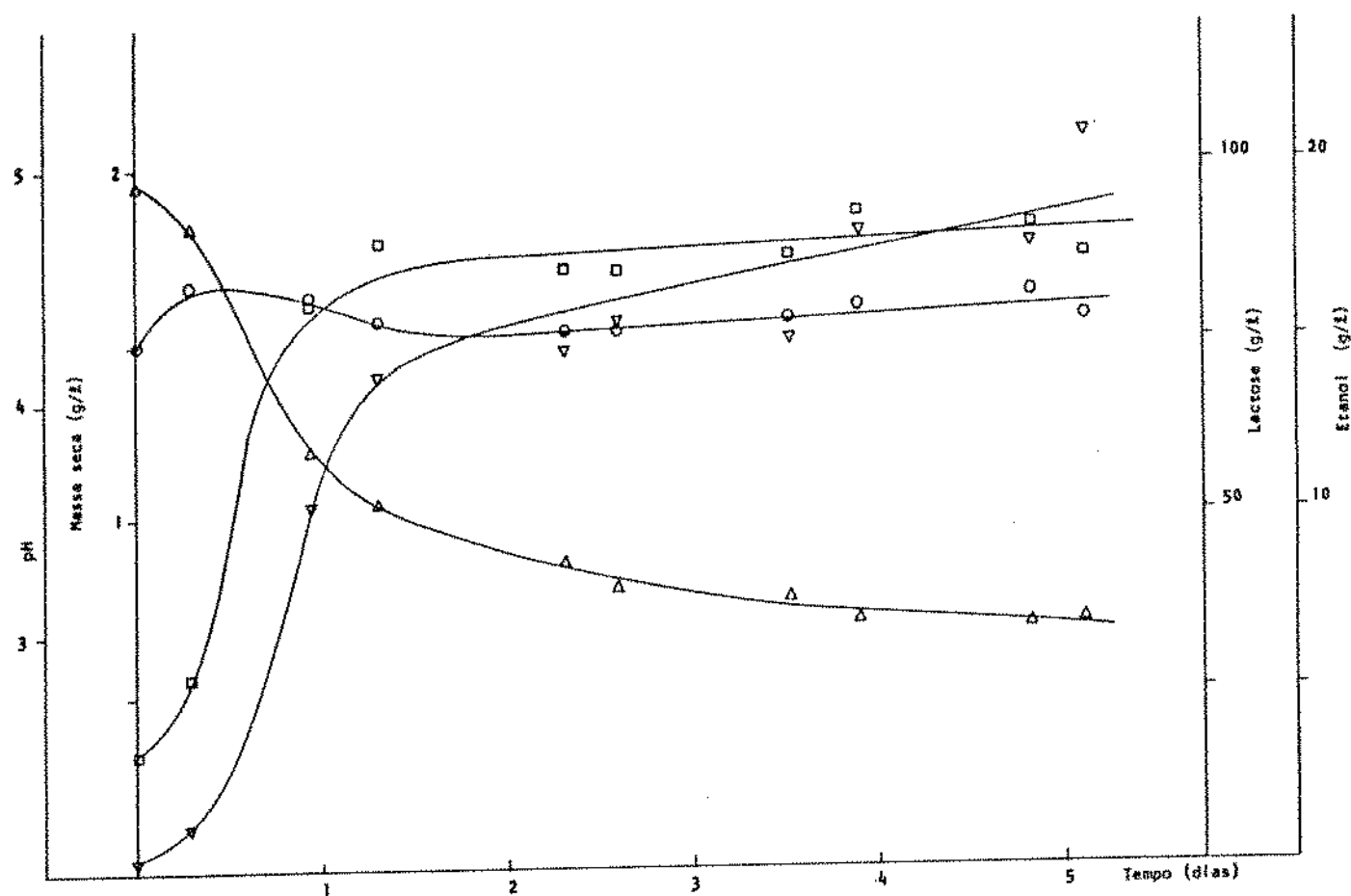


FIGURA 4.11. Fermentação de meio sintético por *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659, pH controlado automaticamente: 1º experimento.

O - pH

□ - Massa seca

Δ - Lactose

▽ - Etanol

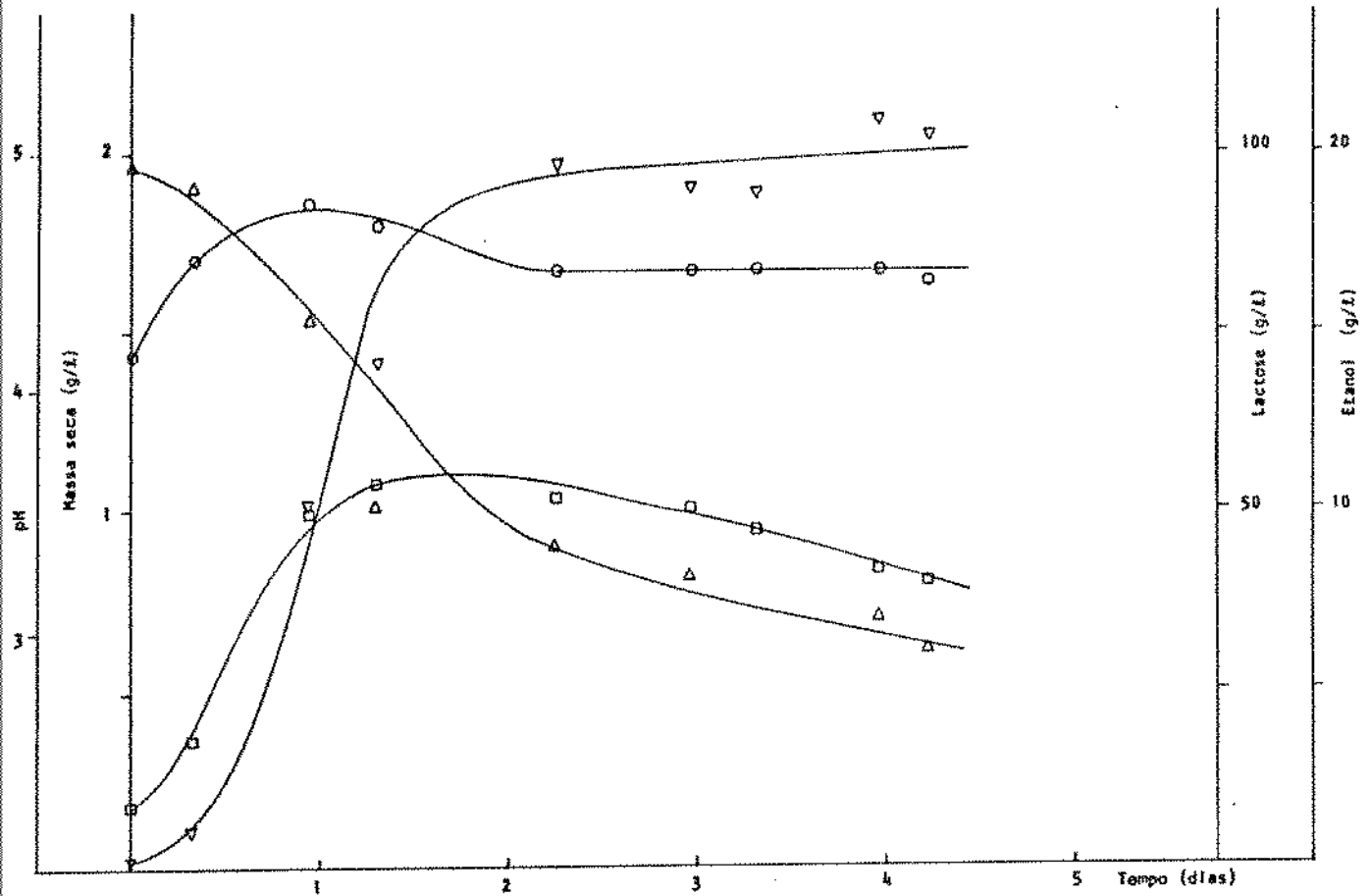


FIGURA 4.12. Fermentação de meio sintético por *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659, pH controlado automaticamente: 2º experimento.

O - pH

□ - Massa seca

Δ - Lactose

▽ - Etanol

Durante estes experimentos, os minifermentadores tiveram suas saídas de gases fechadas com selo de água; em cuja água determinou-se pequena concentração de etanol, indicando que houve perda de etanol por evaporação durante o período de incubação.

4.3. Fermentações em permeado de soro de queijo concentrado a 22,5% de lactose

Durante a adaptação das leveduras em permeado concentrado a 22,5% de lactose, conforme item 3.6.1 de "Materiais e Métodos", verificou-se que não era necessário controlar o pH automaticamente com adição de base ao meio, uma vez que o pH não diminuiu, portanto não causando a inibição dos microrganismos.

Após a adaptação das cepas, foram feitas fermentações não aeradas de permeado concentrado a 22,5% de lactose (concentração nominal), conforme metodologia 3.6.3, cujos resultados são apresentados nas Figuras 4.13 a 4.24. A Tabela 4.5 resume os resultados finais da fermentação de permeado não aerado, concentrado a 22,5% de lactose pelas seis leveduras.

De forma geral, verificou-se que a produção de etanol foi baixa, assim como também o consumo de lactose.

As Figuras 4.13 e 4.14 mostram o comportamento da *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612. Em ambos os experimentos, houve uma produção de cerca de 16g/l de etanol, restando uma concentração de lactose de cerca de 170g/l (Tabela 4.5). Comportamento semelhante a este verificou-se com a *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635 no primeiro experimento (Figura 4.15), tendo apresentado uma produção menor de etanol, cerca de 7,5g/l (Tabela 4.5), já no segundo experimento (Figura 4.16), esta levedura não consumiu lactose, indicando estar inibida. A *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045 (Figuras

4.17 e 4.18) produziu 9,48g/l de etanol no primeiro experimento e 14,44g/l no segundo; a lactose residual no primeiro experimento foi de aproximadamente 193g/l e no segundo de 184g/l (Tabela 4.5). A *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220 não mostrou atividade fermentativa no segundo experimento, provavelmente por estar inibida (Figura 4.20), enquanto que no primeiro (Figura 4.19) produziu cerca de 11g/l de etanol, restando no meio 187g/l de lactose (Tabela 4.5). A *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 foi a levedura que mostrou estar mais adaptada a consumir lactose em permeado concentrado a 22,5% de lactose. No primeiro experimento (Figura 4.21) houve uma produção de 14,22g/l de etanol e uma concentração de lactose remanescente de 177,3g/l (Tabela 4.5), enquanto que no segundo experimento (Figura 4.22), estes valores foram de 46,97g/l de etanol e 109,2g/l de lactose remanescente (Tabela 4.5). Conforme se observa, o primeiro experimento apresenta um valor de etanol produzido relativamente baixo e um valor bastante alto de lactose residual. Estes valores provavelmente se devem ao fato de que a fase lag desta fermentação teve uma duração maior do que no caso do segundo experimento, tendo sido a fase exponencial desta fermentação acompanhada por um dia a menos que no outro caso. Estes resultados indicam que no primeiro experimento, o rendimento foi de 59,47% do teórico e no segundo 73,02% do teórico (Tabela 4.5) (em relação à lactose consumida). Esta levedura também apresentou a maior produção de massa celular, 1,18g/l no primeiro experimento e 2,09g/l no segundo (Tabela 4.5). As Figuras 4.23 e 4.24 mostram os resultados obtidos com *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659. No primeiro experimento (Figura 4.23), houve uma produção de 9,62g/l de etanol e 169,44g/l de lactose remanescente, no segundo 9,42g/l de etanol e 179,67g/l de lactose remanescente (Tabela 4.5).

TABELA 4.5. Produção de etanol a partir de permeado de soro de queijo concentrado a 22,5% de lactose.

	Etanol produzido*		Lactose remanescente		Massa celular		Y _{p/s} como percentagem do rendimento teórico
	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.	
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8612	16,96	15,74	169,58	177,56	0,59	0,32	64,74 65,67
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 8635	7,68	-	186,20	222,31	0,18	0,17	54,86 -
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 16045	9,48	14,44	192,79	183,79	0,20**	1,06	57,36 70,37
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 100220	10,60	-	187,09	216,71	0,14	0,14	57,76 -
<i>Saccharomyces fragilis</i> NRRL Y-2415	14,22	46,97	177,29	109,16	1,18	2,09	59,47 73,02
<i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8659	9,62	9,42	169,44	179,67	0,57	1,18	43,94 41,81

* Etanol produzido calculado como a diferença entre a concentração final e a inicial logo após a adição do inóculo.

** Penúltimo ponto da curva de massa seca.

Os resultados apresentados nesta Tabela são referentes aos últimos pontos dos gráficos (última amostra de cada fermentação) (Gráficos 4.13 a 4.24).

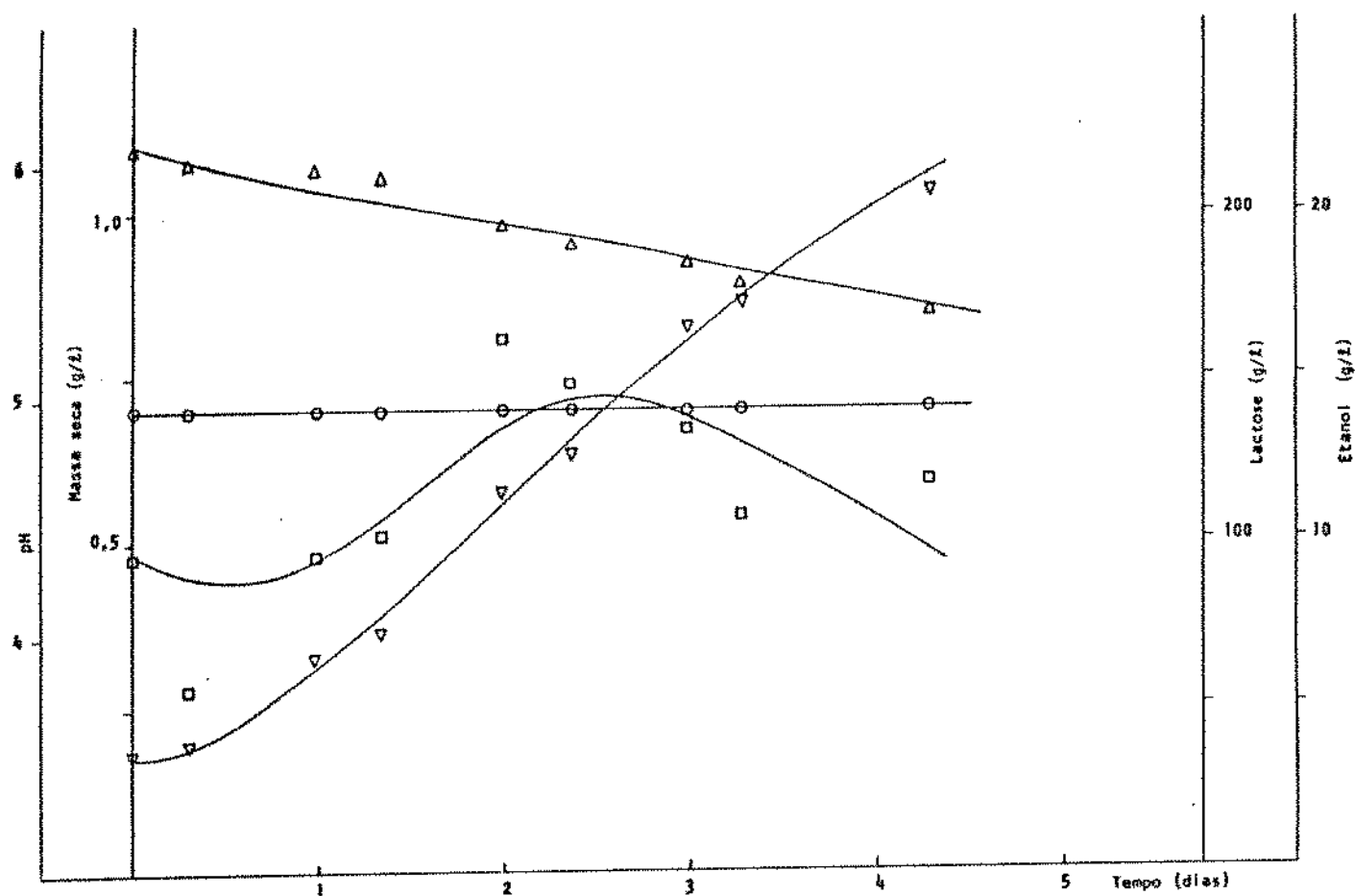


FIGURA 4.13. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

○ - pH

□ - Massa seca

△ - Lactose

▽ - Etanol

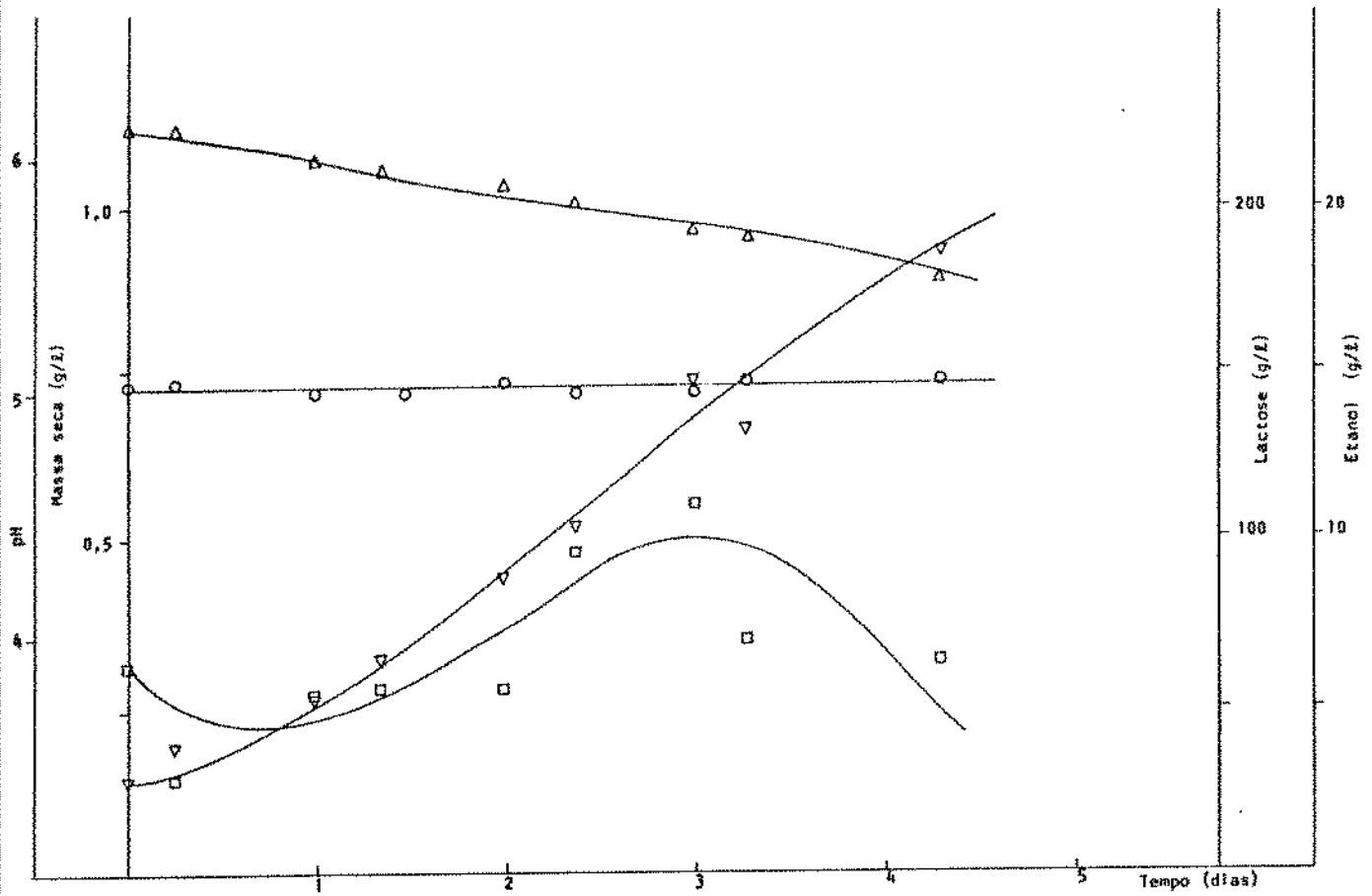


FIGURA 4.14. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

O - pH

□ - Massa seca

Δ - Lactose

▽ - Etanol

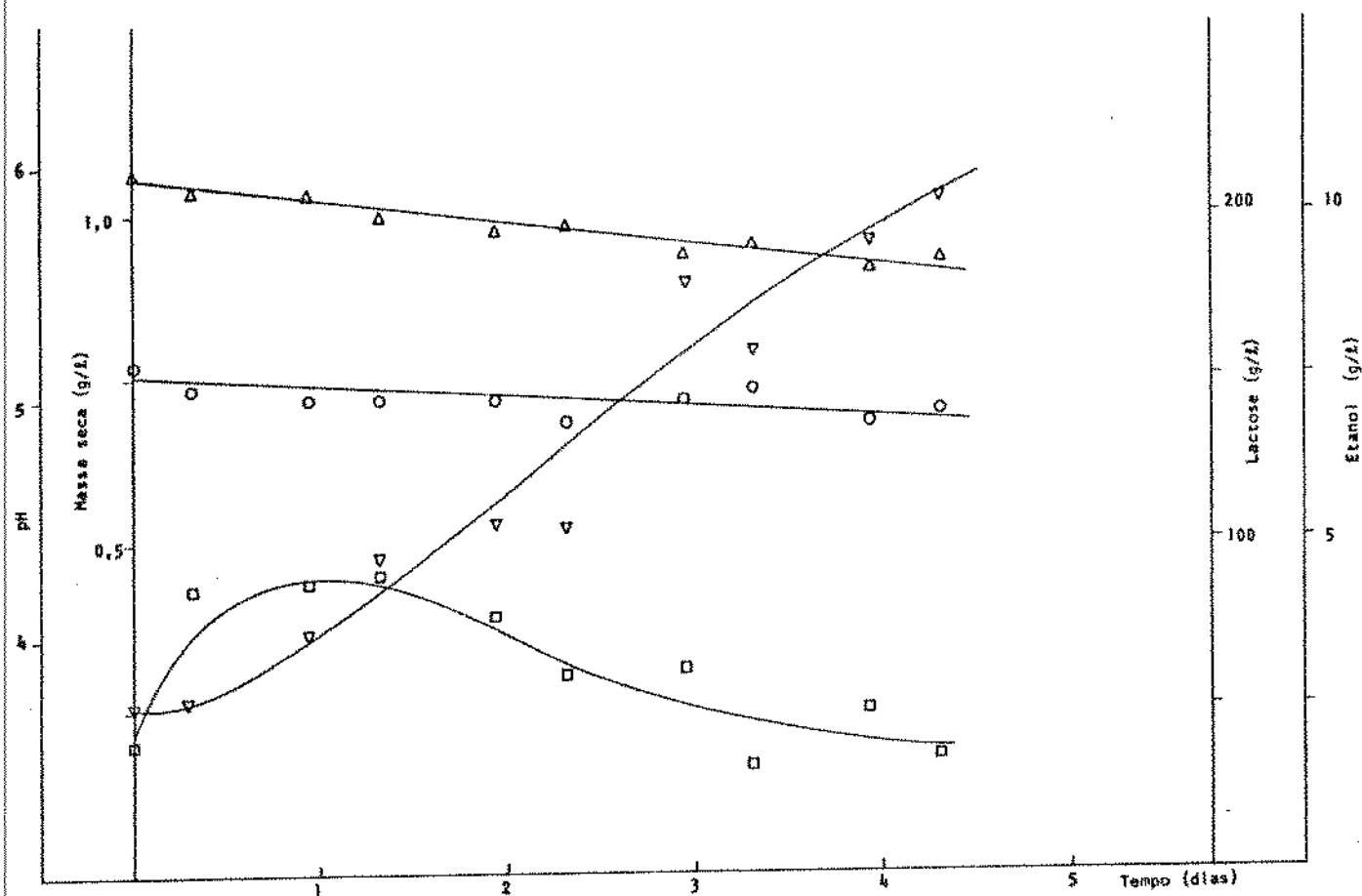


FIGURA 4.15. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

○ - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

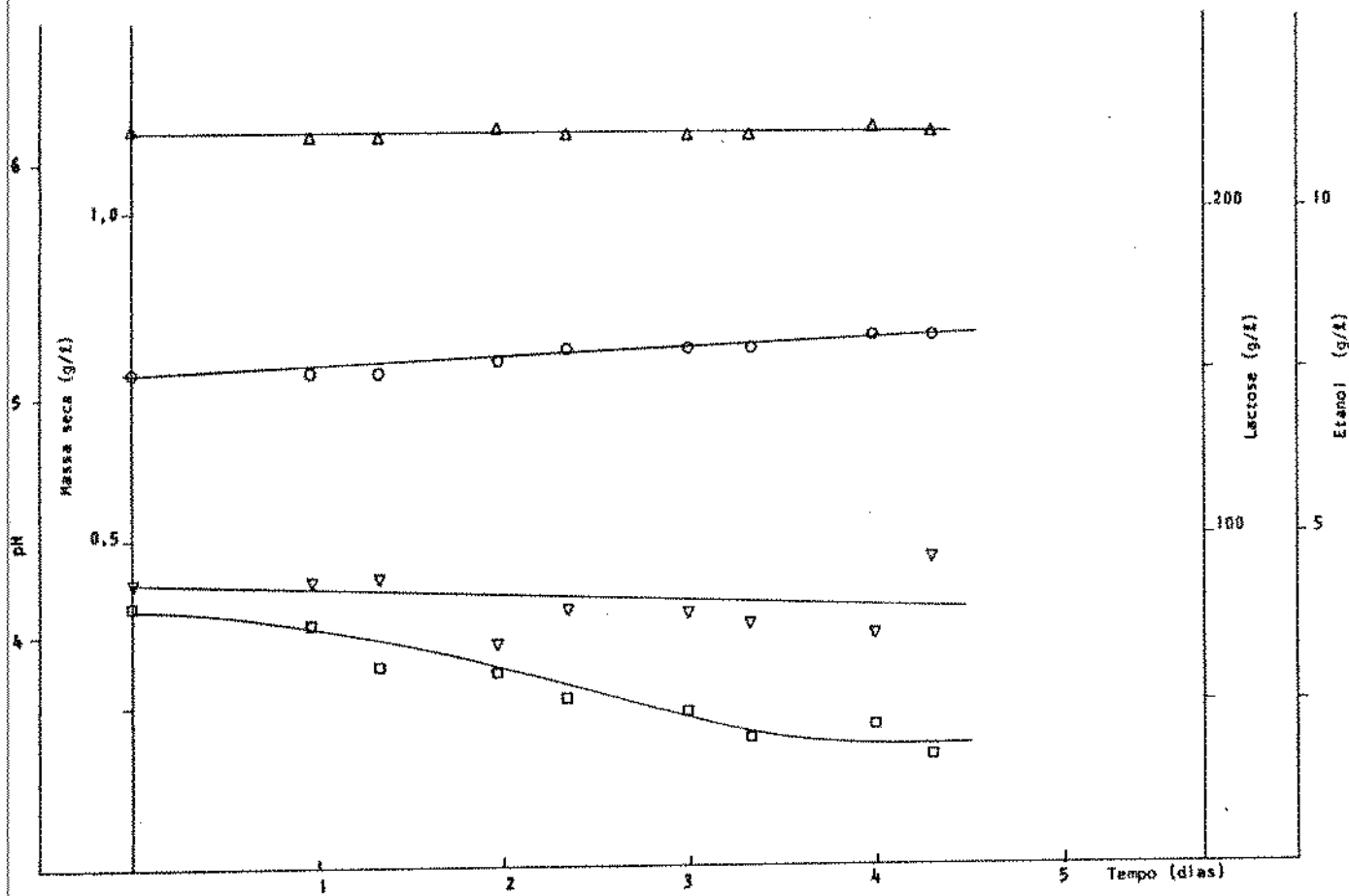


FIGURA 4.16. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

O - pH □ - Massa seca
Δ - Lactose ▽ - Etanol

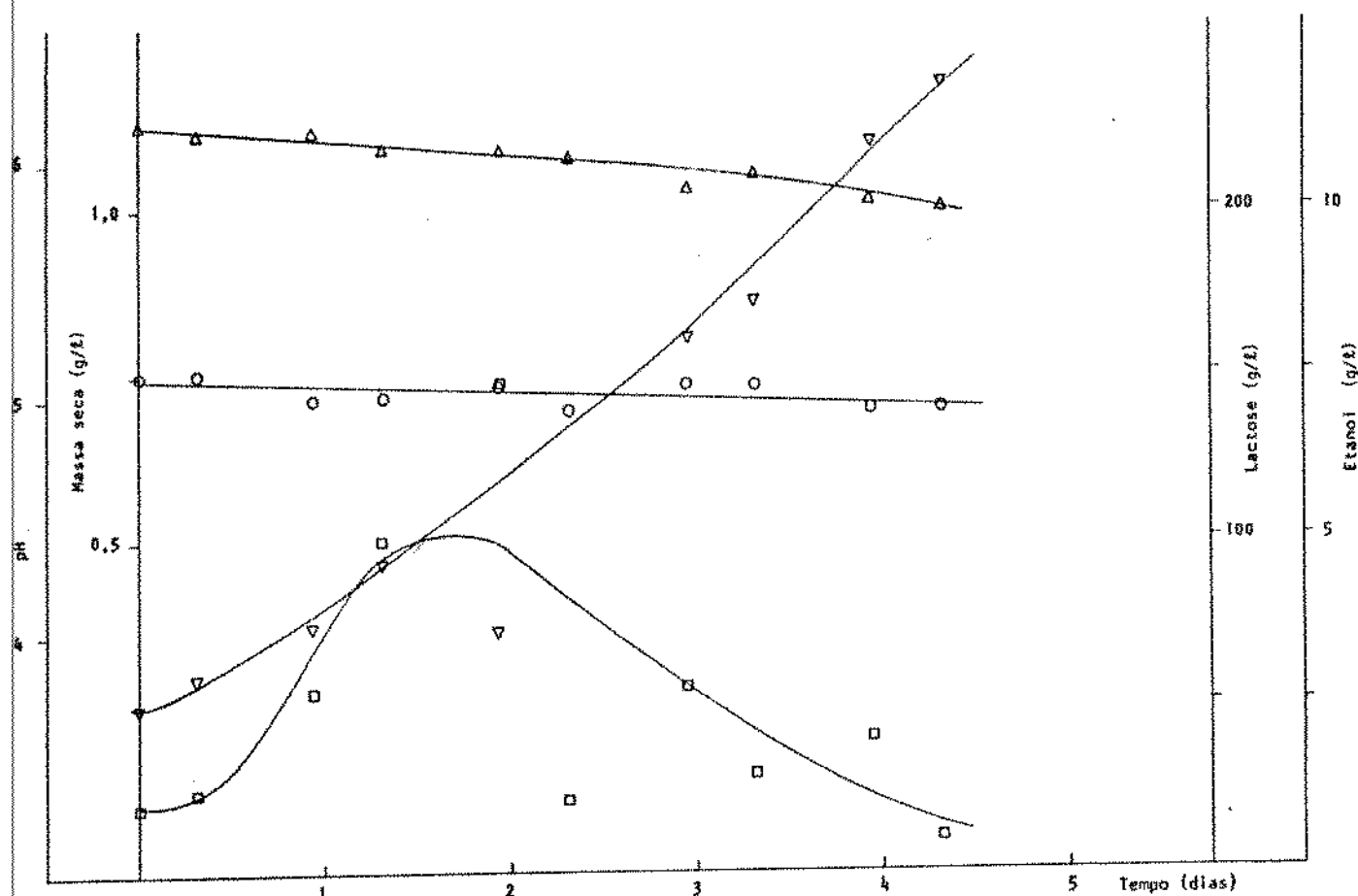


FIGURA 4.17. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

○ - pH □ - Massa seca

△ - Lactose ▽ - Etanol

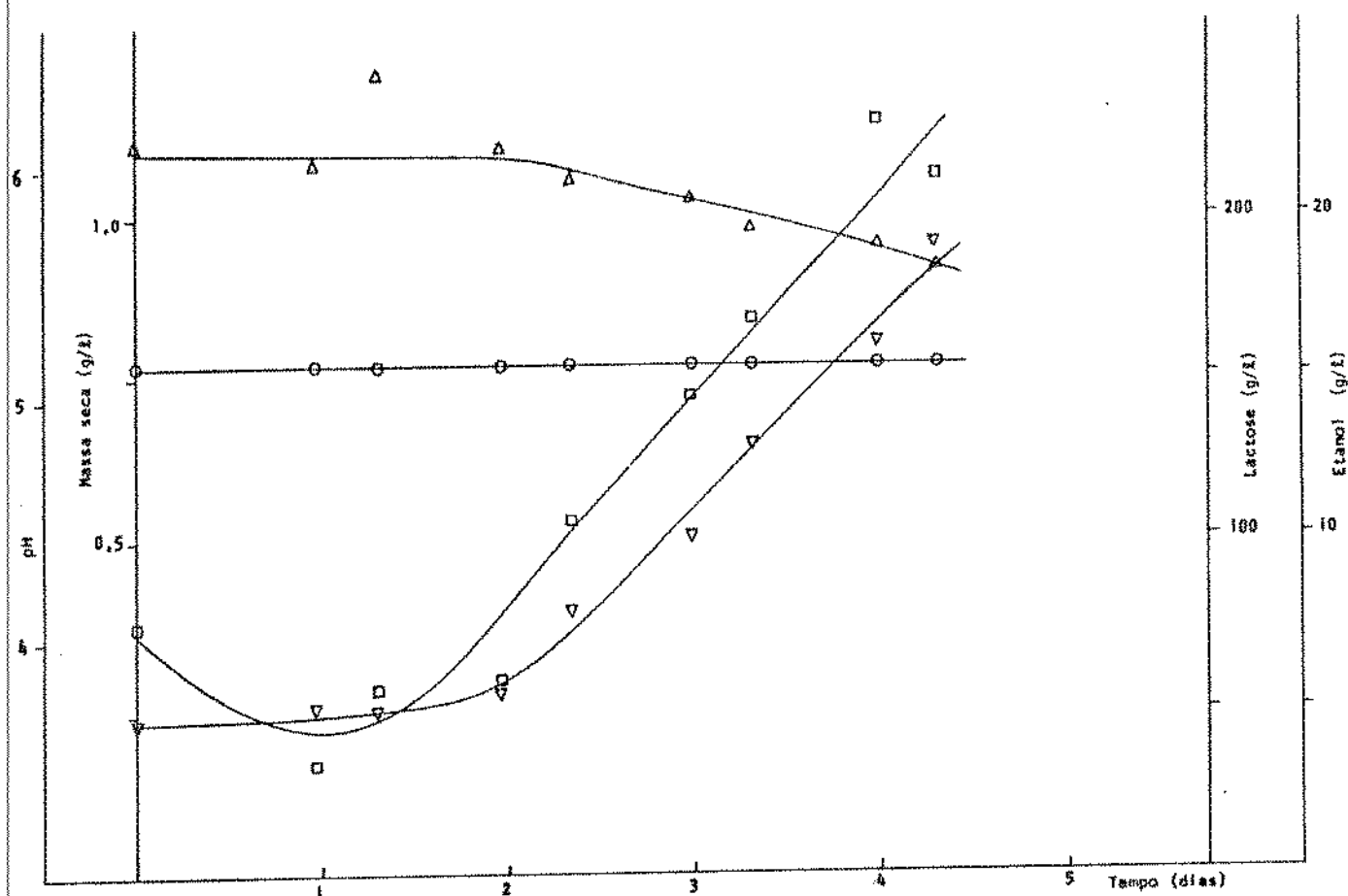


FIGURA 4.18. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

○ - pH

□ - Massa seca

△ - Lactose

▽ - Etanol

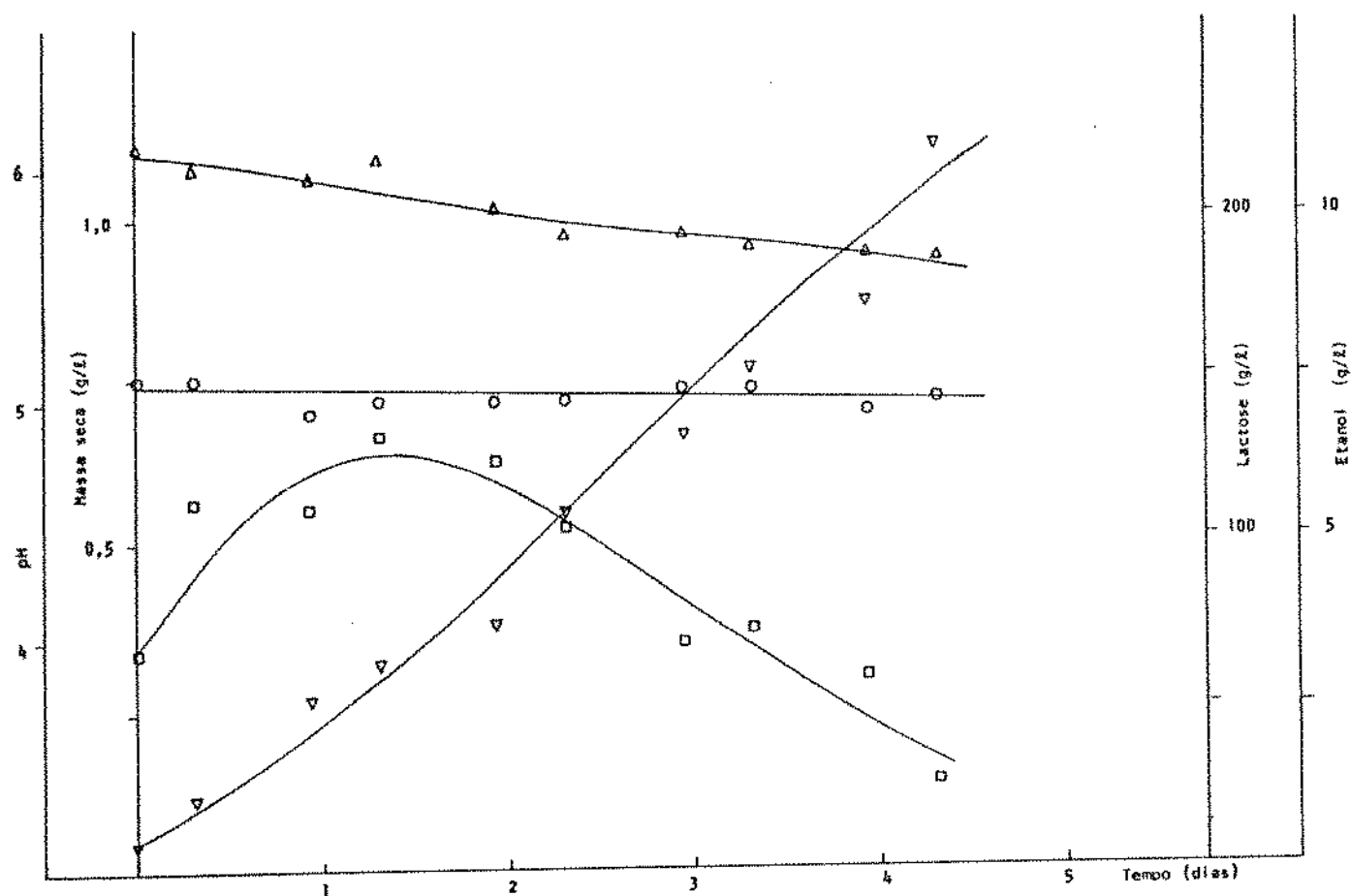


FIGURA 4.19. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

○ - pH

□ - Massa seca

△ - Lactose

▽ - Etanol

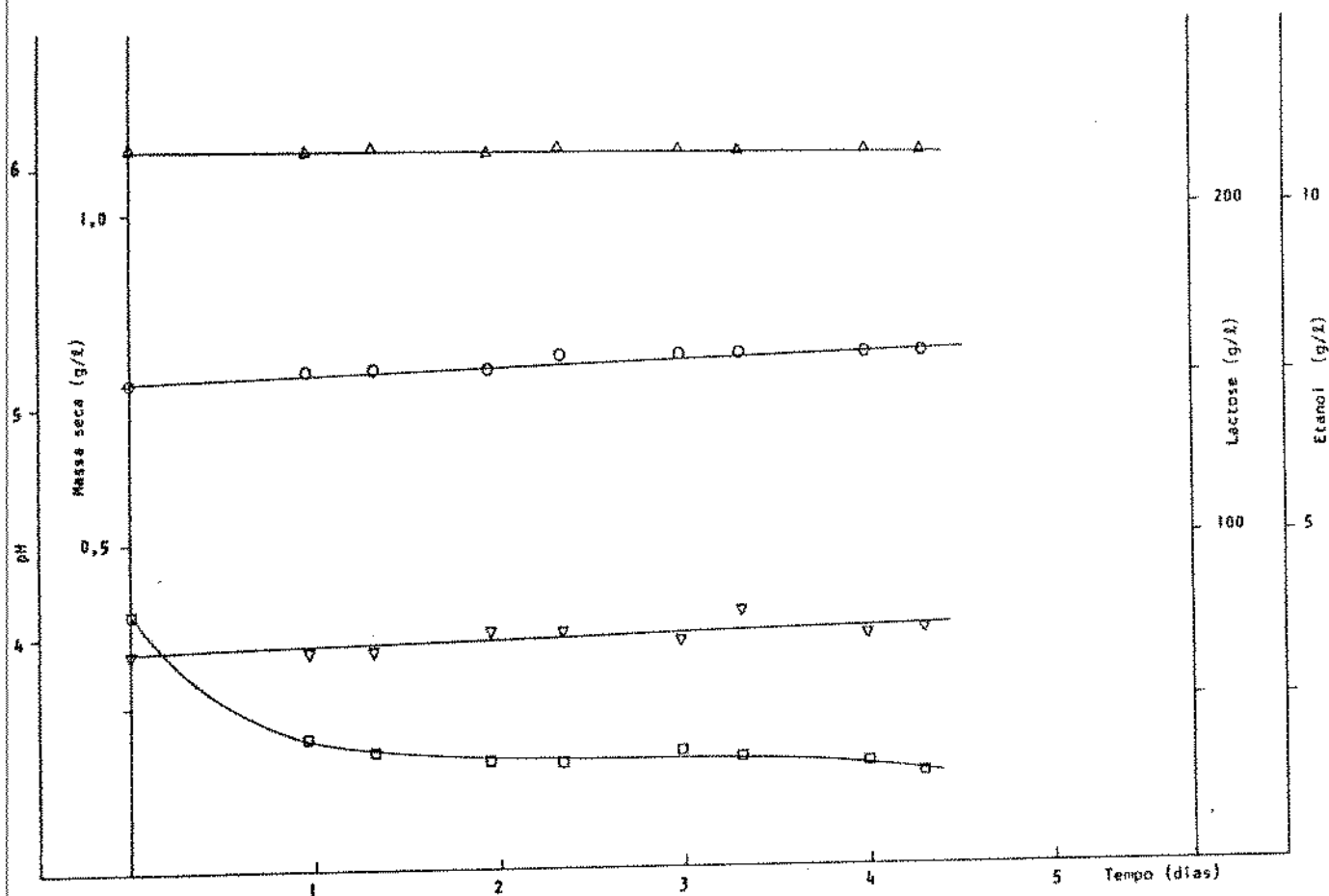


FIGURA 4.20. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

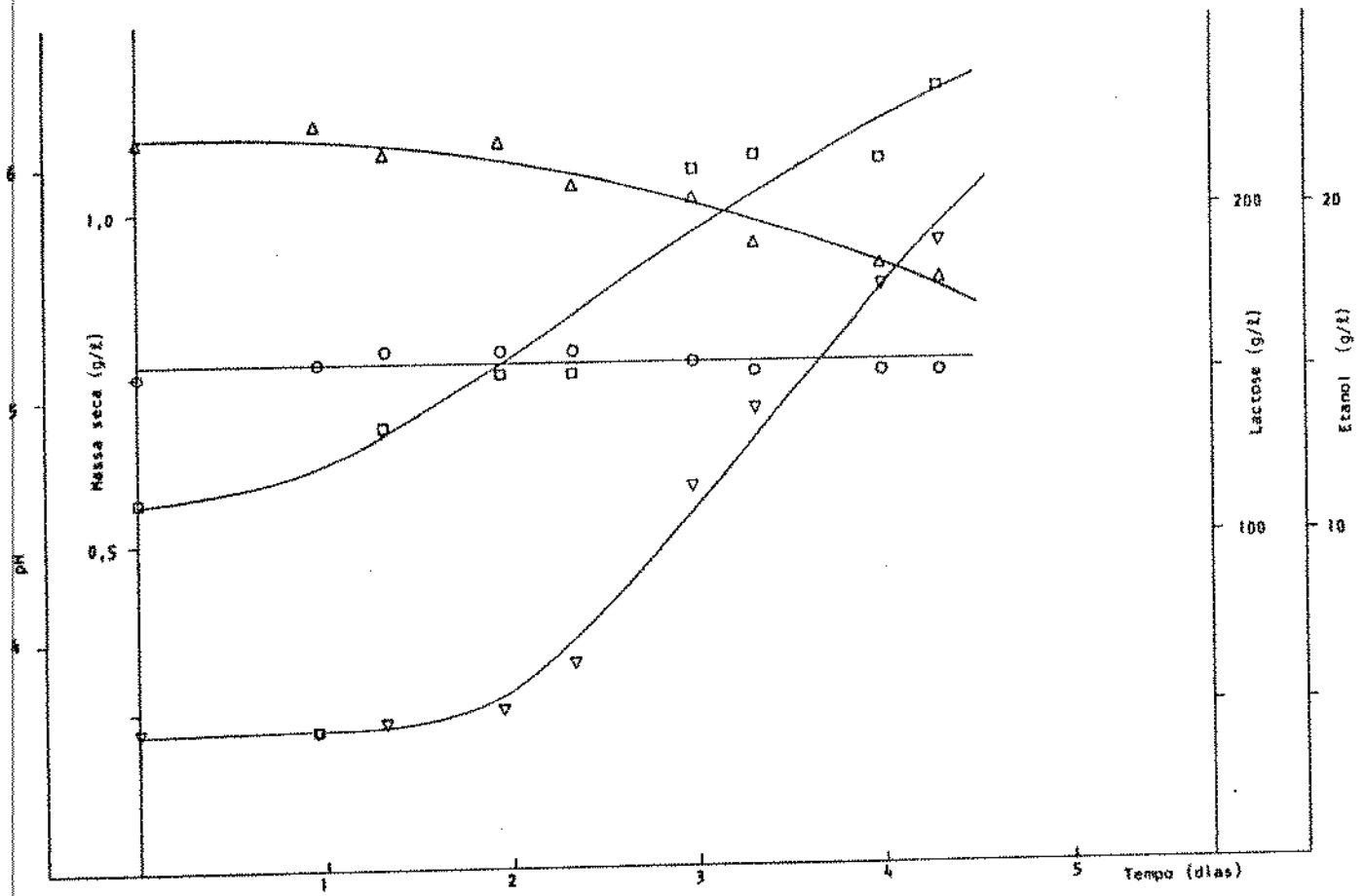


FIGURA 4.21. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

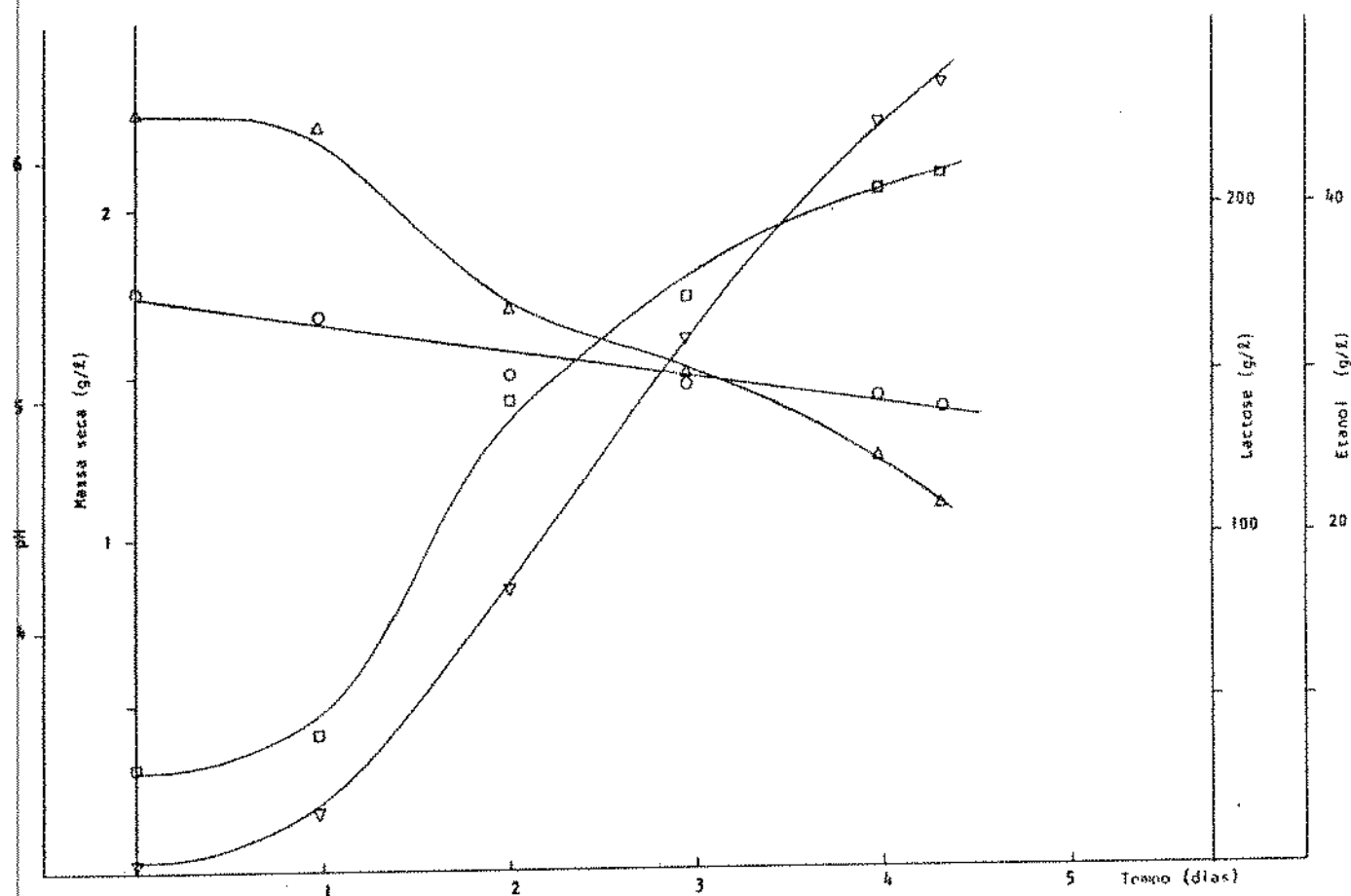


FIGURA 4.22. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

○ - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

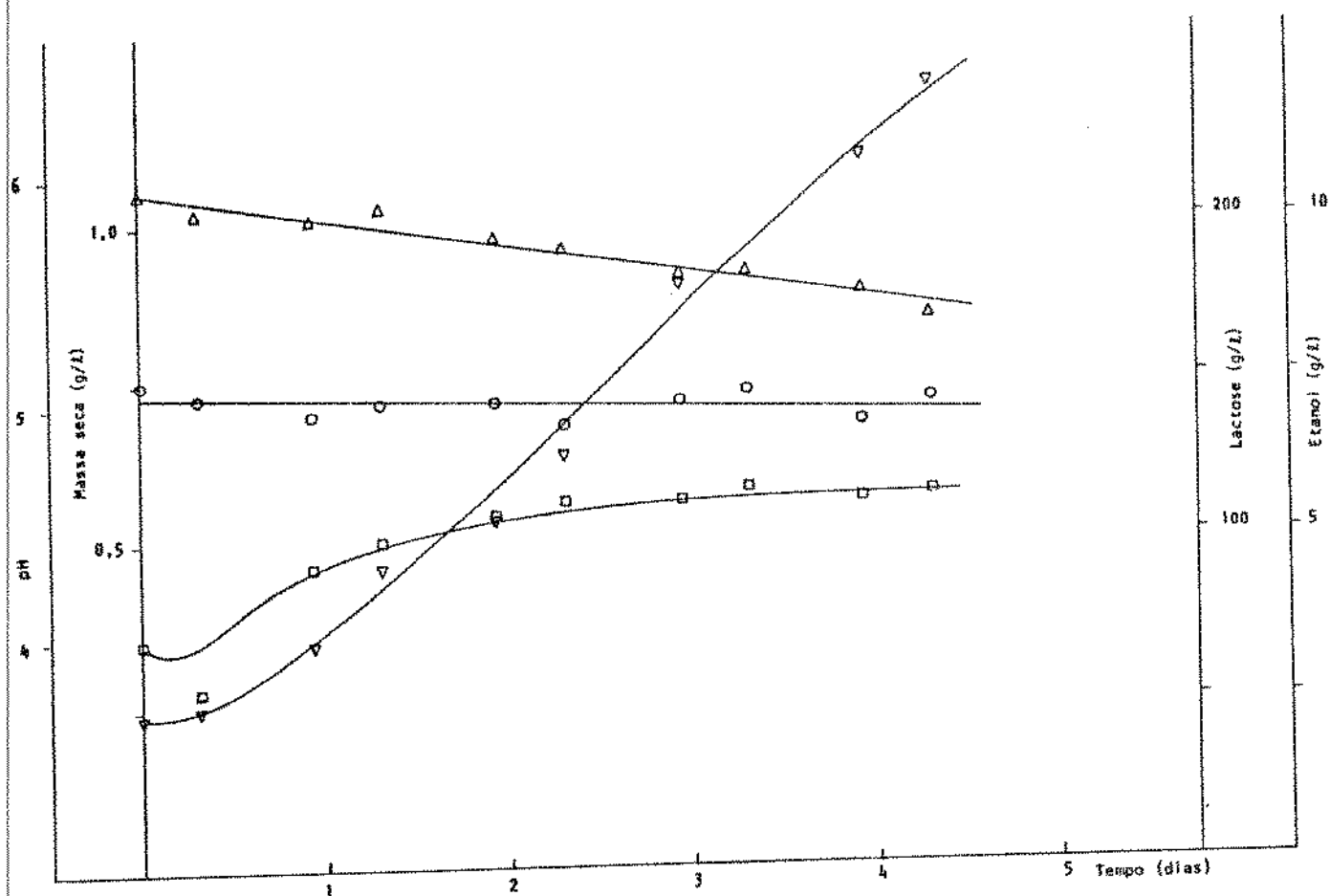


FIGURA 4.23. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

○ - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

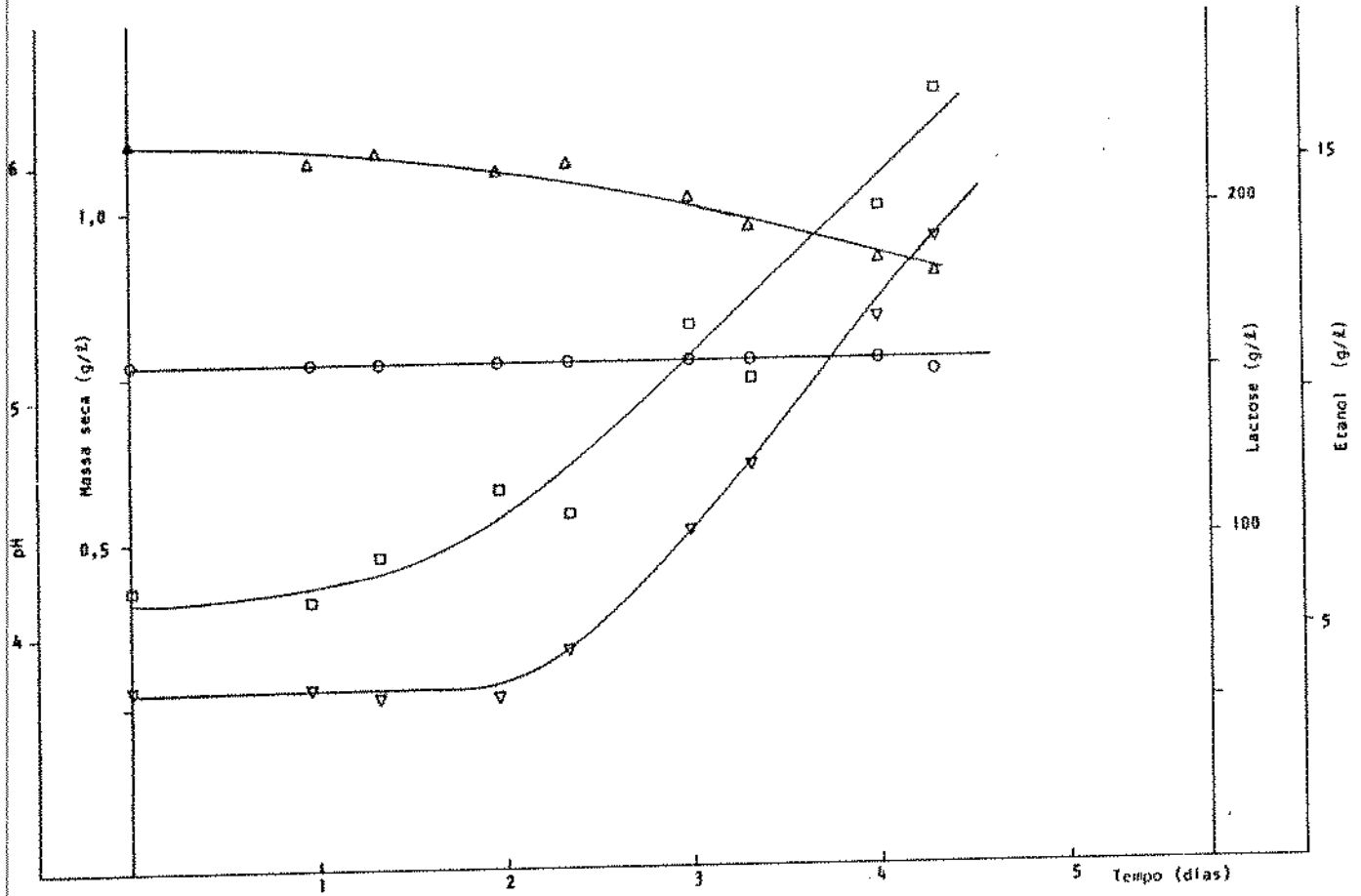


FIGURA 4.24. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

O - pH

□ - Massa seca

Δ - Lactose

▽ - Etanol

Embora o teor de lactose remanescente nos experimentos com a *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 fossem altos, esta levedura foi a que mais produziu etanol (Figura 4.22), sendo que quando a fermentação foi interrompida, esta ainda não havia cessado, indicando que poderia ocorrer um maior consumo de lactose e conseqüentemente maior produção de etanol, fatos que contribuíram para selecioná-la como a melhor produtora de etanol em permeado concentrado a 22,5% de lactose.

4.4. Produção de etanol por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 em função da concentração de lactose no permeado

Com a levedura selecionada nas etapas anteriores, *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, foi estudada a produção de etanol em permeado concentrado a 10 e 15% de lactose (Figuras 4.25, 4.26, 4.27 e 4.28). A Tabela 4.6 resume os resultados finais das fermentações não aeradas de permeado concentrado a 10 e 15%, bem como os resultados obtidos com 22,5% de lactose (Figuras 4.21 e 4.22).

A concentração de etanol obtida no final das fermentações com permeado concentrado a 10% e 15% de lactose foi praticamente a mesma e similar na média à obtida com 22,5% de lactose inicial (Tabela 4.6), enquanto que a concentração de lactose remanescente aumentou com o aumento de concentração inicial de lactose no permeado (Tabela 4.6).

Chen e col. (1982) também encontraram resultado similar para concentração inicial de 10% de lactose em permeado de soro de queijo suplementado com 0,7% de extrato de levedura e 10mg/ℓ de ergosterol (36,5g/ℓ de etanol), tendo também encontrado uma massa celular ao final de 44 horas de incubação ao redor de 2,0g/ℓ.

Jã Marwaha e Kennedy (1984) encontraram resultados melhores que este para fermentação de 9,8% de lactose em permeado de

TABELA 4.6. Fermentações não aeradas de permeado de soro de queijo com 10, 15 e 22,5% de lactose por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415.

Concentração nominal de lactose	10%		15%		22,5%	
	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.
Concentração inicial de lactose (g/l)	100,41	95,15	134,98	141,28	221,73	228,72
Lactose remanescente (g/l)	1,11	1,00	52,92	45,85	177,29	109,16
Lactose consumida (g/l)	99,30	94,15	82,06	95,43	44,44	119,56
Etanol produzido (g/l)*	35,39	32,86	30,54	31,43	14,22	46,97
Rendimento ($Y_{p/s}$ expresso em percentagem de rendimento teórico)	66,24	64,87	69,17	61,22	59,47	73,02
Massa celular seca (g/l)	2,23	2,05	1,91	1,89	1,18	2,09
Rendimento celular ($Y_{x/s}$) (g/g)**	2,25	2,18	2,33	1,98	2,66	1,75

* Etanol produzido calculado como a diferença entre a concentração final e a inicial logo após a adição do inóculo.

** Os valores de rendimento celular ($Y_{x/s}$) encontram-se multiplicados por 100.

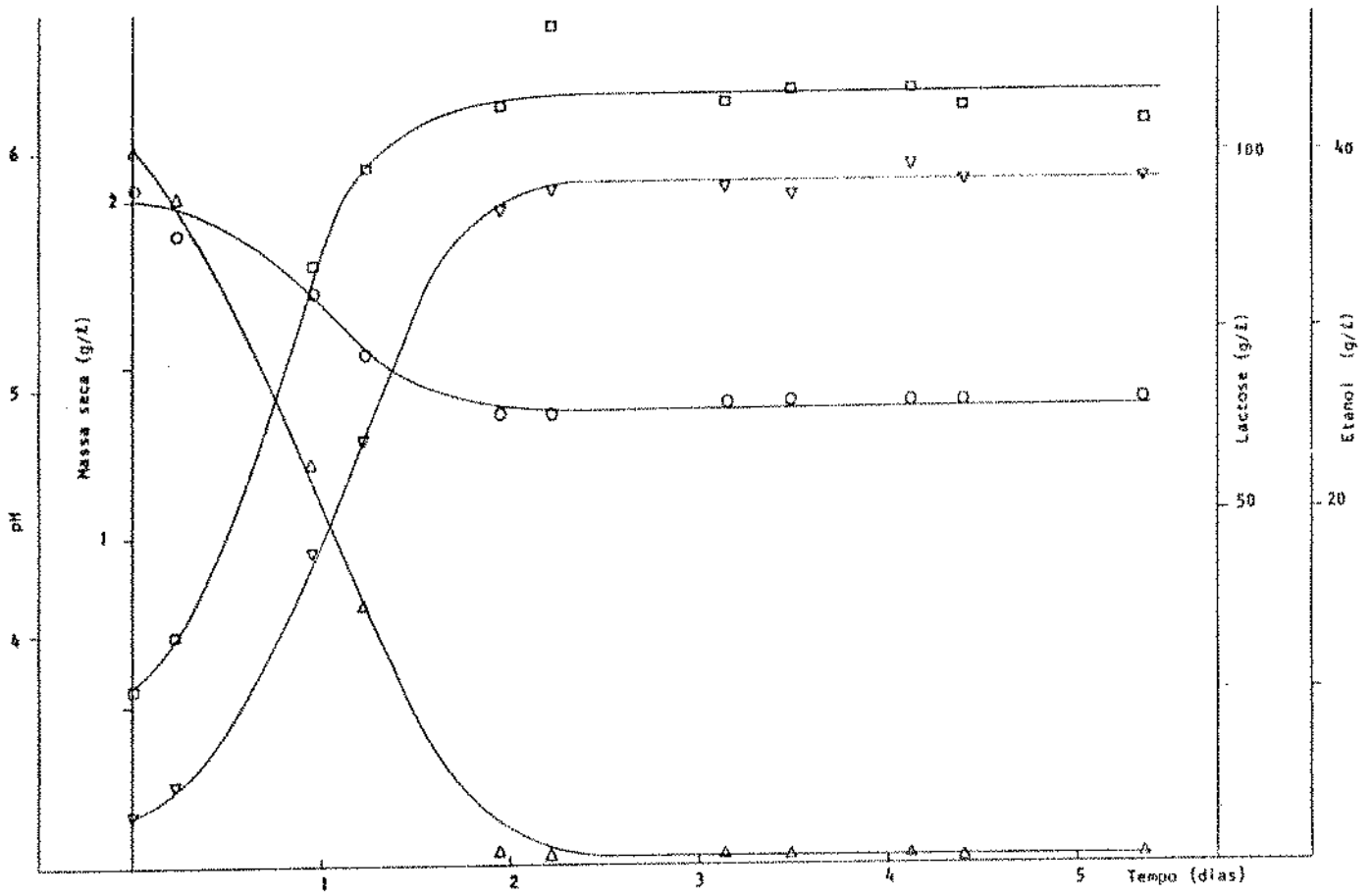


FIGURA 4.25. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 10%.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

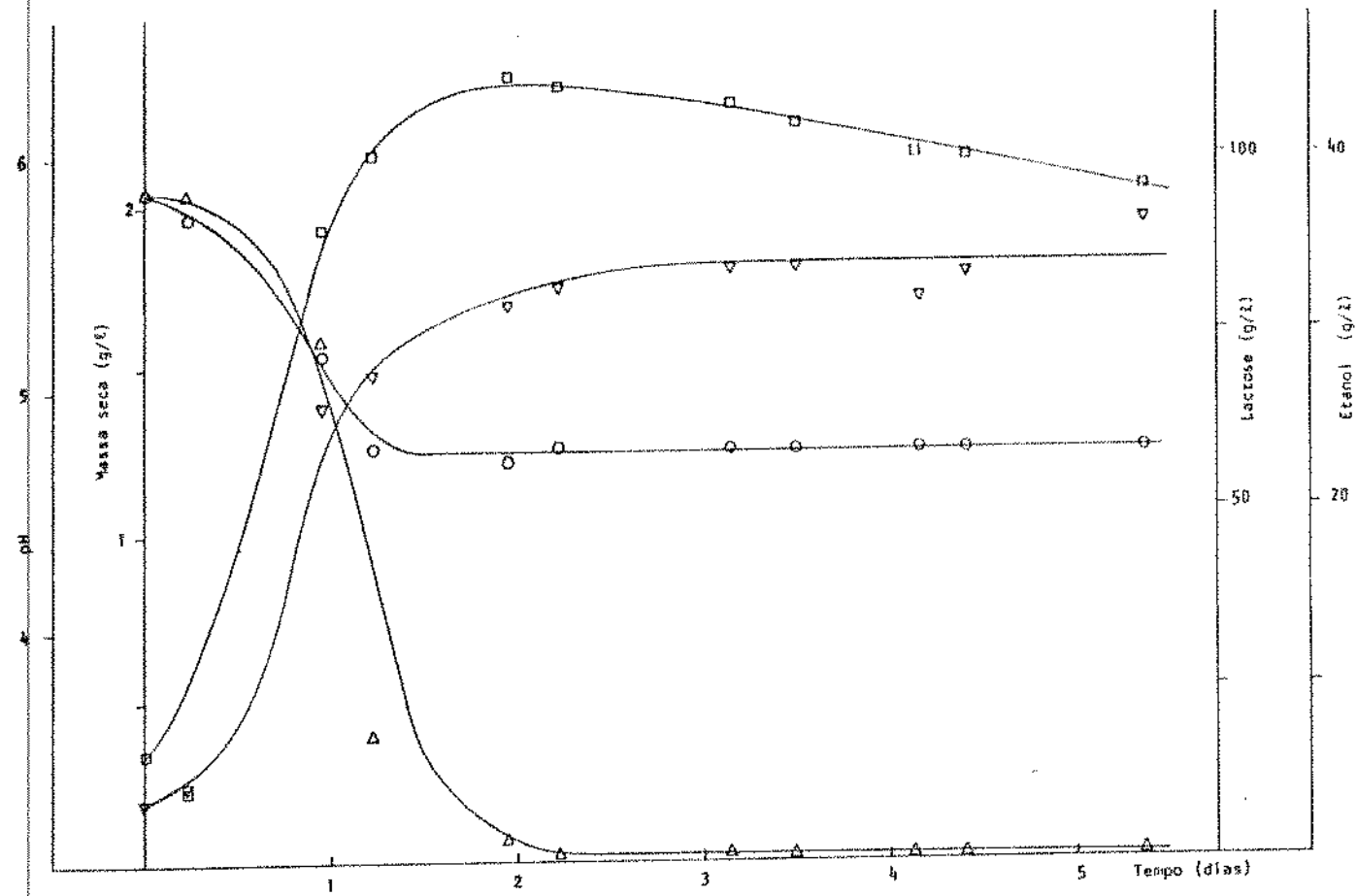


FIGURA 4.26. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 10%.

○ - pH □ - Massa seca
△ - Lactose ▽ - Etanol

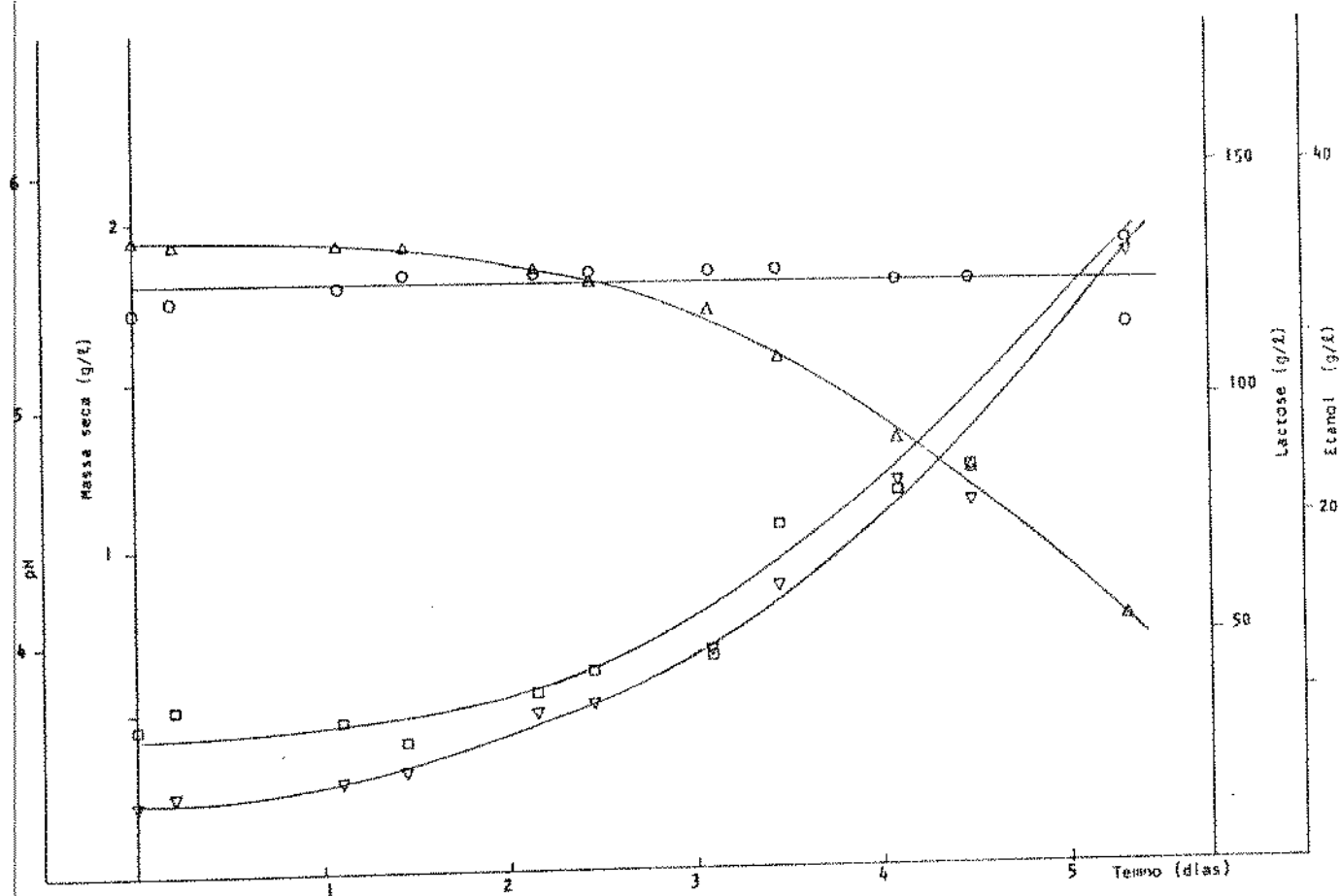


FIGURA 4.27. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 15%.

○ - pH

□ - Massa seca

△ - Lactose

▽ - Etanol

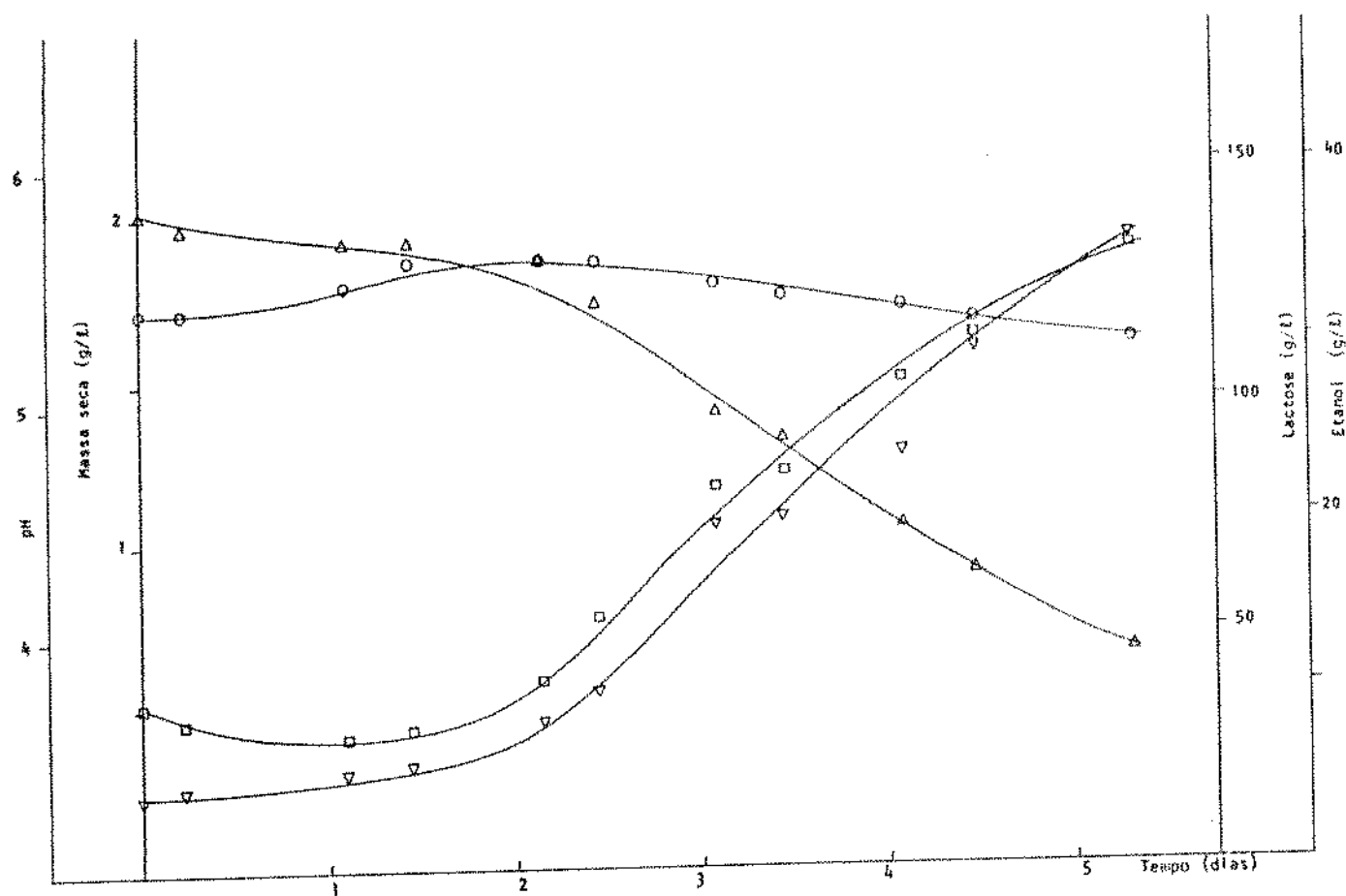


FIGURA 4.28. Fermentação de permeado de soro de queijo por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 15%.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

soro de queijo, obtendo 42,6g/l de etanol em fermentação contínua com *Kluyveromyces marxianus* NCYC 197 com concentração de 120g/l de células secas.

Os valores de rendimento celular obtidos com a *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, nas fermentações não aeradas, oscilaram de $1,75 \cdot 10^{-2}$ a $2,66 \cdot 10^{-2}$ g/g (Tabela 4.6), os quais são da mesma ordem de grandeza do rendimento celular encontrado por Gawel e Kosikowski (1978a) ($1,24 \cdot 10^{-2}$ grama de célula por grama de lactose metabolizada), para a *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 adaptada em permeado concentrado a 22,5% de lactose, rendimento este menor ao que obtiveram para a mesma levedura sem adaptação a altas concentrações de lactose.

As fermentações de permeado com 22,5% de lactose (Figuras 4.21 e 4.22) não haviam cessado em 103,5 horas de incubação (cerca de 4,3 dias), sendo a lactose remanescente alta, como mostra a Tabela 4.6. Com permeado com cerca de 15% de lactose, as fermentações também não haviam cessado em 127 horas de incubação (cerca de 5,3 dias) (Figuras 4.27 e 4.28), sendo a concentração de lactose remanescente alta também. Para concentração de lactose de cerca de 10%, as fermentações cessaram em 2,5 a 3 dias de incubação (Figuras 4.25 e 4.26), sendo a concentração residual de lactose cerca de 1,0g/l.

Visando incrementar o consumo de lactose e reduzir o tempo de incubação, procurou-se produzir maior concentração de massa celular procedendo aeração do meio no início da fermentação, com concentrações iniciais de lactose de 22,5 e 15% (Figuras 4.29, 4.30, 4.31 e 4.32). A Tabela 4.7 resume os resultados finais destas fermentações.

Os resultados obtidos mostram que a máxima produção de etanol para um consumo quase que total da lactose, foi conseguida com concentração inicial de lactose de 15% e aeração (Tabela 4.7), resultados diferentes do encontrado por Moulin e col. (1980), que selecionaram a concentração inicial de lactose de 10% para um teor residual de lactose desprezível. Estes pesquisadores obtiveram um rendimento de 84,1% do teórico e um consumo de 90% de lactose presente no permeado, com uma produção de 6% (p/v) de etanol.

A produção de etanol referente às fermentações com concentração inicial de lactose de 22,5% e aeração de 1 VVM na fase inicial (Tabela 4.7), foi menor que a obtida por Gawel e Kosikowski (1978a), com o mesmo microrganismo (80,5g/l de etanol a partir de permeado de soro de queijo concentrado a 24,04% de lactose, suplementado com $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e NH_4OH). Estes pesquisadores obtiveram para esta fermentação um rendimento de 73,4%, valor acima do valor médio encontrado por nós, de 65,39% (Tabela 4.7) e uma concentração remanescente de lactose de 25,60g/l (em 15 dias de incubação, 2% de inóculo em relação à lactose presente no permeado, sem aeração), também próximo do valor por nós encontrado, de 27,64g/l (média dos dois experimentos) (Tabela 4.7). O rendimento celular obtido para as fermentações aeradas (Tabela 4.7) foram levemente superiores aos obtidos nas fermentações não aeradas (Tabela 4.6), porém da mesma ordem de grandeza.

Com o objetivo de melhorar o desempenho obtido com as fermentações aeradas de concentração inicial de lactose de 15%, testou-se a suplementação nestas condições com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 de acordo com o item 3.6.6 de "Materiais e Métodos". Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 4.33 e 4.34 e sumarizados na Tabela 4.7. Estas fermentações produziram maior concentração de massa celular do que em permeado concentrado a 15% de lactose com aeração e sem suplementação, bem como maior rendimento celular, mas

TABELA 4.7. Fermentações por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, aeradas com 1 VVM na fase inicial, de permeado de soro de queijo com 15 e 22,5% de lactose e permeado com 15% de lactose suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 .

Concentração nominal de lactose	22,5%		15%		15%*
	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.	
Concentração inicial de lactose (g/ℓ)	201,89	209,82	143,41	141,99	139,64
Lactose remanescente (g/ℓ)	37,62	17,66	1,95	2,12	15,96
Lactose consumida (g/ℓ)	164,27	192,16	141,46	139,87	123,40
Etanol produzido (g/ℓ)	56,41	69,21	55,50	58,02	29,63
Rendimento ($Y_{p/s}$ expresso em percentagem do rendimento teórico)	63,83	66,94	72,92	77,10	44,63
Massa celular seca (g/ℓ)	4,29	3,97	4,22	4,37	9,19
Rendimento celular ($Y_{x/s}$)**	2,61	2,07	2,98	3,12	7,45
					3,98

* Permeado suplementado com 0,1% (p/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,05% (p/v) de KH_2PO_4 . (Figuras 4.33 e 4.34).

** Os valores de rendimento celular encontram-se multiplicados por 100.

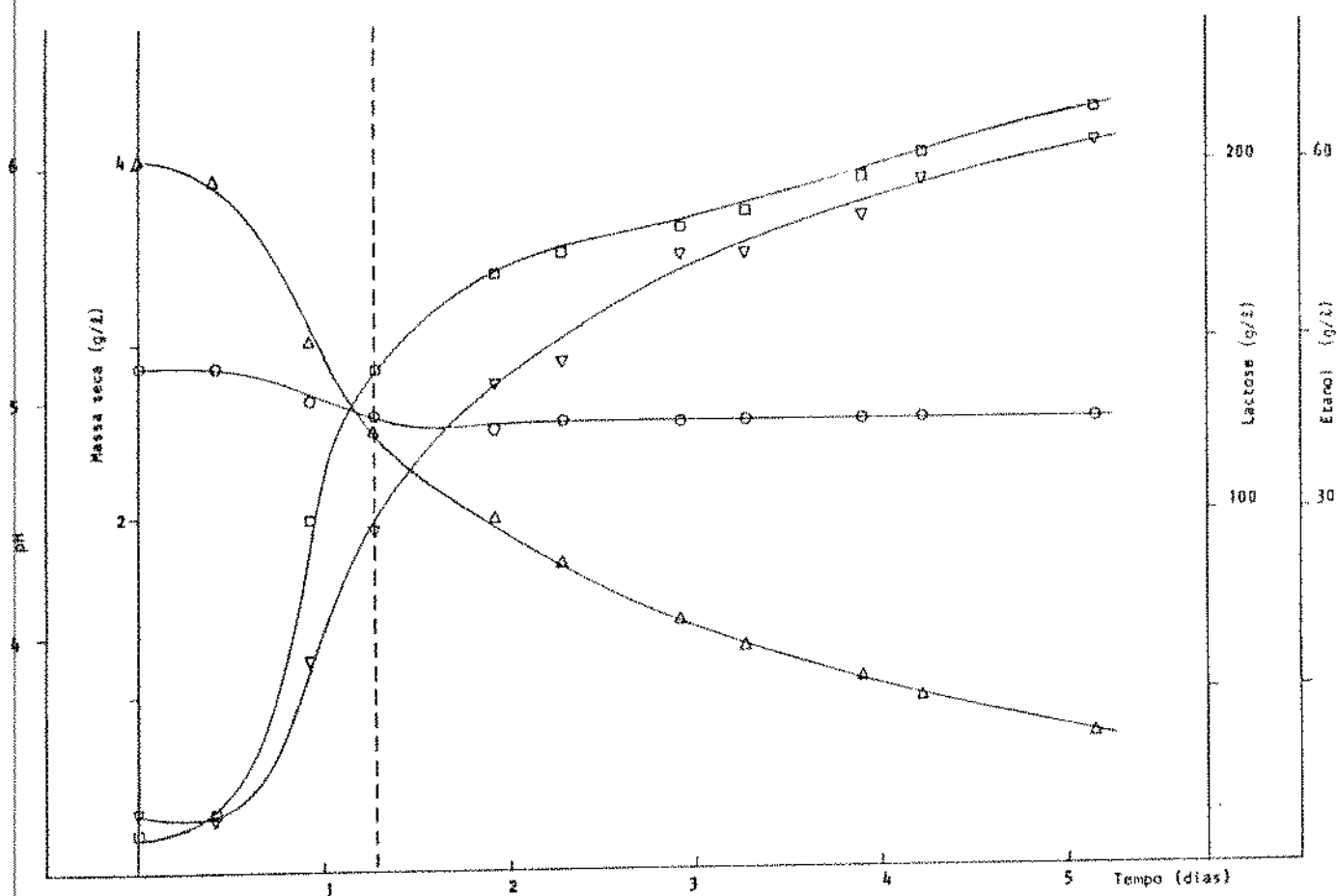


FIGURA 4.29. Fermentação de permeado de soro de queijo com aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

O - pH

□ - Massa seca

Δ - Lactose

▽ - Etanol

Linha pontilhada - momento em que a aeração foi interrompida.

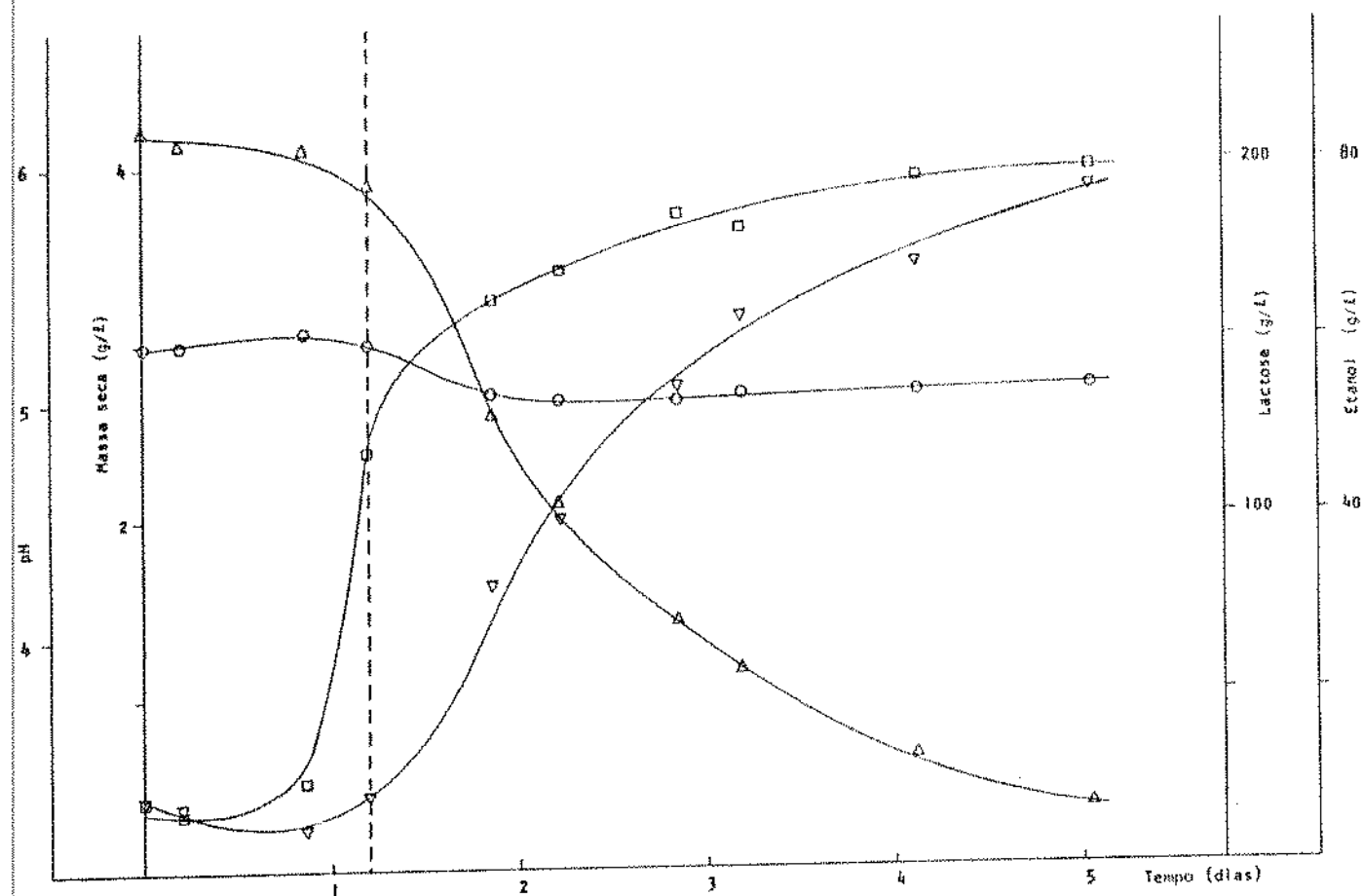


FIGURA 4.30. Fermentação de permeado de soro de queijo com aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

O - pH

□ - Massa seca

Δ - Lactose

▽ - Etanol

Linha pontilhada - momento em que a aeração foi interrompida.

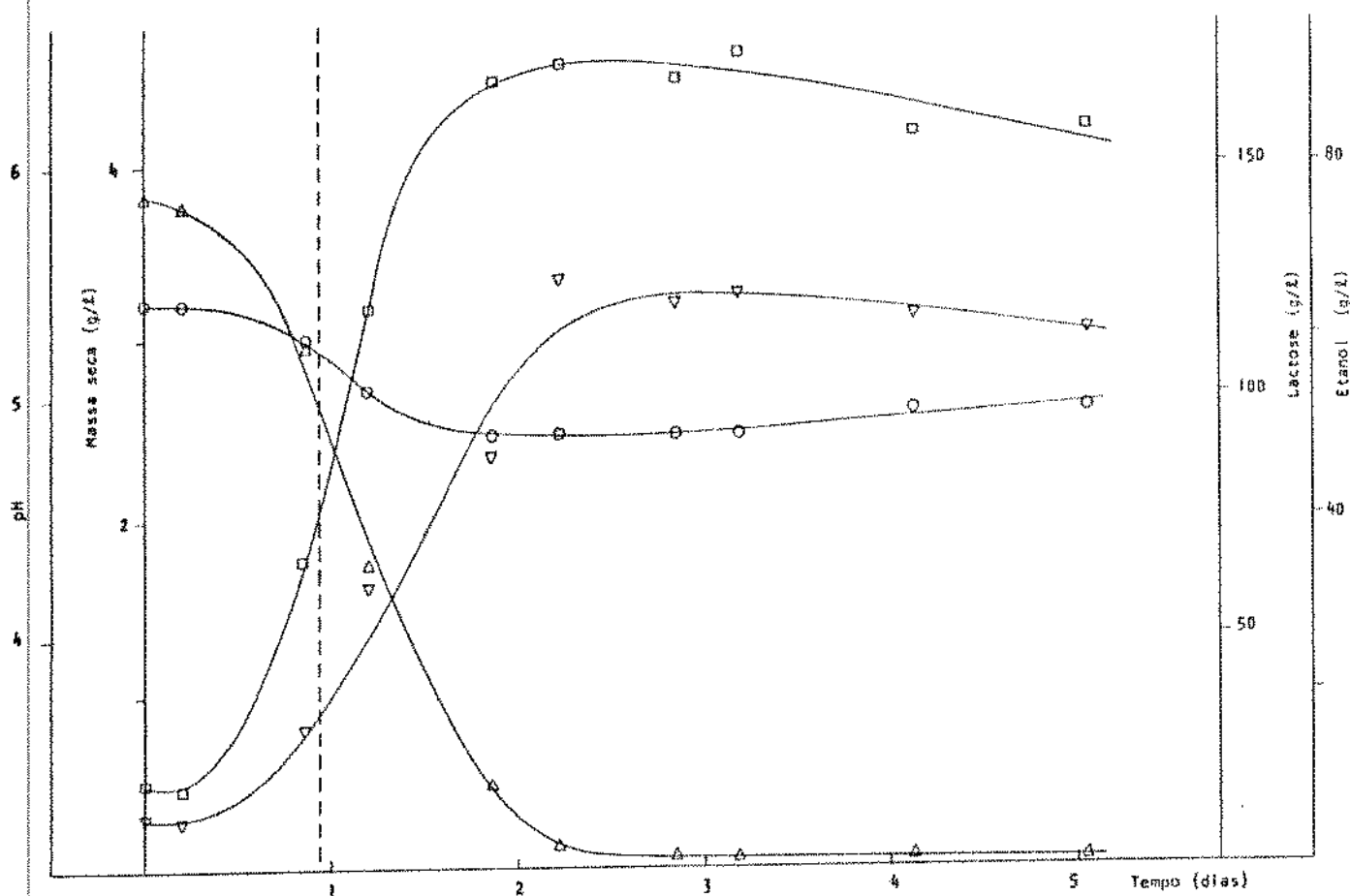


FIGURA 4.31. Fermentação de permeado de soro de queijo com aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 15%.

O - pH

□ - Massa seca

Δ - Lactose

▽ - Etanol

Linha pontilhada - momento em que a aeração foi interrompida.

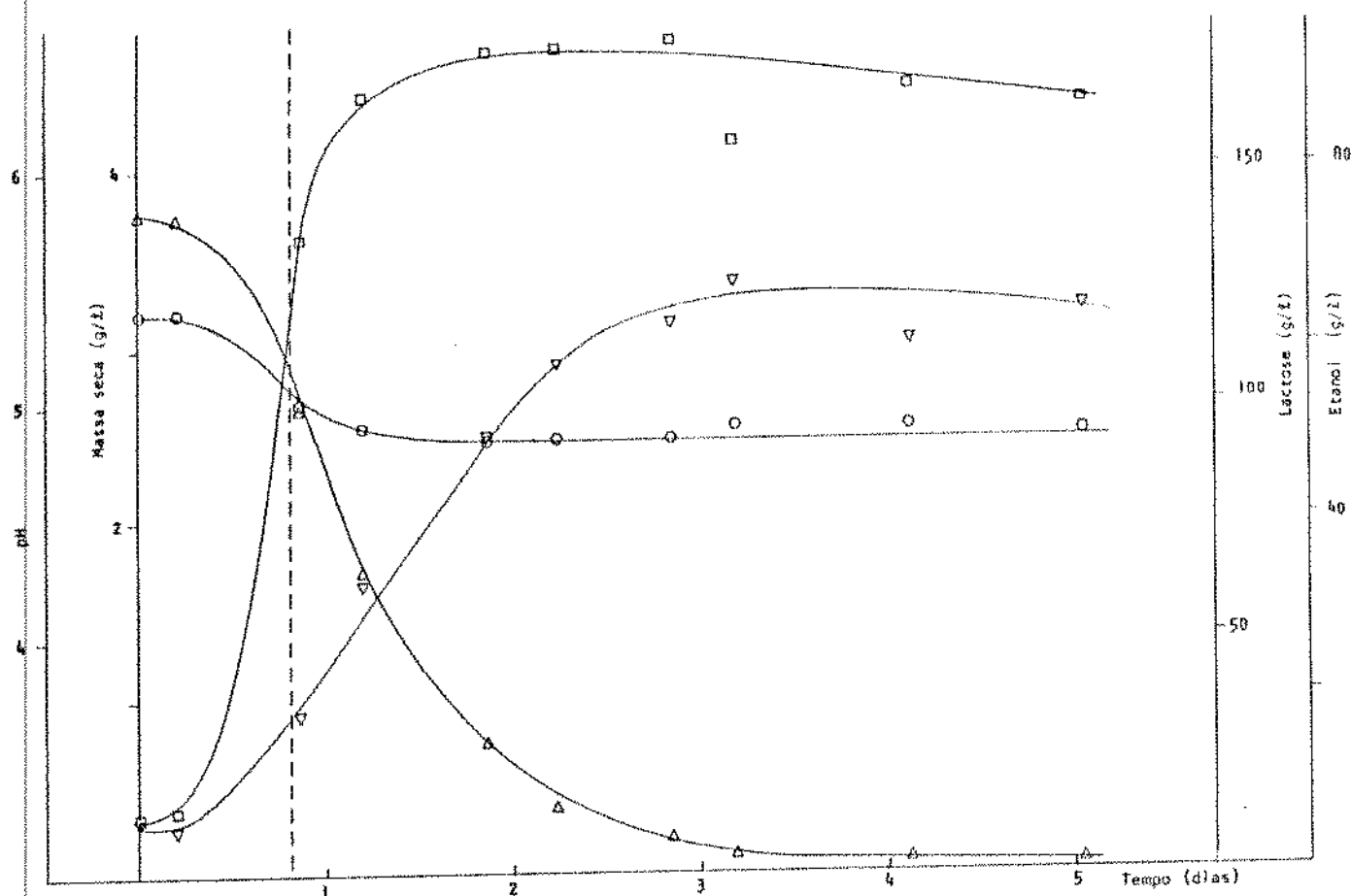


FIGURA 4.32. Fermentação de permeado de soro de queijo com aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 15%.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

Linha pontilhada - momento em que a aeração foi interrompida.

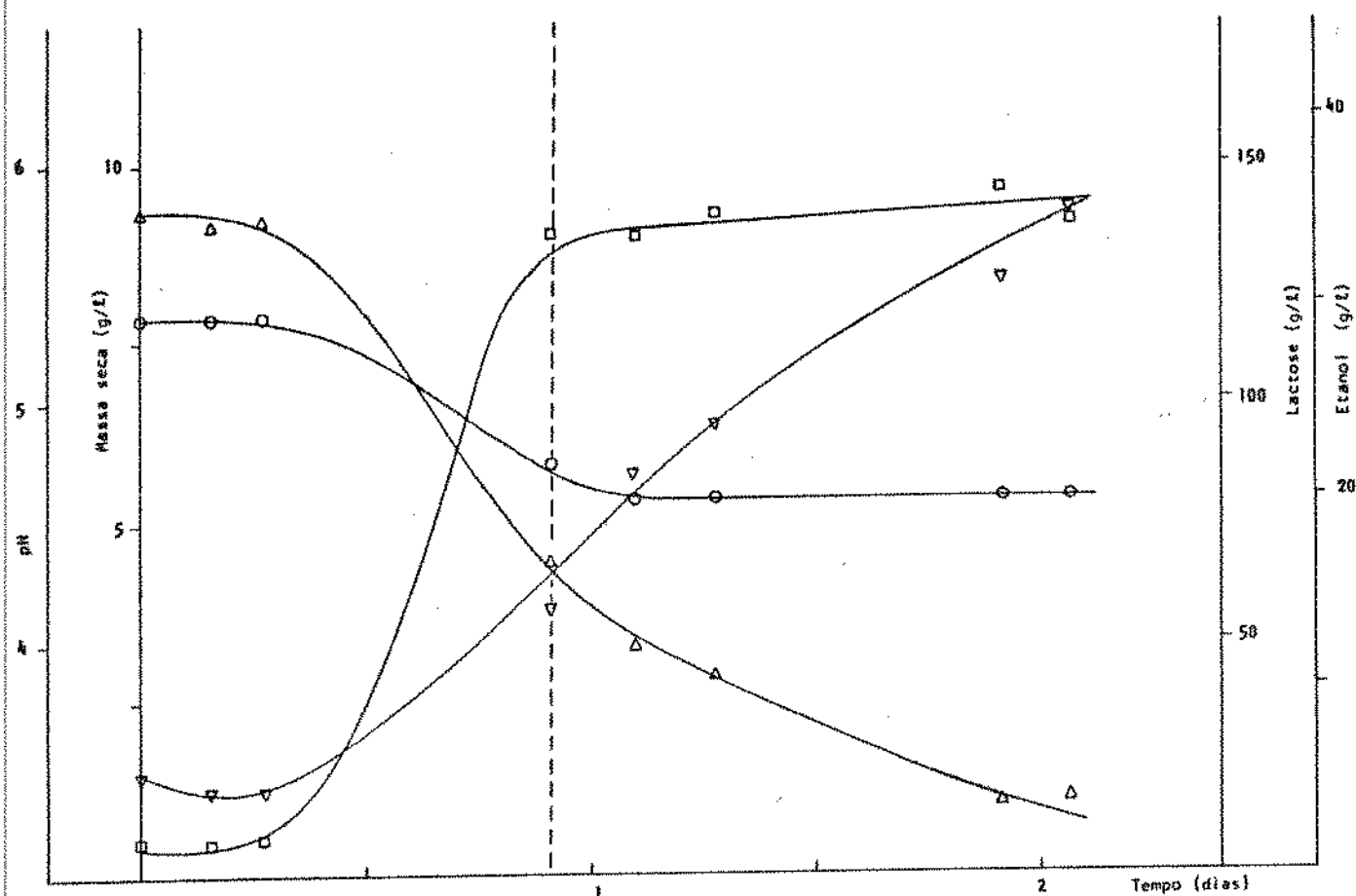


FIGURA 4.33. Fermentação de permeado de soro de queijo suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 e aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose: 15%.

O - pH

□ - Massa seca

Δ - Lactose

▽ - Etanol

Linha pontilhada - momento em que a aeração foi interrompida.

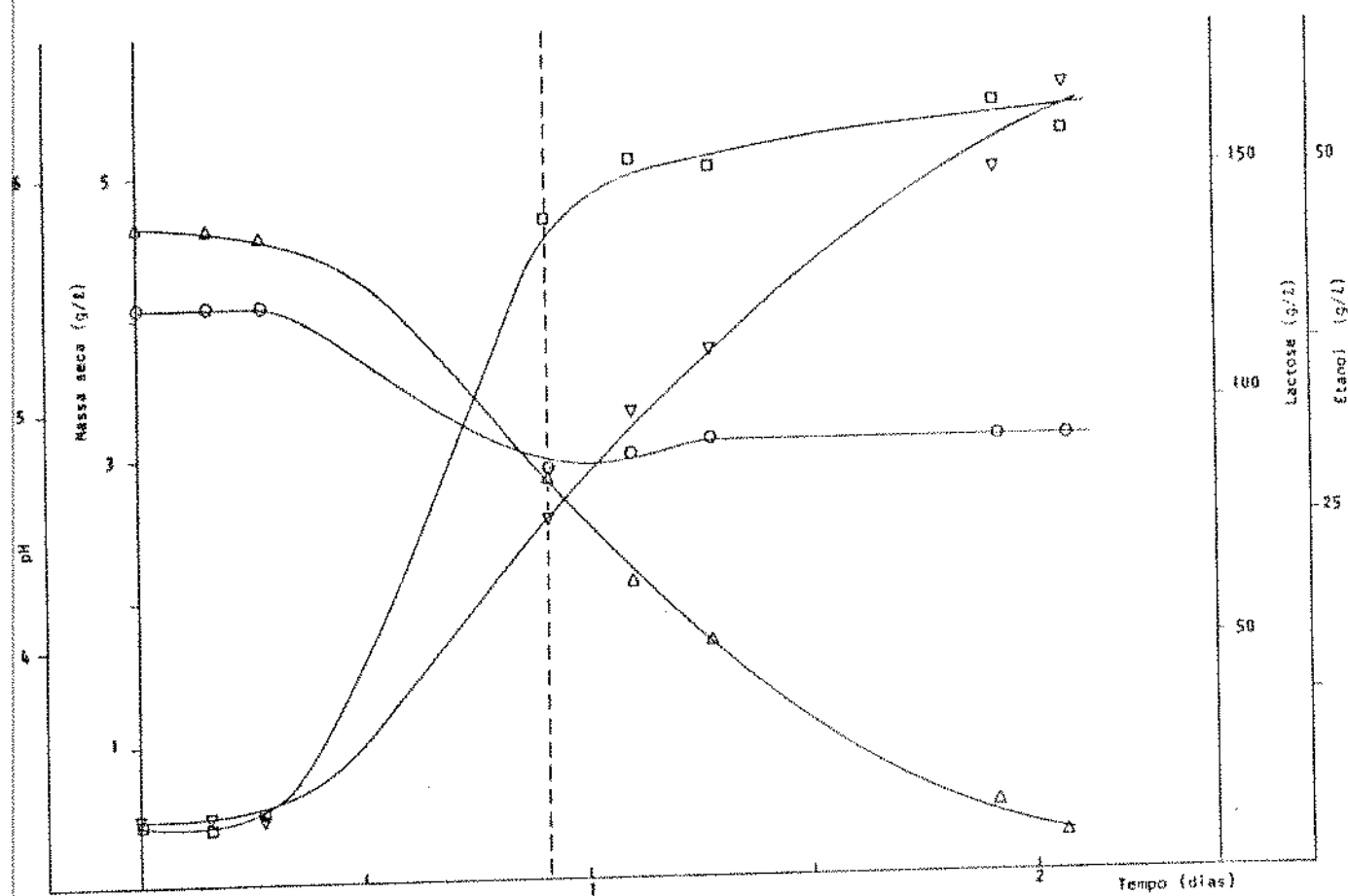


FIGURA 4.34. Fermentação de permeado de soro de queijo suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 e aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 15%.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

Linha pontilhada - momento em que a aeração foi interrompida.

a concentração de etanol obtida foi menor para o mesmo tempo de incubação (50 horas).

A seguir, foram feitas fermentações em permeado de soro de queijo com aeração de 1 VVM na fase inicial e com concentração inicial de lactose de 17 e 22,5%, cuja fração protéica havia sido hidrolisada com protease fúngica, conforme item 3.6.5 de "Materiais e Métodos", uma vez que os aminoácidos resultantes desta hidrólise poderiam satisfazer, em parte, as exigências nutricionais da *Saccharomyces fragilis*. Os resultados destas fermentações estão apresentados nas Figuras 4.35, 4.36, 4.37 e 4.38 e estão sumarizados na Tabela 4.8.

As fermentações com permeado concentrado a 17% de lactose (Tabela 4.8) e tratado com protease fúngica, apresentaram rendimento celular médio de 0,034g/g (Tabela 4.8), maior que nos demais experimentos, com exceção das fermentações de permeado suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 . Este valor foi aproximadamente 50% menor do que o valor obtido por Vienne e von Stockar (1985), que conseguiram rendimento celular de 0,071g/g com *Kluyveromyces fragilis* NRRL 665 em meio sintético contendo lactose como fonte de carbono e adicionado de aminoácidos. Apesar disto, a produção de etanol foi menor que nas fermentações de permeado concentrado a 15% de lactose e aeração (Figuras 4.31 e 4.32).

As fermentações de permeado concentrado a 22,5% de lactose e tratado com protease fúngica (Figuras 4.37 e 4.38), produziram em média menor quantidade de massa celular que as fermentações de permeado concentrado a 17% de lactose e também tratado com protease (Figuras 4.35 e 4.36 e Tabela 4.8). A produção de etanol foi praticamente a mesma nos dois casos, porém, a concentração de lactose remanescente foi alta para concentração inicial de 22,5% (20,67g/l no primeiro experimento e 40,88g/l no segundo) e apenas cerca de 2,5g/l para concentração inicial de 17%. Quando comparadas

TABELA 4.8. Fermentações de permeado de soro de queijo com 17 e 22,5% de lactose, tratado com protease fúngica e aeração de 1 VVM, por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415.

Concentração nominal de lactose	17%		22,5%	
	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.
Concentração inicial de lactose (g/l)	166,80	163,87	212,31	207,50
Lactose remanescente (g/l)	1,73	2,86	20,67	40,88
Lactose consumida (g/l)	165,07	161,01	191,64	166,62
Etanol produzido (g/l)	51,38	50,10	47,90	51,06
Rendimento ($Y_{p/s}$ expresso em percentagem de rendimento teórico)	57,85	57,84	46,46	56,96
Massa celular seca (g/l)	5,51	5,70	5,31	4,69
Rendimento celular ($Y_{x/s}$)*	3,34	3,54	2,77	2,81

* Os valores de rendimento celular encontram-se multiplicados por 100.

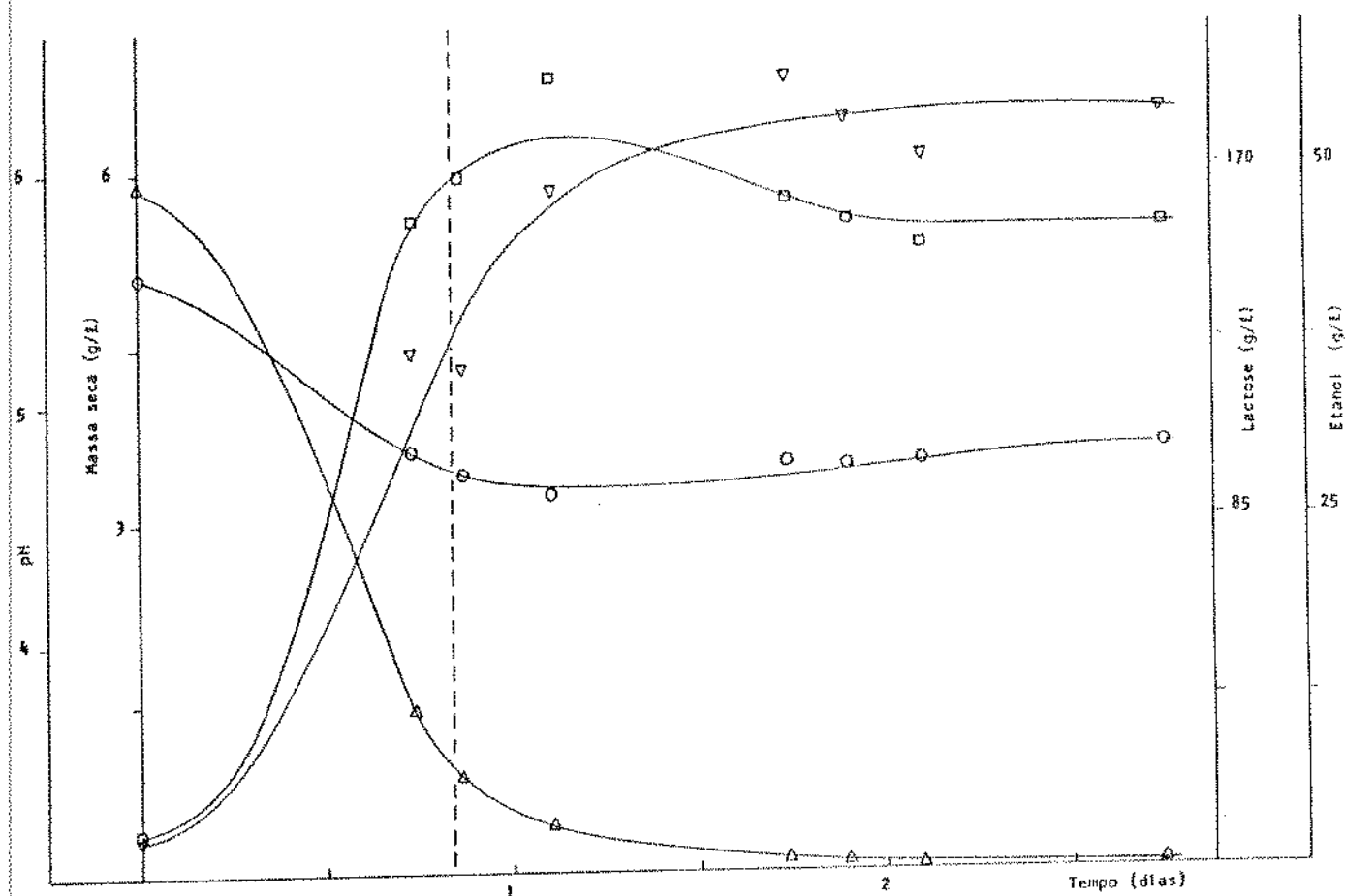


FIGURA 4.35. Fermentação de permeado de soro de queijo tratado com protease fúngica e aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 17%.

○ - pH □ - Massa seca
 ▽ - Lactose ▽ - Etanol

Linha pontilhada - momento em que a aeração foi interrompida.

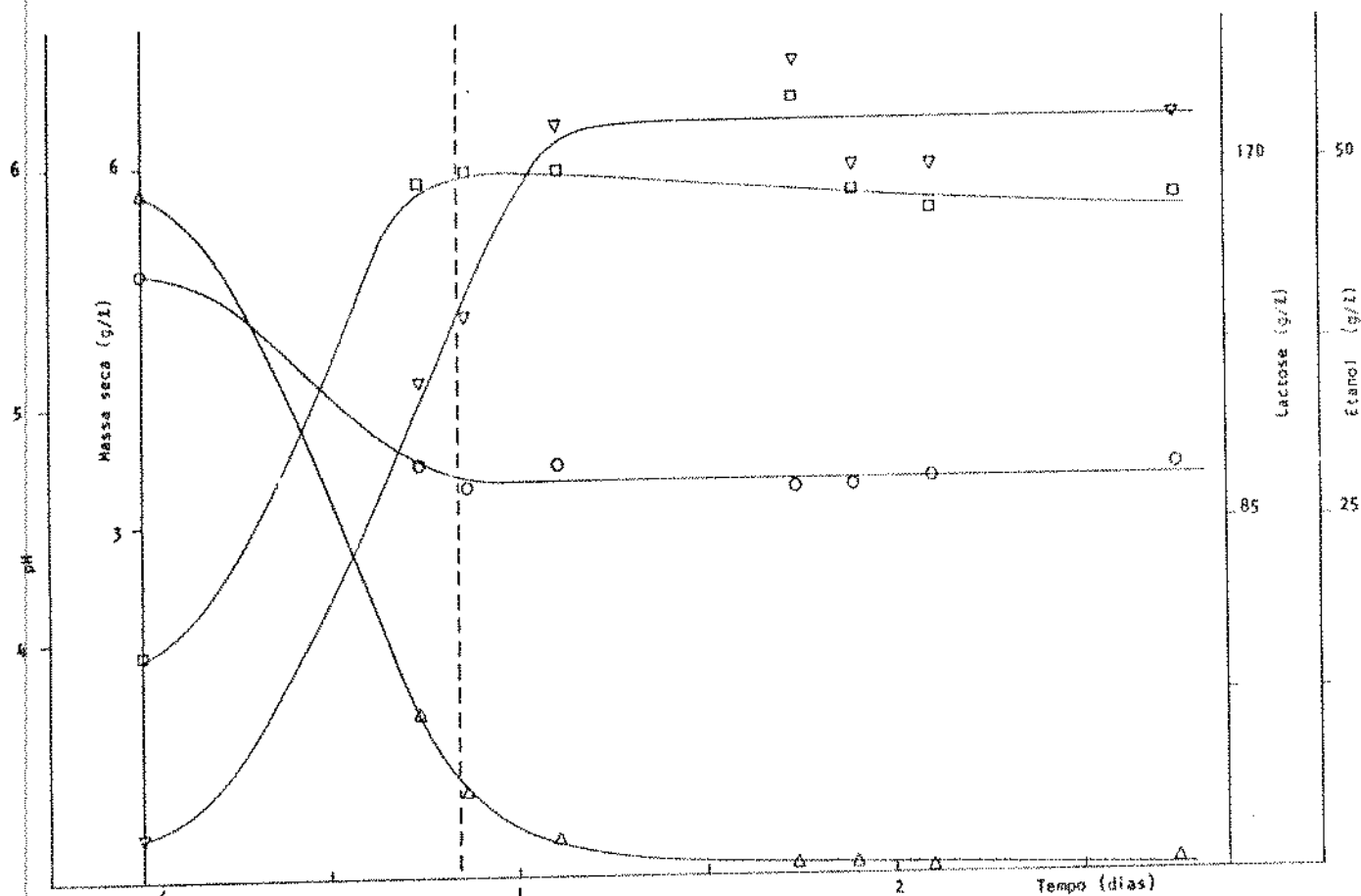


FIGURA 4.36. Fermentação de permeado de soro de queijo tratado com protease fúngica e aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 17%.

O - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

Linha pontilhada - momento em que a aeração foi interrompida.

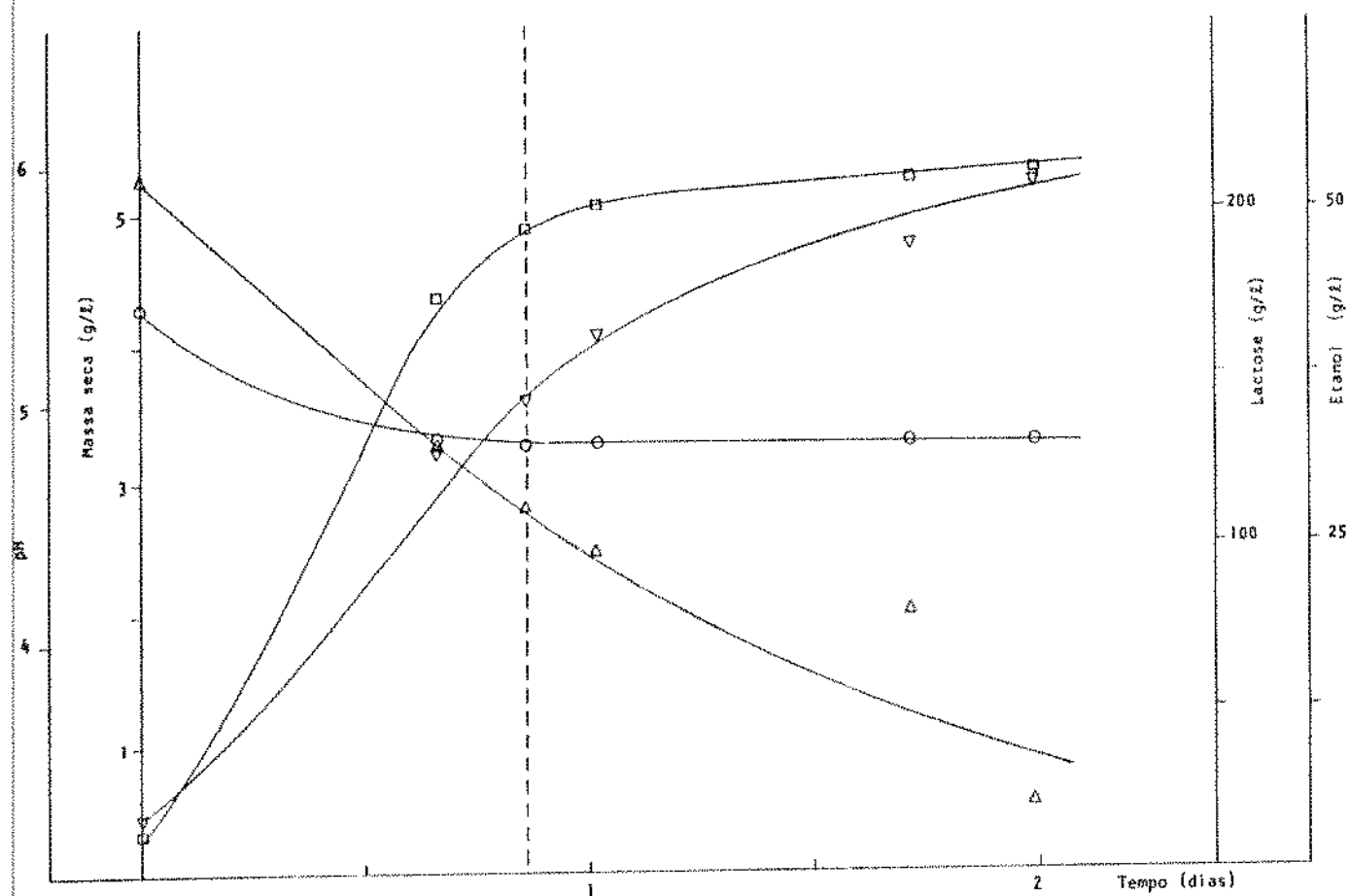


FIGURA 4.37. Fermentação de permeado de soro de queijo tratado com protease fúngica e aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 1º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

○ - pH

□ - Massa seca

△ - Lactose

▽ - Etanol

Linha pontilhada - momento em que a aeração foi interrompida.

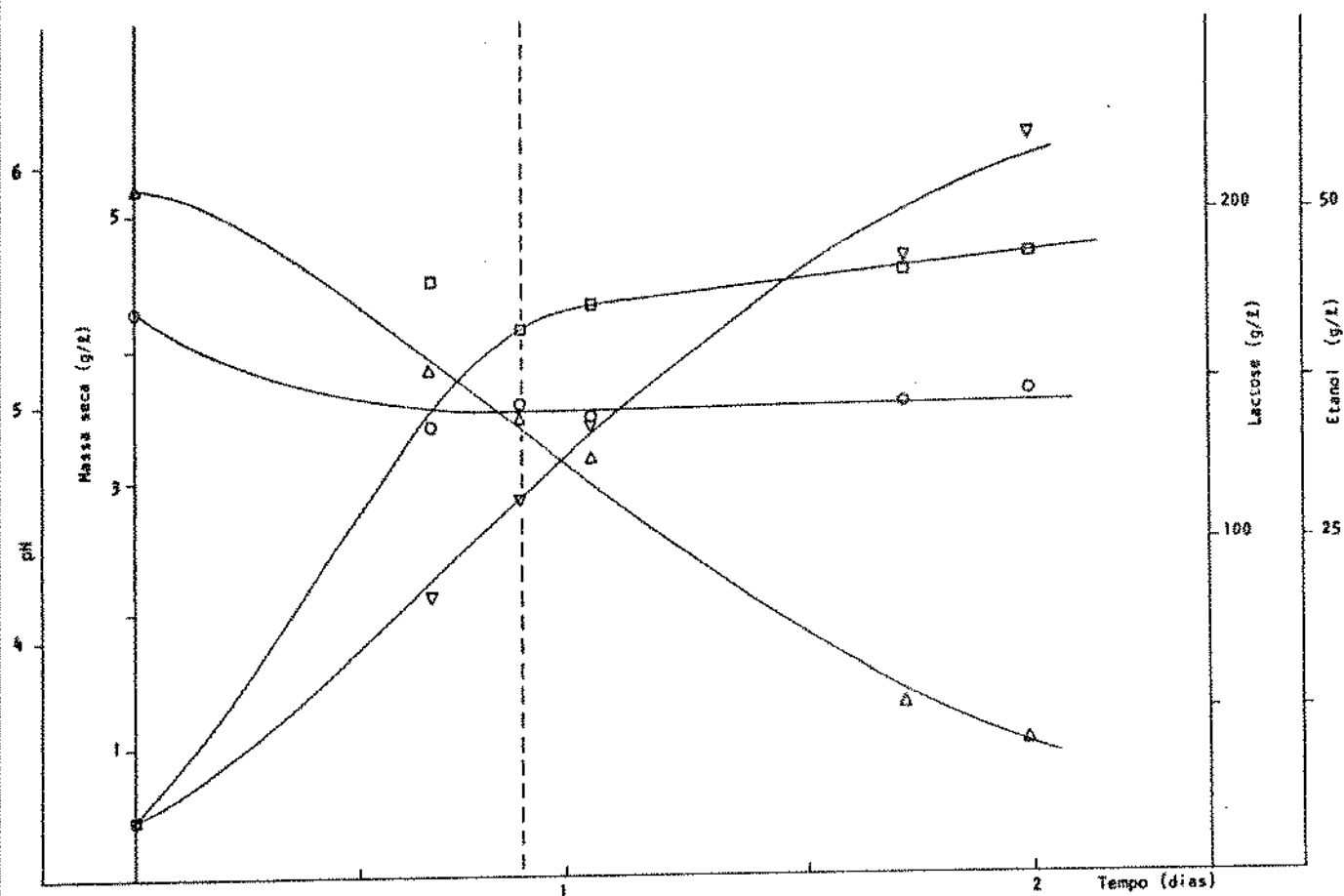


FIGURA 4.38. Fermentação de permeado de soro de queijo, tratado com protease fúngica e aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415: 2º experimento, concentração nominal de lactose - 22,5%.

○ - pH □ - Massa seca
 Δ - Lactose ▽ - Etanol

Linha pontilhada - momento em que a aeração foi interrompida.

as fermentações de permeado concentrado a 22,5% de lactose e aeração não tratado vs. tratado com protease fúngica (Tabelas 4.7 e 4.8), verifica-se que a produção de etanol foi maior quando o permeado não foi tratado com protease fúngica, enquanto que o rendimento celular foi maior para o permeado tratado com protease fúngica. A diferença de tempo para estas duas fermentações foi de cerca de três dias a mais de incubação para permeado não tratado com protease fúngica (Figuras 4.29, 4.30, 4.37 e 4.38).

A produção de etanol e massa celular em permeado concentrado a 22,5% de lactose sem aeração (Tabela 4.6) foram menores que no permeado concentrado a 22,5% de lactose tratado com protease fúngica (Tabela 4.8).

A Tabela 4.9 mostra os parâmetros cinéticos para as fermentações de permeado com 10% de lactose (Figuras 4.25 e 4.26), 15% e 22,5% de lactose e aeração (Figuras 4.31, 4.32, 4.29 e 4.30). A Tabela 4.10 mostra os parâmetros cinéticos para as fermentações de permeado concentrado a 15% de lactose e suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 (Figuras 4.33 e 4.34) e permeado com 17 e 22,5% de lactose tratado com protease fúngica (Figuras 4.35, 4.36, 4.37 e 4.38). Valores da ordem de $0,78\text{h}^{-1}$, em média, foram obtidos para a produtividade específica máxima, nos experimentos com 10% de lactose sem aeração e com 22,5% de lactose e aeração, os quais foram os valores mais altos encontrados nestes experimentos (Tabelas 4.9 e 4.10), valores estes acima dos encontrados por Bothast e col. (1986), que obtiveram uma produtividade específica média de $0,031\text{h}^{-1}$ para cinco leveduras cultivadas em meio sintético com concentração inicial de lactose de 20%.

King e Zall (1984) obtiveram uma produtividade específica de $1,9\text{h}^{-1}$ com células imobilizadas e permeado concentrado a 100g/l de lactose; Janssem e col. (1984) obtiveram uma produtividade de $7,1\text{h}^{-1}$ com reciclo de células e permeado concentrado a 120g/l de lactose.

TABELA 4.9. Parâmetros cinéticos das fermentações de permeado de soro de queijo com 10% de lactose sem aeração e com 15 e 22,5% de lactose e aeração por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415.

Concentração Inicial de lactose (g/L)	10%		15%		22,5%*	
	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.
Produtividade máxima (g/L.h)	1,07	1,71	1,65	1,12	1,85	1,85
Taxa de crescimento máxima** (g/L.h)	6,95	8,55	18,90	34,70	25,50	28,90
Taxa de consumo de substrato máxima (g/L.h)	2,53	4,44	4,31	4,72	4,44	5,49
Produtividade específica máxima*** (h ⁻¹)	4,98	10,70	3,95	2,45	9,77	5,65
Taxa de crescimento específico máxima** (h ⁻¹)	4,42	5,93	6,50	12,20	14,70	16,40
Taxa de consumo específico de substrato máxima (h ⁻¹)	1,29	2,03	1,80	1,97	2,00	1,71

* Fermentações com aeração de 1 VVM na fase inicial.

** Os valores das taxas de crescimento máxima e crescimento específico máxima encontram-se multiplicados por 100.

*** Os valores de produtividade específica máxima encontram-se multiplicados por 10.

TABELA 4.10. Parâmetros cinéticos das fermentações de permeado de soro de queijo, com 15% de lactose suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 , e com 22,5% e 17% de lactose tratado com protase fúngica, por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415.

Concentração inicial de lactose (g/l)	15%		22,5%		17%	
	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.	1º Exp.	2º Exp.
Produtividade máxima (g/l.h)	0,93	1,61	1,73	1,32	2,53	2,46
Taxa de crescimento máxima* (g/l.h)	9,80	3,27	2,81	2,12	5,17	2,55
Taxa de consumo de substrato máxima (g/l.h)	6,05	4,78	5,09	4,36	9,87	9,58
Produtividade específica máxima* (h^{-1})	1,04	3,87	4,17	3,35	4,56	4,33
Taxa de crescimento específico máxima** (h^{-1})	16,90	9,44	9,74	8,25	13,00	5,46
Taxa de consumo específico de substrato máxima (h^{-1})	1,32	1,30	2,85	1,31	2,11	1,84

* Os valores da taxa de crescimento máxima e da produtividade específica máxima encontram-se multiplicados por 10.

** Os valores da taxa de crescimento específico máxima encontram-se multiplicados por 100.

O maior valor de produtividade máxima encontrado 2,5g/l.h foi obtido com permeado concentrado a 17% de lactose e tratado com protease fúngica (Tabela 4.10), valor este menor que o obtido por Vienne e von Stockar (1985), que conseguiram uma produtividade de 5,23g/l.h e um rendimento de 91% do rendimento teórico, em fermentação contínua com reciclo de células.

Valores de produtividade máxima da ordem de 100 a 135g/l.h foram encontrados por Mehaia e Cheryan (1984), trabalhando com meio sintético com 150g/l de lactose e um reator de fibra oca carregado de células de *Kluyveromyces fragilis*.

A maior concentração de etanol, 62,81g/l, em média, foi obtida com permeado com 22,5% de lactose e aeração na fase inicial (Tabela 4.7, Figuras 4.29 e 4.30), sendo que, neste caso, a produtividade específica máxima obtida foi de $0,77h^{-1}$ em média (Tabela 4.9).

Nas fermentações com 15% de lactose e aeração na fase inicial, obteve-se uma concentração remanescente de lactose média de 2,04g/l (Tabela 4.7), sendo que neste caso obteve-se uma taxa de consumo específico de substrato de $1,90h^{-1}$, em média (Tabela 4.9, Figuras 4.31 e 4.32).

A maior massa celular obtida foi com permeado com 15% de lactose suplementado com $(NH_4)_2SO_4$ e KH_2PO_4 , 7,22g/l em média (Tabela 4.7), sendo que neste caso, a taxa de crescimento específico máxima foi de $0,13h^{-1}$, em média (Tabela 4.10, Figuras 4.33 e 4.34). Moulin e col. (1980a) obtiveram uma taxa de crescimento específico máxima de $0,17h^{-1}$ para *Candida pseudotropicalis* IP 513 cultivada em permeado concentrado a 20% de lactose, resultado semelhante ao que obtivemos para a fermentação de permeado concentrado a 22,5% de lactose e aeração na fase inicial ($0,16h^{-1}$, em média - Tabela 4.9), sendo também da mesma ordem de grandeza dos valores obtidos nos demais experimentos.

4.5. Obtenção de β -galactosídase

4.5.1. Obtenção de β -galactosídase de células de mini-fermentador

Células de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 foram obtidas conforme item 3.6.4 de "Materiais e Métodos", com permeado concentrado a 15% de lactose. Foram feitas duas fermentações, em mini fermentador, obtendo-se 1,5 litros de meio fermentado.

A seguir, as células obtidas foram separadas conforme item 3.11.1 de "Materiais e Métodos", efetuando-se, em seguida, a autólise das mesmas conforme item 3.11.2 de "Materiais e Métodos" para os tempos de autólise de 17, 24 e 41 horas, a partir das quais obteve-se três extratos enzimáticos de lactase (extratos enzimáticos I, II e III), conforme metodologia 3.11.3 de "Materiais e Métodos". Os três extratos enzimáticos assim obtidos foram testados quanto à sua atividade de hidrólise de lactose, conforme item 3.11.6 de "Materiais e Métodos".

A Tabela 4.11 mostra a atividade enzimática obtida com os extratos enzimáticos I, II e III. Nela se pode observar que o valor de atividade enzimática para o extrato enzimático II, expresso na forma de μmol de glicose liberada por minuto e por mL de extrato enzimático ($\text{UGL}/\text{mL Ext.}$) não foi semelhante aos outros dois casos, uma vez que ela foi menor do que a obtida para os tempos de autólise de 17 e 41 horas.

A atividade enzimática expressa em μmol de glicose liberada por minuto e por miligrama de células autolisadas ($\text{UGL}/\text{mg Cel. Aut.}$) para o extrato enzimático II foi de 4,81 $\text{UGL}/\text{mg Cel. Aut.}$ (Tabela 4.11), que é maior do que o valor obtido para o extrato enzimático III. No entanto, a atividade enzimática obtida com os extratos enzimáticos I, II e III expressa na forma μmol de glicose liberada por minuto e por miligrama de células ($\text{UGL}/\text{mg Cel. Aut.}$) mostra

que houve uma perda de atividade enzimática por célula autolisada com o aumento do tempo de autólise (Tabela 4.11). Comportamento similar ao relatado por Bales e Castillo (1979). Este comportamento também foi confirmado pelos dados obtidos na determinação da atividade enzimática dos extratos I, II e III com orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato da lactase (Tabela 4.11).

Os valores de atividade expressos na forma $\mu\text{mol ONPG}$ por minuto e por mililitro de extrato enzimático (UONPG/mL Ext.), ou por miligrama de célula autolisada (UONPG/mg Cél. Aut.) são menores que os respectivos valores de atividade em UGL/mL Ext. ou UGL/mg Cél. Aut., guardando, contudo, o mesmo comportamento em função do tempo de autólise.

O resultado obtido em 17 horas de autólise é equivalente a uma atividade de $3,31 \cdot 10^{-8} \mu\text{mol}$ de ONPG hidrolisado por célula autolisada por minuto, valor superior ao encontrado por Barbosa e col. (1985), que obtiveram uma atividade de $0,5 \cdot 10^{-11} \mu\text{mol}$ de ONPG hidrolisado por célula por minuto, para células permeáveis de *Kluyveromyces fragilis* cultivada em meio sintético com 3% de lactose. Chen e col. (1985) obtiveram uma atividade de lactase de células de *Kluyveromyces fragilis* de $0,4 \mu\text{mol}$ de lactose hidrolisada por minuto por miligrama de células, cerca de 35 vezes menor do que a atividade que obtivemos em 17 horas de autólise (Tabela 4.11). Bales e Castillo (1979) também obtiveram uma atividade de lactase de *Candida pseudotropicalis* de $2,68 \mu\text{mol}$ de ONPG hidrolisado por minuto e por miligrama de célula autolisada, resultado similar ao nosso para 17 horas de autólise, quando cultivaram a levedura em soro de queijo com 2% de lactose e suplementado com 0,25% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, porém, nosso resultado para 17 horas de autólise é 2,3 vezes maior que o obtido por Mahoney e Whitaker (1978), que obtiveram uma atividade de $1,125 \mu\text{mol}$ de ONPG hidrolisado por minuto e por miligrama

TABELA 4.11. Atividade de lactase de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 em função do tempo de autólise -
- Extratos enzimáticos I, II e III.

Extrato enzimático	Tempo de autólise (h)	Células autolisadas (%)	Atividade enzimática		
			UGL/ml Ext.	UGL/mg Cel. Aut.	UONPG/mg Cel. Aut.
I	17	7,07	15,92	14,26	3,02
II	24	11,96	9,07	4,81	1,86
III	41	39,13	12,87	2,08	2,53

UGL = μ mol de glicose liberada por minuto.

UONPG = μ mol de ONPG hidrolisado por minuto.

Número de células na suspensão antes da autólise = $1,29 \cdot 10^9$ cel/cm³.

Massa celular seca na suspensão antes da autólise = 15,78mg/ml (média de 15,37 e 16,20mg/ml).

de células, a partir de uma suspensão de 200mg cél./ml de células de *Kluyveromyces fragilis*, cultivada em permeado concentrado a 15% de lactose.

4.5.2. *Caracterização de extrato enzimático de β -galactosidase a partir de células de Saccharomyces fragilis NRRL Y-2415 obtidas em fermentação escala piloto*

A fermentação em escala piloto (item 3.6.7. de "Materiais e Métodos"), foi iniciada com uma taxa de aeração de 0,5 VVM, mas com adição de antiespumante, provavelmente em excesso, devido a dificuldade de controlar a espuma que se formava, a fermentação foi inibida, só voltando a mostrar atividade fermentativa cerca de 6 horas após a interrupção da aeração, a qual também foi mantida por cerca de 6 horas. A concentração inicial de lactose foi de 158,10g/l sendo que quando a fermentação foi interrompida, 48 horas após, a concentração de lactose era de 20,00g/l.

O permeado fermentado foi ultrafiltrado para remoção e lavagem das células, conforme itens 3.12.1 e 3.12.2 de "Materiais e Métodos". Uma alíquota desta suspensão celular lavada foi autolizada por três tempos diferentes: 20, 28 e 44 horas (conforme itens 3.11.2 e 3.11.3 de "Materiais e Métodos"). Os sobrenadantes obtidos destas células foram denominados extratos enzimáticos IV, V e VI.

Uma segunda alíquota foi ressuspendida em água destilada e centrifugada, conforme item 3.11.1 de "Materiais e Métodos", e autolisada conforme itens 3.11.2 e 3.11.3 de "Materiais e Métodos", por 20, 28 e 44 horas, obtendo-se três sobrenadantes que foram denominados extratos enzimáticos VII, VIII e IX.

As Tabelas 4.12 e 4.13 mostram os resultados obtidos para os extratos enzimáticos IV a IX, para os diferentes tempos de autólise.

Os valores de atividade obtidos a partir dos extratos enzimáticos IV, V e VI, apresentados na Tabela 4.12, tanto em UGℓ, como em UONPG por mililitro de extrato, aumentaram com o aumento do tempo de autólise, enquanto que a atividade medida em UGℓ ou UONPG por miligrama de células autolisadas diminuiu quando o tempo de autólise aumentou, indicando que parte da lactase foi inativada, confirmando os resultados obtidos com os extratos enzimáticos I, II e III (Tabela 4.11). Os resultados obtidos a partir dos extratos enzimáticos VII, VIII e IX apresentaram também comportamento similar para a atividade enzimática medida em UGℓ por mililitro de autolisado, sendo que em ambos os casos, estes valores (UGℓ/ml ext.) são da mesma ordem de grandeza.

A atividade enzimática medida em UOPNG por mililitro de extrato para o extrato enzimático IX é menor que para o extrato enzimático VIII (Tabela 4.12). As atividades de lactase dos extratos enzimáticos VII, VIII e IX (Tabela 4.13), medidas em UOPNG por mililitro ou miligrama de células autolisadas, também têm a mesma ordem de grandeza dos valores obtidos a partir dos extratos enzimáticos IV, V e VI (Tabela 4.12), para os três tempos de autólise.

Os valores apresentados nas Tabelas 4.12 e 4.13 são valores próximos e, levando em conta que no preparo dos extratos enzimáticos as suspensões celulares tinham praticamente o mesmo número de células, isto mostra que apenas a lavagem das células na planta de ultrafiltração foi suficiente, sendo desnecessária a segunda lavagem das células com água destilada e posterior separação por centrifugação.

Para ambos os extratos enzimáticos IV e VII obteve-se, respectivamente, uma atividade de lactase de $2,92 \cdot 10^{-8}$ e $3,25 \cdot 10^{-8}$ μmol de ONPG hidrolisado por célula autolisada por minuto, valores maiores que o obtido por Barbosa e col. (1985) ($0,5 \cdot 10^{-11}$ μmol ONPG

TABELA 4.12. Atividade de lactase de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 em função do tempo de autólise -
- Extratos enzimáticos IV, V e VI.

Extrato enzimático	Tempo de autólise (h)	Células autolisadas (%)	Atividade enzimática		
			UGL/mL Ext.	UGL/mg Cel. Aut.	UONPG/mL Ext.
IV	20	16,34	88,36	41,98	8,87
V	28	24,01	96,53	31,21	10,84
VI	44	41,27	124,68	23,46	13,71

UGL = µmol de glicose liberada por minuto.

UONPG = µmol de ONPG hidrolisado por minuto.

Número de células na suspensão celular = $1,86 \cdot 10^9$ cel/cm³.

Massa celular seca na suspensão = 12,88mg/mL (Média de 12,86 e 12,90).

TABELA 4.13. Atividade de lactase de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 em função do tempo de autólise -
- Extratos Enzimáticos VII, VIII e IX.

Extrato enzimático	Tempo de autólise (h)	Células autolisadas (%)	Atividade enzimática		
			UG /mg Cel. Aut.	UONPG/mg Ext.	UONPG/mg Cel. Aut.
VII	20	15,39	82,87	37,84	9,24
VIII	28	22,14	89,45	28,39	12,54
IX	44	39,24	152,97	27,40	11,89

UG = μ mol de glicose liberada por minuto.

UONPG = μ mol de ONPG hidrolisado por minuto.

Número de células na suspensão antes da autólise = $1,85 \cdot 10^9$ cel/cm³.

Massa celular seca na suspensão = 14,23mg/ml (média de 15,32 e 13,14).

hidrolisado por células por minuto), sendo estes valores da mesma ordem de grandeza ao obtido com o extrato enzimático I.

Para ambos os extratos enzimáticos IV e VII, nossos resultados são cerca de 10,5 vezes maiores que os obtidos por Chen e col. (1985) ($0,4\mu\text{mol}$ de lactose hidrolisada por minuto por miligrama de células) e cerca de 1,6 vezes maiores do que o valor obtido por Bales e Castillo (1979) para hidrólise de ONPG. São maiores também que os respectivos valores obtidos com o extrato enzimático I (Tabela 4.11).

Para os extratos IV e VII (Tabelas 4.12 e 4.13), nossos valores de atividade para hidrólise de lactose em UG_l por miligrama de células autolisadas, são maiores que a atividade conseguida por Jasewicz e Wasserman (1961), que obtiveram um valor de $2,2\mu\text{mol}$ de lactose hidrolisada por minuto por miligrama de células secas de *Saccharomyces fragilis*, quando esta levedura foi cultivada em soro de queijo com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e extrato de levedura.

4.5.3. Determinação de K_m e V_m para β -galactosidase de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415

Nas Tabelas 4.14 e 4.15 são apresentados os valores de velocidades iniciais de hidrólise de lactose (v_i) em função do tempo de autólise e concentração de lactose, determinados conforme item 3.11.5 de "Materiais e Métodos" e os valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) e V_m (Velocidade máxima) obtidos para os extratos enzimáticos IV a IX. Os dados de lactose hidrolisada versus tempo para os extratos enzimáticos IV a IX e para as concentrações de lactose de 1,25, 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0% de lactose, são apresentados nos gráficos 7.1 a 7.36, no apêndice, sendo que K_m e V_m foram determinados pelo gráfico de Lineweaver-Burk ($1/v_i \times 1/S$), que também são apresentados no apêndice.

Para todos os extratos enzimáticos, verifica-se nas Tabelas 4.14 e 4.15 que a enzima estava saturada em concentrações de lactose maior ou igual a 7,5%. Os valores apresentados em ambas as Tabelas são da mesma ordem de grandeza, sendo que os valores de velocidade inicial e velocidade máxima (V_m) aumentaram com o aumento do tempo de autólise, indicando que houve maior liberação de enzimas das células, confirmando os dados já analisados no item 4.5.2.

Os valores obtidos para K_m são próximos uns dos outros, sendo o maior valor encontrado para extrato enzimático IV (Tabela 4.14), que apresentou um valor de 67,93 milimol de lactose por litro, valor acima da média. A média dos seis valores obtidos para K_m (Tabelas 4.14 e 4.15) é 60,32 milimol de lactose por litro, se o valor referente ao tempo de autólise de 20 horas para o extrato enzimático IV for excluído, a média dos outros cinco valores é 58,72 milimol de lactose por litro, que é 4,2 vezes maior ao encontrado por Greenberg e Mahoney (1981), que relataram ter encontrado K_m igual a 14 milimol de lactose por litro para a *Saccharomyces fragilis*. Porém, este mesmo valor médio (58,72) é 1,9 vezes menor ao encontrado por Weetall e col. (1974), que obtiveram um K_m de 112 milimol de lactose por litro para lactase solúvel de levedura.

TABELA 4.14. Velocidade inicial de hidrólise de lactose por lactase de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 para os extratos enzimáticos IV, V e VI.

Lactose (%)	Extrato enzimático		
	IV	V	VI
1,25	1,31	1,71	2,08
2,50	2,24	2,74	3,07
5,00	2,68	2,97	3,96
7,50	2,40	3,17	4,32
10,00	2,38	3,15	4,11
V_m	3,88	4,24	6,20
K_m	67,93	54,20	62,00

V_i é dado em milímol de lactose hidrolisada por litro e por minuto.

V_m é dado em milímol de lactose hidrolisada por litro e por minuto.

K_m é dado em milímol de lactose por litro.

TABELA 4.15. Velocidade inicial de hidrólise de lactose por lactase de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 para os extratos enzimáticos VII, VIII e IX.

Lactose (%)	Extrato enzimático		
	VII	VIII	IX
1,25	1,33	1,69	1,98
2,50	2,15	2,63	3,48
5,00	2,47	2,93	3,76
7,50	2,72	3,36	3,88
10,00	2,52	3,21	3,71
V_m	3,42	4,35	5,49
K_m	57,20	56,20	64,01

V_i é dado em milímol de lactose hidrolisada por litro e por minuto.

V_m é dado em milímol de lactose hidrolisada por litro e por minuto.

K_m é dado em milímol de lactose por litro.

5. CONCLUSÕES

1. Dentre as leveduras estudadas: *Saccharomyces fragilis* ATCC 8612, *Saccharomyces fragilis* ATCC 8635, *Saccharomyces fragilis* ATCC 16045, *Saccharomyces fragilis* ATCC 100220, *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, *Candida pseudotropicalis* ATCC 8659 e *Candida pseudotropicalis* 10C 2697, a *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 foi a que apresentou melhores características para a metabolização de lactose em permeado de soro de queijo obtido por ultrafiltração concentrado a 22,5% de lactose inicial.

2. A *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 mostrou que em condições anaeróbias a concentração inicial de lactose para o consumo total da mesma, em três dias de fermentação, estava ao redor de 10%.

3. A *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415 mostrou que com a aeração da cultura com uma taxa de 1 VVM na fase inicial de fermentação, a concentração inicial máxima de lactose para o consumo total da mesma, em três dias de fermentação, estava ao redor de 15%. Neste caso, a produção de etanol e a conversão de substrato em etanol foram maiores que nas fermentações com 10% de lactose sem aeração.

4. A produção e o rendimento em etanol diminuíram quando o permeado foi suplementado com sulfato de amônio (0,1%) e fosfato de potássio monobásico (0,05%), ou quando o permeado foi tratado com protease fúngica, contudo, o rendimento celular foi maior que nas demais fermentações.

5. O concentrado enzimático de lactase foi obtido pela autólise de células de levedura, obtidas a partir da fermentação de permeado com concentração inicial de lactose de 15% e aeração de 1 VVM na fase inicial da mesma.

6. A ruptura celular durante a autólise das células para extração da lactase aumenta com o aumento do tempo de incubação. Porém, a inativação da enzima é proporcional ao aumento do tempo de autólise, sendo a atividade final a somatória destes dois efeitos.

7. Os resultados obtidos confirmam a possibilidade de se obter lactase e etanol como subproduto a partir de permeado de soro de queijo fermentado por *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415. Este uso do permeado pode contribuir para minimizar o problema de poluição ambiental causado pelo descarte de soro de queijo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANUÁRIO Estatístico do Brasil, 1982.
2. AOAC - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 20^a ed. Washington, D.C., 1975. 256 (16032).
3. AOAC - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 20^a ed. Washington, D.C., 1975. 256 (16035).
4. BALES, S.A. & F.J. CASTILLO, 1979. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. Applied and Environmental Microbiology, 37: 1201-1205.
5. BANERJEE, M.; A. CHAKRABARTY & S.K. MAJUMDAR, 1982. Immobilization of yeast cells containing β -galactosidase. Biotechnology and Bioengineering, 24: 1839-1850.
6. BARBOSA, M.F.S.; D.O. SILVA; A.J.R. PINHEIRO; W.V. GUIMARÃES & A.C. BORGES, 1985. Production of beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown in cheese whey. Journal of Dairy Science, 68: 1618-1623.
7. BARFORD, J.P.; R.G. CAIL; I.J. CALLANDER & E.J. FLOYD, 1986. Anaerobic digestion of high-strength cheese whey utilizing semicontinuous digesters and chemical flocculant addition. Biotechnology and Bioengineering, 28: 1601-1607.
8. BARRAQUIO, V.L.; L.G. SILVERIO; R.P. REVILLEZAN & W.L. FERNANDEZ, 1979. Whey for protein production. NSDB Technology Journal, 4: 68-74.

9. BEDDOWS, C.G.; R.A. MIRAUER & J.T. GUTRIE, 1980. Immobilization of β -galactosidase and others enzymes onto p-aminocarbanilated cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 22: 311-321.
10. BERNSTEIN, S.; C.H. TZENG & D. SISSON, 1977. The commercial fermentation of cheese whey for the production of protein and/or alcohol. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, n^o 7, 1-9.
11. BOTHAST, R.J.; C.P. KURTZMAN; M.D. SALTARELLI & P.J. SLININGER, 1986. Ethanol production by 107 strain of yeast on 5, 10 and 20% lactose. *Biotechnology Letters*, 8: 593-596.
12. CHEN, H.C. & R.R. ZALL, 1982. Continuous fermentation of whey into alcohol using and attached expanded bed reactor. *Process Biochemistry*, 17: 20-25.
13. CHEN, H.C.; J.Y. HOUNG & A.C. LING, 1985. Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose. *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 510-514.
14. COX, G.C. & R.D. MacBEAN, 1977. Lactic acid production by *Lactobacillus bulgaricus* in supplemented whey ultrafiltrate. *Australian Journal of Dairy Technology*, 32: 19-22.
15. DAHLQVIST, A., 1964. Method for assay of intestinal dissacharidases. *Analytical Biochemistry*, 7: 18-25.
16. FLASCHEL, E.; E. RAETZ & A. KENKEN, 1982. The kinetics of lactose hydrolysis for the β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 2499-2518.
17. FRIEND, B.A. & K.M. SHASHANI, 1979. Whey fermentation. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 15: 143-152.

18. GAWEL, J. & F.V. KOSIKOWSKI, 1978a. Improving alcohol fermentation in concentrated ultrafiltration permeates of cottage cheese whey. *Journal of Food Science*, 43: 1717-1719.
19. GAWEL, J. & F.V. KOSIKOWSKI, 1978b. Application of acid lactase to wine making from cottage cheese whey concentrates. *Journal of Food Science*, 43: 1031-1032.
20. GIEC, A.; I. CZARNECKA; B. BARANIECKA & J. SKUPIN, 1978. Ultrafiltration of whey for protein concentrates and yeast/propionic acid bacterial biomasses production. *Acta Alimentaria Polonica*, 4: 247-254.
21. GONZALEZ, J.B. & D.R. BERRY, 1982. Induction of β -galactosidase in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Letters*, 4: 369-374.
22. GREENBERG, N.A. & R.R. MAHONEY, 1981. Immobilization of lactase (beta-galactosidase) for use in dairy processing: a review. *Process Biochemistry*, 16: 2-8.
23. GRISWOLD, R.M., 1972. Estudo experimental dos alimentos. Tradução de A.C. Santos, ed. Edgard Blucher Ltda.
24. HAHN-HÄGERDAL, B., 1985. Comparison between immobilized *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae* coimmobilized with β -galactosidase, with respect to continuous ethanol production from concentrated whey permeate. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 914-916.
25. HAMMOND, E.G.; B.A. GLATZ; Y. CHOI & M.T. TEASDALE, 1981. Oil production by *Candida curvata* and extration, composition and properties of the oil. Journal Paper N0. J9859 of the Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station, 171-187.

26. IZAGUIRRE, M.E. & F.J. CASTILLO, 1982. Selection of lactose-fermenting yeast for ethanol production from whey. *Biotechnology Letters*, 4: 257-262.
27. JANSSENS, J.H.; A. BERNARD; & R.B. BAILEY, 1984. Ethanol from whey: continuous fermentation with cell recycle. *Biotechnology and Bioengineering*, 26: 1-5.
28. JASEWICZ, L. & A.E. WASSERMAN, 1961. Quantitative determination of lactase. *Journal of Dairy Science*, 44: 939-400.
29. KING, V.A.E. & R.R. ZALL, 1983. Ethanol fermentation of whey using calcium alginate entrapped yeast. *Process Biochemistry*, 18: 17-20.
30. KOSARIC, N. & N. MIYATA, 1981. Growth of morel mushroom mycelium in cheese whey. *Journal of Dairy Research*, 48: 149-162.
31. KOSARIC, N. & Y. ASHER, 1982a. Cheese whey and its utilization. *Conservation & Recycling*, 5: 23-32.
32. KOSARIC, N. and A. WIECZOREL, 1982b. Fermentative utilization of food industry liquid wastes (by-products) such as cheese whey for specialty products, single cell proteins and fuel alcohol production. *International Symposium of Food Industry and the Environment*, Budapest, Hungary, September, 9-11.
33. KOSIKOWSKI, F.V. & L.E. WIERZBICKI, 1973. Lactose hydrolysis of raw and pasteurized milks by *Saccharomyces lactis* lactase. *Journal of Dairy Science*, 56: 146-148.
34. LENZ, T.G. & A.R. MOREIRA, 1980. Economic evaluation of the acetone-butanol fermentation. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 19: 478-483.

35. MADDOX, I.S., 1980. Production of n-butanol from whey filtrate using *Clostridium acetobutylicum* NCIB 2951. Biotechnology Letters, 2: 493-498.
36. MAHONEY, R.R.; T.A. NICKERSON & J.R. WHITAKER, 1975. Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Dairy Science, 58: 1620-1629.
37. MAHONEY, R.R. & J.R. WHITAKER, 1978. Purification and physico-chemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Food Science, 43: 584-591.
38. MAHONEY, R.R. & C. ADAMCKUK, 1980. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Food Science, 45: 962-964.
39. MAIORELLA, B.L. & F.J. CASTILLO, 1984. Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste abatement. Process Biochemistry, 19: 157-161.
40. MARWAHA, S.S.; J.F. KENNEDY & R.P. SETHI, 1983. Vitamin B₁₂ production from whey and simulation of optimal cultural conditions. Process Biochemistry, 18: 24-27.
41. MARWAHA, S.S. & J.F. KENNEDY, 1984. Alcohol production from whey by immobilized and free cells of *Kluyveromyces marxianus* NCYC 179. Process Biochemistry, 19: 79-80.
42. MEHAIA, M.A. & M. CHERYAN, 1984. Hollow fibre bioreactor for ethanol production: application to the conversion of lactose by *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme Microb. Technol., 6: 117-120.

43. MEIERING, A.G.; F.A. AZI & K.F. GREGORY, 1978. Microbial protein production from whey and cassava. American Society of Agricultural Engineers, 21: 586-593.
44. MIGNONE, C.; L.A. MAZZA & A.P. BALATTI, 1979. Transformacion de suero de queso por procesos fermentativos. Revista de la Facultad de Agronimia, 55: 49-57.
45. MOON, N.J. & E.G. HAMMOND, 1978a. Oil production by fermentation of lactose and the effect of temperature on the fatty acid composition. Journal of the American Oil Chemistry Society, 55: 683-688.
46. MOON, N.J.; E.G. HAMMOND & B.A. GLATZ, 1978b. Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single-cell protein. Journal of Dairy Science, 61: 1537-1547.
47. MORITA, T. & R.M.V. ASSUMPÇÃO, 1976. Manual de soluções, reagentes e solventes. 2.^a ed., 300. Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo, SP.
48. MOULIN, C.; M. GUILLAUME & P. GALZY, 1980a. Alcohol production by yeast in whey ultrafiltrate. Biotechnology and Bioengineering, 22: 1277-1281.
49. MOULIN, G.; H. BOZE & P. GALZY, 1980b. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnology and Bioengineering, 22: 2375-2381.
50. MUSTRANTA, A.; M. LINKO; M. HARJU & M. KEIKONEN, 1979. Production and use of lactase. Kemia-kemi, 6: 306-308.

51. OKOS, M.R.; E.A. GRULKE & A. SYVERSON, 1978. Hydrolysis of lactose in acid whey using β -galactosidase adsorbed to a phenol formaldehyde resin. *Journal of Food Science*, 43: 566-571.
52. O'LEARY, V.S.; R. GREEN; B.C. SULLIVAN & V.H. HOLSINGER, 1977a. Alcohol production by selected yeast strain in lactose-hydrolyzed acid whey. *Biotechnology and Bioengineering*, 19: 1019-1035.
53. O'LEARY, V.S.; C. SUTTON; M. BENCIVENGO; B. SULLIVAN & V.H. HOLSINGER, 1977b. Influence of lactose hydrolysis and solids concentration on alcohol production by yeast in acid whey ultrafiltrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 19: 1689-1702.
54. PAINE, M.A. & R.G. CARBONELL, 1975. Immobilization of beta-galactosidase in collodion microcapsules. *Biotechnology and Bioengineering*, 17: 617-618.
55. PARK, Y.K.; M.S.S. de SANTI & G.M. PASTORE, 1979. Production and characterization of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*, 44: 100-103.
56. PARK, Y.K. & G.M. PASTORE, 1981. Immobilization of *Scopulariopsis* β -galactosidase to DEAE-cellulose with glutaraldehyde and some properties of the preparation obtained. *Journal Fermentation Technology*, 59: 165-168.
57. PASTORE, G.M. & Y.K. PARK, 1980. Purification and characterization of β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp. *Journal Ferment. Technol.*, 58: 79-81.

58. PASTORE, G.M. & Y.K. PARK, 1981. Beta-galactosidase de *Scopula xiopsis*: imobilização em resina fenol-formaldeído (Duolite) e sua eficiência na hidrólise de lactose em soro de leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 1: 65-72.
59. POMAR, F.T.; C.A. MEINARD & C.A. CRENZ, 1977. Produccion de beta-galactosidase aprovechando suero de lache. *Revista de la Facultad de Ingenieria Química*, 42: 89-98.
60. POMERANZ, Y.; B.S. MILLER & J.A. JOHNSON, 1962. Use of lactase in breadmaking. *Cereal Chemistry*, 39: 398-406.
61. REESEN, L. & R. STRUBE, 1978. Complete utilization of whey for alcohol and methane production. *Process Biochemistry*, 13: 21-22.
62. ROGOSA, M.; H.H. BROWNE & E.O WHITTIER, 1947. Ethyl alcohol from whey. *Journal of Dairy Science*, 30: 263-269.
63. SABIONI, J.G.; A.J.R. PINHEIRO; D.O. SILVA; J.B.P. CHAVES & A.C. BORGES, 1984a. Control of lactose crystallization in "Dulce de Leche" by β -D-galactosidase activity from permeabilized *Kluyveromyces lactis* cells. *Journal of Dairy Science*, 67: 2210-2215.
64. SABIONI, J.G.; D.O. SILVA; A.J.R. PINHEIRO; A.C. BORGES & J.B. P. CHAVES, 1984b. Control of lactose crystallization in "Dulce de Leche" by *Kluyveromyces lactis* fermentation. *Journal of Dairy Science*, 67: 1694-1698.
65. SCHOUTENS, G.H. & W.J. GROOT, 1985. Economic feasibility of the production of iso-propanol-butanol-ethanol fuels from whey permeate. *Process Biochemistry*, 20: 117-121.

66. SILVA, T.J.P.; A.J.P. PINHEIRO; D.T. CELLHO; A.S. PEREIRA & J.B.P. CHAVES, 1984. Utilização de beta-galactosídase no processo contínuo de fabricação de Doce de leite homogeneizado. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", 39: 19-30.
67. SOMOGYI, M., 1945. Determination of blood sugar. Journal of Biological Chemistry, 160: 69.
68. STIEBER, R.W. & P. GERHARDT, 1979. Continuous process for ammonium-lactate fermentation. Journal of Dairy Science, 62: 1558-1566.
69. STIEBER, R.W. & P. GERHARDT, 1980. Production of *Lactobacillus* cells by dialysis continuous fermentation of deproteinized whey. Journal of Dairy Science, 63: 722-730.
70. THOMPSON, M.P. & D.P. BROWER, 1976. Hydrolyzed lactose cultured dairy products. I. Manufacture of cheddar cheese. Cultured Dairy Products Journal, 22-23.
71. TODA, K.; T. TAKEUCHI & H. SANÔ, 1979. Growth rate dependence of enzyme synthesis in chemostat cultures: α -amilase, β -galactosidase and β -frutosidase. J. Chem. Tech. Biotechnol., 29: 747-755.
72. VAN HUYNH, N.; M. DECLEIRE; A.M. VOETS; J.C. MOTTE & X. MONSEUR, 1986. Production of gluconic acid from whey hydrolyzate by *Gluconobacter oxydans*. Process Biochemistry, 21: 31-32.
73. VIENNE, P. & U. von STOCKAR, 1985a. An investigation of ethanol inhibition and other limitations occurring during the fermentation of concentrated whey permeate by *Kluyveromyces fragilis*. Biotechnology Letters, 7: 521-526.

74. VIENNE, P. & U. von STOCKAR, 1985b. Metabolic, physiological and kinetic aspects of the alcoholic fermentation of whey permeate by *Kluyveromyces fragilis* NRRL 665 and *Kluyveromyces lactis* NCYC 571. *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 287-294.
75. VISKARI, R.; M. LINKO; M. HARJU & M. HEIKONEN, 1978. Immobilized lactases and hydrolysis of lactose in whey. *Kemia-Kemi*, 5: 12.
76. WASSERMAN, A.E.; J. HAMPSON; N.F. ALVARE & N.J. ALVARE, 1961. Whey utilization V - Growth of *Saccharomyces fragilis* in whey in a pilot plant. *Journal Dairy Science*, 44: 387-392.
77. WASSERMAN, A.E., 1960. Amino acid and composition of *Saccharomyces fragilis* grown in whey. *Journal of Dairy Science*, 44: 379-385.
78. WEETALL, H.H.; N.B. HAVEWALA; W.H. PITCHER Jr; C.C. DETAR; W. P. VANN & S. YAUVERBAUM, 1974. The preparation of immobilized lactase and its use in the enzymatic hydrolysis of acid whey. *Biotechnology and Bioengineering*, 26: 295-313.
79. WEETALL, H.H., 1976. Immobilized enzyme technology. *Cereal Foods World*, 21: 581-587.
80. WIERZBICKI, V.H. & F.V. KOSIKOWSKI, 1973. Lactase potential of various microorganisms grown in whey. *Journal of Dairy Science*, 56: 26-32.
81. WIERZBICKI, V.H.E. & F.V. KOSIKOWSKI, 1974. Hydrolysis of lactose in acid whey using β -galactosidase immobilized on porous glass particles: preparation and characterization of a reusable catalyst for the production of low-lactose dairy products. *Biotechnology and Bioengineering*, 16: 397-411.

82. ZERTUCHE, L. & R.R. ZALL, 1985. Optimizing alcohol production from whey using computer technology. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 547-554.

7. APÊNDICE

Gráficos de lactose hidrolisada contra tempo de reação para determinação da velocidade inicial de hidrólise de lactose com β -galactosídase de *Saccharomyces fragilis* NRRL Y-2415, sendo os parâmetros a concentração de lactose e tempo de autólise; e os respectivos gráficos de Lineweaver-Burk.

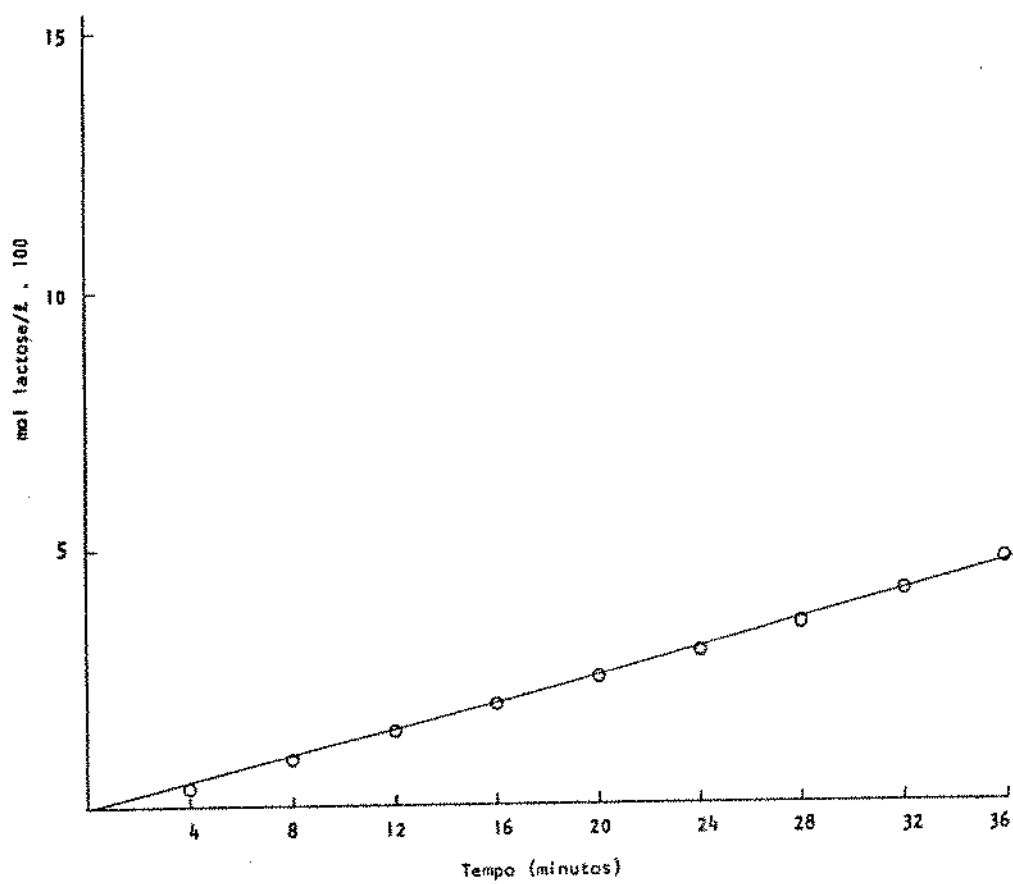


FIGURA 7.1. Extrato enzimático IV (20 horas de autólise), 1,25% lac_tose.

$$v_i = 1,31 \text{ mM lactose/min.}$$

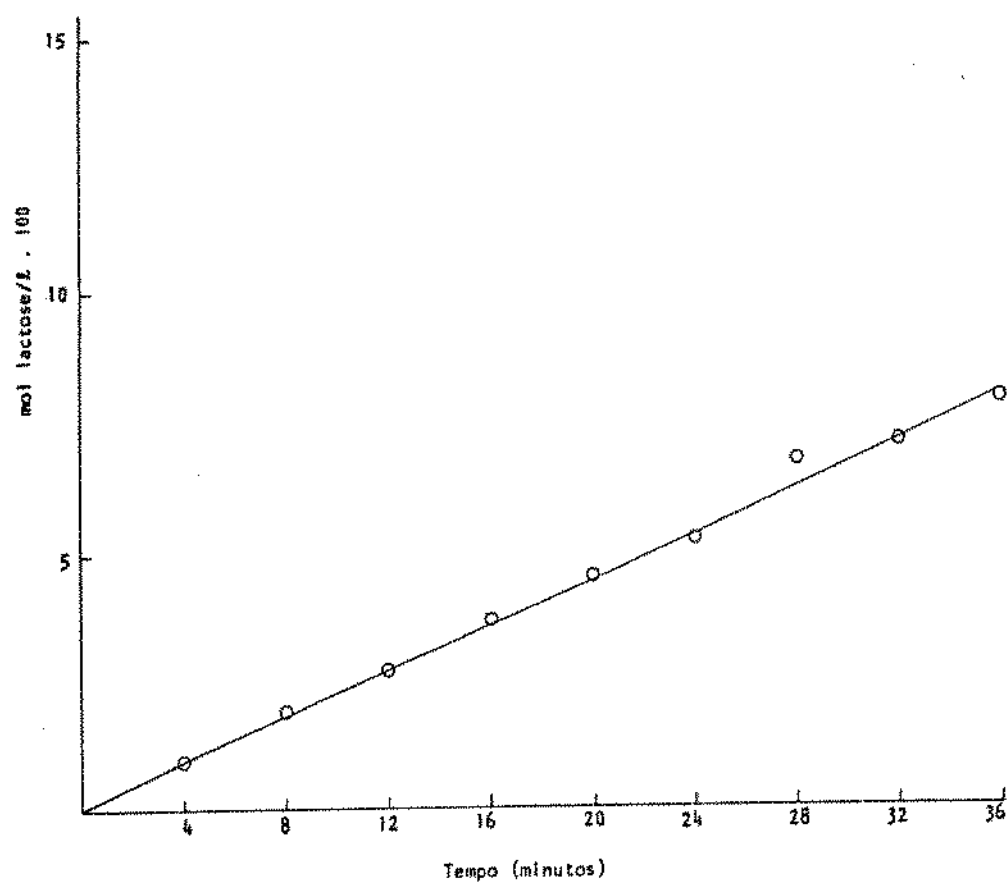


FIGURA 7.2. Extrato enzimático IV (20 horas de autólise), 2,5% lactose.

$$v_i = 2,24 \text{ mM lactose/min.}$$

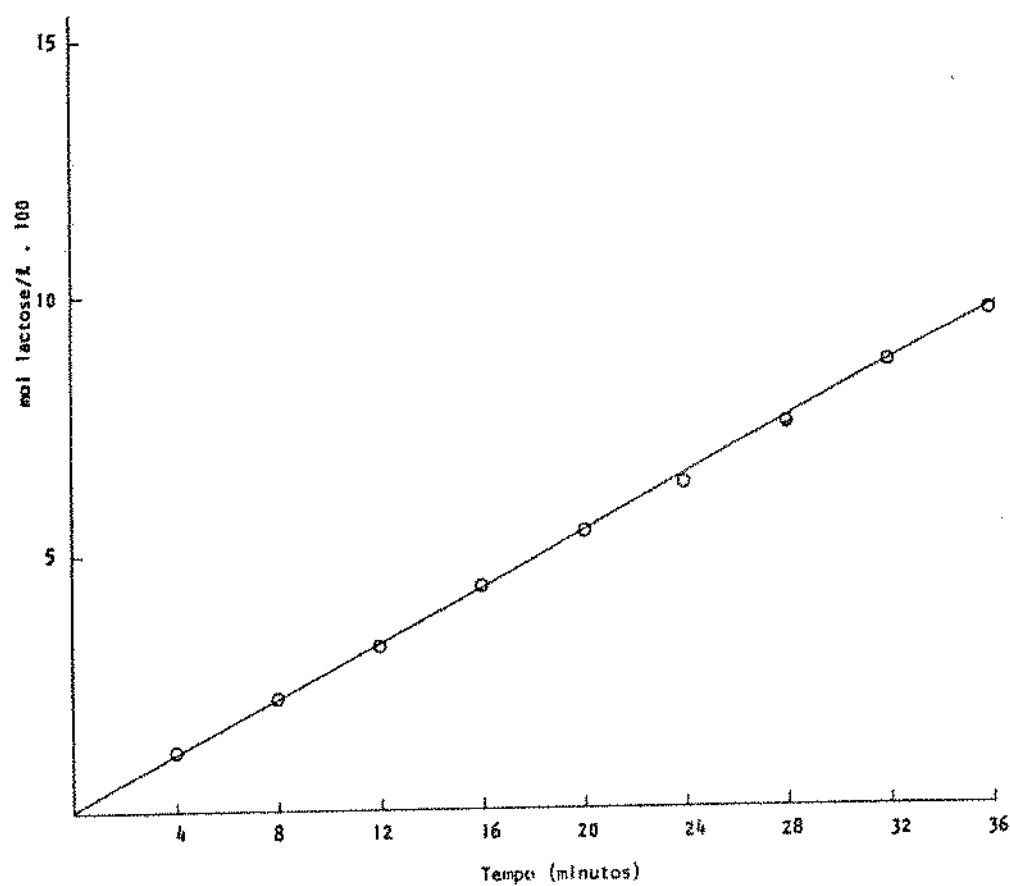


FIGURA 7.3. Extrato enzimático IV (20 horas de autólise), 5,0% lactose.

$$v_i = 2,68 \text{ mM lactose/min.}$$

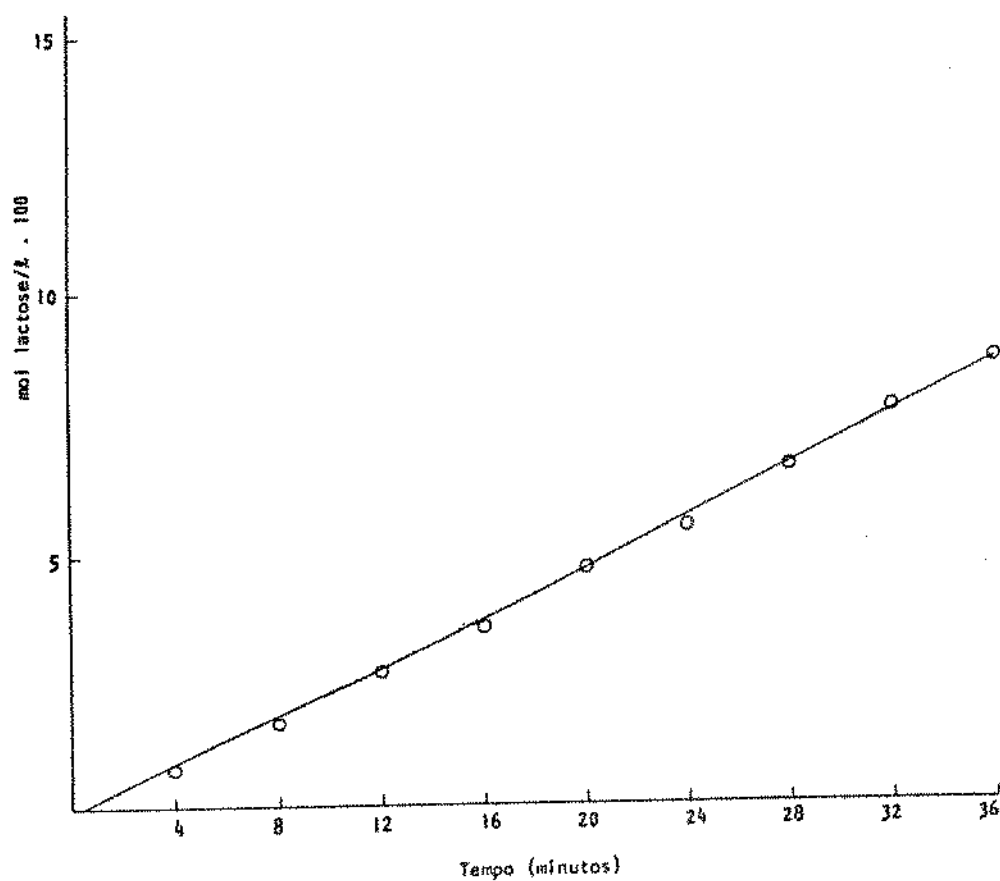


FIGURA 7.4. Extrato enzimático IV (20 horas de autólise), 7,5% lactose.

$$v_i = 2,40\text{mM lactose/min.}$$

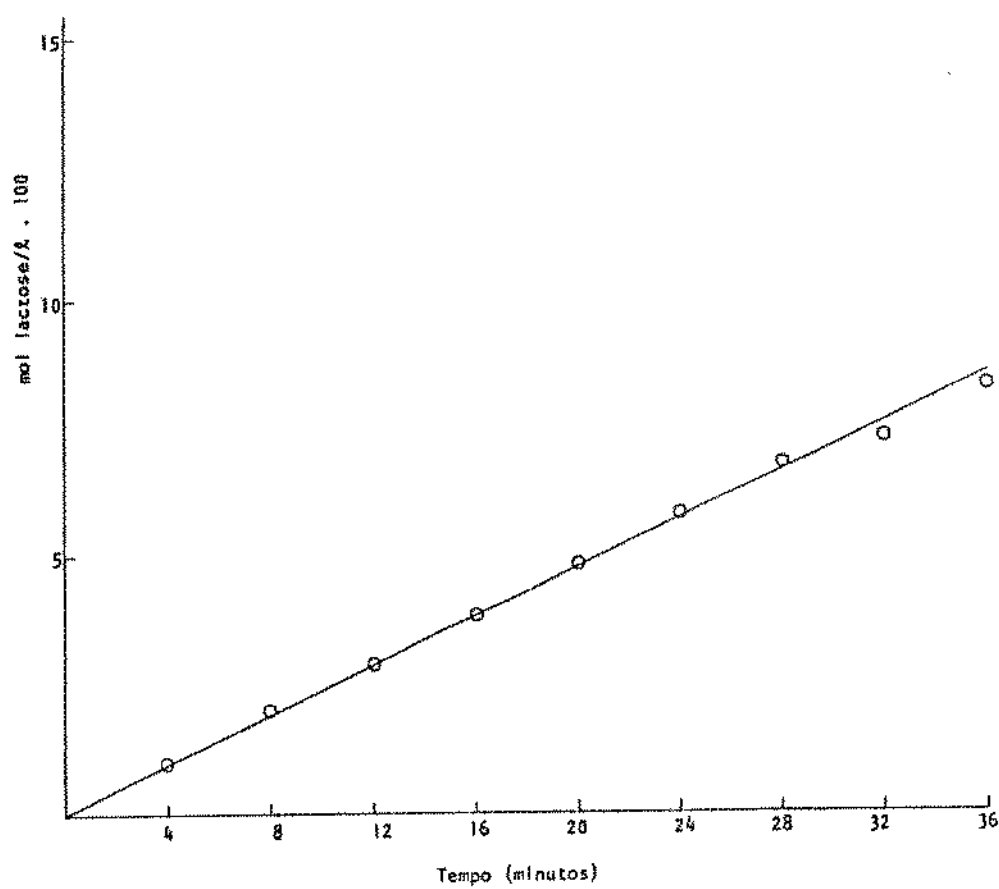


FIGURA 7.5. Extrato enzimático IV (20 horas de autólise), 10% lactose.

$$v_i = 2,38 \text{ mM lactose/min.}$$

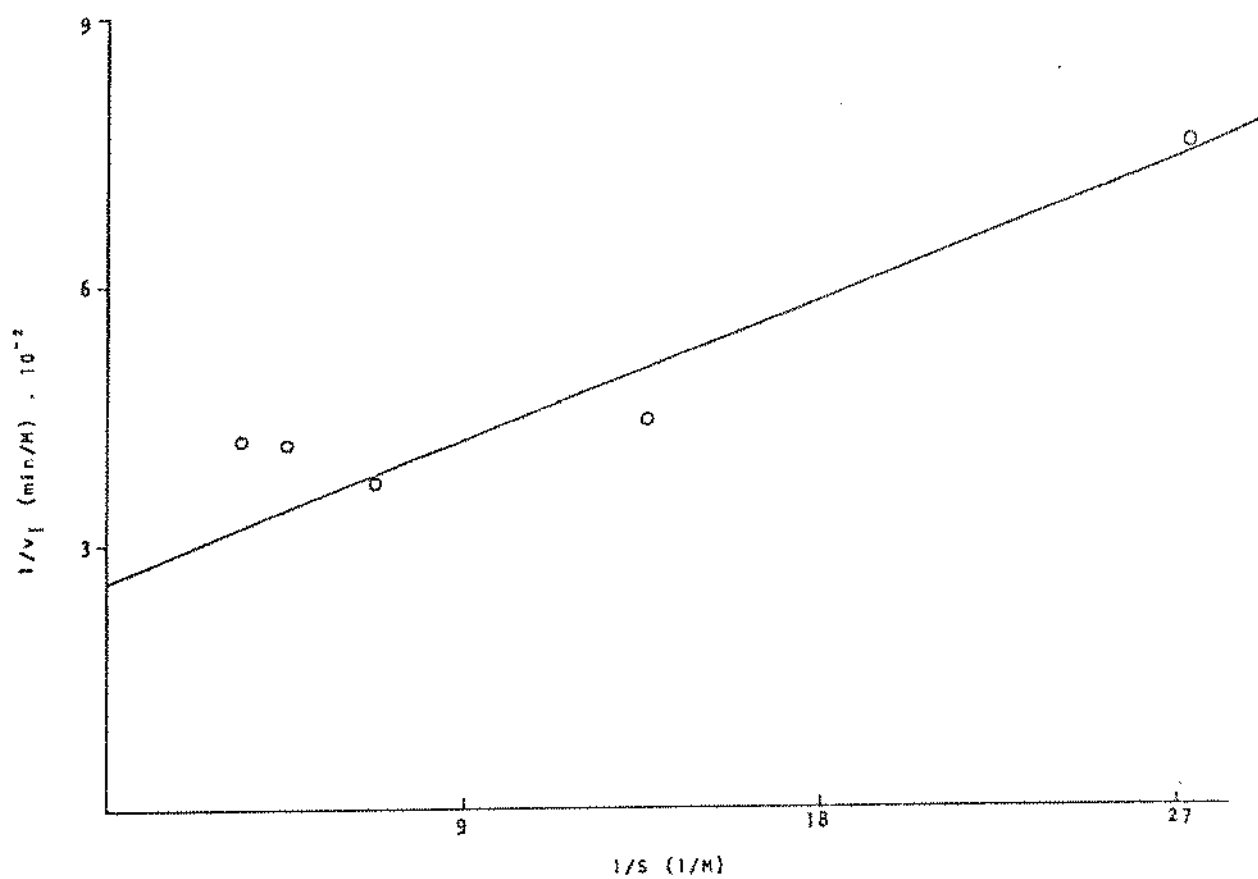


FIGURA 7.6. Extrato enzimático IV (20 horas de autólise).

$$K_m = 67,93\text{mM}$$

$$V_m = 3,88\text{mM/min.}$$

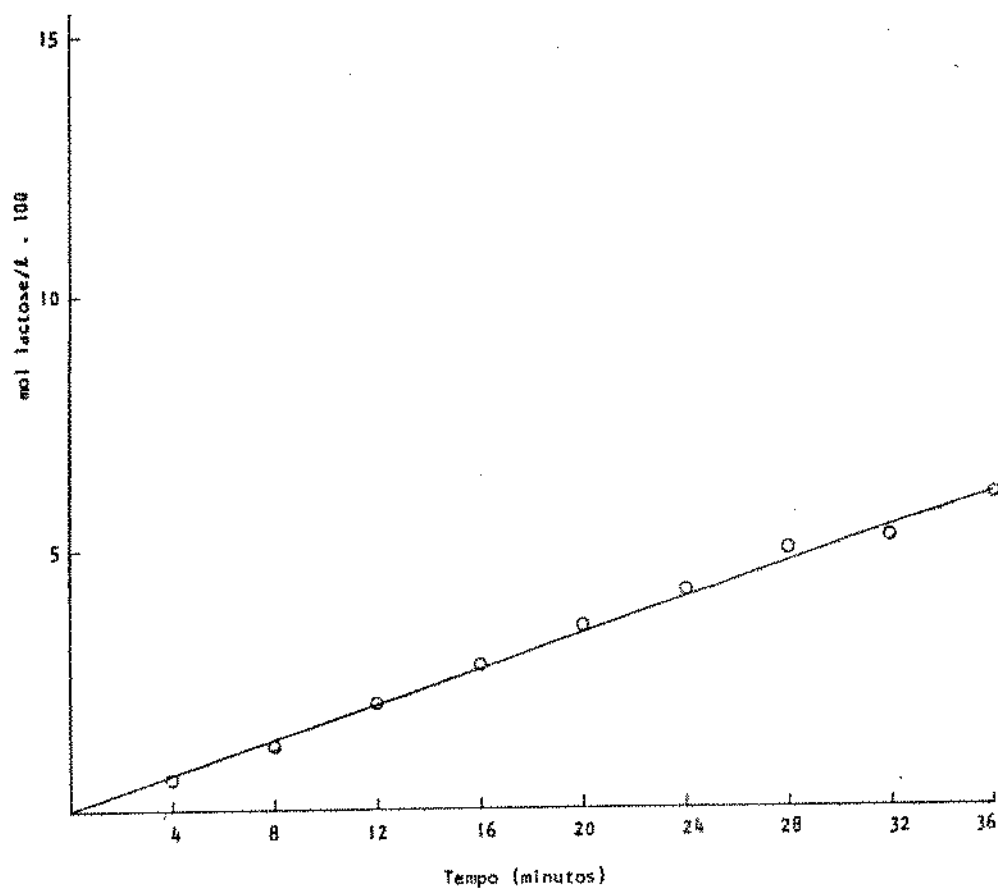


FIGURA 7.7. Extrato enzimático V (28 horas de autólise), 1,25% lactose.

$$v_i = 1,706 \text{ mM lactose/min.}$$

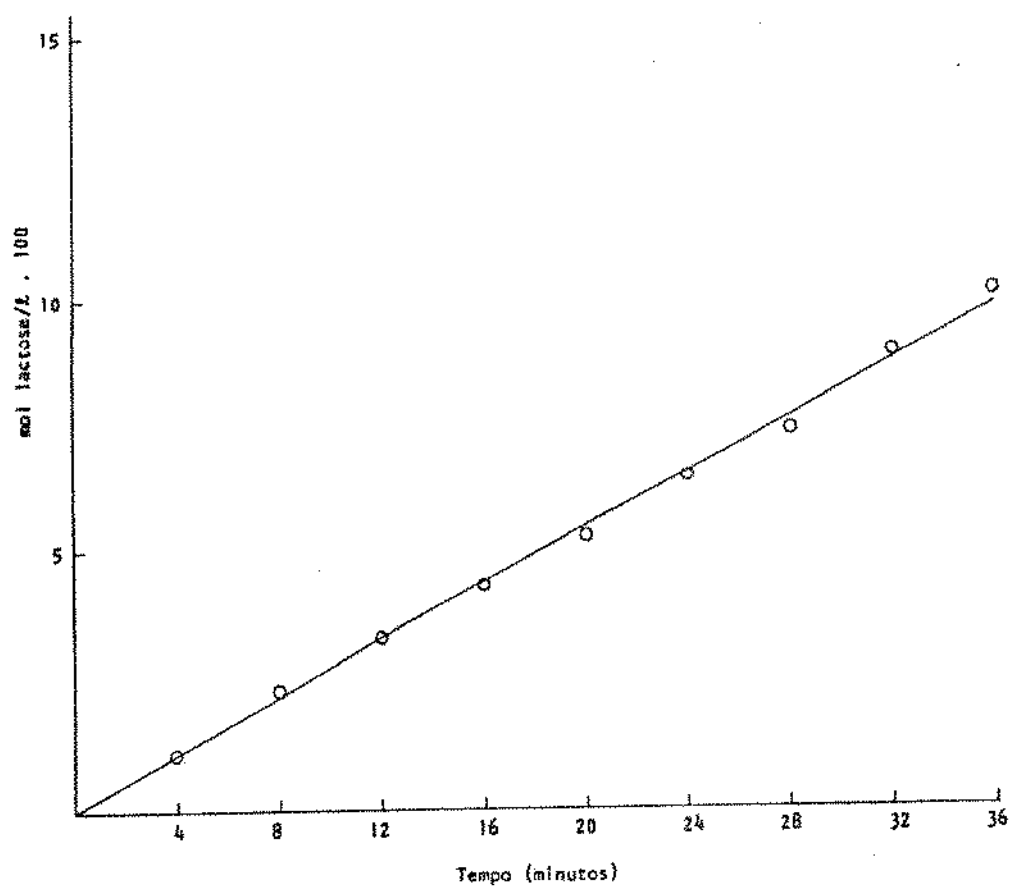


FIGURA 7.8. Extrato enzimático V (28 horas de autólise), 2,5% lactose.

$$v_i = 2,741 \text{ mM lactose/min.}$$

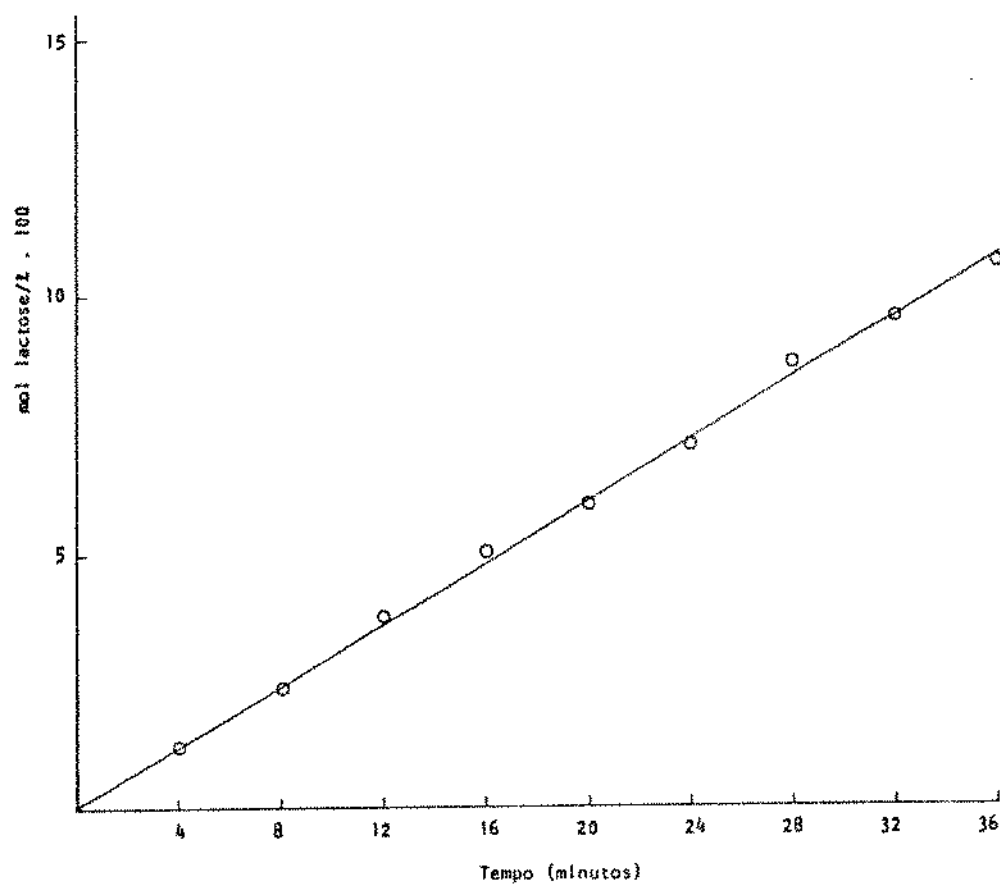


FIGURA 7.9. Extrato enzimático V (28 horas de autólise), 5,0% lactose.

$$v_i = 2,975 \text{ mM lactose/min.}$$

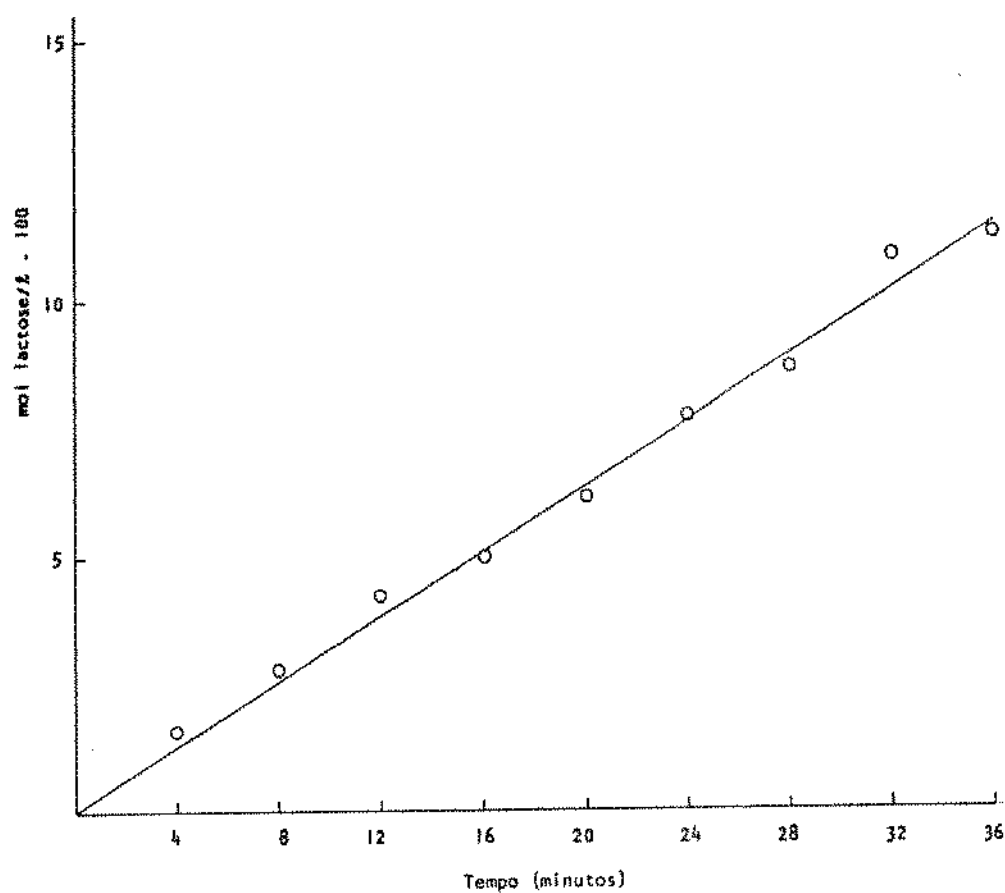


FIGURA 7.10. Extrato enzimático V (28 horas de autólise), 7,5% lactose.

$$v_i = 3,169 \text{ mM lactose/min.}$$

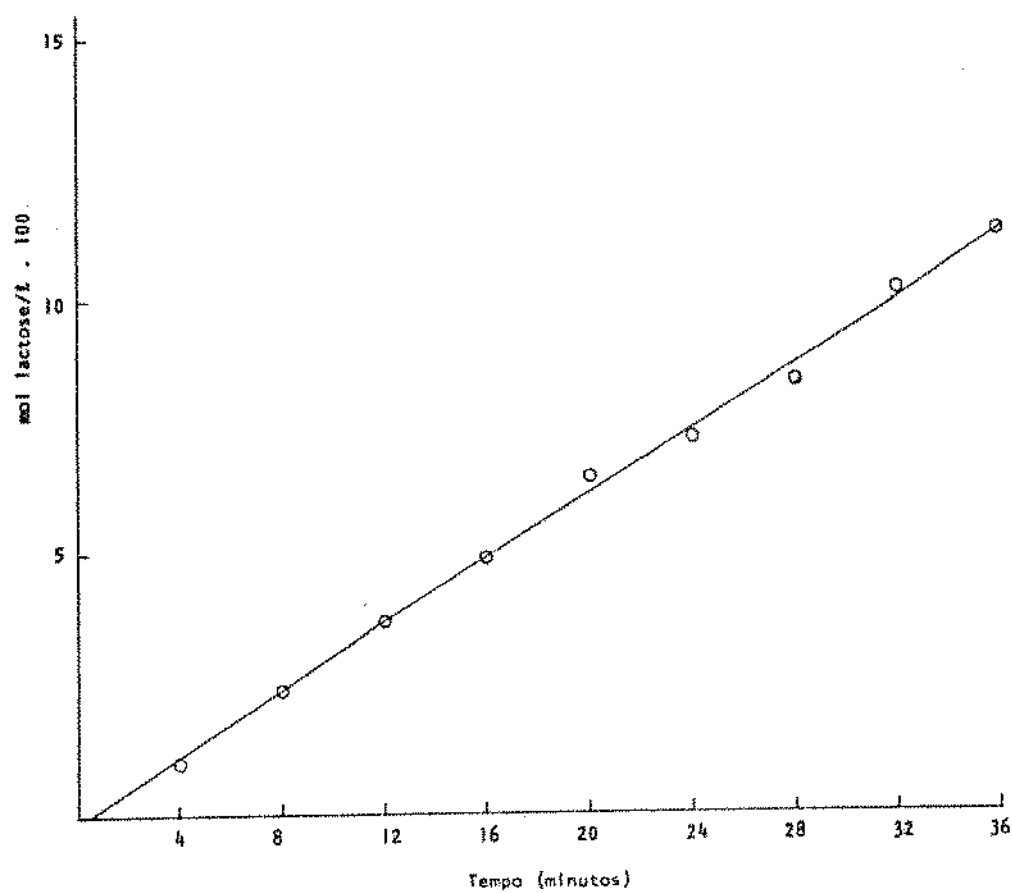


FIGURA 7.11. Extrato enzimático V (28 horas de autólise), 10% lactose.

$$v_i = 3,151 \text{ mM lactose/min.}$$

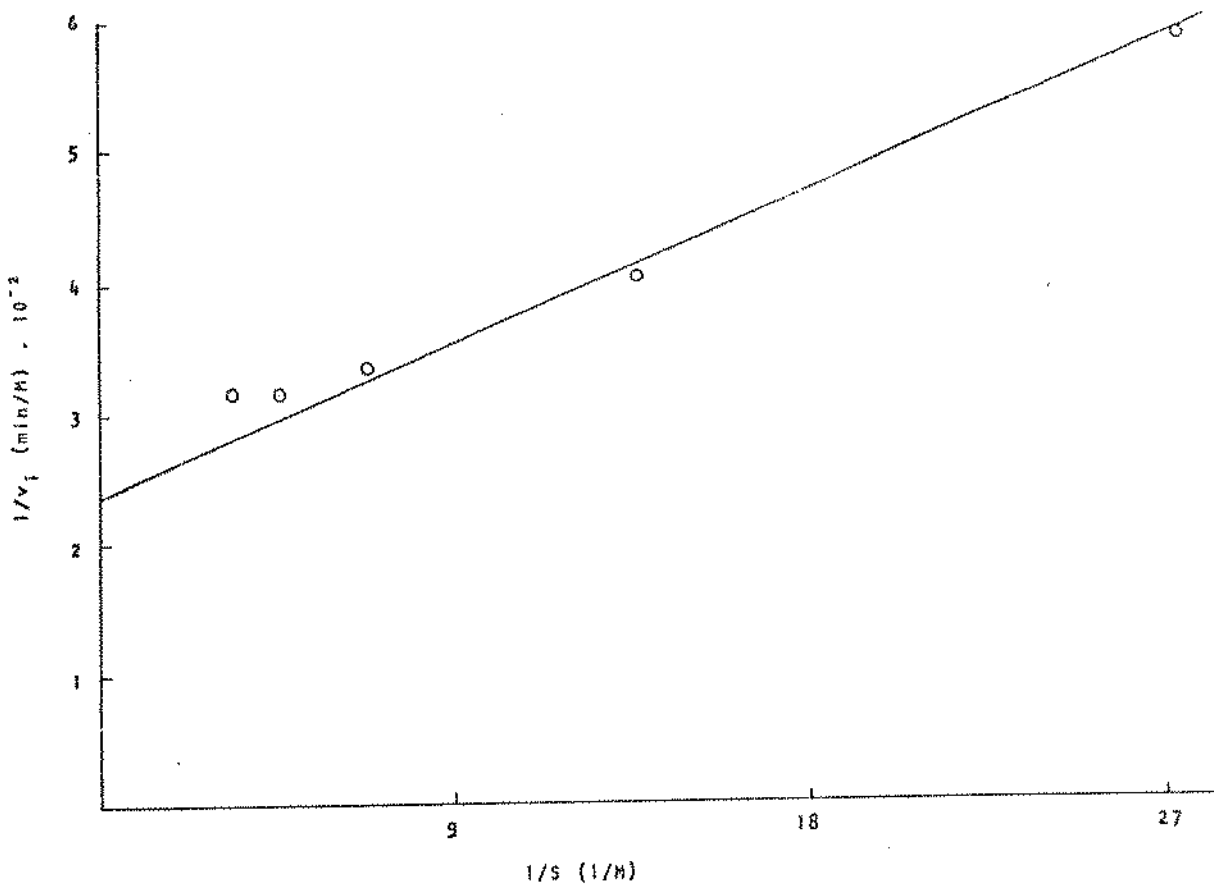


FIGURA 7.12. Extrato enzimático V (28 horas de autólise).

$$K_m = 54,2 \text{ mM}$$

$$V_m = 4,24 \text{ mM/min.}$$

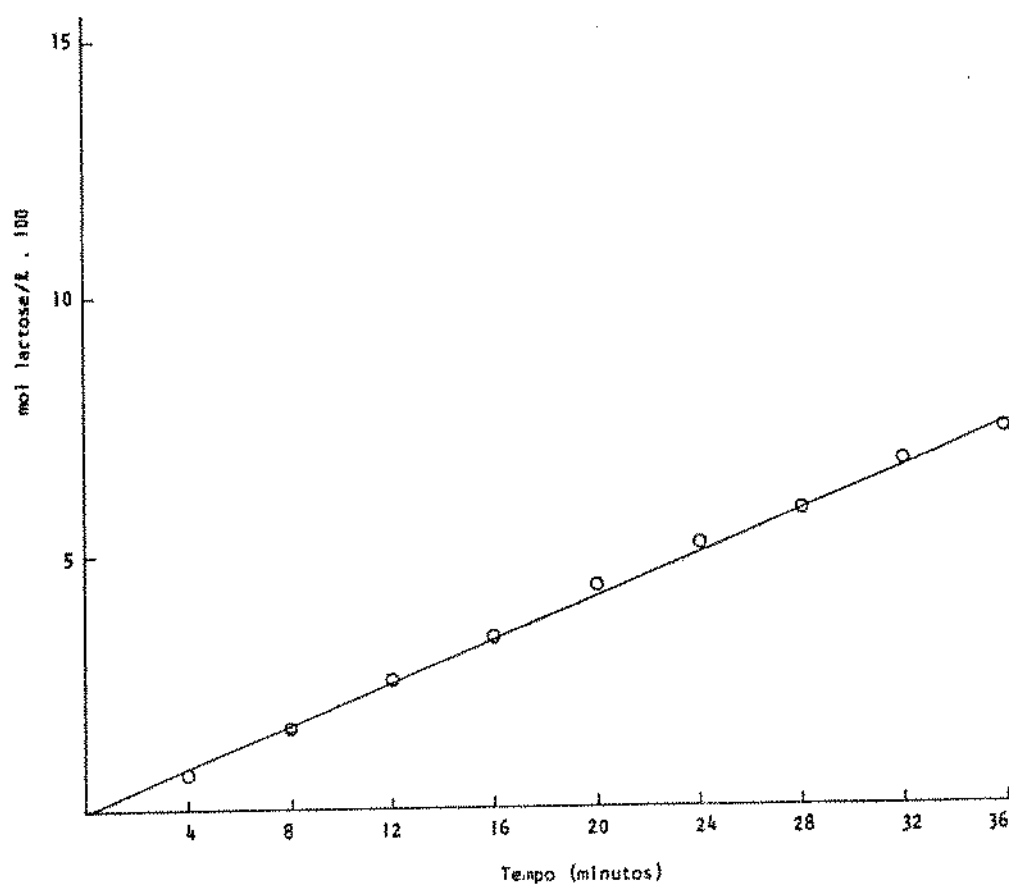


FIGURA 7.13. Extrato enzimático VI (44 horas de autólise), 1,25% lactose.

$$v_i = 2,08 \text{ mM lactose/min.}$$

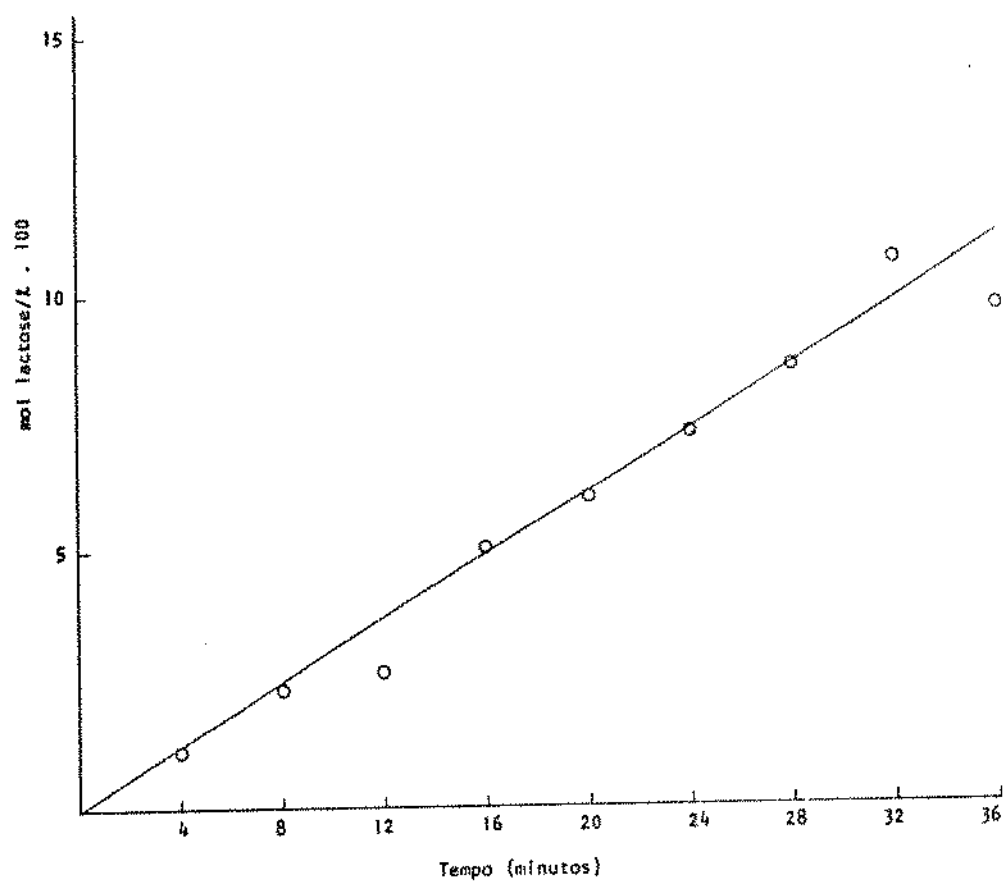


FIGURA 7.14. Extrato enzimático VI (44 horas de autólise), 2,5% lactose.

$$v_i = 3,07 \text{ mM lactose/min.}$$

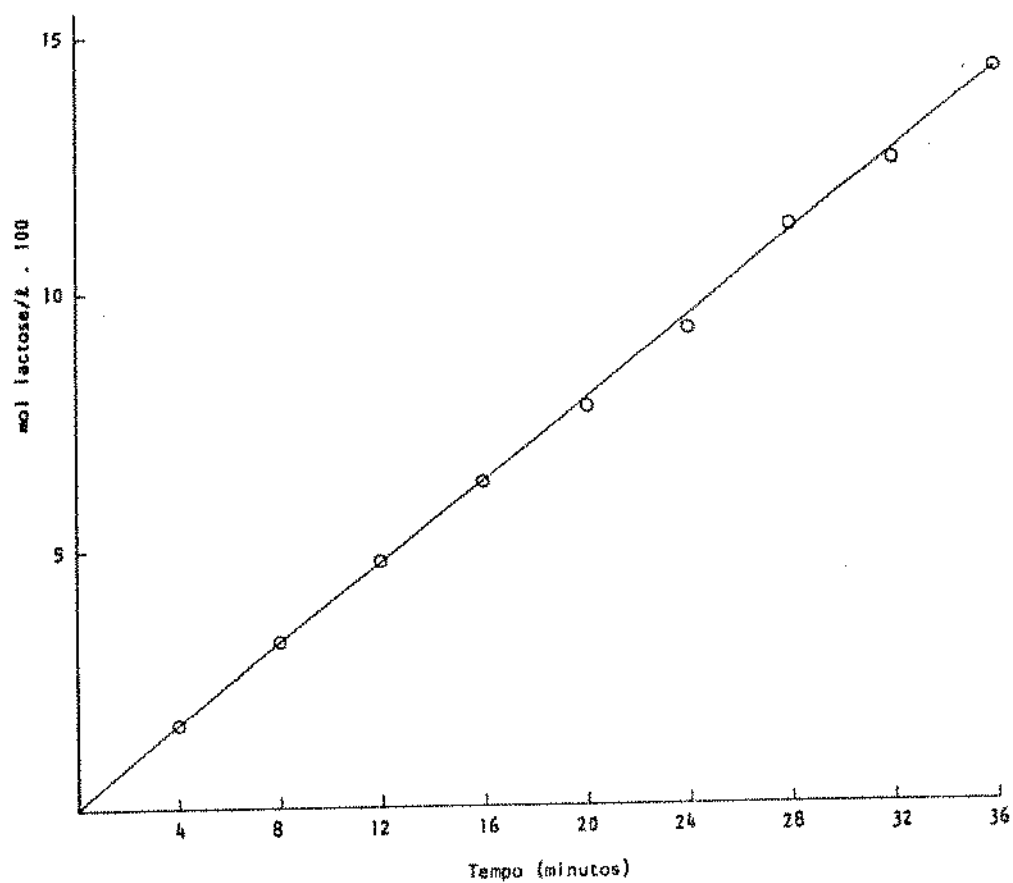


FIGURA 7.15. Extrato enzimático VI (44 horas de autólise), 5,0% lactose.

$$v_i = 3,96\text{mM lactose/min.}$$

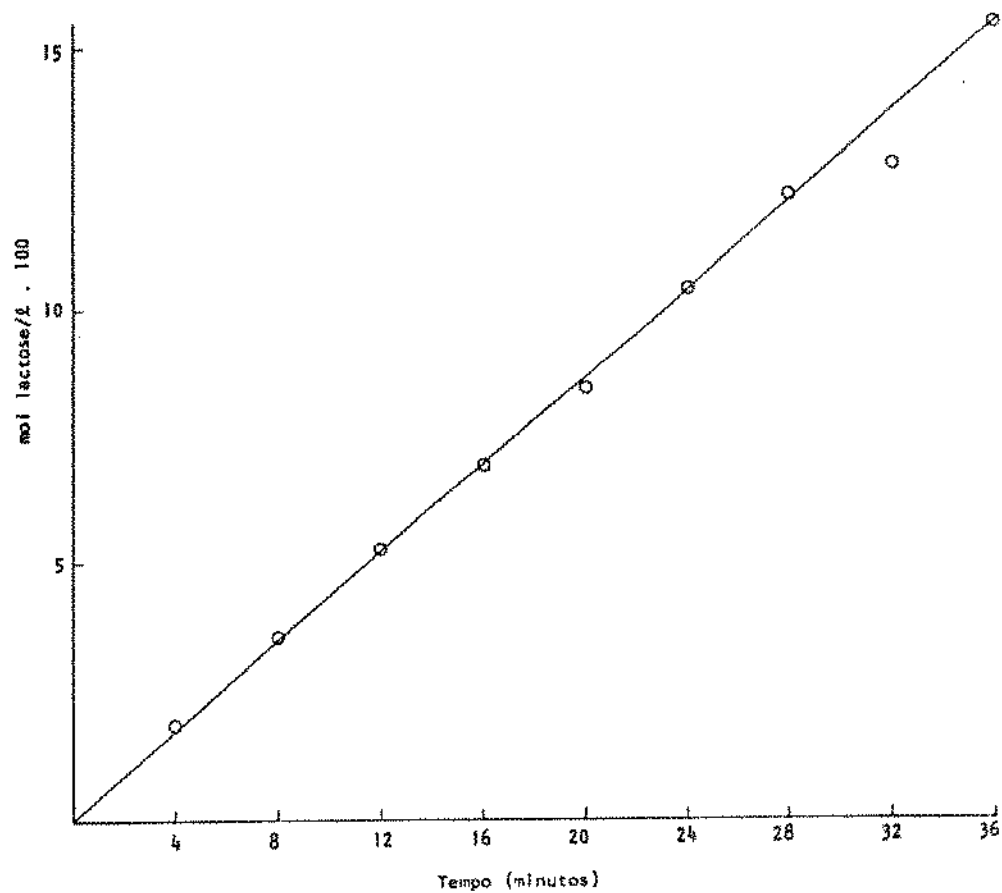


FIGURA 7.16. Extrato enzimático VI (44 horas de autólise), 7,5% lactose.

$$v_i = 4,32 \text{ mM lactose/min.}$$

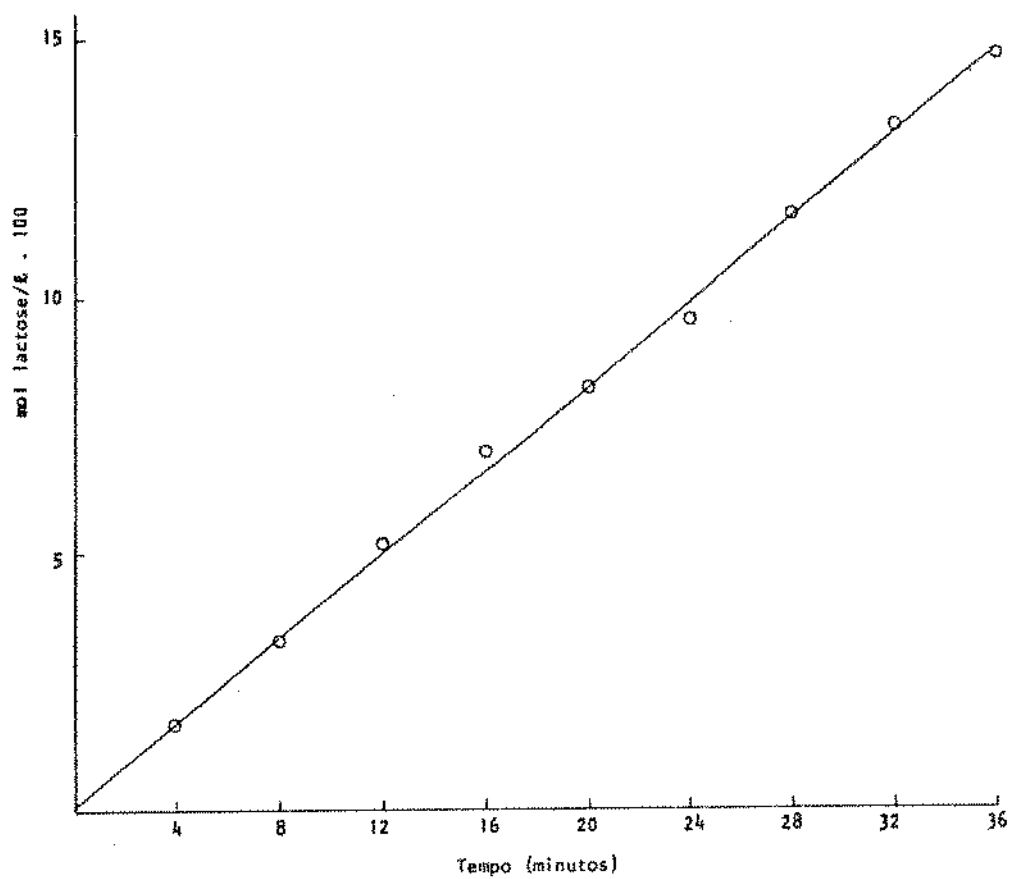


FIGURA 7.17. Extrato enzimático VI (44 horas de autólise), 10% lactose.

$$v_i = 4,11\text{mM lactose/min.}$$

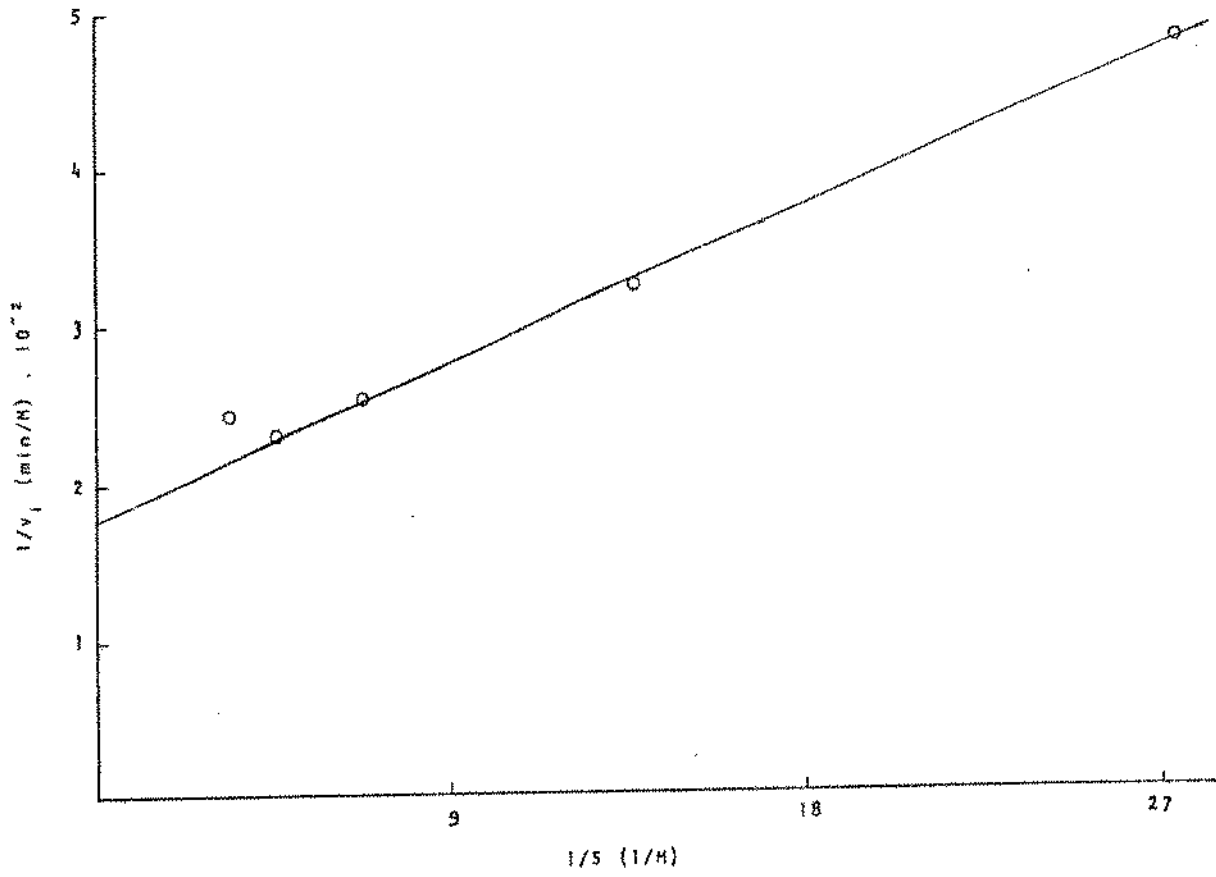


FIGURA 7.18. Extrato enzimático VI (44 horas de autólise).

$$K_m = 62,0 \text{ mM}$$

$$V_m = 6,20 \text{ mM/min.}$$

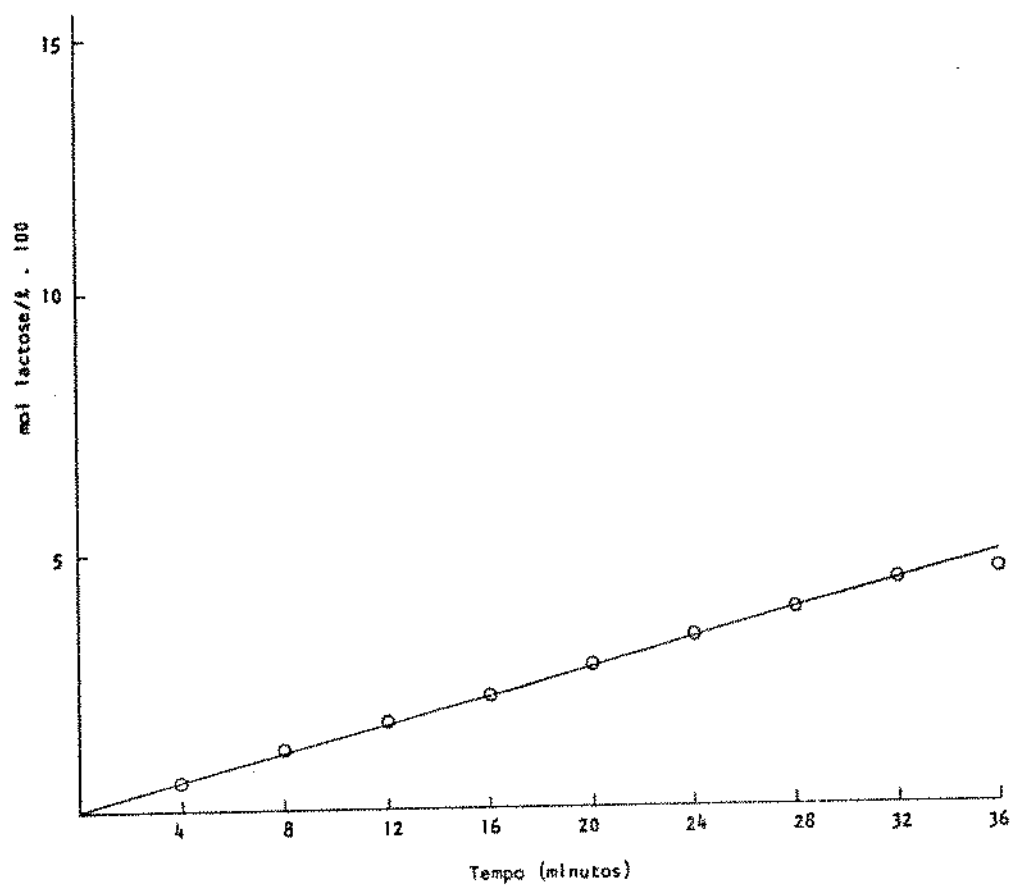


FIGURA 7.19. Extrato enzimático VII (20 horas de autólise), 1,25% lactose.

$$v_1 = 1,33\text{mM lactose/min.}$$

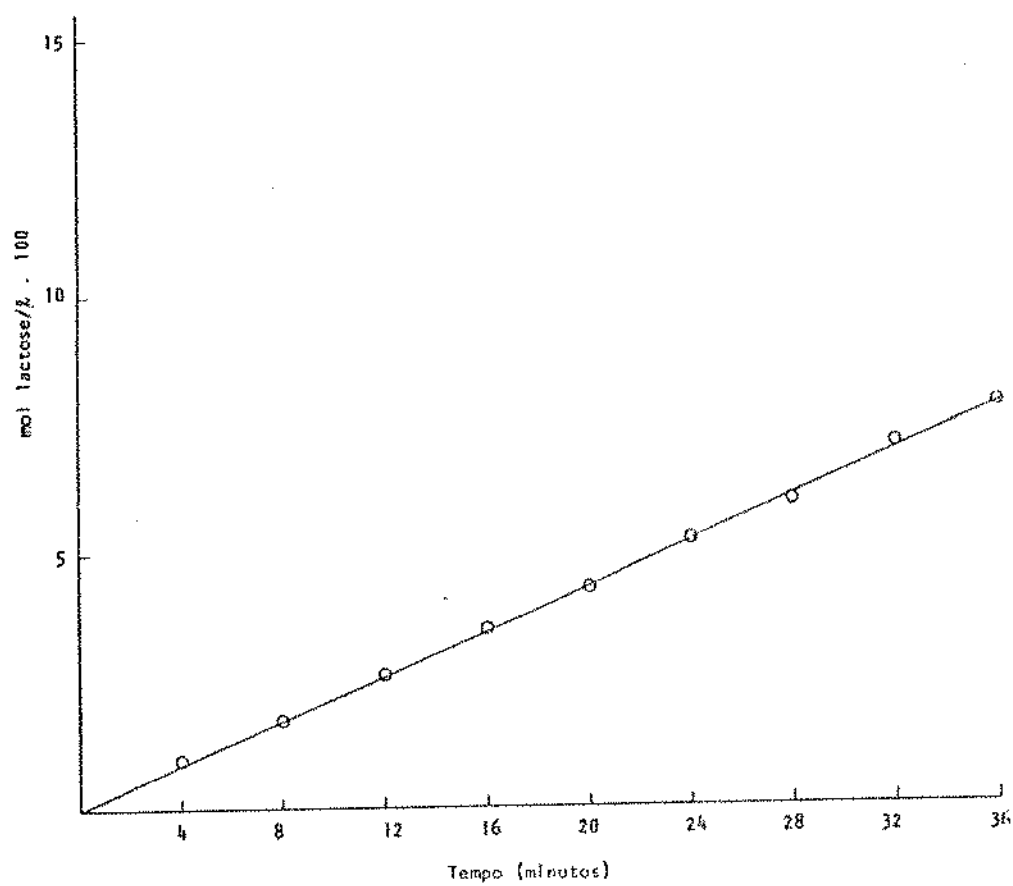


FIGURA 7.20. Extrato enzimático VII (20 horas de autólise), 2,5% lactose.

$$v_i = 2,15 \text{ mM lactose/min.}$$

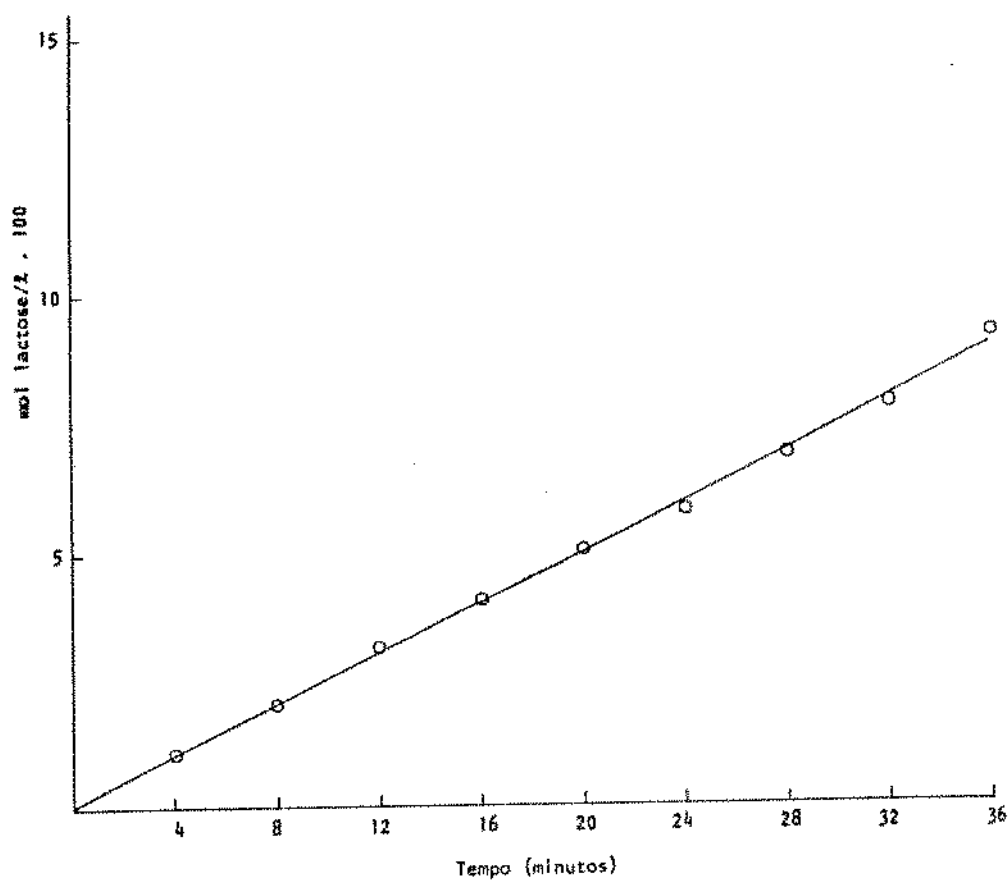


FIGURA 7.21. Extrato enzimático VII (20 horas de autólise), 5% lactose.

$$v_i = 2,47 \text{ mM lactose/min.}$$

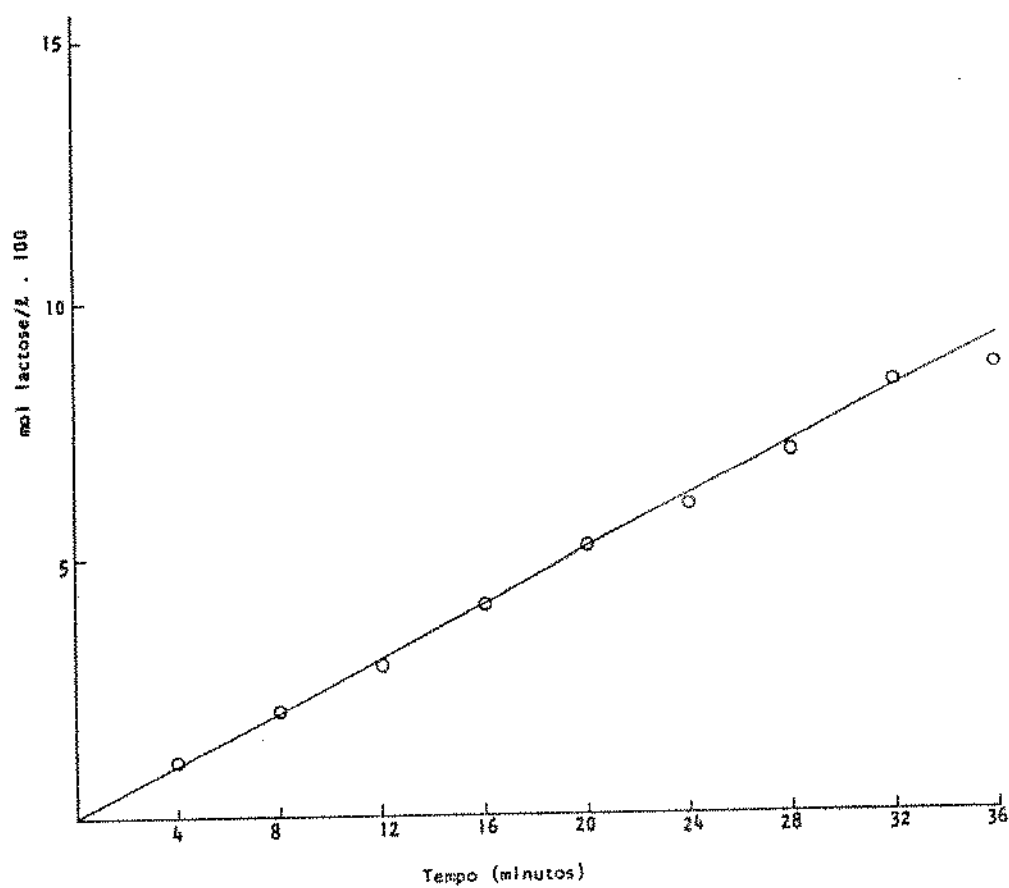


FIGURA 7.22. Extrato enzimático VII (20 horas de autólise), 7,5% lactose.

$$v_i = 2,72 \text{ mM lactose/min.}$$

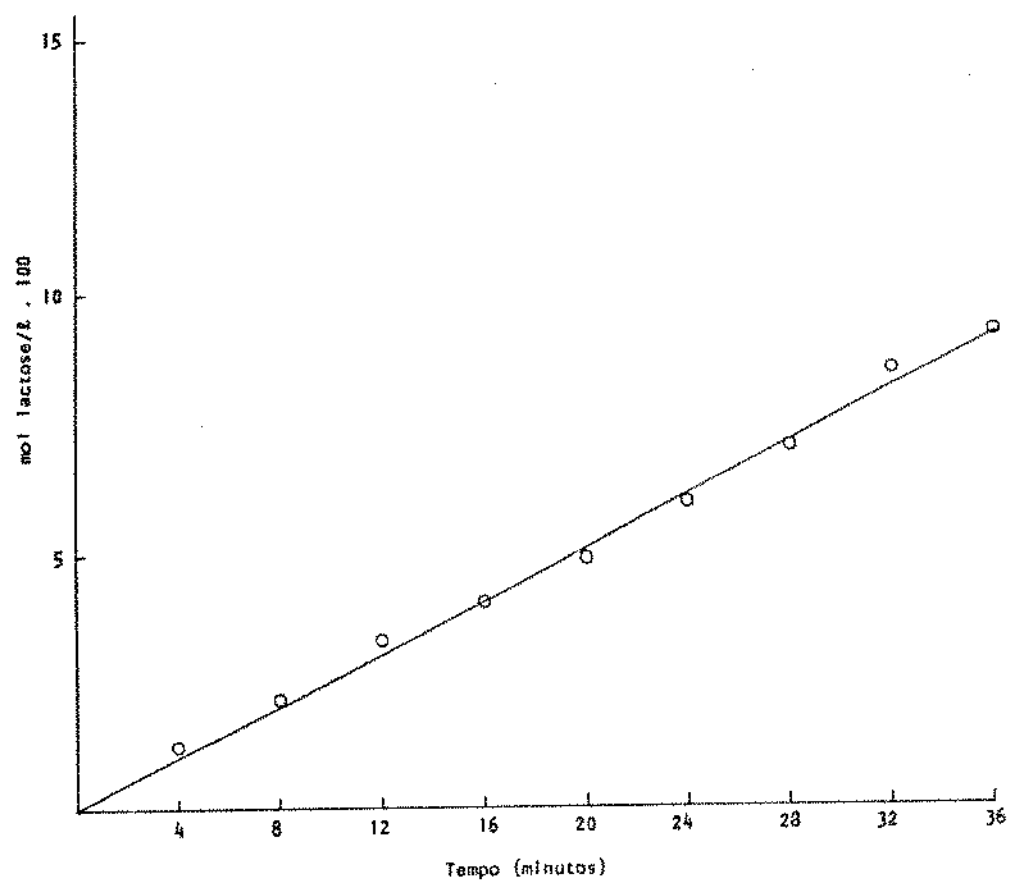


FIGURA 7.23. Extrato enzimático VII (20 horas de autólise), 10% lactose.

$$v_i = 2,52 \text{ mM lactose/min.}$$

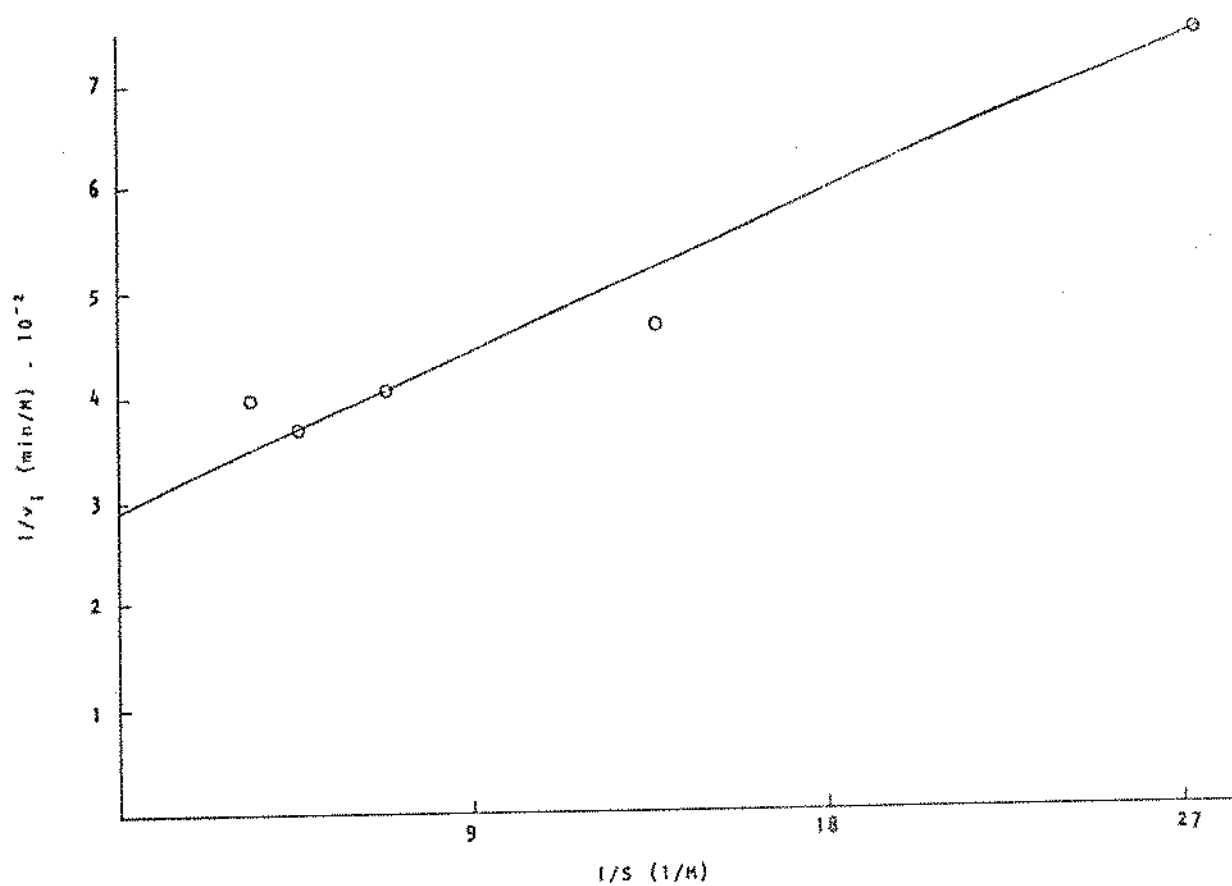


FIGURA 7.24. Extrato enzimático VII (20 horas de autólise).

$$K_m = 57,20\text{mM}$$

$$V_m = 3,42\text{mM/min.}$$

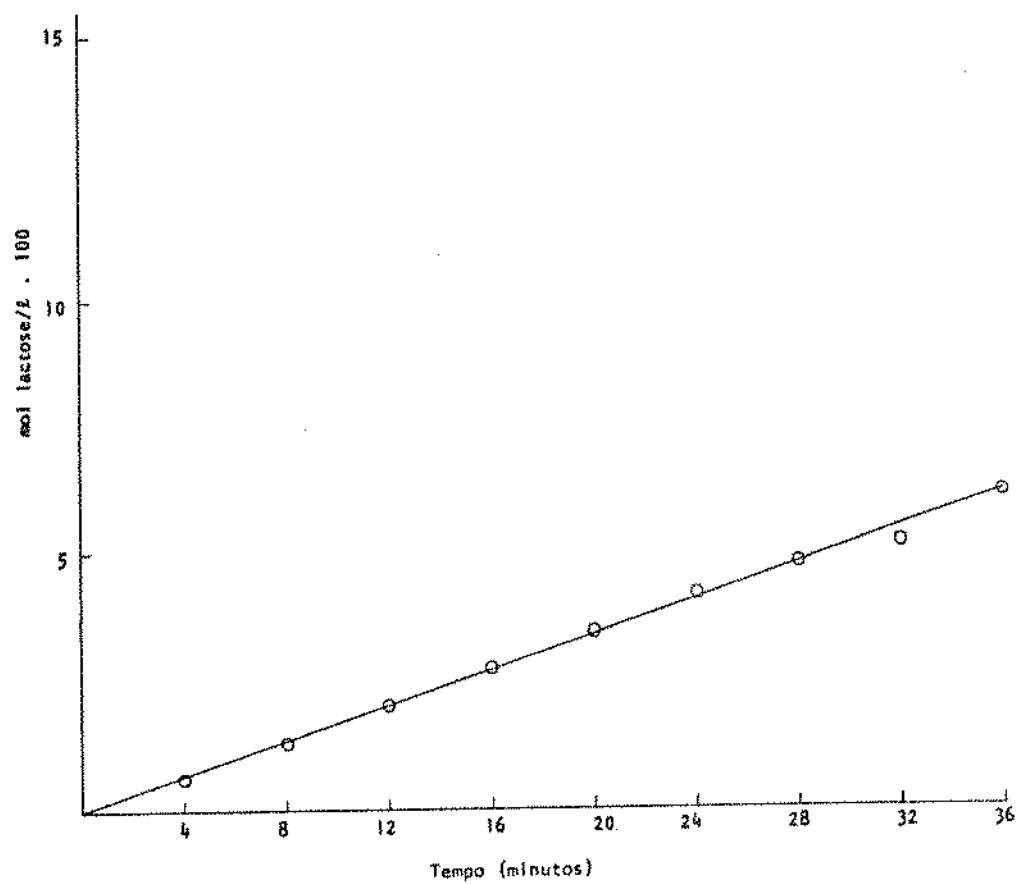


FIGURA 7.25. Extrato enzimático VIII (28 horas de autólise), 1,25% lactose.

$$v_i = 1,69 \text{ mM lactose/min.}$$

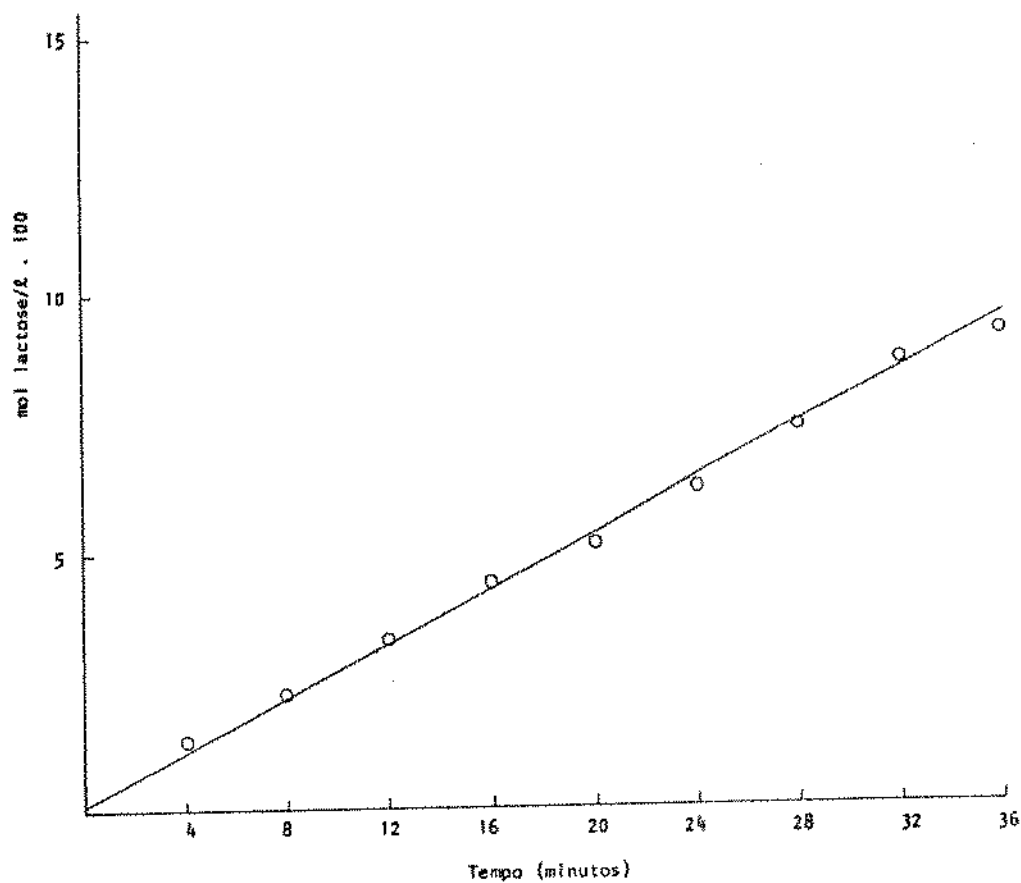


FIGURA 7.26. Extrato enzimático VIII (28 horas de autólise), 2,5% lactose.

$$v_i = 2,63 \text{ mM lactose/min.}$$

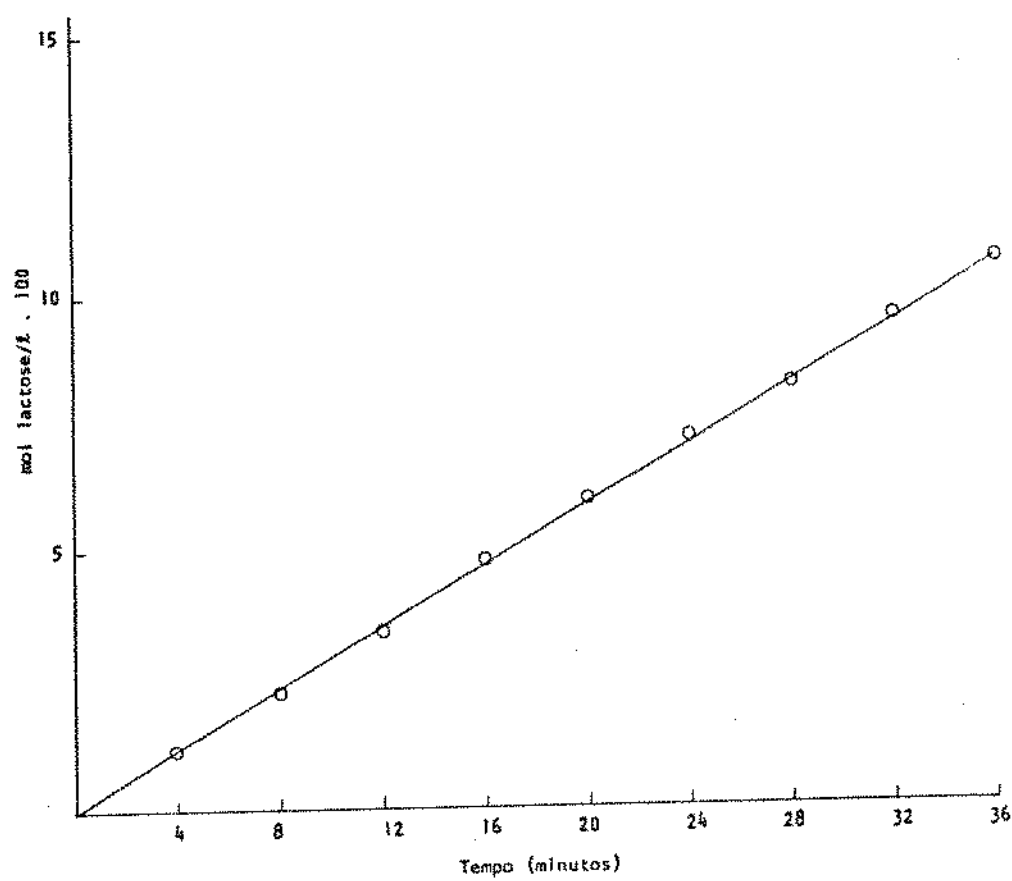


FIGURA 7.27. Extrato enzimático VIII (28 horas de autólise), 5,0% lactose.

$$v_i = 2,93\text{mM lactose}/\text{mín.}$$

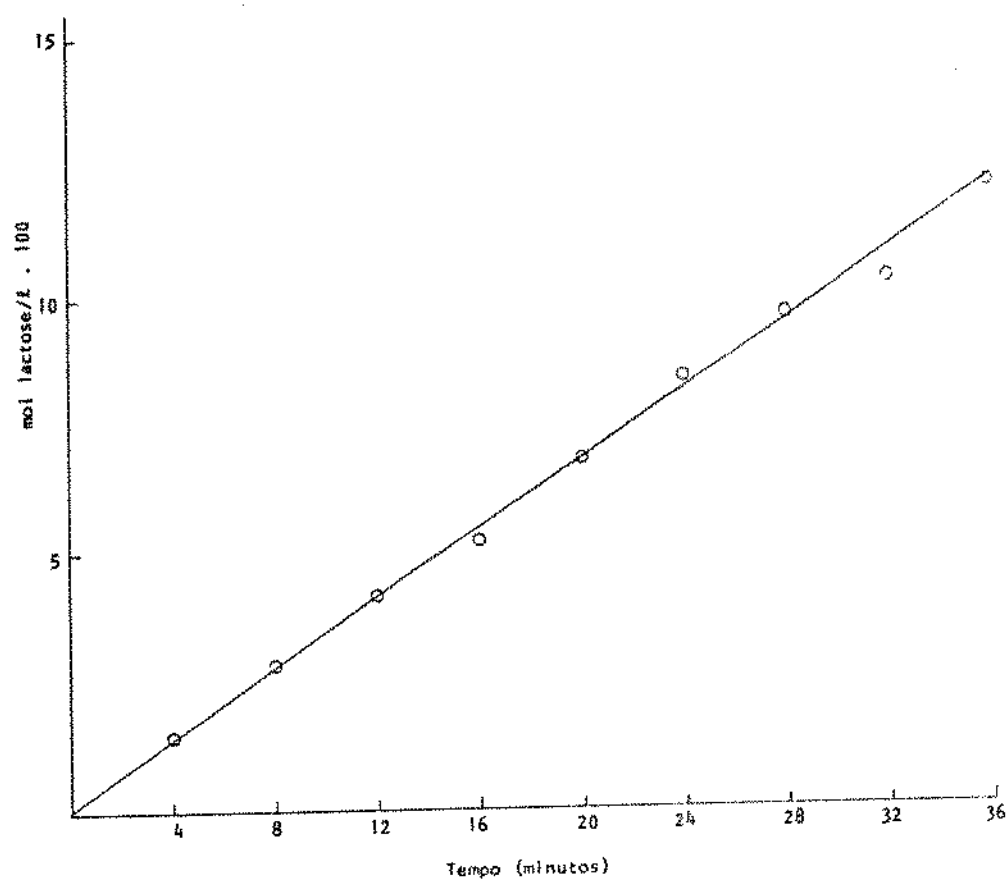


FIGURA 7.28. Extrato enzimático VIII (28 horas de autólise), 7,5% lactose.

$$v_i = 3,36 \text{ mM lactose/min.}$$

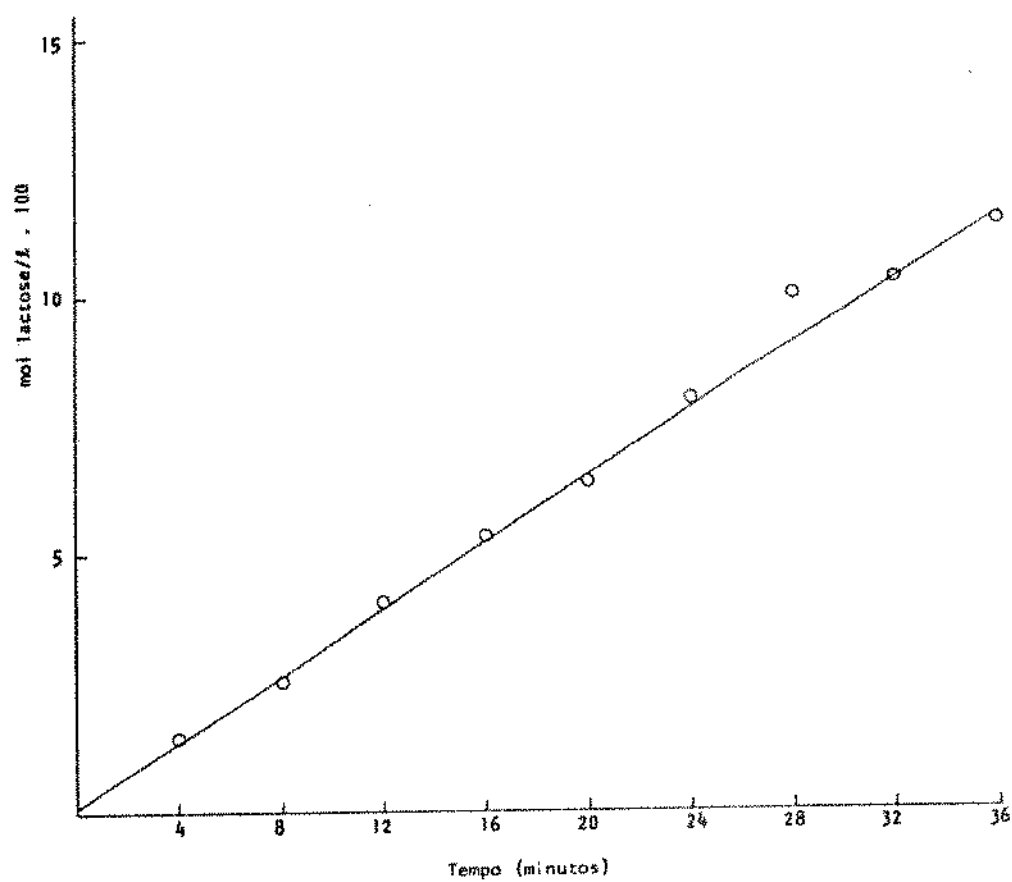


FIGURA 7.29. Extrato enzimático VIII (28 horas de autólise), 10% lactose.

$$v_i = 3,21 \text{ mM lactose/min.}$$

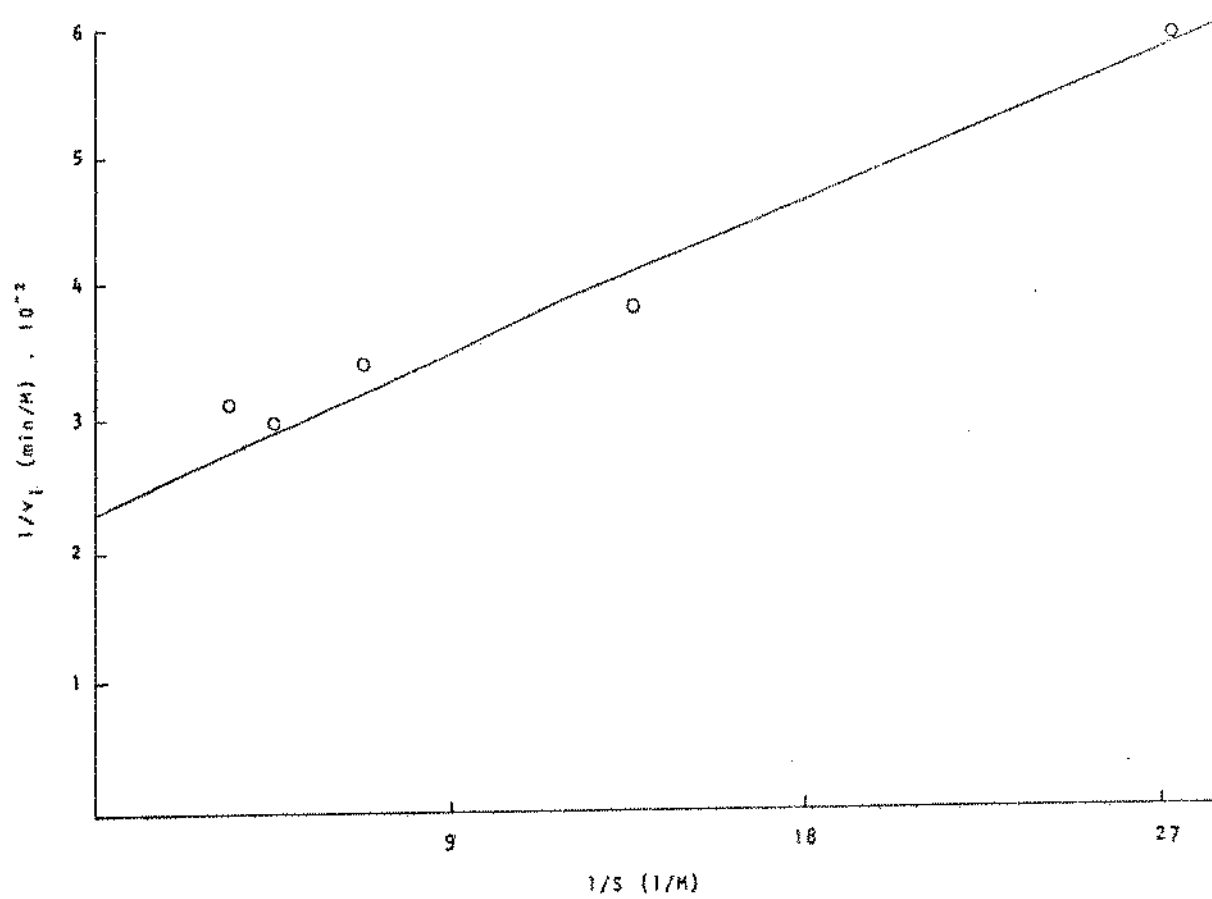


FIGURA 7.30. Extrato enzimático VIII (28 horas de autólise).

$$K_m = 56,20 \text{ mM}$$

$$V_m = 4,35 \text{ mM/min.}$$

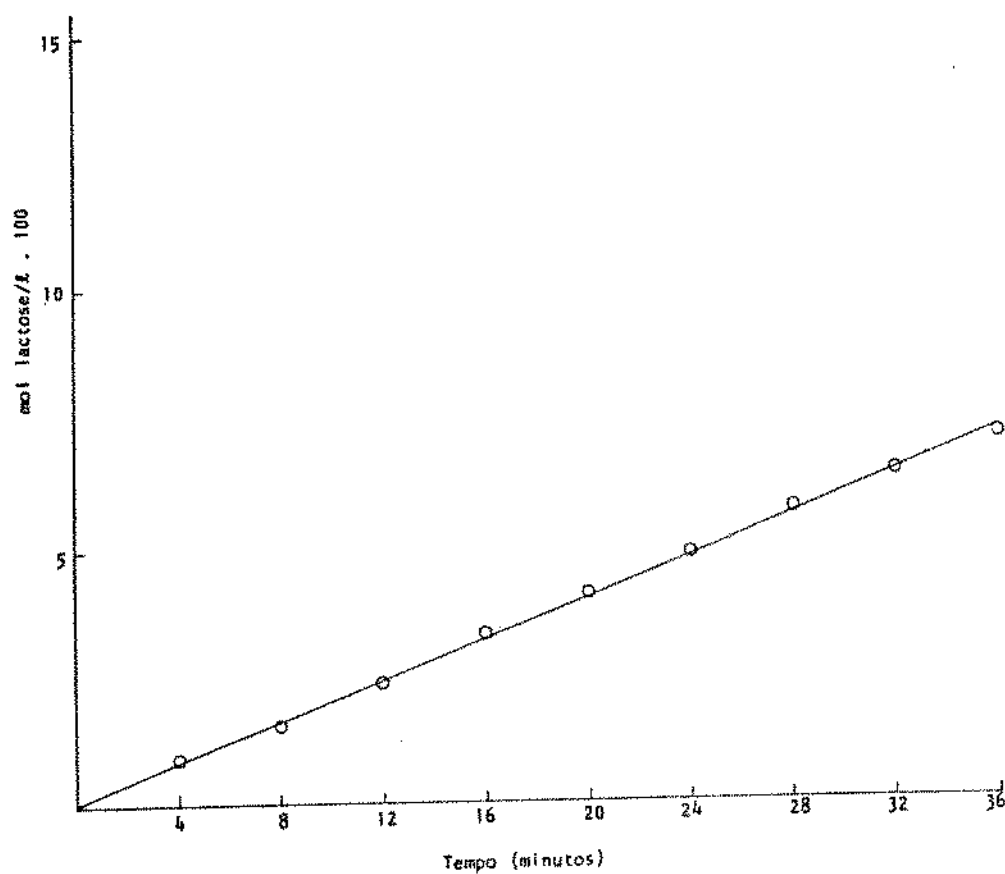


FIGURA 7.31. Extrato enzimático IX (44 horas de autólise), 1,25% lactose.

$$v_i = 1,98\text{mM lactose/min.}$$

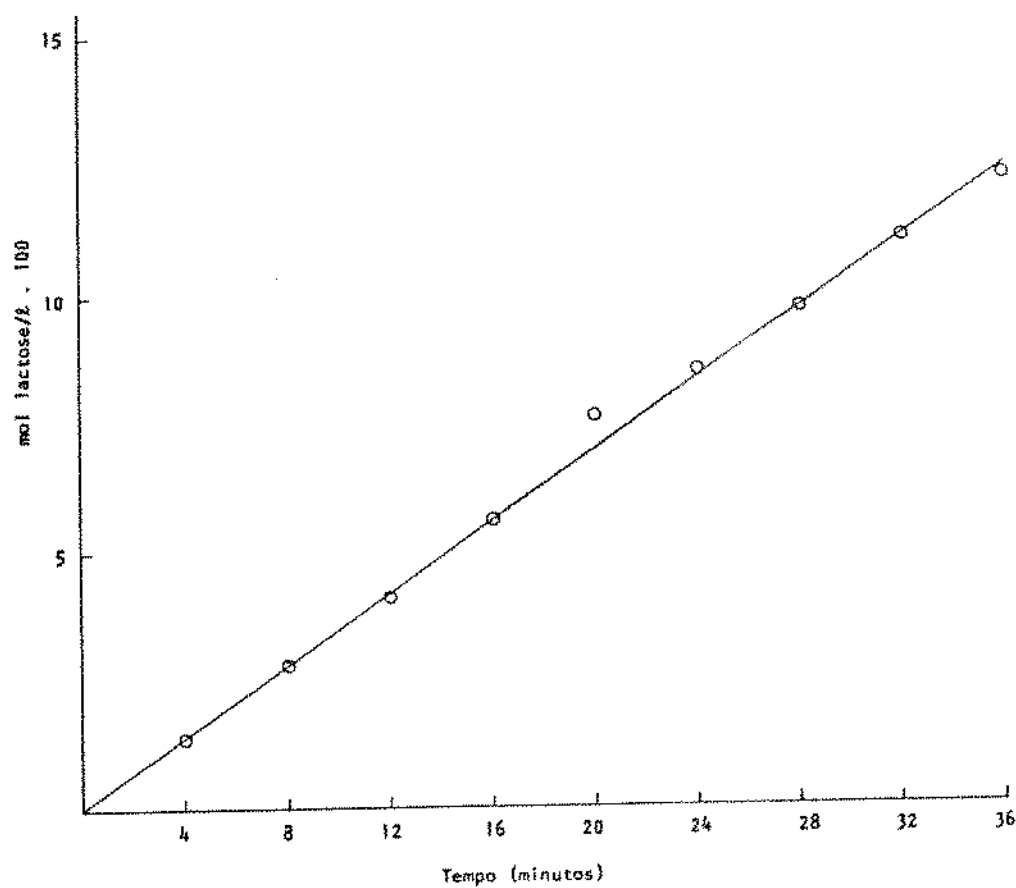


FIGURA 7.32. Extrato enzimático IX (44 horas de autólise), 2,5% lactose.

$$v_i = 3,48 \text{ mM lactose/min.}$$

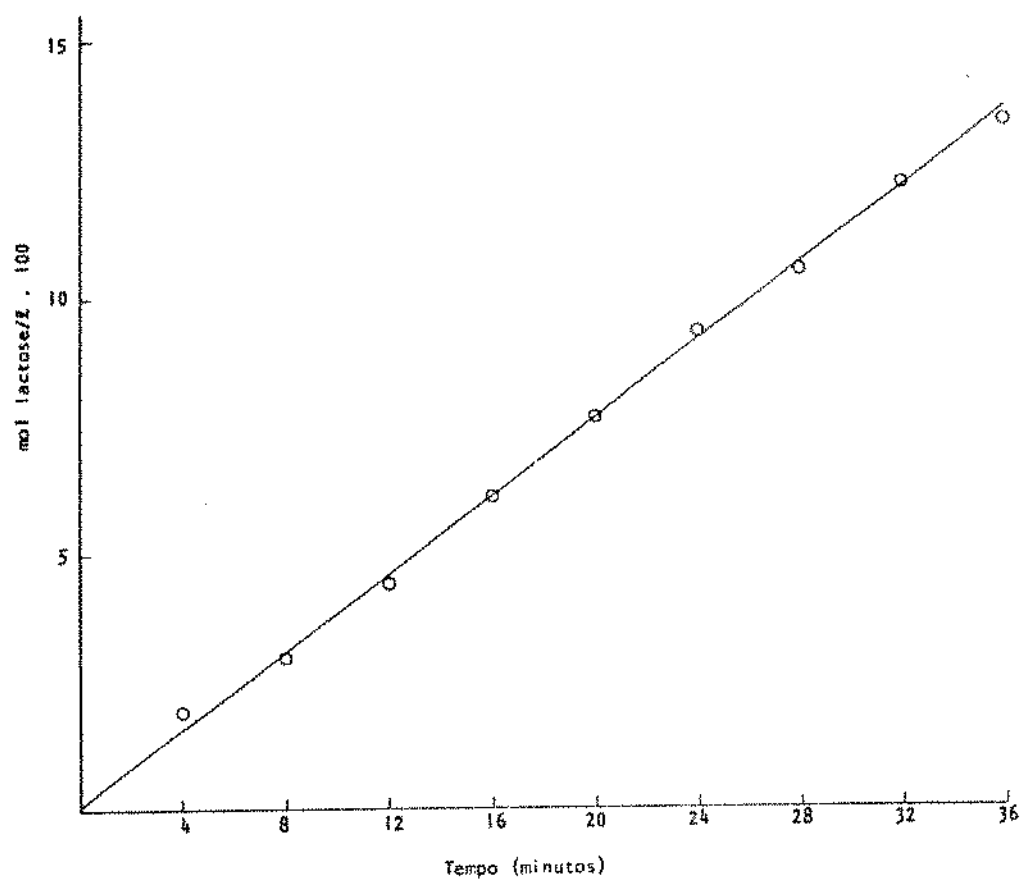


FIGURA 7.33. Extrato enzimático IX (44 horas de autólise), 5% lactose.

$$v_i = 3,76 \text{ mM lactose/min.}$$

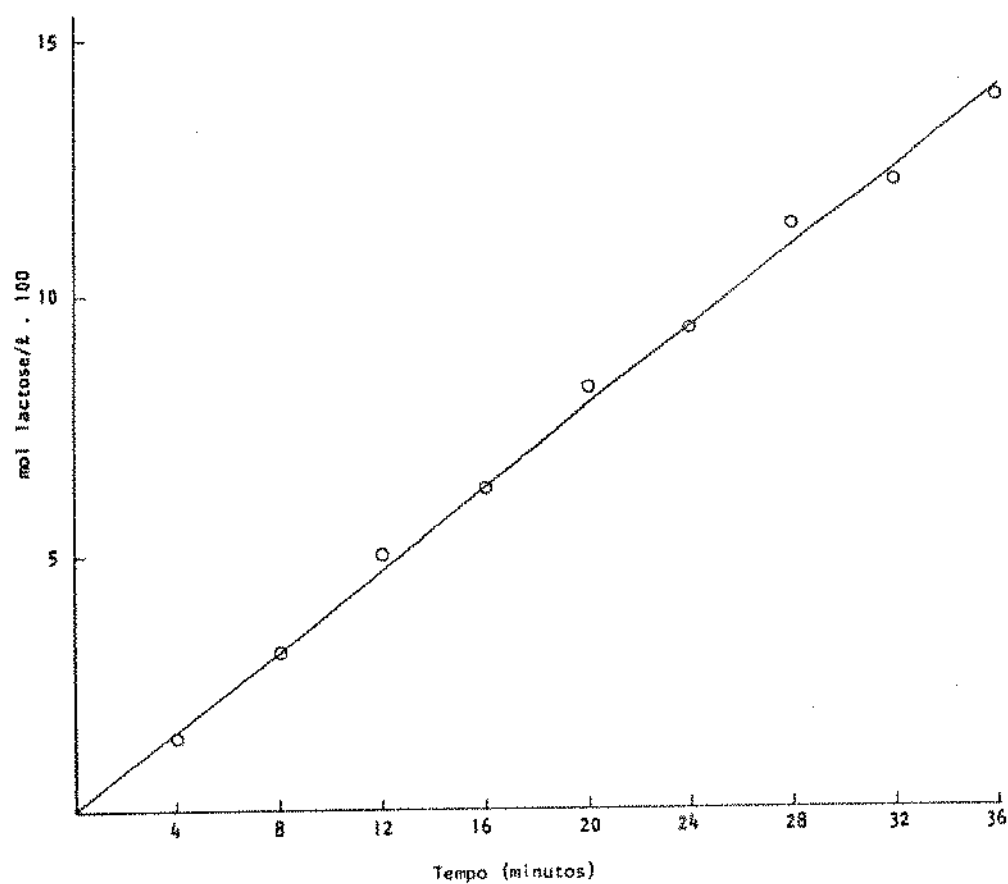


FIGURA 7.34. Extrato enzimático IX (44 horas de autólise), 7,5% lactose.

$$v_i = 3,88 \text{ mM lactose/min.}$$

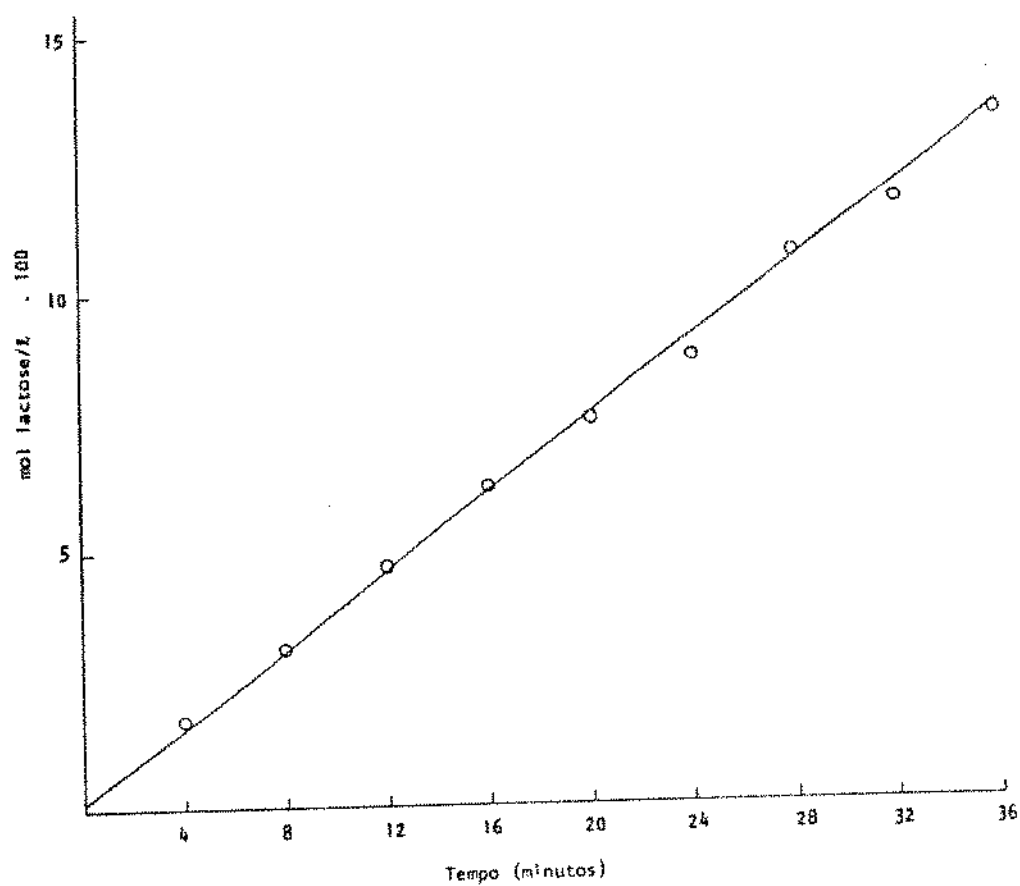


FIGURA 7.35. Extrato enzimático IX (44 horas de autólise), 10% lactose.

$$v_i = 3,71 \text{ mM lactose/min.}$$

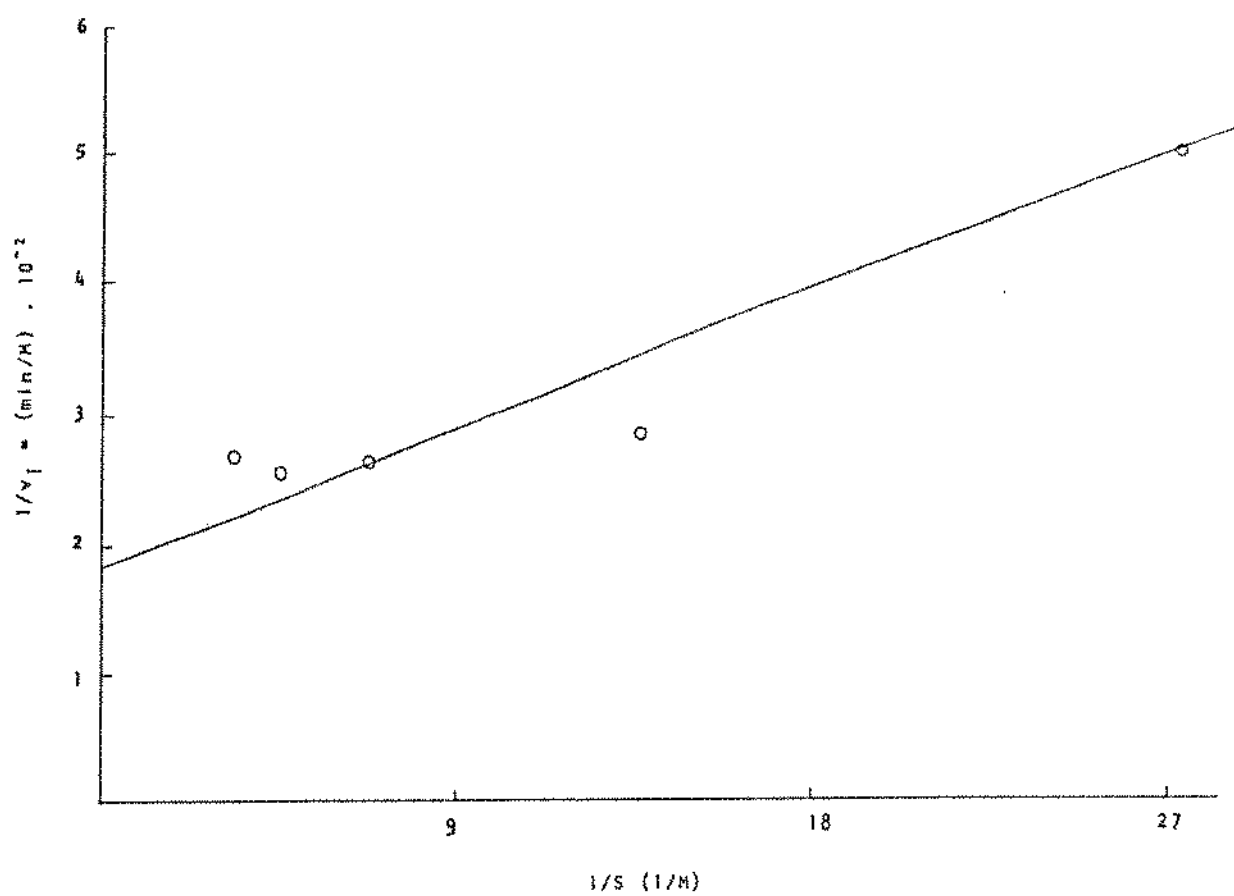


FIGURA 7.36. Extrato enzimático IX (44 horas de autólise).

$$K_m = 64,01 \text{ mM}$$

$$V_m = 5,49 \text{ mM/min.}$$