

WENDEL BATISTA DA SILVEIRA

PRODUÇÃO DE ETANOL EM PERMEADO DE SORO DE QUEIJO POR
Kluyveromyces marxianus UFV-3

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

WENDEL BATISTA DA SILVEIRA

PRODUÇÃO DE ETANOL EM PERMEADO DE SORO DE QUEIJO POR
Kluyveromyces marxianus UFV-3

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2004.

Prof. Frederico José Vieira Passos
(Conselheiro)

Prof. Hilário Cuquetto Mntovani
(Conselheiro)

Dr^a Virgínia Maria Chaves Alves

Prof. Daison Olzany Silva

Prof^a Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

A Deus.
Aos meus pais João e Maria das Graças.
À minha namorada Marcela.
Ao meu irmão Diego.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização do Programa de Mestrado e pelo auxílio financeiro.

Ao Departamento de Microbiologia da UFV, pela oportunidade de desenvolver meu projeto de tese e pelo aproveitamento científico, entre outros.

À minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio, pelo carinho e pela dedicação impescindíveis durante toda a minha vida.

À minha amada Marcela, pelo carinho, pelo companheirismo e pela felicidade que trouxe à minha vida.

À Professora Flávia Maria Lopes Passos, pelos ensinamentos de Fisiologia, pelos incentivos, pelas oportunidades oferecidas desde a graduação – que tanto contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal – e pela amizade.

Aos Professores Hilário Cuquetto Mantavani e Frederico José Vieira Passos, pelos conselhos, pelos ensinamentos e pelas sugestões, de grande importância para a execução deste trabalho.

Ao Professor Daison Olzany Silva e à Doutora Virgínia, pela participação na banca examinadora de defesa desta tese e pelas valiosas sugestões.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos Adriana, Agenor, Alex, Cláudia, Fábio, Gisela, Lígia, Mateus, Rafael, Valdilene e tantos outros, aqui não citados, pela amizade e pelo auxílio.

Aos meus amigos Leonardo (Laboratório de Microbiologia Industrial), Jorge e Juliana (Laboratório de Genética de Microrganismos), pela amizade e pelo companheirismo.

A todos os meus amigos dos Laboratórios de Microbiologia Industrial, Genética de Microrganismos, Microbiologia de Anaeróbios, Microbiologia de Alimentos, Microbiologia Ambiental e Associações Micorrízicas, pela agradável convivência.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pela disponibilidade, pelo apoio, pela amizade e pelos serviços prestados.

A todas às pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se realizasse.

BIOGRAFIA

WENDEL BATISTA DA SILVEIRA, filho de João Batista da Silveira e Maria das Graças Raimundo da Silveira, nasceu em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, no dia 21 de setembro de 1979.

Em março de 1998, ingressou-se no curso de Tecnologia de Laticínios da Universidade Federal de Viçosa, bacharelando-se em Tecnologia de Laticínios em maio de 2002.

Em setembro de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 16 de fevereiro de 2004.

CONTEÚDO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | xi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 10 |
| 3.1. Microrganismo..... | 10 |
| 3.2 . Manutenção da cultura..... | 10 |
| 3.3. Inóculo..... | 11 |
| 3.4. Meio de fermentação | 11 |
| 3.5. Regime de fermentação..... | 12 |
| 3.5.1. Batelada | 12 |
| 3.5.1.1 Aerobiose | 13 |
| 3.5.1.2. Microaerobiose..... | 13 |
| 3.5.1.3. Anaerobiose | 13 |
| 3.6. Determinação da relação entre massa celular seca e densidade óptica a 600 nm (D.O. 600 nm)..... | 14 |
| 3.7. Medida de crescimento | 14 |
| 3.8. Determinação da velocidade específica de crescimento e estimação das constantes cinéticas | 14 |

| | Página |
|---|--------|
| 3.9. Determinação do consumo de substrato e da produção de metabólitos..... | 15 |
| 3.10. Determinação dos parâmetros de crescimento e fermentativos e da velocidade de consumo e de produção de etanol | 15 |
| 4. RESULTADOS | 17 |
| 4.1. Cinética de crescimento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 em função da concentração de substrato nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, sob as condições aeróbica e microaeróbica..... | 17 |
| 4.2. Consumo de lactose e produção de etanol e glicerol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, sob as condições aeróbica e microaeróbica..... | 20 |
| 4.3. Parâmetros fermentativos da produção de etanol de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose sob as condições aeróbica e microaeróbica..... | 24 |
| 4.4. Cinética de crescimento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 em função da concentração de substrato nas fermentações realizadas em permeado de soro de queijo sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica | 26 |
| 4.5. Efeito da concentração de etanol no crescimento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado de soro de queijo, sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica..... | 31 |
| 4.6. Produção de etanol, glicerol e ácidos orgânicos por <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado de soro de queijo sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica..... | 32 |
| 4.7. Parâmetros fermentativos da produção de etanol de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado de soro de queijo, nas condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica..... | 34 |

| | Página |
|--|--------|
| 4.8. Efeito da concentração de substrato e do nível de oxigênio nas velocidades de consumo de lactose e de produção de etanol de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado de soro de de queijo, sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica..... | 39 |
| 5. DISCUSSÃO | 41 |
| 6. RESUMO E CONCLUSÕES | 47 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 50 |
| APÊNDICE | 54 |
| APÊNDICE A | 55 |

RESUMO

SILVEIRA, Wendel Batista, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Produção de etanol em permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3**. Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Conselheiros: Frederico José Vieira Passos e Hilário Cuquetto Mantovani.

Com o objetivo de estabelecer a condição fisiológica para a conversão máxima da lactose do permeado de soro de queijo em etanol, avaliaram-se os efeitos da concentração de substrato e do nível de oxigênio no direcionamento do fluxo metabólico para a via fermentativa da levedura *K. marxianus* UFV-3. Inicialmente, as fermentações foram conduzidas em meio YNB sintético com altas concentrações de lactose, em condições aeróbica e microaeróbica (injeção de nitrogênio gasoso por 12 minutos), em regime de batelada. Nas fermentações sob microaerobiose, os rendimentos máximos de etanol por substrato foram próximos a 85% do rendimento teórico, ou seja, superiores aos obtidos em aerobiose, por volta de 55% desse rendimento. O rendimento de etanol máximo por massa celular também foi maior em microaerobiose, sendo a produtividade volumétrica maior em microaerobiose apenas na fermentação, cuja concentração inicial de lactose foi de 67,0 g L⁻¹. As fermentações realizadas em permeado de soro de queijo com 10 diferentes concentrações de lactose, que variaram de 1,0 g L⁻¹ a 240,0 g L⁻¹, em regime de batelada, sob

condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica (injeção de nitrogênio gasoso por todo o tempo de fermentação), apresentaram rendimento máximo de etanol por substrato e por massa celular, bem como de produtividade máxima volumétrica, superior àqueles obtidos em YNB. Além disso, *K. marxianus* UFV-3 exibiu maiores velocidades específicas de crescimento, maior produção de massa celular e maior produção de glicerol nas fermentações em permeado que naquelas em YNB. Os parâmetros fermentativos da produção de etanol em permeado foram maiores em microaerobiose e anaerobiose do que em aerobiose. As fermentações em permeado – cujas concentrações iniciais de lactose foram acima de 50 g L⁻¹ – e o nível de oxigênio reduzido (microaerobiose e anaerobiose) apresentaram altos rendimentos máximos de etanol por substrato, correspondendo a quase 100% do teórico. A velocidade de consumo de lactose e de produção de etanol aumentou à medida que a concentração inicial de substrato também aumentou e o nível de oxigênio diminuiu. A tolerância do produto (etanol) foi verificada no permeado acrescido de etanol, em concentrações que variaram de 5 a 80 g L⁻¹. Em 50 g L⁻¹, *K. marxianus* UFV-3 manteve um crescimento próximo a 80% em relação ao controle em condição anaeróbica e perto de 60% sob condições microaeróbica e aeróbica.

ABSTRACT

SILVEIRA, Wendel Batista, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2004. **Ethanol production in permeated of cheese whey by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Committee Members: Frederico José Vieira Passos and Hilário Cuquetto Mantovani.

To establish the physiological condition for maximum conversion of lactose from permeated of cheese whey in ethanol, the effects of substrate concentration and level of oxygen in the directioning of the metabolic flow for the fermentative pathway of the yeast *K. marxianus* UFV-3 were evaluated. Initially, fermentation was carried out in synthetic YNB medium with high lactose concentrations, in aerobic and microaerobic conditions (injection of nitrogen gas for 12 minutes), in batch culture. For fermentation under microaerobiosis, the maximum ethanol yield per substrate was close to 85% of the theoretical yield, in other words, superior to the obtained in aerobiosis, about 55% of that yield. The maximum ethanol yield per cellular mass was also higher in microaerobiosis, being the volumetric yield higher in microaerobiosis only in fermentation, with initial lactose concentration of 67,0 g L⁻¹. The fermentation performed in permeated of cheese whey with 10 different lactose concentrations which that varied from 1,0 g L⁻¹ to 240,0 g L⁻¹, in batch regime, under aerobic, microaerobic and anaerobic conditions, (injection of nitrogen gas

for the entire fermentation) presented maximum ethanol yield per substrate and per cellular mass, as well as maximum volumetric yield, higher than those obtained in YNB. Besides, *K. marxianus* UFV-3 gave greater specific growth rates, greater cellular mass production and greater glycerol production in fermentation in permeated than in YNB. The fermentative parameters of ethanol production in permeated were greater in microaerobiosis and anaerobiosis than in aerobiosis. The fermentation in permeated – with initial lactose concentrations above 50 g L⁻¹ – and reduced oxygen level (microaerobiosis and anaerobiosis) gave high ethanol maximum yield per substrate, corresponding to almost 100% of the theoretical value. The lactose consumption rate and ethanol production rate increased with the increase in the initial substrate concentration and the oxygen level decreased. The tolerance of the product (ethanol) was verified in permeated added to ethanol, in concentrations ranging from 5 to 80 g L⁻¹. In 50 gL⁻¹, *K. marxianus* UFV-3 maintained a growth close to 80% in relation to the control in anaerobic conditions and close to 60% under microaerobic and aerobic conditions.

1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo é o subproduto da indústria de laticínios resultante da precipitação e remoção da caseína do leite durante a produção de queijos. A produção mundial de soro vem aumentando, nos últimos anos, com o impulso da indústria de laticínios, atingindo 100 bilhões de litros. No Brasil, em 1998 a produção foi de 3,6 bilhões de litros. Destacam-se na produção mundial os Estados Unidos, que produziram 31 bilhões de litros em 1999. Nos últimos anos, a legislação que trata da qualidade do efluente da indústria de laticínios tornou-se mais rigorosa com relação ao destino do soro de queijo, na tentativa de preservar o meio ambiente, porém 50% do soro de queijo produzido no Brasil ainda é descartado na natureza como resíduo inútil. Simplesmente tratar o soro de queijo é muito oneroso para a indústria, pois, mais que tratá-lo, é procurar uma tecnologia eficiente, mais atrativa economicamente e que agregue valor comercial a esse subproduto.

A primeira operação recomendável no processamento desse soro é a ultrafiltração, que resulta num produto concentrado de proteínas, nutricionalmente rico e num permeado que ainda confere altas Demandas Bioquímica e Química de Oxigênio (DBO e DQO), por conter a lactose originalmente presente no soro de queijo. O aproveitamento do permeado pela fermentação de leveduras para a produção de etanol vem sendo considerado há décadas e, nos últimos anos, ganhou grande impulso devido ao aumento da demanda de álcool combustível. Algumas destilarias produtoras de álcool, a

partir do soro de queijo, estão em operação comercial na Irlanda, nos Estados Unidos e, principalmente, na Nova Zelândia, onde um quinto do soro de queijo é utilizado para produzir o etanol. Porém, devido ao caráter diluído da lactose no permeado desse soro, a produção do etanol é considerada inviável. A concentração do permeado pode ser uma solução para reduzir os custos e aumentar a produção de etanol, bem como eliminar parte da água presente no soro, diminuindo os gastos energéticos na destilação.

O potencial fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* não pode ser explorado na fermentação do permeado de soro de queijo, porque essa levedura não possui a via de assimilação de lactose, sendo incapaz de converter lactose em etanol. Leveduras do gênero *Kluyveromyces*, embora apresentem um metabolismo respirofermentativo, são capazes de assimilar lactose como fonte de carbono e energia, sendo empregadas nos processos industriais de fermentação do soro de queijo. O metabolismo de leveduras é caracterizado como oxidativo (respiratório), quando todo o açúcar é oxidado a CO₂. Caso o açúcar seja parcialmente oxidado a piruvato e este reduzido a etanol, o metabolismo é oxidorreduutivo (fermentação). É possível haver um balanço entre esses dois metabolismos caracterizando o respirofermentativo. Em *S. cerevisiae*, a concentração do açúcar é determinante no fluxo oxidorreduutivo. Em leveduras respirofermentativas, a concentração de açúcar parece não ser mais importante que o nível de oxigênio em favorecer o fluxo da via oxidorreduativa. Leveduras do gênero *Kluyveromyces*, além da assimilação de lactose, diferenciam-se de *S. cerevisiae* também na regulação do metabolismo de açúcar, em especial na sensibilidade à repressão por glicose. *S. cerevisiae* apresenta repressão por glicose em genes do metabolismo respiratório em altas concentrações de glicose, enquanto em *K. lactis* a repressão por glicose é menos pronunciada e dependente da linhagem. As diferenças apresentadas pelas linhagens de *K. lactis* à repressão por glicose possivelmente refletem a capacidade de transporte desse açúcar.

Esse projeto propõe avaliar as condições fisiológicas que favorecem o metabolismo oxidorreduutivo em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, visando à conversão máxima da lactose do permeado do soro de queijo em etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O soro de queijo é a porção aquosa do leite que se separa do coágulo ou caseína, durante a produção de queijos (KOSIKOWSKI, 1979). Nos últimos anos foi observado, em todo o mundo, um crescente aumento da produção de soro de queijo devido ao impulso da indústria de laticínios (DALLAS e LAGRANGE, 1998). A produção mundial de soro gira em torno de 100 bilhões de litros (FILHO, 2002), e no ano de 1998 atingiu 3,6 bilhões de litros no Brasil (ANUÁRIO MILKBIZZ, 1999). Destacam-se na produção mundial os Estados Unidos, com a produção de 31 bilhões de litros no ano de 1999 (ANUÁRIO MILKBIZZ, 1999). O soro de queijo representa aproximadamente 85-95% do volume do leite e retém 55% dos nutrientes do leite entre os quais se destacam lactose (4,5-5% p/v), proteínas solúveis (0,6-0,8% p/v), lipídios (0,4-0,5% p/v) e sais minerais (8-10% de extrato seco), além de outros nutrientes presentes em menores concentrações como as vitaminas, principalmente as do grupo B (SISO, 1996).

O soro de queijo é, na maioria das vezes, descartado em mananciais como um resíduo inútil ou utilizado na alimentação de animais em fazendas (KOURKOUTAS et al., 2002). Quando é descartado sem tratamento prévio, esse resíduo causa graves problemas ambientais em razão, principalmente, da lactose, o fator responsável pelas altas Demandas Bioquímica e Química de Oxigênio (MAWSON, 1994). Quando empregado na alimentação animal, a lactose é dificilmente metabolizada, e por isso outros carboidratos são

preferidos, a menos que o custo do soro seja bem reduzido (BARBA et al., 2000). A solução para esse problema ambiental é de caráter urgente, devido ao aumento dos volumes de soro produzido e dos requerimentos da legislação da última década com respeito à qualidade do efluente (SIEKIEWICZ e RIEDEL, 1990, citados por SISO, 1996). Essa realidade enfrentada pela indústria de laticínios está revendo a idéia de que o soro de queijo seja um resíduo inútil e de que simplesmente tratá-lo seja muito oneroso para a indústria (TIN e MAWSON, 1993). Além de simplesmente tratar o soro de queijo como um subproduto, uma tecnologia eficiente e mais atrativa economicamente deve agregar valor comercial a esse subproduto (BARBA et al., 2000). Nos últimos 50 anos, algumas alternativas para o aproveitamento do soro de queijo foram desenvolvidas, porém metade do soro produzido no mundo é descartada como efluente sem tratamento. Das alternativas de aproveitamento do soro de queijo, podem-se destacar a recuperação de suas proteínas e a produção de ácidos orgânicos a partir da lactose do permeado, que apresentam aplicações na indústria de alimentos, além da produção de biogás, extração da lactose e obtenção de seus derivados e produção de glicerol, entre outros (SISO, 1996).

A recuperação das proteínas do soro é a etapa inicial da maioria dos procedimentos adotados para seu aproveitamento. O menor custo, a alta velocidade, a ausência de desnaturação das proteínas e a obtenção de um concentrado de proteínas livres de sais fazem do processo de ultrafiltração o método mais empregado na recuperação das proteínas do soro (KOSIKOWSKI, 1979). A ultrafiltração consiste na extração e concentração das proteínas do soro na forma hidrossolúvel, por meio de bombeamento do soro sob alta pressão, através de membranas, cujos poros permitem a passagem de moléculas menores, como água, lactose e sais que constituem o permeado e impedem a passagem das proteínas (ZEIKUS, 1986). As proteínas do soro possuem aminoácidos essenciais facilmente digeríveis e considerados altamente completos, tanto fisiológica quanto nutricionalmente. Além de apresentarem características funcionais excelentes, as proteínas do soro possuem, do ponto de vista nutricional, uma das mais altas razões de eficiência de proteínas conhecidas de 3,3, superando a da caseína do leite, que é de 2,5 (FORSUM, 1974). Essas características fazem das proteínas do soro uma fonte muito atrativa para a produção de suplemento alimentar (SISO, 1996). A recuperação das proteínas do soro não resolve o problema ambiental deste,

porque o permeado gerado na ultrafiltração contém toda a lactose originalmente presente no soro de queijo (VIENNE e STOCKAR, 1985). O aproveitamento do permeado pela fermentação de leveduras para a produção de etanol vem sendo considerado há décadas. Portanto, a conversão da lactose do permeado em etanol é a operação subsequente à ultrafiltração (JANSSENS et al., 1983, citados VIENNE e STOCKAR, 1985). Esse processo já vem sendo praticado em alguns países (RAPIN et al., 1994). Algumas destilarias produtoras de álcool, a partir de soro de queijo, estão em operação comercial na Irlanda, nos Estados Unidos e, principalmente, na Nova Zelândia, onde um quinto do soro de queijo é utilizado para produzir o etanol (MAWSON, 1994). Devido ao caráter diluído da lactose do soro de queijo (4,5 a 5% p/v), a produção de álcool a partir deste é economicamente inviável (TIN e MAWSON, 1993). Entretanto, uma promissora solução é a concentração do soro de queijo que reduz os custos de produção, por aumentar a produção de etanol e eliminar parte da água presente no soro, diminuindo os gastos energéticos empregados no processo de destilação (MAWSON, 1994). As projeções para a produção de álcool no mundo são crescentes, destacando-se os Estados Unidos. No ano de 2001, a produção de álcool nesse país foi de 6,7 bilhões de litros, e a projeção para 2010 é de 19 bilhões de litros (PULITI, 2002).

O metabolismo oxidorreduutivo do carboidrato por leveduras, que resulta na formação de etanol, depende do destino do piruvato, o intermediário glicolítico parcialmente oxidado proveniente da glicose. A oxidação completa do piruvato a CO_2 pelo ciclo do ácido tricarboxílico constitui o metabolismo oxidativo ou respiratório. Caso o piruvato seja reduzido a etanol e outros compostos, o metabolismo é oxidorreduutivo ou fermentativo. É possível haver um balanço entre essas vias, e ambas coexistirem, caracterizando o metabolismo respirofermentativo (SISO et al., 2000). Na avaliação das vias metabólicas adotadas por leveduras, a análise deve ser global, pois o metabolismo de oxidorredução, por exemplo, é estreitamente conectado a reações periféricas e centrais do metabolismo de carbono e de nitrogênio (BAKKER et al., 2001). A formação de NADH, em que os elétrons são captados das reações oxidativas do metabolismo, ocorre na glicólise e no ciclo do ácido tricarboxílico, que apresentam funções nas vias de obtenção de energia do açúcar, como na geração de precursores para reações biossintéticas (BAKKER

et al., 2001). O poder redutor, NADH, também é gerado nas reações de biossíntese de aminoácidos (ALBERS et al., 1996). Durante o crescimento via metabolismo respiratório, o NADH produzido nas reações anabólicas e catabólicas pode ser reoxidado por respiração mitocondrial. Em condições anaeróbicas, a reoxidação do NADH pela redução do piruvato a etanol (fermentação alcoólica) pode ser insuficiente para reoxidar o NADH produzido em reações biossintéticas, pois aquela via é um processo de oxidorredução neutro, ou seja, reoxida apenas o NADH produzido na via glicolítica. Leveduras contornam essa insuficiência pela reoxidação de NADH na reação catalisada por glicerol-3-fosfato desidrogenase, reduzindo o intermediário glicolítico diidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato. O glicerol-3-fosfato é depois convertido em glicerol pela hidrólise do grupo fosfato na reação catalisada pela glicerol-3-fosfatase (BAKKER et al., 2001). Em condições osmóticas normais, a formação de glicerol é importante na manutenção do balanço intracelular de oxidorredução na ausência de oxigênio (VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986, citados por NEVOIGT e STHAL, 1997), na reciclagem de fosfato inorgânico utilizado na glicólise (THEVELEIN e HOHMANN, 1995, citados por NEVOIGT e STHAL, 1997). Em condições de alta osmolaridade, o glicerol é o principal soluto compatível formado na fase exponencial de crescimento de *S. cerevisiae* (REED et al., 1987, citados por NEVOIGT e STHAL, 1997), e um número crescente de evidências indica que a concentração intracelular de glicerol é ajustada pela atividade de água do meio (BLONEMBRG e ADLER, 1992, citados por NEVOIGT e STHAL, 1997).

Desde os primeiros estudos da bioquímica e fisiologia celular, diferenças marcantes na regulação do metabolismo de açúcar por leveduras despertaram grande interesse. O efeito Pasteur, efeito Crabtree (BREUNIG et al., 2000) e efeito Kluver (FUKUHARA, 2003) têm sido descritos como resultados da regulação do metabolismo de açúcar por leveduras. O efeito Pasteur é a repressão da fermentação por aerobiose, o que prevalece, por exemplo, em condições limitantes de glicose em *S. cerevisiae*, já o efeito Crabtree prescreve a fermentação em condições totalmente aeróbicas, em altas concentrações de açúcar (BREUNIG et al., 2000). O efeito Crabtree vem sendo discriminado como "long term" e "short term". O "long term" é definido como a ocorrência de fermentação alcoólica aeróbica em condições de altas velocidades de crescimento tanto em regime de batelada quanto em condições limitantes de

açúcar em batelada alimentada e cultura contínua (PETRIK et al., 1983; RIEGER et al., 1983; van URK et al., 1990, citados por KIERS et al., 1998). O "short term" é definido como a imediata produção de etanol em condições aeróbicas em resposta ao excesso de glicose (RIEGER et al., 1983; van URK et al., 1990, citados por KIERS et al., 1998). O efeito Kluver tem sido definido como a ausência de crescimento e fermentação em certos açúcares na ausência de respiração, independentemente da presença de oxigênio. O efeito Kluver ocorre em muitas leveduras na assimilação de açúcares como galactose, maltose, rafinose, lactose, sacarose e celobiose, porém na glicose o efeito Kluver não é geralmente observado (FUKUHARA et al., 2003).

S. cerevisiae, a levedura que se estabeleceu em processos fermentativos industriais (PREEZ e SCHEFFERS, 2003), devido ao seu alto poder fermentativo, é uma levedura Crabtree positiva e Kluver negativa na maioria dos açúcares (FUKUHARA, 2003). Porém seu potencial fermentativo não pode ser aproveitado na conversão de lactose a etanol por não apresentar um transportador para a lactose e a enzima β -galactosidase, responsável pela hidrólise deste dissacarídeo (RUSSEL, 1986). A natural inabilidade de *S. cerevisiae* utilizar lactose como fonte de carbono tem sido contornada pela construção de linhagens recombinantes *lac*+. Sreeekrishna e Dickson (1985), citados por Rubio Teixeira (1998), transformaram *S. cerevisiae* com os genes *lac4* e *lac12* de *Kluyveromyces lactis*. A linhagem resultante, porém, apresentou pequeno crescimento em lactose e foi geneticamente instável. Kumar et al. (1992) construíram uma linhagem *lac*+ pela transformação com o gene *lacA* de *Aspergillus niger*, que codifica uma β -galactosidase secretável. Entretanto, a linhagem, além de apresentar crescimento diáuxico, foi geneticamente instável. Rubio Teixeira (1998) construiu uma linhagem *lac*+ de *S. cerevisiae* capaz de crescer eficientemente em lactose, porém o crescimento foi predominantemente associado ao metabolismo respiratório.

Uma opção promissora seria a utilização de leveduras do gênero *Kluyveromyces*, ocupantes do ambiente de laticínios, que assimilam lactose e apresentam grande potencial para produzir álcool a partir do soro de queijo (O'LEARY et al., 1977; MOULIN e GALZIN, 1981, citados por KURTZMAM et al., 1998). A levedura *Kluyveromyces marxianus* vem sendo a mais utilizada em nível industrial até o momento (MAWSON, 1994). Outra levedura do gênero *Kluyveromyces*, a levedura *Kluyveromyces lactis*, vem chamando a atenção por

apresentar aplicações industriais, sobretudo pelos estudos de respiração mitocondrial, em comparação com os de *S. cerevisiae* (BREUNIG et al., 2000).

Uma das maiores diferenças entre *K. lactis* e *S. cerevisiae*, além da assimilação de lactose, é a regulação do metabolismo por glicose com respeito à repressão da respiração por glicose, isto é, em *S. cerevisiae* o metabolismo oxidativo é completamente reprimido por glicose. Já em *K. lactis* alta concentração de glicose resulta em uma repressão bem menor da via oxidativa, em comparação com *S. cerevisiae* (KIERS et al., 1998; BREUNIG et al., 2000 (SISO et al., 2000)). A repressão do metabolismo oxidativo por glicose em leveduras é mediada, principalmente, pela proteína Mig1. Acredita-se que, quando a razão ATP/AMP é alta, a proteína quinase Snf1, ativadora da proteína Mig1, não exerce sua atividade. Sem a atividade da proteína Snf1, a Mig1 fica em um estado subfosforilado, dirigindo-se para o núcleo, onde se liga a região promotora de genes respiratórios, bem como de genes que expressam proteínas ativadoras da transcrição de genes respiratórios. A proteína Mig1 reprime esses genes por recrutar fatores gerais de repressão Ssn6 e Tup1 (ROLLAND et al., 2001).

S. cerevisiae apresentou alta capacidade de transporte para glicose, devido ao grande número de transportadores para esse açúcar. Dos 18 genes transportadores de hexoses nesta levedura, 17 são capazes de transportar glicose. Esse número de transportadores é bem maior que os dois transportadores, um de alta afinidade e o outro de baixa afinidade, encontrados na linhagem de *K. lactis* CBS 2359, que está sendo seqüenciada em laboratórios franceses (BREUNIG et al., 2000). A alta capacidade de transporte em *S. cerevisiae* gera alto fluxo glicolítico, conseqüentemente uma alta razão ATP/AMP, que conduz à repressão de genes respiratórios, favorecendo, assim, o metabolismo oxidorreduutivo. Já em *K. lactis*, além da concentração do açúcar, a atividade de transporte e o fluxo glicolítico parecem ser acoplados ao suprimento de oxigênio (MILKOWSKI et al., 2001). Em *K. lactis*, repressão por glicose é bem menos pronunciada e dependente da linhagem em razão, basicamente, das diferenças nas atividades de transporte (BREUNIG et al., 2000). A linhagem de *K. lactis* JA6, que é mais adaptada ao metabolismo respirofermentativo, apresenta transportadores diferentes dos de outras linhagens, que não apresentam repressão por glicose (BREUNIG et al., 2000).

Informações contraditórias a respeito do metabolismo oxidorreduutivo, oxidativo e respirofermentativo de *K. lactis* e outras leveduras em glicose e outros açúcares podem ser subtraídas da literatura. Vários autores descreveram *K. lactis* como uma levedura Crabtree negativa, porém Siso et al. (1996) obtiveram evidências da capacidade fermentativa de *K. lactis* pelo cultivo em regime de batelada em condições aeróbicas. Foi constatado que *K. lactis* e *S. cerevisiae* apresentam capacidades fermentativas muito similares nessas condições de oxigênio limitante. Esses resultados levaram aqueles autores a proporem que *K. lactis* não pode ser caracterizada como Crabtree positiva nem como Crabtree negativa, ocupando uma posição intermediária. Segundo Kiers et al. (1998), as baixas concentrações de etanol em fermentadores bem aerados e o acúmulo considerável de etanol em cultivos em regime de batelada como os descrito por Siso et al. (1996), indicam que a limitação de oxigênio no último caso foi o principal fator do aumento na concentração de etanol. Além disso, esses autores observaram que a baixa concentração de etanol encontrada em condições totalmente aeróbicas evidencia o comportamento Crabtree negativo de *K. lactis*. Em relação ao efeito Kluver, que é um fenômeno específico para cada açúcar, os resultados suportam a hipótese de que em *K. lactis* a atividade de transporte do açúcar tem papel muito importante em definir o efeito Kluver como positivo ou negativo (FUKUHARA, 2003). Porém, outros fatores podem influenciar o efeito Kluver, como o desbalanço de oxidorredução na ausência de respiração em espécies altamente aeróbicas (FUKUHARA, 2003), a influência dos níveis de oxigênio nos níveis das enzimas glicolíticas (SIMS e BARNETT, citados por FUKUHARA, 2003) e as mudanças de afinidade dos transportadores em condições anaeróbicas (BARNETT, 1992, citado por FUKUHARA, 2003). Portanto, conforme reconhecido por Siso et al. (1996), a importância da concentração de açúcar, o nível de oxigênio e a fase de crescimento das culturas são aspectos muito relevantes na análise da conduta metabólica por leveduras e no estabelecimento de condições fisiológicas que possam maximizar a conversão do açúcar em etanol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo foi a levedura selecionada com máxima atividade de α -galactosidase, entre outras isoladas de cinco laticínios da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, pertencentes ao acervo de culturas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. Essa levedura, identificada pelo instituto de identificação de leveduras Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) como *Candida Kefyr* (Beijerinck) Van Uden & Buckley ou em estado não formador de ascósporos da *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt, foi denominada, neste trabalho, *Kluyveromyces marxianus* UFV-3.

3.2 . Manutenção da cultura

A levedura *Kluyveromyces marxianus* isolada em meio YPD ágar (extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glicose 2% (p/v) e ágar-ágar 2% (p/v)) foi ativada em caldo YPD (extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v) e glicose 2% (p/v)) por aproximadamente 18 horas. Nesse tempo, as culturas foram centrifugadas a 7.000 rpm, por sete minutos, sendo o sobrenadante descartado e a célula ressuspensa em caldo YPD com 20% de

glicerol, em um volume de 1 mL, em tubos de microcentrífuga. Esses tubos contendo as culturas foram congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, estocados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3. Inóculo

Um volume de 1 mL da cultura estocada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi transferido para meio YNB com 2% de lactose (p/v) ou permeado de soro de queijo (permeado) 2% (p/v), em um volume de 20 mL presente em erlenmeyers de 125 mL. As culturas foram conduzidas em incubadoras, sob agitação de 250 rpm, à temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 18 horas, para produção do inóculo. Após esse tempo, cerca de 10 mL da cultura foi centrifugados a 2.988 g por cinco minutos, à temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sedimento de célula foi lavado duas vezes em água peptonada 0,1% (p/v), antes de ser adicionada ao meio de cultivo. O inóculo inicial em ambos os meios foram de densidade óptica (D.O.) de 600_{nm} 0,08 a 0,1.

3.4. Meio de fermentação

Os meios de fermentação utilizados neste estudo foram o meio Yeast Nitrogen Base sem aminoácidos, com $5,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de amônia (YNB) e o permeado de soro de queijo (permeado). O meio YNB, preparado conforme manual da DIFCO, foi esterilizado por filtração e, depois, acrescido de $65,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $180\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; e $320\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose como única fonte de carbono e energia, esterilizada previamente por calor úmido. O permeado em 10 diferentes concentrações também foi avaliado neste trabalho.

O soro de queijo "in natura" foi proveniente da empresa MAROCA & RUSSO Indústria e Comércio LTDA. (COTOCHÉS), situada na cidade de Rio Casca, no Estado de Minas Gerais. Assim que foi coletado dos tanques de soro de queijo, o soro foi submetido a processo de ultrafiltração para remoção de proteínas do soro, utilizando-se membrana com exclusão molecular de 10.000 Da, o que gerou um concentrado de proteínas (retentado) e o permeado, constituído basicamente de lactose, água e sais minerais. O permeado foi pulverizado no atomizador do Departamento de Tecnologia de Alimentos da

Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. O permeado em pó obtido foi reconstituído em água destilada, para atingir as concentrações de lactose de aproximadamente 1,0 g L⁻¹, 5,0 g L⁻¹, 10,0 g L⁻¹, 25,0 g L⁻¹, 50,0 g L⁻¹, 65,0 g L⁻¹, 85,0 g L⁻¹, 130 g L⁻¹, 170 g L⁻¹ e 240 g L⁻¹. Posteriormente, o permeado foi filtrado utilizando papel WATMAN® de diâmetro de 150 mm e uma bomba de vácuo. O permeado foi esterilizado por filtração usando filtros de membranas com poros de 0,22 µm. Na fermentação em permeado, na qual a cultura apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento (μ), foi testado o efeito da concentração de etanol nas μ . Para isso foram acrescidas ao meio as diferentes concentrações de etanol, cuja concentração inicial de lactose foi de 85,0 g L⁻¹ para aerobiose e microaerobiose e 65,0 g L⁻¹ para anaerobiose, sendo também acrescidos de etanol (5,0 g L⁻¹, 10,0 g L⁻¹, 20,0 g L⁻¹, 30,0 g L⁻¹, 50,0 g L⁻¹ e 80,0 g L⁻¹), para determinar o efeito do produto (etanol) sobre o crescimento da levedura. Os resultados foram expressos como razão de inibição da velocidade específica de crescimento no meio com etanol (μ_E) e velocidade específica de crescimento na ausência de etanol (μ), (μ_E / μ).

3.5. Regime de fermentação

3.5.1. Batelada

Todas as fermentações estudadas foram conduzidas em regime de batelada, em condições aeróbica e microaeróbica, para a fermentação em YNB acrescido de lactose e em condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica, nas fermentações com permeado de soro de queijo. Antes de cada cultivo, as células foram ativadas para produção do inóculo, como descrito no item 3.3. Durante a fermentação, amostras foram retiradas para acompanhar o crescimento populacional pela leitura da densidade óptica a 600 nm (D.O. 600 nm) e centrifugadas para obtenção do sobrenadante. Este foi mantido a -20 °C, para análise posterior do consumo de substrato e produção de metabólitos por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).

3.5.1.1 Aerobiose

A fermentações em condições aeróbicas em YNB acrescido de lactose e em permeado foi realizada em erlenmeyers de 250 mL com 1/5 do volume do meio e vedado com tampão de algodão. Ambas foram conduzidas em incubadores rotatórios (NEW BRUNSWICH SCIENTIFIC CO., INC. Séries 25D) sob a agitação de 250 rpm, à temperatura de 30 °C, por 72 horas, quando o meio de fermentação foi YNB acrescido de lactose, e por 96 horas em permeado.

3.5.1.2. Microaerobiose

A fermentação sob condição microaeróbica foi realizada em erlenmeyers de 250 mL contendo 1/5 do volume de meio YNB acrescido de lactose ou permeado, vedado com tampão de borracha, para reduzir a permeabilidade ao oxigênio. Um filtro de 0,45 µm foi conectado a um tubo de vidro para permitir a saída de CO₂ proveniente da fermentação. Depois de padronizado, o inóculo inicial, nitrogênio gasoso, foi borbulhado intensamente por um período de 12 minutos para expulsar o oxigênio. As fermentações foram conduzidas em incubadores (NEW BRUNSWICH SCIENTIFIC CO., INC. Séries 25 D) sob a agitação de 250 rpm, à temperatura de 30 °C, por 72 horas em meio YNB acrescido de lactose e 96 horas em permeado.

3.5.1.3. Anaerobiose

A fermentação em condições anaeróbicas foi realizada em frascos jaquetados (WHEATON ®) de 1.000 mL com 1/5 do volume do meio e em erlenmeyers de 250 mL com um 1/5 do volume do meio. No permeado foram adicionados 1,0 g L⁻¹ de Tween 80 e 20 µg mL⁻¹ de ergosterol, conforme Siso et al. (1996), para garantir a síntese de componentes esteróis da membrana em condições anaeróbicas. Uma vez padronizado o inóculo inicial nitrogênio gasoso, foi borbulhado continuamente durante as 96 horas de fermentação. A temperatura foi mantida a 30 °C pela contínua circulação de água a 30 °C na camisa que envolve o frasco jaquetado e no experimento conduzido em erlenmeyers pela imersão em banho-maria rotatório.

3.6. Determinação da relação entre massa celular seca e densidade óptica a 600 nm (D.O. 600 nm)

A levedura *Kluyveromyces marxianus* foi ativada para a produção do inóculo conforme descrito no item 3.3. Depois de padronizado o inóculo inicial para uma D.O. 600_{nm} entre 0,08 e 0,1 em erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de permeado com concentração inicial de lactose de 20 g L⁻¹ e 50 mL de YNB, com concentração inicial de lactose de 20 g L⁻¹ de lactose, a cultura foi conduzida sob a agitação de 250 rpm por 24 horas à temperatura de 30 °C. Após 24 horas, as células ativadas foram separadas por centrifugação a 4.000 g, por cinco minutos a 4 °C e utilizadas para o preparo de suspensão em 5 mL de água peptonada. Foram retiradas quatro alíquotas de 1 mL da suspensão para determinação da massa seca a 105 °C por 48 horas. Uma amostra de 1 mL da suspensão foi utilizada para a realização das seguintes diluições de 2 x 10⁻², 3 x 10⁻², 4 x 10⁻², 5 x 10⁻² e 6 x 10⁻² em duplicata. A regressão linear entre a absorbância e a massa seca celular (g L⁻¹) permitiu a determinação da massa celular seca correspondente a uma unidade de D.O. a 600 nm. Uma unidade de D.O. 600 nm mostrou ser equivalente a 0,465 g L⁻¹ de massa seca celular em meio YNB acrescido de lactose e a 0,493 g L⁻¹ de massa seca celular em permeado.

3.7. Medida de crescimento

O crescimento da massa celular da levedura foi estimado pela medida da absorvância em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de onda de 600 nm. O valor da D.O. 600 nm foi convertido em massa seca celular, de acordo com a relação obtida no item 3.6.

3.8. Determinação da velocidade específica de crescimento e estimação das constantes cinéticas

A velocidade específica de crescimento (μ) nos meios com diversas concentrações de substrato sob diferentes níveis de oxigênio foi determinada pela regressão linear dos valores obtidos pelo logaritmo neperiano da D.O. 600 nm na fase exponencial de crescimento. A μ é o coeficiente angular

da relação do logaritmo da D.O. 600 nm *versus* tempo dado pela equação da regressão linear. Os valores cinéticos da velocidade máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), constante de saturação (K_S) e constante de inibição (K_i), foram estimados por regressão não-linear, utilizando o programa Sistema de Análise Estatística (SAS) pelo método iterativo de Marquart. O modelo cinético adotado nas análises foi o proposto por Andrews em 1968. As melhores estimativas das constantes cinéticas foram definidas pelos menores valores apresentados da soma de quadrados dos resíduos do modelo de regressão.

3.9. Determinação do consumo de substrato e da produção de metabólitos

Os sobrenadantes das culturas foram estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e analisados posteriormente. O consumo de lactose e produção de metabólitos como etanol, glicerol, ácido acético, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico, ácido α -cetoglutárico e ácido propiônico foram analisados em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) – HP 1050 M Hewlett Packard Série 1050, detector HP 1047A, utilizando coluna BIO-RAD aminex HPX-874 (300 x 7,8 mm), eluente H_2SO_4 0,005 M, fluxo 0,7 ml/min e temperatura da coluna a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na montagem dos métodos e da curva-padrão foram preparados padrões de 2,5 mM, 6,5 mM, 10, 0 mM, 12,5 mM e 20,0 mM para açúcares e 5,0 mM, 10,0 mM, 12,5 mM, 20,0 mM, 25,0 mM e 40,0 mM para etanol, glicerol e ácidos. As amostras foram diluídas quando necessário, sendo utilizado o volume de 20 μL na análise cromatográfica.

3.10. Determinação dos parâmetros de crescimento e fermentativos e da velocidade de consumo e de produção de etanol

Para determinar o rendimento celular ($Y_{X/S}$) e o coeficiente de manutenção (m) foi utilizada a equação ($dS/dt = (-1/Y_{X/S})(dx/dt) - m \cdot X$). Para determinar o rendimento de etanol ($Y_{P/X}$) e o rendimento de manutenção (Y_m) foi utilizada a equação ($dP/dt = (Y_{P/X})(dx/dt) + Y_m \cdot X$) (BAILEY e OLLIS, 1986).

Como os valores obtidos para o m e o Y_m foram negligenciáveis nas condições estudadas, o $Y_{X/S}$ e o $Y_{P/X}$ foram calculados como:

- Rendimento celular ($Y_{X/S}$) = massa celular final – massa celular inicial em $g L^{-1}$ /concentração final de lactose – concentração inicial de lactose em $g L^{-1}$.
- Rendimento ($Y_{P/X}$) = concentração final de produto – concentração inicial de produto em $g L^{-1}$ / = massa celular final – massa celular inicial em $g L^{-1}$.

Também foram calculados:

- Rendimento ($Y_{P/S}$) = concentração final de etanol – concentração inicial de etanol em $g L^{-1}$ /concentração final de lactose – concentração inicial de lactose em $g L^{-1}$. O rendimento teórico de 0,538 g de etanol por 1 g de lactose consumida foi obtido pelo balanço estequiométrico, no qual 1 mol de lactose consumida pela levedura produzirá 4 mols de etanol, ou 342 g de lactose produzirão 184 g de etanol, ou seja, um rendimento teórico de $0,538 g g^{-1}$.
- Produtividade volumétrica (Q_P) = concentração final de etanol – concentração inicial de etanol em $g L^{-1}$ /período em horas.
- Velocidade de consumo de lactose ($g g^{-1} h^{-1}$) = foi determinada como média na fase exponencial de crescimento da expressão: $(S_o - S_f)/(X \cdot t)$, em qual S_o = concentração inicial de substrato em cada período, S_f = concentração final de substrato em cada período, X = média da massa celular em cada período e t = variação de tempo em cada período.
- Velocidade de produção de etanol ($g g^{-1} h^{-1}$) = foi determinada como a média na fase exponencial de crescimento da expressão: $(P_f - P_o)/(X \cdot t)$, em que P_f = concentração do produto final em cada período, P_o = concentração inicial de produto em cada período, X = média da massa celular em cada período e t = variação de tempo em cada período.

4. RESULTADOS

4.1. Cinética de crescimento de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 em função da concentração de substrato nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, sob as condições aeróbica e microaeróbica

Em condição aeróbica, as velocidades específicas máximas de crescimento (μ) de *K. marxianus* UFV-3 em meio YNB contendo lactose como única fonte de carbono foram maiores que as obtidas nas fermentações em microaerobiose (Figura 1). Em aerobiose e microaerobiose, a μ foi praticamente a mesma quando a concentração inicial de lactose aumentou de 65,0 g L⁻¹ para 180,0 g L⁻¹. Nas fermentações com concentrações iniciais de lactose próximas a 325,0 g L⁻¹, observou-se em aerobiose uma diminuição da μ máx de 26,5 e 32,4% em relação às fermentações com concentrações iniciais de lactose próximas de 65,0 g L⁻¹ e 180,0 g L⁻¹, respectivamente. Também, em microaerobiose, verificou-se a diminuição da μ máx, na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de 325,0 g L⁻¹. Essa diminuição foi de 33,1 e 36,4% vezes em relação às concentrações iniciais de lactose próximas a 65,0 g L⁻¹ e 180 g L⁻¹, respectivamente (Figura 1).

Semelhante ao observado para a μ , a massa celular máxima obtida nas fermentações também foi superior sob condição aeróbica (Tabela 1). Verificou-se, tanto nas fermentações sob condição aeróbica quanto microaeróbica, que,

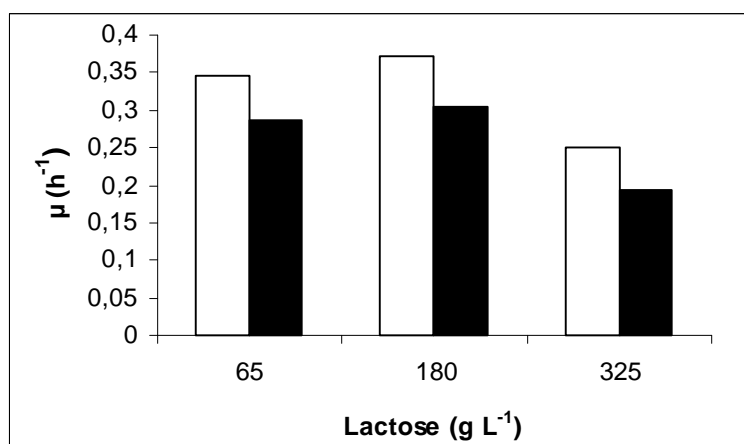


Figura 1 – Velocidade específica máxima de crescimento (μ máx)-(h⁻¹) obtida por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, em condições aeróbica () e microaeróbica ().

Tabela 1 – Massa celular máxima obtida por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, sob as condições aeróbica e microaeróbica

| Aerobiose | | | | Microaerobiose | | | |
|-----------------|--------------------|-----------|-------------------|-----------------|--------------------|-----------|-------------------|
| So ^a | X máx ^b | Tempo (h) | C.L. ^c | So ^a | X máx ^b | Tempo (h) | C.L. ^c |
| 68,3 | 4,02 | 48 | 100 | 67,0 | 2,73 | 48 | 100 |
| 180,4 | 4,12 | 48 | 49,5 | 175,7 | 2,87 | 48 | 49,6 |
| 327,4 | 2,90 | 72 | 31,3 | 324,6 | 1,6 | 72 | 25,48 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose em g L⁻¹.

^b Massa celular máxima em g L⁻¹.

^c Consumo de lactose em %.

com o aumento da concentração inicial de lactose de 65,0 g L⁻¹ para 180 g L⁻¹, a massa celular máxima foi praticamente a mesma. Como ocorrido em μ , observou-se que as fermentações, cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de 325,0 g L⁻¹, apresentaram menor massa celular máxima, em comparação com aquelas obtidas nas fermentações com concentrações iniciais de lactose próximas a 65,0 g L⁻¹ e 180 g L⁻¹. Em aerobiose, a massa celular

máxima na fermentação, cuja concentração inicial de lactose foi próxima de 325,0 g L⁻¹, foi 27,8 e 29,6% menor que as fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de 65,0 g L⁻¹ e 180,0 g L⁻¹, respectivamente. Em microaerobiose, a massa celular máxima na fermentação, cuja concentração inicial de lactose foi próxima de 325,0 g L⁻¹, foi 41,4 e 44,2% menor que as fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de 65,0 g L⁻¹ e 180 g L⁻¹, respectivamente (Tabela 1).

Semelhante ao observado na velocidade específica máxima de crescimento e na massa celular máxima, o rendimento celular máximo de ($Y_{X/S}$ máx) também foi maior sob condição aeróbica (Tabela 2). Em aerobiose, o $Y_{X/S}$ máx diminuiu 31,9 e 56,9% nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas a 180,0 g L⁻¹ e 325,0 g L⁻¹, respectivamente, em relação à fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima a 65,0 g L⁻¹. Em microaerobiose, o rendimento celular máximo foi similar quando a concentração inicial de lactose na fermentação aumentou de 65,0 g L⁻¹ para 180,0 g L⁻¹. Porém, quando a concentração de lactose aumentou de 65,0 g L⁻¹ para 325,0 g L⁻¹, o rendimento celular máximo alcançado foi 56,8% menor (Tabela 2).

Tabela 2 – Rendimento celular máximo ($Y_{X/S}$ máx)-(g g⁻¹) obtido por *K. marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, sob as condições aeróbica e microaeróbica

| Aerobiose | | | | Microaerobiose | | | |
|-----------------|----------------------------|-----------|-------------------|-----------------|----------------------------|-----------|-------------------|
| So ^a | $Y_{X/S}$ máx ^b | Tempo (h) | C.L. ^c | So ^a | $Y_{X/S}$ máx ^b | Tempo (h) | C.L. ^c |
| 68,3 | 0,072 | 8 | 41,31 | 67,0 | 0,044 | 24 | 82,00 |
| 180,4 | 0,049 | 12 | 20,94 | 175,7 | 0,041 | 12 | 13,26 |
| 327,4 | 0,031 | 24 | 22,17 | 324,6 | 0,019 | 48 | 25,48 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose em g L⁻¹.

^b Rendimento máximo celular em g g⁻¹.

^c Consumo de lactose em %.

4.2. Consumo de lactose e produção de etanol e glicerol por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, sob as condições aeróbica e microaeróbica

O consumo de lactose nas fermentações, cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas a $65,0 \text{ g L}^{-1}$, foram similares até o período de 24 horas de fermentação (Figuras 2 e 3). Com 48 horas de fermentação, observou-se o consumo total de lactose nas fermentações sob condições aeróbica e microaeróbica. Verificou-se, ainda, que nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de $180,0 \text{ g L}^{-1}$ até o período de 12 horas, o consumo de lactose foi similar em aerobiose e microaerobiose. Com 24 horas de fermentação, o consumo em aerobiose foi maior (48,72%) do que em microaerobiose (29,76%). Porém em nenhuma condição, aeróbica ou microaeróbica, ocorreu o consumo completo do açúcar. Nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de $325,0 \text{ g L}^{-1}$, tanto em aerobiose quanto em microaerobiose o consumo de lactose foi similar durante todo o curso da fermentação, entretanto sem jamais consumi-la completamente (Figuras 2 e 3).

A produção de glicerol nas fermentações sob condições aeróbica e microaeróbica, cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de $65,0 \text{ g L}^{-1}$, foram similares até o tempo de 24 horas de fermentação, quando, então, a produção de glicerol foi 4,29% maior em microaerobiose do que em aerobiose (Figura 2). Nas fermentações sob condições aeróbica e microaeróbica, cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de 180 g L^{-1} , não houve produção de glicerol nas primeiras 12 horas, a qual ocorreu no período de 24 horas. A partir desse período, observou-se que a produção de glicerol na fermentação sob condição microaeróbica foi 53,21; 57,9; e 66,3% maior que sob condição aeróbica, nos períodos de 24, 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente. Nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de $325,0 \text{ g L}^{-1}$ sob condição microaeróbica, não houve produção de glicerol até 12 horas de fermentação, enquanto em aerobiose ocorreu a produção de $0,35 \text{ g L}^{-1}$ nesse período. Com 24 horas de fermentação, a produção de glicerol foi similar em aerobiose e microaerobiose; com 48 horas, 63,3% maior em aerobiose; e com 72 horas, 26,31% maior em microaerobiose (Figura 2).

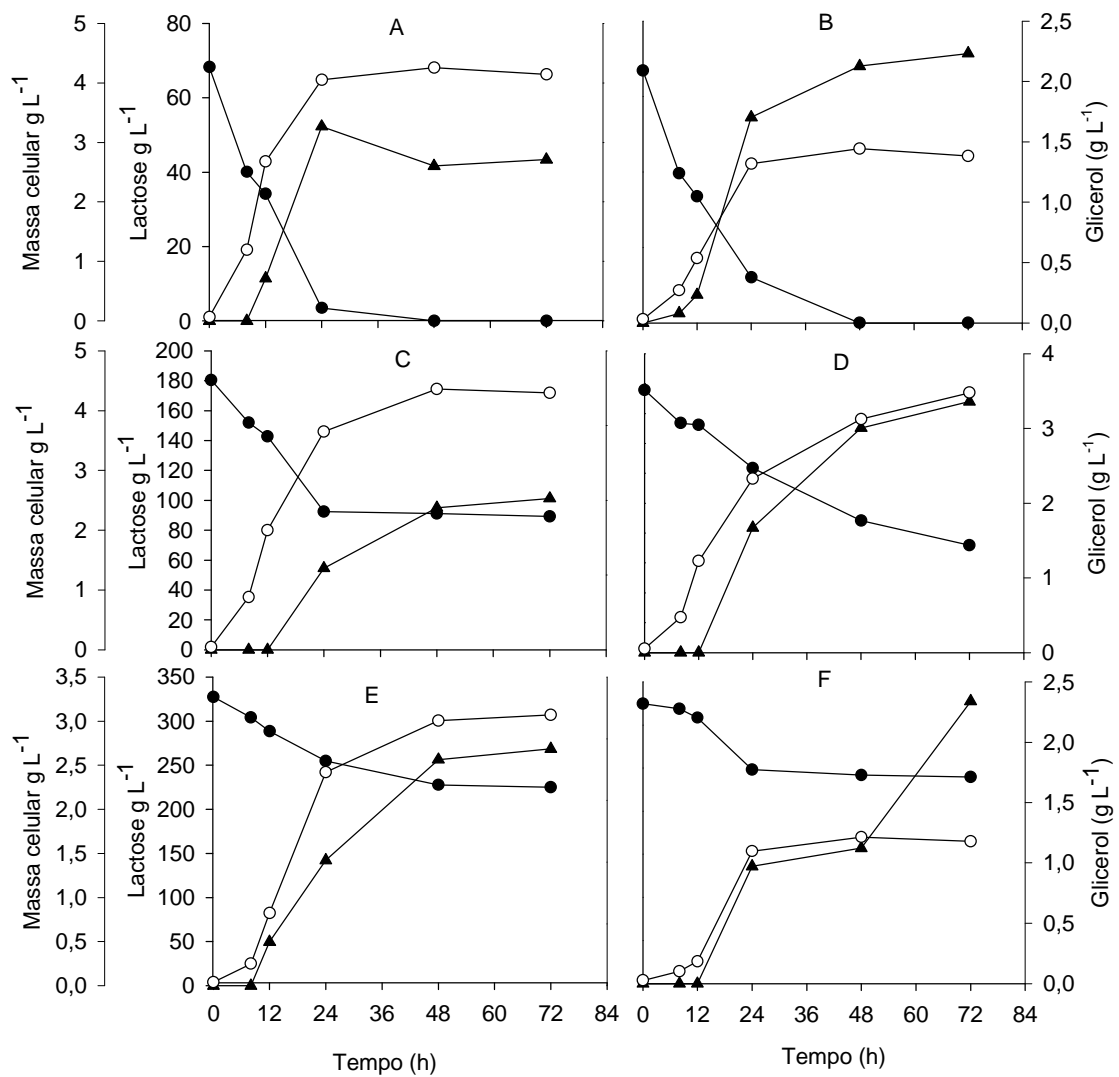


Figura 2 – Consumo de lactose (●), produção de glicerol (▲) e massa celular (○) obtidos por *Kluveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose: 65,0 g L⁻¹ sob as condições aeróbica (A) e microaeróbica (B), 180,0 g L⁻¹ sob as condições aeróbica (C) e microaeróbica (D) e 325,0 g L⁻¹ sob as condições aeróbica (E) e microaeróbica (F).

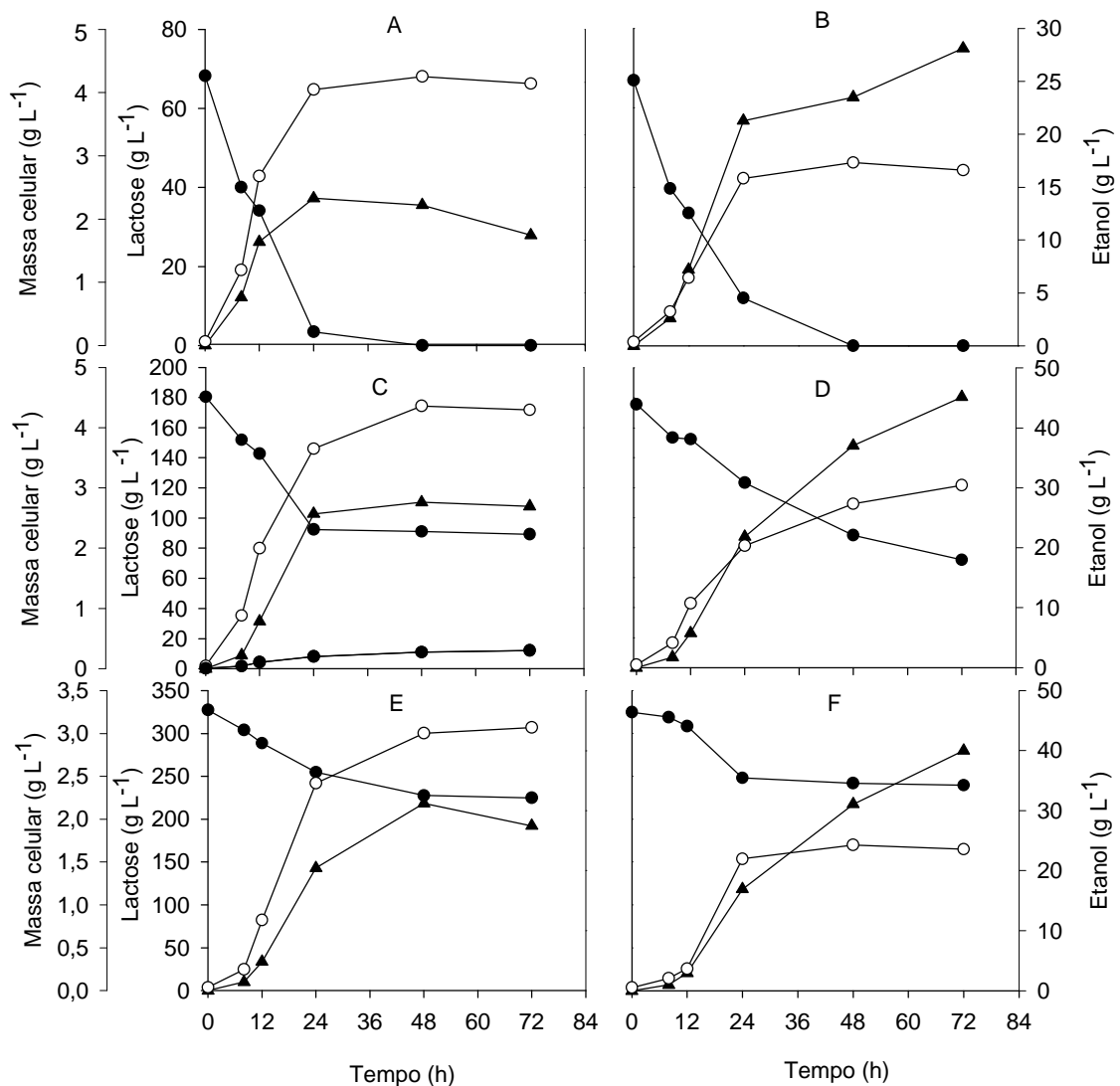


Figura 3 – Consumo de lactose (●), produção de etanol (○) e massa celular (▲) obtidos por *Kluveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose: 65,0 g L⁻¹ sob as condições aeróbica (A) e microaeróbica (B), 180,0 g L⁻¹ sob as condições aeróbica (C) e microaeróbica (D) e 325,0 g L⁻¹ sob as condições aeróbica (E) e microaeróbica (F).

A produção de etanol nas fermentações sob condições aeróbica e microaeróbica, cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de $65,0 \text{ g L}^{-1}$, foi similar até o período de 12 horas (Figura 3). A partir de 24 horas de fermentação, evidenciou-se que a produção de etanol foi 52,3; 76,3; e 168,8% maior na fermentação conduzida em microaerobiose nos períodos de 24, 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente. As fermentações sob condições aeróbica e microaeróbica, cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de $180,0 \text{ g L}^{-1}$, exibiram similaridade na produção de etanol até o período de 24 horas de fermentação. A partir de 48 horas de fermentação, verificou-se que essa produção foi 25,4 e 67,3% maior em microaerobiose. Nas fermentações realizadas sob condições aeróbica e microaeróbica, cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de $325,0 \text{ g L}^{-1}$, observou-se que até 48 horas de fermentação a produção de etanol em aerobiose e microaerobiose foi similar. Com 72 horas de fermentação, notou-se que a produção de etanol foi 45,9% maior em microaerobiose (Figura 3). De forma geral, nas fermentações sob condição aeróbica as massas celulares obtidas por *K. marxianus* UFV-3 foram maiores que sob condições microaeróbicas (Figuras 2 e 3).

As concentrações máximas de etanol foram maiores em microaerobiose que em aerobiose. Nesta, o aumento da concentração inicial de lactose de $65,0 \text{ g L}^{-1}$ para $180,0 \text{ g L}^{-1}$ elevou em 97,7% a concentração máxima de etanol, enquanto o aumento da concentração inicial de lactose da ordem de $325,0 \text{ g L}^{-1}$ proporcionou incremento de 123,7% (Figura 4). Em microaerobiose, o aumento da concentração inicial de lactose da ordem de $65,0 \text{ g L}^{-1}$ para $180,0 \text{ g L}^{-1}$ levou a um incremento de 60,5% na concentração máxima de etanol, enquanto o aumento da concentração inicial de lactose para cerca de $325,0 \text{ g L}^{-1}$ proporcionou um acréscimo de 42,27%.

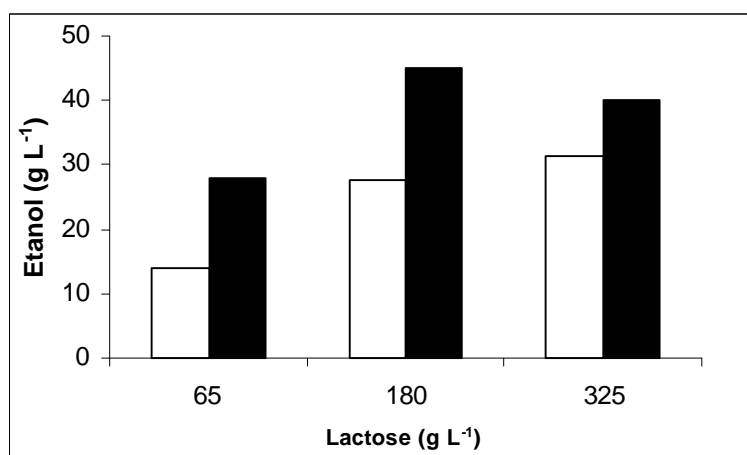


Figura 4 – Concentração máxima de etanol obtida por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, sob as condições aeróbica () e microaeróbica ().

4.3. Parâmetros fermentativos da produção de etanol de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose sob as condições aeróbica e microaeróbica

O rendimento máximo de etanol por substrato ($Y_{P/S}$ máx) foi maior em microaerobiose do que em aerobiose (Tabela 3). Nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de 65 g L^{-1} , o $Y_{P/S}$ máx foi 45,9% maior em microabiose do que em aerobiose. O $Y_{P/S}$ máx foi 41,7% maior em microarobiose do que em aerobiose, nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de 180 g L^{-1} . Nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de 325 g L^{-1} , o $Y_{P/S}$ máx foi 50,15% maior em microaerobiose do que em anaerobiose. Tanto em condição aeróbica quanto microaeróbica, observou-se que, com o aumento da concentração inicial de lactose de $65,0 \text{ g L}^{-1}$ para 180 g L^{-1} e 325 g L^{-1} , o $Y_{P/S}$ máx foi similar (Tabela 3).

O rendimento máximo de etanol por massa celular ($Y_{P/X}$ máx) aumentou com a elevação da concentração inicial de lactose. Assim como observado quanto ao rendimento máximo de etanol por substrato ($Y_{P/S}$ máx), o $Y_{P/X}$ máx foi maior nas fermentações microaeróbicas (Tabela 4). Em aerobiose, o aumento da concentração inicial de lactose de $65,0 \text{ g L}^{-1}$ para $180,0 \text{ g L}^{-1}$ e para

Tabela 3 – Rendimento máximo de etanol por substrato ($Y_{P/S}$)-(g g⁻¹) obtido por *K. marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, sob as condições aeróbica e microaeróbica

| Aerobiose | | | | | Microaerobiose | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------------|--------------|-------------------|-----------------|-------------------------------|----------------|--------------|-------------------|
| So ^a | $Y_{P/S}$ máx ^b | Y teórico % | Tempo (h) | C.L. ^c | So ^a | $Y_{P/S}$ máx ^b | Y teórico % | Tempo (h) | C.L. ^c |
| 68,3 | 0,2879 | 53,51 | 8 | 41,37 | 67,0 | 0,4203 | 78,12 | 72 | 100 |
| 180,4 | 0,310 | 57,43 | 48 | 48,65 | 175,7 | 0,4378 | 81,37 | 72 | 59,2 |
| 327,4 | 0,313 | 58,23 | 48 | 30,46 | 324,6 | 0,4700 | 87,40 | 72 | 26,18 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose em g L⁻¹.

^b Rendimento máximo de etanol por substrato em g g⁻¹.

^c Consumo de lactose em %.

Tabela 4 – Rendimento máximo de etanol por massa celular ($Y_{P/X}$ máx)-(g g⁻¹) obtido por *K. marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, sob as condições aeróbica e microaeróbica

| Aerobiose | | | | Microaerobiose | | | |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| So ^a | $Y_{P/X}$ máx ^b | Tempo (h) ^b | C.L. ^c (%). | So ^a | $Y_{P/X}$ máx ^b | Tempo (h) ^b | C.L. ^c (%). |
| 68,3 | 4,0 | 8 | 41,34 | 67,0 | 11,0 | 72 | 100 |
| 180,4 | 8,0 | 24 | 48,88 | 175,7 | 15,0 | 72 | 59,2 |
| 327,4 | 11,0 | 48 | 30,46 | 324,6 | 26,0 | 72 | 26,18 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose em g L⁻¹.

^b Rendimento máximo de etanol por massa celular em g g⁻¹.

^c Consumo de lactose em %.

325,0 g L⁻¹ resultou em incrementos de 100 e 175% do $Y_{P/X}$ máx, respectivamente. Em microaerobiose, a elevação da concentração inicial de lactose de 65,0 g L⁻¹ para 180,0 g L⁻¹ e 325,0 g L⁻¹ resultou em aumentos de 36,3 e 136,3% do $Y_{P/X}$ máx, respectivamente (Tabela 4).

A produtividade máxima volumétrica (Q_P máx)-(g L⁻¹ h⁻¹) foi maior sob a condição aeróbica nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de 180,0 g L⁻¹ e 325,0 g L⁻¹ de lactose. Em microaerobiose na

fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de 65,0 g L⁻¹, a Q_P máx foi 7,31% maior do que em aerobiose (Tabela 5). Nesta condição, a maior produtividade máxima volumétrica (Q_P máx)-(g L⁻¹ h⁻¹), 1,07 g L⁻¹ h⁻¹, foi obtida na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 180,4 g L⁻¹ de lactose com 24 horas de fermentação, quando houve um consumo de lactose de 88,06 g L⁻¹ (48,8%). Sob condição microaeróbica, a maior produtividade máxima volumétrica máxima (Q_P máx), 0,91 g L⁻¹ h⁻¹, foi obtida na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 175,7 g L⁻¹ com 24 horas de fermentação, quando houve um consumo de 103,78 g L⁻¹ (59,1%) de lactose (Tabela 5).

Tabela 5 – Produtividade máxima volumétrica de etanol (Q_P máx)-(g L⁻¹ h⁻¹) obtida por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em YNB acrescido de lactose, sob as condições aeróbica e microaeróbica

| Aerobiose | | | | Microaerobiose | | | |
|-----------------|---------------------------------|-----------|-----------------------|-----------------|---------------------------------|-----------|-----------------------|
| So ^a | Q _P máx ^b | Tempo (h) | C.L. ^c (%) | So ^b | Q _P máx ^b | Tempo (h) | C.L. ^c (%) |
| 68,3 | 0,82 | 24 | 41,37 | 67,0 | 0,88 | 14 | 60,66 |
| 180,4 | 1,07 | 24 | 48,8 | 175,7 | 0,91 | 24 | 59,1 |
| 327,4 | 0,85 | 24 | 22,17 | 324,6 | 0,7 | 8 | 7,72 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose em g L⁻¹.

^b Produtividade máxima volumétrica em g L⁻¹ h⁻¹.

^c Consumo de lactose em %.

4.4. Cinética de crescimento de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 em função da concentração de substrato nas fermentações realizadas em permeado de soro de queijo sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica

Em condição aeróbica, as velocidades específicas máximas de crescimento (μ) de *K. marxianus* UFV-3 em 10 concentrações de permeado de soro de queijo foram maiores que as obtidas sob condições microaeróbica e

anaeróbica (Figura 5). As fermentações em microaerobiose apresentaram valores de μ maiores que em anaerobiose. Nesta, a μ aumentou com a elevação da concentração inicial de lactose até a fermentação cuja concentração inicial foi próxima de $85,0 \text{ g L}^{-1}$ de lactose. A μ nessa concentração foi de $0,450 \text{ h}^{-1}$. As fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram superiores a $85,0 \text{ g L}^{-1}$ apresentaram ligeiro decréscimo nas μ . As μ diminuíram para $0,440 \text{ h}^{-1}$; $0,435 \text{ h}^{-1}$; e $0,393 \text{ h}^{-1}$ nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de $130,0 \text{ g L}^{-1}$; $170,0 \text{ g L}^{-1}$; e $240,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma que na fermentação em aerobiose, pode-se observar, na Figura 5, que em microaerobiose as μ máx aumentaram com a elevação da concentração inicial de substrato até a fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de $85,0 \text{ g L}^{-1}$; após essa concentração, a μ máx diminuiu. Nas fermentações com concentrações iniciais de lactose superiores a $85, \text{ g L}^{-1}$, as quais foram próximas de $130,0 \text{ g L}^{-1}$; $170,0 \text{ g L}^{-1}$; e $240,0 \text{ g L}^{-1}$ de lactose, a μ máx h^{-1} diminui para $0,34 \text{ h}^{-1}$; $0,29 \text{ h}^{-1}$; e $0,20 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Observa-se ainda, nessa figura, que sob condições anaeróbicas a μ aumentou com a elevação da concentração inicial de substrato até a concentração de 50 g L^{-1} , atingindo a mesma μ máx ($0,260 \text{ h}^{-1}$). Nas fermentações com concentrações iniciais de lactose próximas de $85,0 \text{ g L}^{-1}$; $130,0 \text{ g L}^{-1}$; $170,0 \text{ g L}^{-1}$; e $240,0 \text{ g L}^{-1}$ de lactose, as μ máximas diminuíram para $0,25 \text{ h}^{-1}$; $0,24 \text{ h}^{-1}$; $0,21 \text{ h}^{-1}$; e $0,20 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Figura 5).

A velocidade máxima de crescimento (μ máx) sob condição aeróbica foi maior que a obtida sob condição microaeróbica. Nesta condição, a μ máx foi maior que a obtida em condição anaeróbica (Tabela 6). Observa-se, nessa tabela, que com a diminuição do nível de oxigênio houve o aumento da constante de saturação (K_s), ou seja, a K_s obtida em aerobiose foi menor do que a em microaerobiose. Além disso, verificou-se que a K_s obtida nesta condição foi maior do que a em anaerobiose. A constante de inibição K_i em aerobiose foi maior que as em microaerobiose e anaerobiose. Verificou-se ainda que a K_i em microaerobiose foi menor que a em anaerobiose (Tabela 6).

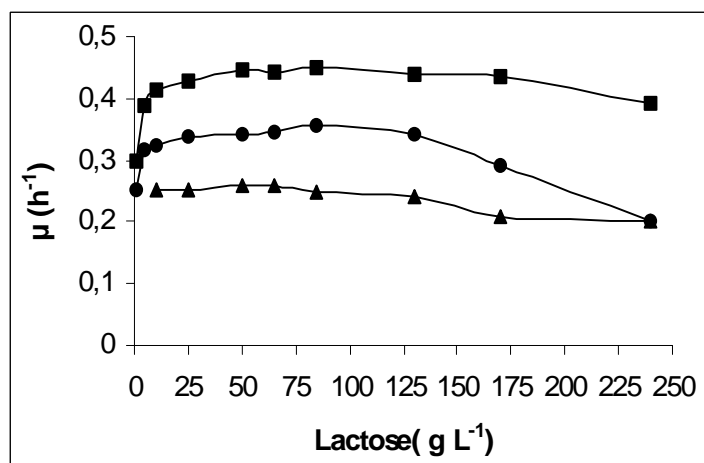


Figura 5 – Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)-(h⁻¹), obtida por *Kluveromyces marxianus* UFV-3, nas fermentações realizadas em permeado com 10 diferentes concentrações de lactose, sob as condições aeróbica (■), microaeróbica (●) e anaeróbica (▲).

Tabela 6 – Valores estimados das constantes cinéticas do crescimento de *Kluveromyces marxianus* UFV-3 em permeado de soro de queijo sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica por regressão não-linear, utilizando o programa SAS (método de Marquardt iterativo)

| Nível de Oxigênio | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | K_s (g·L ⁻¹) | K_i (g·L ⁻¹) | Soma do Quadrado do Resíduo |
|-------------------|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Aerobiose | 0,452 | 0,682 | 2629,4 | 0,0013 |
| Microaerobiose | 0,383 | 0,841 | 490,2 | 0,0068 |
| Anaerobiose | 0,292 | 1,517 | 529,4 | 0,0003 |

O mesmo resultado observado em velocidade específica máxima de crescimento (μ) pode ser visto na massa celular máxima, que apresentou valores maiores em aerobiose seguidos de microaerobiose e anaerobiose. As massas celulares máximas em microaerobiose, com exceção das fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas de 130,0 g L⁻¹ e 240,0 g L⁻¹, foram maiores do que em anaerobiose (Tabela 7).

Tabela 7 – Massa celular máxima (g L⁻¹) obtida por *K. marxianus* UFV 3 nas fermentações realizadas em permeado com 10 diferentes concentrações de lactose, sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica

| Aerobiose | | | | Microaerobiose | | | | Anaerobiose | | | |
|-----------------|----------------|-----------|--------------------|-----------------|----------------|-----------|--------------------|-----------------|----------------|-----------|--------------------|
| So ^a | X ^b | Tempo (h) | C. L. ^c | So ^a | X ^b | Tempo (h) | C. L. ^c | So ^a | X ^b | Tempo (h) | C. L. ^c |
| 1,23 | 0,492 | 48 | 95,93 | 1,40 | 0,446 | 48 | 95,01 | NR ^d | | | |
| 5,42 | 1,03 | 72 | 100 | 5,8 | 0,855 | 96 | 100 | NR ^d | | | |
| 10,90 | 1,56 | 48 | 98,25 | 11,10 | 1,18 | 96 | 99,55 | 9,30 | 0,84 | 96 | 100 |
| 26,00 | 3,64 | 72 | 98,58 | 26,10 | 2,38 | 96 | 100 | 22,6 | 1,52 | 96 | 100 |
| 48,60 | 5,16 | 96 | 98,48 | 46,00 | 3,09 | 96 | 100 | 48,20 | 2,27 | 96 | 100 |
| 62,8 | 8,11 | 96 | 100 | 69,70 | 4,00 | 96 | 100 | 65,60 | 2,16 | 48 | 100 |
| 84,0 | 9,17 | 96 | 100 | 85,80 | 4,05 | 96 | 100 | 87,40 | 2,77 | 48 | 100 |
| 126,0 | 10,33 | 96 | 100 | 127,0 | 4,06 | 96 | 100 | 133,00 | 5,17 | 72 | 99,53 |
| 167,4 | 13,37 | 96 | 100 | 176,0 | 4,42 | 96 | 100 | 171,0 | 3,25 | 72 | 91,02 |
| 247,0 | 12,06 | 96 | 74,37 | 244,0 | 3,79 | 96 | 45,56 | 237,0 | 3,92 | 96 | 50,63 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose em g L⁻¹.

^b Massa celular máxima em g L⁻¹.

^c Consumo de lactose em %.

^d Não realizado.

Observou-se tendência de aumento da massa celular máxima com a elevação da concentração inicial de substrato, à exceção da fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de 247,0 g L⁻¹ de lactose, que teve massa celular de 12,06 g L⁻¹, inferior à apresentada pela fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 167,4 g L⁻¹ (Tabela 7). A massa celular máxima de 13,37 g L⁻¹ foi obtida na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 167,4 g L⁻¹ com 96 horas de fermentação, quando houve o consumo completo da lactose (Tabela 7). De forma semelhante à ocorrida em aerobiose, observa-se, na Tabela 6, que em microaerobiose a massa celular máxima também teve tendência de aumento com a elevação da concentração inicial de substrato, com exceção da fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 244,0 g L⁻¹, que resultou numa massa celular máxima de 3,79 g L⁻¹, inferior à apresentada pela fermentação com concentração inicial de lactose de 176,0 g L⁻¹, isto é, 4,42 g L⁻¹. A massa celular máxima de 4,42 g L⁻¹ foi obtida com 96 horas de fermentação, com o consumo total da lactose

(Tabela 7). Em anaerobiose, as massas celulares máximas obtidas aumentaram com a concentração de substrato até a concentração inicial de $133,0 \text{ g L}^{-1}$ de lactose, alcançando uma massa celular de $5,17 \text{ g L}^{-1}$. A partir dessa concentração, a massa celular diminuiu para $3,25 \text{ g L}^{-1}$ e $3,92 \text{ g L}^{-1}$ nas fermentações com concentrações iniciais de lactose de $171,0 \text{ g L}^{-1}$ e $237,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. A massa celular máxima obtida em anaerobiose ($5,17 \text{ g L}^{-1}$) foi aproximadamente 61,33% menor que em aerobiose e 16,97% maior que em microaerobiose, que foi de $4,42 \text{ g L}^{-1}$. Aquela massa celular máxima de $5,17 \text{ g L}^{-1}$ foi obtida na fermentação cuja concentração inicial foi de $133,0 \text{ g L}^{-1}$ com 72 horas de fermentação, quando havia sido consumida praticamente toda a lactose (99,53%) (Tabela 7).

O rendimento celular máximo ($Y_{X/S} \text{ máx}$) foi maior em condição aeróbica do que em microaeróbica e anaeróbica (Tabela 8). Em microaerobiose, o $Y_{X/S} \text{ máx}$ foi superior ao apresentado por anaerobiose. O rendimento celular máximo tendeu a diminuir com o aumento da concentração inicial de substrato nos três níveis de oxigênio testados. Em aerobiose, o rendimento celular máximo foi maior nas fermentações realizadas em baixas concentrações iniciais de lactose. Na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, obteve-se o maior rendimento celular máximo de $0,418 \text{ g g}^{-1}$, aproximadamente 464,8% maior que o obtido na concentração inicial de lactose próxima de $240,0 \text{ g L}^{-1}$. De forma similar ao ocorrido em aerobiose, os rendimentos celulares máximos ($Y_{X/S}$) foram maiores na presença de baixas concentrações de substrato. O rendimento máximo celular de $0,358 \text{ g g}^{-1}$, obtido na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, foi 418,8% maior que o de $0,069 \text{ g g}^{-1}$ obtido na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de $244,0 \text{ g L}^{-1}$. Esse aumento foi próximo ao obtido em aerobiose (464,8%). Na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de 130 g L^{-1} , obteve-se o maior rendimento celular máximo ($0,083 \text{ g g}^{-1}$). Esse rendimento foi similar ao encontrado na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de $10,0 \text{ g L}^{-1}$, a menor concentração inicial de lactose estudada nas fermentações realizadas sob condições anaeróbicas (Tabela 8).

Tabela 8 – Rendimento máximo celular ($Y_{X/S}$)-(g g⁻¹) obtido por *K. marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado com 10 diferentes concentrações de lactose, sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica

| Aerobiose | | | | Microaerobiose | | | | Anaerobiose | | | |
|-----------------|-------------------------------|--------------|--------------------|-----------------|------------------|--------------|--------------------|-----------------|-------------------------------|--------------|--------------------|
| So ^a | $Y_{X/S}$ máx ^b | Tempo (h) | C. L. ^b | So ^a | $Y_{X/S}$ máx | Tempo (h) | C. L. ^b | So ^a | $Y_{X/S}$ máx ^b | Tempo (h) | C. L. ^b |
| 1,23 | 0,418 | 10 | 66,3 | 1,40 | 0,358 | 10 | 63,8 | NR ^d | | | |
| 5,42 | 0,31 | 6 | 20,4 | 5,8 | 0,178 | 6 | 43,3 | NR ^d | | | |
| 10,90 | 0,259 | 12 | 31,9 | 11,10 | 0,189 | 12 | 24,98 | 9,30 | 0,081 | 96 | 100 |
| 26,00 | 0,255 | 12 | 27,07 | 26,10 | 0,086 | 12 | 20,85 | 22,6 | 0,074 | 12 | 18,78 |
| 48,60 | 0,229 | 12 | 23,05 | 46,00 | 0,087 | 12 | 19,07 | 48,20 | 0,046 | 96 | 100 |
| 62,8 | 0,167 | 10 | 19,5 | 69,70 | 0,061 | 10 | 54,19 | 65,60 | 0,05 | 10 | 11,89 |
| 84,0 | 0,108 | 96 | 100 | 85,80 | 0,063 | 96 | 35,47 | 87,40 | 0,043 | 14 | 28,63 |
| 126,0 | 0,134 | 14 | 22,56 | 127,0 | 0,114 | 14 | 2,31 | 133,00 | 0,083 | 24 | 17,29 |
| 167,4 | 0,08 | 96 | 100 | 176,0 | 0,066 | 96 | 12,51 | 171,0 | 0,046 | 24 | 29,83 |
| 247,0 | 0,074 | 72 | 66,4 | 244,0 | 0,069 | 72 | 13,31 | 237,0 | 0,035 | 48 | 29,39 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose (g L⁻¹).

^b Rendimento celular máximo (g L⁻¹).

^c Consumo em % de lactose.

^d Não realizado.

4.5. Efeito da concentração de etanol no crescimento de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado de soro de queijo, sob as condição aeróbica, microaeróbica e anaeróbica

O efeito inibidor do etanol no crescimento pode ser observado na Figura 6. A inibição do crescimento foi maior nas fermentações cujas concentrações iniciais de etanol foram maiores. Na presença de 80 g L⁻¹ de etanol, o crescimento em relação ao controle foi de aproximadamente 15% em aerobiose e 25% em microaerobiose e na anaerobiose, menor que o crescimento apresentado nas demais concentrações de etanol. Nas fermentações em que foram adicionados até 20 g L⁻¹ de etanol, observou-se que o crescimento foi mais similar nos três níveis de oxigênio testados. Na presença de 30 g L⁻¹ de etanol, o crescimento em anaerobiose foi de aproximadamente 90%, maior que o crescimento de cerca de 80% em microaerobiose e de cerca de 70% em aerobiose. A diferença de crescimento apresentada entre as fermentações em aerobiose, microaerobiose e

anaerobiose foi mais acentuada na presença de 50 g L⁻¹ de etanol. Nessa concentração, o crescimento em anaerobiose foi em torno de 80% em relação ao controle, enquanto em microaerobiose e aerobiose foi por volta de 60% (Figura 6).

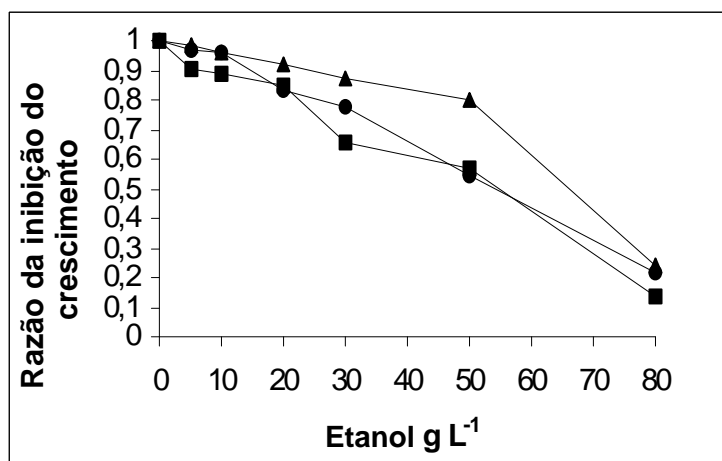


Figura 6 – Efeito do etanol sobre o crescimento de *Kluveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado com concentrações iniciais de lactose próximas de 85 g L⁻¹ em aerobiose () e microaerobiose () e 65 g L⁻¹ em anaerobiose ().

4.6. Produção de etanol, glicerol e ácidos orgânicos por *Kluveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado de soro de queijo sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica

A produção de ácidos orgânicos esteve abaixo dos limites de detecção do cromatógrafo. Os valores máximos das concentrações de glicerol e etanol foram maiores em anaerobiose e microaerobiose do que em aerobiose (Tabela 9). Esse resultado indica que os maiores níveis de etanol em níveis reduzidos de oxigênio (microaerobiose e anaerobiose) são acompanhados pelo aparecimento de glicerol. Observou-se também que, nos três níveis de oxigênio testados, houve tendência de aumento da concentração máxima de etanol e glicerol em função do incremento da concentração de substrato.

Tabela 9 – Efeito da concentração de substrato e nível de oxigênio sobre a produção máxima de etanol e glicerol por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 sobre permeado de soro de queijo

| So ^a | Aerobiose | | Microaerobiose | | Anaerobiose | |
|-----------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| | Etanol ^b | Glicerol ^c | Etanol ^b | Glicerol ^c | Etanol ^b | Glicerol ^c |
| 1,00 | n.d. | 0,12 | 0,26 | 0,11 | NR ^d | NR ^d |
| 5,00 | 0,48 | 0,30 | 1,57 | 0,31 | NR ^d | NR ^d |
| 10,0 | 0,81 | 0,21 | 3,87 | 0,29 | 2,36 | 0,60 |
| 25,0 | 1,84 | 0,42 | 9,47 | 0,72 | 9,52 | 2,30 |
| 50,0 | 7,2 | 1,1 | 23,5 | 1,62 | 24,44 | 1,98 |
| 65,0 | 13,4 | 1,04 | 35,7 | 2,70 | 30,60 | 4,04 |
| 85,0 | 23,3 | 1,15 | 46,0 | 3,67 | 43,70 | 7,73 |
| 130,0 | 33,1 | 2,40 | 66,7 | 4,45 | 68,70 | 6,40 |
| 170,0 | 45,77 | 2,51 | 76,0 | 6,30 | 80,04 | 12,40 |
| 240,0 | 57,00 | 2,42 | 59,8 | 3,50 | 64,17 | 9,90 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose (g L⁻¹).

^b Concentração máxima de etanol (g L⁻¹).

^c Concentração máxima de glicerol (g L⁻¹).

^d Não realizado.

n.d. Não detectável.

Fermentações realizadas em maiores concentrações iniciais de lactose produziram maiores níveis de etanol. Mas, em condições microaeróbicas e anaeróbicas, nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram de 240 g L⁻¹ a produção de etanol foi menor que a observada na fermentação com concentração inicial de lactose de 170 g L⁻¹. Na concentração de 240 g L⁻¹, observou-se que somente a metade dessa concentração foi consumida em microaerobiose e anaerobiose, enquanto na concentração de lactose de 170 g L⁻¹ praticamente toda a lactose foi consumida do meio de fermentação, isto é, 170 g L⁻¹ e 155 g L⁻¹ na microaerobiose e anaerobiose, respectivamente. As concentrações máximas de etanol obtidas neste estudo foram de 76 g L⁻¹ e 80 g L⁻¹, nas fermentações com concentrações iniciais de lactose de 170 g L⁻¹ sob a microaerobiose e anaerobiose, respectivamente (Tabela 9).

4.7. Parâmetros fermentativos da produção de etanol de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado de soro de queijo, nas condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica

Comparando, na Tabela 10, os rendimentos máximos de etanol por substrato ($Y_{P/S}$ máx), observa-se a similaridade entre as fermentações sob condições anaeróbica e microaeróbica, bem como a superioridade dessas em relação à fermentação sob a condição aeróbica. Com o aumento da concentração inicial de substrato, verificou-se uma tendência de incremento nos rendimentos máximos de etanol por substrato nos três níveis de oxigênio testados (Tabela 10). Os dois maiores rendimentos máximos de etanol por substrato obtidos em aerobiose foram similares a $0,39 \text{ g g}^{-1}$ e $0,38 \text{ g g}^{-1}$, nas fermentações cujas concentrações iniciais eram de $126,0 \text{ g L}^{-1}$ e $167,4 \text{ g L}^{-1}$ de lactose, respectivamente (Tabela 10). O rendimento de $0,39 \text{ g g}^{-1}$ ocorreu com 24 horas de fermentação, quando $61,0 \text{ g L}^{-1}$ (48,4%) da lactose haviam sido consumidos, já o de $0,38 \text{ g g}^{-1}$ foi obtido com 48 horas de fermentação, com um consumo de $132,6 \text{ g L}^{-1}$ de lactose (79,2%). Pode-se verificar que o rendimento teórico com relação aos referidos acima foi de 72,0 e 71,0%, respectivamente. Na Tabela 10, mostra-se que em microaerobiose, a partir da fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de $46,0 \text{ g L}^{-1}$, os rendimentos máximos de etanol por substrato em cada concentração de substrato foram superiores a $0,51 \text{ g g}^{-1}$. Nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram de $46,0 \text{ g L}^{-1}$; $69,80 \text{ g L}^{-1}$; $86,0 \text{ g L}^{-1}$; $127,0 \text{ g L}^{-1}$; $176,0 \text{ g L}^{-1}$; e $244,0 \text{ g L}^{-1}$, os rendimentos máximos de etanol por substrato e os rendimentos teóricos da conversão de lactose a etanol foram de $0,51 \text{ g g}^{-1}$ (94,8%), $0,52 \text{ g g}^{-1}$ (96,6%), $0,535 \text{ g g}^{-1}$ (99,44%), $0,53 \text{ g g}^{-1}$ (98,5%), $0,53 \text{ g g}^{-1}$ (98,5%) e $0,534 \text{ g g}^{-1}$ (99,25%), respectivamente. Esses rendimentos foram obtidos com 72 horas de fermentação nas concentrações iniciais de lactose referidas anteriormente, com exceção da concentração de $176,0 \text{ g L}^{-1}$, que foi obtida com 48 horas de fermentação. O maior $Y_{P/S}$ máx foi alcançado na concentração inicial de $85,8 \text{ g L}^{-1}$ de lactose, com o completo consumo de lactose. Em anaerobiose semelhante ao ocorrido em microaerobiose, a partir da fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de $48,0 \text{ g L}^{-1}$, os rendimentos máximos de etanol ($Y_{P/S}$ máx) em cada fermentação foram superiores ou iguais a

Tabela 10 – Rendimento máximo de etanol por substrato ($Y_{P/S}$ máx) $g\ g^{-1}$ e rendimento teórico obtido por *K. marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em 10 diferentes concentrações de permeado, sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica

| Aerobiose | | | | | Microaerobiose | | | | | Anaerobiose | | | | |
|-----------------|----------------------------|-------------|-----------|--------------------|-----------------|----------------------------|-------------|-----------|--------------------|-----------------|---------------|-------------|-----------|--------------------|
| So ^a | $Y_{P/S}$ máx ^b | Y teórico % | Tempo (h) | C. L. ^c | So ^a | $Y_{P/S}$ máx ^b | Y teórico % | Tempo (h) | C. L. ^c | So ^a | $Y_{P/S}$ máx | Y teórico % | Tempo (h) | C. L. ^c |
| 1,23 | n.d. | | | | 1,40 | 0,202 | 37,54 | 24 | 92,14 | NR ^d | | | | |
| 5,42 | 0,104 | 19,33 | 24 | 85 | 5,8 | 0,373 | 69,33 | 8 | 35,8 | NR ^d | | | | |
| 10,90 | 0,102 | 18,95 | 24 | 73 | 11,10 | 0,354 | 65,79 | 72 | 98,64 | 9,30 | 0,424 | 78,81 | 12 | 48,93 |
| 26,00 | 0,105 | 19,51 | 24 | 67 | 26,10 | 0,406 | 75,55 | 12 | 58,28 | 22,6 | 0,453 | 84,2 | 24 | 88,46 |
| 48,60 | 0,273 | 50,74 | 6 | 7,6 | 46,00 | 0,510 | 94,8 | 72 | 100,0 | 48,20 | 0,520 | 96,65 | 48 | 98,56 |
| 62,8 | 0,271 | 50,37 | 14 | 32,7 | 69,70 | 0,520 | 96,09 | 72 | 100,0 | 65,60 | 0,530 | 98,50 | 14 | 37,43 |
| 84,0 | 0,343 | 63,75 | 24 | 62,1 | 85,80 | 0,535 | 99,44 | 72 | 100,0 | 87,40 | 0,510 | 94,80 | 14 | 28,66 |
| 126,0 | 0,39 | 72,0 | 24 | 48,2 | 127,0 | 0,530 | 98,51 | 72 | 100,0 | 133,00 | 0,520 | 96,65 | 72 | 99,53 |
| 167,4 | 0,38 | 71,0 | 48 | 79,2 | 176,0 | 0,530 | 98,51 | 48 | 66,24 | 171,0 | 0,510 | 94,80 | 72 | 91,37 |
| 247,0 | 0,348 | 64,7 | 72 | 66,4 | 244,0 | 0,534 | 99,25 | 72 | 43,07 | 237,0 | 0,530 | 98,50 | 96 | 50,62 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose em $g\ L^{-1}$.

^b Rendimento máximo de etanol por substrato em $g\ g^{-1}$.

^c Consumo de lactose em %.

^d Não realizada.

n.d. Não detectável.

0,51 $g\ g^{-1}$. Esses rendimentos e respectivos valores teóricos foram de 0,52 $g\ g^{-1}$ (96,65%), 0,53 $g\ g^{-1}$ (98,5%), 0,51 $g\ g^{-1}$ (94,8%), 0,52 $g\ g^{-1}$ (96,65%), 0,51 $g\ g^{-1}$ (94,80%) e 0,53 $g\ g^{-1}$ (98,5%), nos cultivos com concentrações iniciais de 48,21 $g\ L^{-1}$; 65,64 $g\ L^{-1}$; 87,39 $g\ L^{-1}$; 133,07 $g\ L^{-1}$; 171,0 $g\ L^{-1}$; e 237,0 $g\ L^{-1}$ de lactose, respectivamente (Tabela 10). O rendimento máximo de etanol foi maior na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 87,4 $g\ L^{-1}$, com 48 horas de fermentação, porém apenas 37,43% da lactose foi consumida (24,57 $g\ L^{-1}$). O mesmo rendimento ($Y_{P/S}$ máx), 0,53 $g\ g^{-1}$, foi obtido na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 237,0 $g\ L^{-1}$ com 96 horas de fermentação; com um consumo de 119,96 $g\ L^{-1}$ desse açúcar (50,76%). Nesse mesmo período foi obtido o rendimento máximo de etanol ($Y_{P/S}$ $g\ g^{-1}$ máx), 0,53 $g\ g^{-1}$, para fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 171,0 $g\ L^{-1}$. Em anaerobiose semelhante ao ocorrido em microaerobiose, a partir da fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 48,20 $g\ L^{-1}$, os rendimentos máximos de etanol ($Y_{P/S}$ $g\ g^{-1}$ máx) para cada cultivo foram

superiores a $0,51 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. Esses rendimentos e seus rendimentos teóricos de conversão de lactose a etanol foram de $0,52 \text{ g g}^{-1}$ (96,65%), $0,53 \text{ g g}^{-1}$ (98,5%), $0,51 \text{ g g}^{-1}$ (94,8%), $0,52 \text{ g g}^{-1}$ (96,65%), $0,51 \text{ g g}^{-1}$ (94,8%) e $0,53 \text{ g g}^{-1}$ (98,5%), nas fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram de $48,20 \text{ g L}^{-1}$; $65,6 \text{ g L}^{-1}$; $87,4 \text{ g L}^{-1}$; $133,0 \text{ g L}^{-1}$; $171,0 \text{ g L}^{-1}$; e $237,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. O rendimento máximo de etanol em anaerobiose foi maior na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de $65,60 \text{ g L}^{-1}$, durante o período de 14 horas de fermentação, porém apenas $24,57 \text{ g L}^{-1}$ da lactose (37,43%) foram consumidos. O mesmo rendimento ($Y_{P/S} \text{ máx}$), $0,53 \text{ g g}^{-1}$, foi obtido na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de $237,0 \text{ g L}^{-1}$, durante 96 horas de fermentação, quando se observou um consumo de $119,96 \text{ g L}^{-1}$ (50,76%) desse açúcar. Nesse mesmo período foi obtido o $Y_{P/S} \text{ máx}$, $0,51 \text{ g g}^{-1}$, na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de $171,0 \text{ g L}^{-1}$ (Tabela 10).

Na Tabela 11, mostra-se que rendimentos máximos de etanol por massa celular ($Y_{P/X} \text{ máx}$) foram maiores nas fermentações sob a condição anaeróbica em relação às fermentações nas condições microaeróbica e anaeróbica. As fermentações sob a condição microaeróbica apresentaram rendimentos máximos de etanol por massa celular ($Y_{P/X} \text{ máx}$) maiores que os $Y_{P/X} \text{ máx}$ obtidos em aerobiose. Observa-se também, nessa tabela, uma tendência de aumento nos $Y_{P/X} \text{ máx}$ em função do aumento na concentração inicial de substrato nos três níveis de oxigênio testados. Em condição aeróbica, o rendimento máximo de etanol por massa celular ($Y_{P/X} \text{ máx}$)-(g g^{-1}) foi maior, $5,46 \text{ g g}^{-1}$, na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de $247,0 \text{ g L}^{-1}$ (Tabela 9). Esse rendimento foi obtido com 48 horas de fermentação, em que $141,19 \text{ g L}^{-1}$ (57,1%) da lactose foram consumidos (Tabela 11). Em microaerobiose, observou-se que o $Y_{P/X} \text{ máx}$, $19,0 \text{ g g}^{-1}$, foi alcançado na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de $127,1 \text{ g L}^{-1}$, com 72 horas de fermentação quando a lactose foi completamente consumida. Nas condições anaeróbicas, o maior ($Y_{P/X} \text{ máx}$)-(g g^{-1}), $35,9 \text{ g g}^{-1}$, foi obtido na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de $237,0 \text{ g L}^{-1}$, com oito horas de fermentação, quando apenas 2,65% da lactose foi consumida ($6,28 \text{ g L}^{-1}$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Rendimento máximo de etanol por massa celular ($Y_{P/X}$ máx)-(g g⁻¹) obtido por *K. marxianus* UFV-3 em permeado com 10 diferentes concentrações de lactose, sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica

| Aerobiose | | | | Microaerobiose | | | | Anaerobiose | | | |
|-----------------|----------------------------|-----------|--------------------|-----------------|----------------------------|-----------|--------------------|-----------------|----------------------------|-----------|--------------------|
| So ^a | $Y_{P/X}$ máx ^b | Tempo (h) | C. L. ^c | So ^a | $Y_{P/X}$ máx ^b | Tempo (h) | C. L. ^c | So ^a | $Y_{P/X}$ máx ^b | Tempo (h) | C. L. ^c |
| 1,23 | n.d. | | | 1,40 | 0,65 | 12 | 64,61 | | NR ^d | | |
| 5,42 | 0,63 | 24 | 85 | 5,8 | 2,74 | 24 | 100 | | NR ^d | | |
| 10,90 | 0,67 | 24 | 73,9 | 11,10 | 4,01 | 48 | 98,73 | 9,30 | 7,18 | 14 | 60,66 |
| 26,00 | 0,73 | 24 | 67 | 26,10 | 6,55 | 24 | 100 | 22,6 | 9,67 | 24 | 88,46 |
| 48,60 | 2,23 | 6 | 7,6 | 46,00 | 9,89 | 24 | 100 | 48,20 | 14,2 | 8 | 7,72 |
| 62,8 | 1,96 | 48 | 99 | 69,70 | 11,0 | 72 | 100 | 65,60 | 18,6 | 6 | 5,63 |
| 84,0 | 3,37 | 24 | 62,9 | 85,80 | 13,5 | 48 | 100 | 87,40 | 16,8 | 48 | 100 |
| 126,0 | 3,71 | 24 | 48,2 | 127,0 | 19 | 72 | 100 | 133,00 | 26,3 | 6 | 4,12 |
| 167,0 | 4,9 | 48 | 79,2 | 176,0 | 17,3 | 96 | 100 | 171,0 | 24,9 | 72 | 91,37 |
| 247,0 | 5,46 | 48 | 57,1 | 244,0 | 15,9 | 96 | 48,98 | 237,0 | 35,9 | 8 | 2,64 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose g L⁻¹.

^b Rendimento máximo de etanol em relação à massa celular (g g⁻¹).

^c Consumo de lactose em %.

^d Não realizada.

n.d. Não detectável.

As produtividades máximas volumétricas (Q_P máx)-(g L⁻¹ h⁻¹) foram similares nas fermentações sob as condições anaeróbicas e microaeróbicas, com exceção da fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de 130 g L⁻¹, em que a Q_P máx sob a anaerobiose foi de aproximadamente 193,6% maior que em microaerobiose e na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de 240 g L⁻¹, em que a Q_P máx sob a condição microaeróbica foi de 202,2% maior que sob a anaerobiose (Tabela 12). Verificou-se ainda que a Q_P máx na fermentação sob a condição aeróbica foi menor que as obtidas em microaerobiose e anaerobiose, com exceção da fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de 240,0 g L⁻¹, maior que aquela fornecida pela condição anaeróbica, mas menor que a fornecida pela condição microaeróbica. Outro fato que chama a atenção é a tendência do aumento Q_P máx com o incremento da concentração inicial de substrato nos três níveis de oxigênio. Em aerobiose, a maior produtividade máxima volumétrica (Q_P máx)-(g L⁻¹ h⁻¹) foi de 1,33 g L⁻¹ h⁻¹, sendo obtida na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 167,4 g L⁻¹ (Tabela 12).

Essa produtividade foi alcançada com 24 horas de fermentação com um consumo de 90,2 g L⁻¹ de lactose (53,85%). Sob a condição microaeróbica, a Q_P máx (1,49 g L⁻¹ h⁻¹) foi maior na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi de 167,0 g L⁻¹ com 24 horas de fermentação, quando 99,31 g L⁻¹ de lactose (40,7%) haviam sido consumidos. Em anaerobiose, Q_P máx foi maior na fermentação com concentração inicial de lactose de 87,4 g L⁻¹ com 24 horas de fermentação, quando 62,11 g L⁻¹ (71,07%) da lactose tinham sido consumidos (Tabela 12).

Tabela 12 – Produtividade máxima volumétrica (Q_P máx)-(g L⁻¹ h⁻¹) obtida por *K. marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado com 10 diferentes concentrações de lactose, sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica

| Aerobiose | | | | Microaerobiose | | | | Anaerobiose | | | |
|-----------------|---------------------------------|-----------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------|--------------------|-----------------|---------------------------------|-----------|--------------------|
| So ^a | Q _P máx ^b | Tempo (h) | C. L. ^c | So ^a | Q _P máx | Tempo (h) | C. L. ^c | So ^a | Q _P máx ^b | Tempo (h) | C. L. ^c |
| 1,23 | n.d. | 0 | | 1,40 | 0,0142 | 10 | 64,3 | | NR ^d | | |
| 5,42 | 0,020 | 24 | 85 | 5,8 | 0,152 | 6 | 36,92 | | NR ^d | | |
| 10,90 | 0,034 | 24 | 73 | 11,10 | 0,158 | 6 | 24,82 | 9,30 | 0,168 | 14 | 60,64 |
| 26,00 | 0,070 | 24 | 67 | 26,10 | 0,620 | 14 | 76,04 | 22,6 | 0,377 | 24 | 88,46 |
| 48,60 | 0,300 | 24 | 63,3 | 46,00 | 0,920 | 24 | 100 | 48,20 | 0,600 | 24 | 83,07 |
| 62,8 | 0,400 | 14 | 32,7 | 69,70 | 1,200 | 24 | 96,08 | 65,60 | 0,930 | 14 | 37,43 |
| 84,0 | 0,740 | 24 | 62,1 | 85,80 | 1,170 | 14 | 35,48 | 87,40 | 1,300 | 24 | 71,07 |
| 126,0 | 0,980 | 24 | 48,2 | 127,0 | 1,410 | 24 | 50,7 | 133,00 | 1,150 | 48 | 94,68 |
| 167,0 | 1,330 | 24 | 53,85 | 176,0 | 1,490 | 24 | 40,7 | 171,0 | 1,050 | 48 | 67,89 |
| 247,0 | 1,100 | 24 | 41,3 | 244,0 | 0,860 | 48 | 30,48 | 237,0 | 0,860 | 24 | 20,64 |

^a Fermentação com concentração inicial de lactose em g L⁻¹.

^b Produtividade volumétrica máxima (Q_P máx)-(g L⁻¹ h⁻¹).

^c Consumo de lactose em %.

^d Não realizada.

n.d. Não detectável.

4.8. Efeito da concentração de substrato e do nível de oxigênio nas velocidades de consumo de lactose e de produção de etanol de *Kluyveromyce marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado de soro de de queijo, sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica

Com o aumento da concentração inicial de substrato houve uma tendência de elevação na velocidade de consumo de lactose-($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$), nas fermentações sob as condições aeróbica, microaeróbica e anaeróbica (Figura 7). Entretanto, em aerobiose e microaerobiose esse aumento ocorreu até as fermentações cujas concentrações iniciais de lactose foram próximas a 170 g L^{-1} , atingindo velocidades de consumo de $6,8 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ e $5,8 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ e, a partir dessas, diminuindo para $5,7 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ e $5,1 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente. Em anaerobiose, a velocidade de consumo foi maior na fermentação cuja concentração inicial de lactose foi próxima de $240,0 \text{ g L}^{-1}$, alcançando uma velocidade de consumo de $7,6 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Observou-se que a velocidade de consumo na fermentação sob a condição anaeróbica foi maior do que a de consumo, nas fermentações sob as condições microaeróbica e aeróbica, em todas as concentrações iniciais de substrato testadas. A fermentação na condição microaeróbica apresentou velocidades de consumo maiores que a fermentação na condição aeróbica até a concentração inicial de lactose próxima de 130 g L^{-1} . A partir dessa concentração, a fermentação aeróbica apresentou velocidades de consumo superiores (Figura 7).

A velocidade de produção de etanol ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) teve uma tendência de aumento com a elevação da concentração inicial de substrato (Figura 8). A fermentação em anaerobiose apresentou velocidades de produção de etanol maiores que as fermentações nas condições aeróbica e microaeróbica, em todas as concentrações iniciais de substrato estudadas. Na fermentação em microaerobiose, as velocidades de produção de etanol foram maiores que as apresentadas pela fermentação na condição aeróbica.

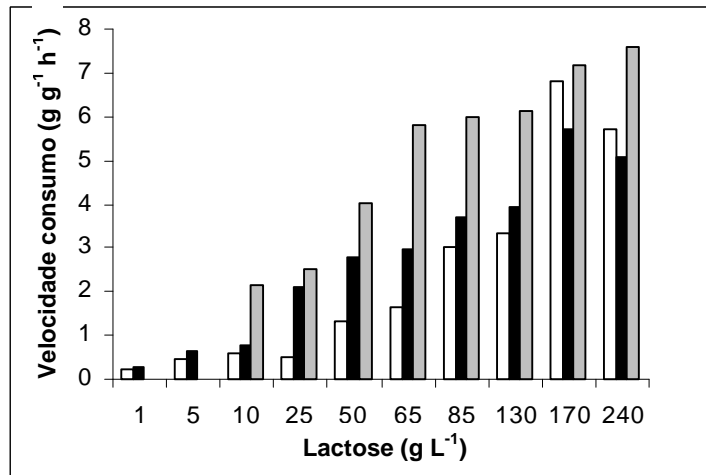


Figura 7 – Velocidade de consumo de lactose ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) obtida por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 sob as condições aeróbica (), microaeróbica () e anaeróbica (), em permeado com diferentes concentrações de lactose.

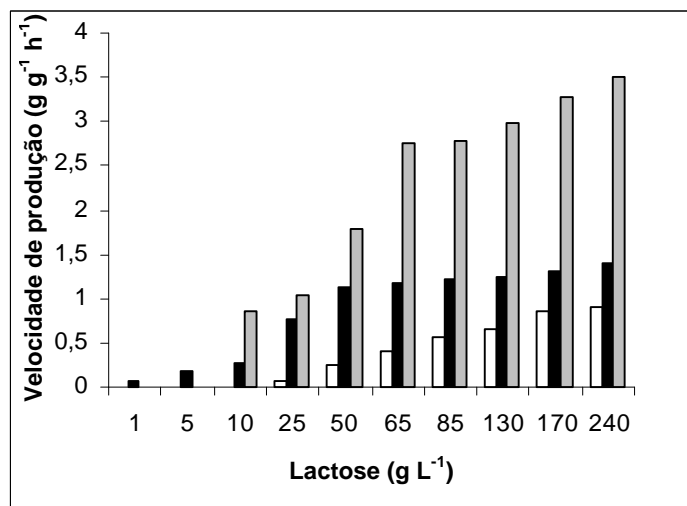


Figura 8 – Velocidade de produção de etanol ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) obtida por *K. marxianus* UFV-3 sob as condições aeróbicas (), microaeróbicas () e anaeróbicas (), em permeado com diferentes concentrações de lactose.

5. DISCUSSÃO

O fluxo do metabolismo fermentativo de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 como resposta a altas concentrações de lactose foi investigado inicialmente em meio sintético YNB acrescido desse açúcar. Essa capacidade de canalizar todo o açúcar para a via fermentativa é de fundamental importância na escolha de leveduras com potencial para produzir etanol a partir do permeado de soro de queijo (permeado), pois o caráter diluído da lactose presente no permeado (4,5-5% p/v) torna o processo inviável economicamente. Tal problema seria contornado pela concentração da lactose, o que já foi reconhecido ser capaz de diminuir os custos desse processo (MAWSON, 1994). Leveduras do gênero *Kluyveromyces* fazem parte de um pequeno grupo de leveduras capazes de assimilar lactose como fonte de carbono e energia e são reconhecidas como aquelas que apresentam metabolismo predominantemente oxidativo. Entretanto, *K. marxianus* UFV-3 mostrou-se apto a crescer e fermentar altas concentrações de lactose em meio YNB e, portanto, foi utilizada nos estudos de fermentação do permeado.

A velocidade específica máxima de crescimento (μ) em permeado aumentou até determinada concentração, a partir da qual se verificou uma diminuição da μ . Esses resultados concordam com os observados por Wang et al. (1987) e Ghaly e Taweel (1995). Segundo estes últimos autores, a inibição pelo substrato se deve ao aumento da pressão osmótica que leva à remoção de água do citoplasma ou previne o processo de difusão da água para o interior

celular. Fato interessante é que, em YNB, a μ foi maior nas fermentações com concentrações iniciais de lactose próximas de 180 g L^{-1} , enquanto em permeado μ aumentou até as fermentações com concentrações iniciais de lactose menores, próximas de 85 g L^{-1} em aerobiose e microaerobiose e de $65,60 \text{ g L}^{-1}$ em anaerobiose. Esses resultados possivelmente ocorreram porque, no permeado, não se concentrou apenas a lactose, mas outros fatores nutricionais nele presentes, inclusive sais minerais que, ao serem concentrados, contribuem para aumentar a pressão osmótica do meio. Tais resultados estão de acordo com a observação de Vienne e Stockar (1985) de que a desmineralização do permeado diminui o tempo necessário para fermentar completamente o permeado concentrado. Apesar de a μ em permeado sob as condições aeróbicas ter aumentado até uma menor concentração inicial de lactose, comparando com a fermentação em YNB, observou-se que, na fermentação em permeado com concentração inicial de lactose de $167,4 \text{ g L}^{-1}$, próxima de 180 g L^{-1} em YNB, a $\mu \text{ máx h}^{-1}$ foi maior que a obtida em YNB. Esse resultado indica que a concentração no permeado de outros fatores nutricionais, além da lactose e sais minerais como vitaminas e fontes de nitrogênio, permitiu que as fermentações em permeado atingissem maior μ .

Um aspecto importante em processos fermentativos é a capacidade de a levedura suportar os efeitos tóxicos do etanol por ela produzido durante a fermentação. A velocidade específica de crescimento de *K. marxianus* UFV-3 cultivada em permeado na presença de baixas concentrações de etanol foi similar ao controle. Mesmo na presença de altas concentrações de etanol (80 g L^{-1}), a levedura foi capaz de apresentar crescimento. Tais resultados parecem estar de acordo com os obtidos por Bajpai e Margaritis (1982), que detectaram reduzidas μ na presença de 80 g L^{-1} de etanol e inibição do crescimento de *K. marxianus* na presença de 95 g L^{-1} desse composto. A tolerância a etanol pela levedura *K. marxianus* UFV-3 foi maior que a apresentada por *Kluyveromyces fragilis*, 46 g L^{-1} , nos estudos de Vienne e Stockar (1983). Segundo Vienne e Stockar (1985), os efeitos tóxicos do etanol sobre leveduras abrangem desde a inibição da atividade das enzimas hexoquinase e álcool desidrogenase até a alteração da permeabilidade da

membrana celular. Segundo Heipieper et al. (2000), a maior resposta adaptativa apresentada por *Kluyveromyces lactis* ao etanol são mudanças na composição de ácidos graxos da membrana. *K. lactis*, ao contrário do que ocorre com *S. cerevisiae*, diminui a fluidez da membrana, por reduzir a insaturação dos ácidos nela presentes.

As menores massas celulares e os menores rendimentos celulares alcançados nas fermentações em YNB em relação ao permeado indicam que a concentração no permeado de fatores nutricionais como vitaminas e fontes de nitrogênio permitiu que as fermentações em permeado atingissem maior massa e rendimento celulares. Segundo Vienne e Stockar (1985), o conteúdo de vitaminas do permeado "in natura" foi um fator limitante do crescimento de *Kluyveromyces fragilis* em seus estudos. Essa observação parece realçar a idéia de que algum fator nutricional limitante do permeado ao ser concentrado permitiu maior crescimento de *K. marxianus* (UFV-3). Além disso, no laboratório, Silveira et al. (2001) também observaram maior μ e maior população máxima celular de *K. lactis* em permeado concentrado em relação ao permeado não-concentrado, acrescido apenas de lactose. Esses autores também atribuíram à concentração de fatores nutricionais no permeado concentrado o favorecimento do crescimento de *K. lactis*.

Verificou-se, tanto nas fermentações em YNB quanto nas fermentações em permeado, que a μ , a população máxima celular e o $Y_{X/S}$ máx $g\ g^{-1}$ foram maiores na presença de maior nível de oxigênio. Ghaly e Taweel (1995), estudando a influência da taxa de aeração na fermentação do permeado, observaram que o crescimento foi maior nas taxas maiores, devido à predominância do metabolismo respiratório. Constatou-se, em geral, que o aumento na concentração inicial de substrato reduziu o rendimento celular máximo e aumentou a concentração máxima de etanol e dos seus parâmetros fermentativos de produção.

Schaefer et al. (1985) notaram que *K. fragilis* foi capaz de fermentar o permeado concentrado sem perdas de rendimento de etanol. A fermentação do permeado concentrado por *K. marxianus* UFV-3 indicou que, além de não haver perda no rendimento de etanol, este foi favorecido por maiores concentrações de substrato. Portanto, o aumento na concentração de substrato favoreceu o metabolismo fermentativo.

Muitas questões a respeito da importância da concentração de açúcar no direcionamento do fluxo metabólico de leveduras respirofermentativas, como *K. marxianus*, vêm sendo discutidas na literatura. Em *S. cerevisiae* ficou bem-estabelecido que a concentração de açúcar apresenta papel primordial no direcionamento do metabolismo em favor da via fermentativa em condições aeróbicas (BREUNIG et al., 2000).

Em experimentos realizados em meio sintético com altas concentrações de lactose por Mehaia e Cheryan (1983), em permeado concentrado por Vienne e Stockar (1985) e em permeado acrescido de lactose por Ghaly e Taweel (1995), constatou-se que o aumento na concentração de substrato favoreceu a produção de etanol. Alguns autores como Kiers et al. (1998) atribuíram a baixa concentração de oxigênio ao maior fluxo do metabolismo fermentativo em leveduras *Kluyveromyces*. Aqueles autores, cultivando *K. lactis* em meio mínimo com 1% de glicose em erlenmeyers sob a aerobiose, detectaram consideráveis concentrações de etanol, mas o mesmo meio de fermentação conduzido em fermentadores continuamente aerados com etanol não foi produzido em nível detectável. Eles concluíram que a formação de etanol em erlenmeyers foi devida à inadequada aeração ou outros fatores que limitaram seu crescimento. Siso et al. (1996) relataram que em fermentações conduzidas em erlenmeyers os baixos níveis de oxigênio dissolvido foram devidos às altas concentrações de açúcar e biomassa no meio, favorecendo a produção de etanol.

É importante destacar que os estudos de Kiers et al. (1998) foram conduzidos com baixa concentração de glicose, diferentemente das altas concentrações de lactose no permeado concentrado. É possível que altas concentrações de açúcar possam vir a induzir maior capacidade de transporte do açúcar pela membrana celular. A capacidade de transporte tem sido atribuída por Fukuhara (2003) como a provável causa da ausência do efeito Kluyver em leveduras fermentativas como *S. cerevisiae*. Segundo esse autor, linhagens recombinantes de *K. lactis* com genes heterólogos para transportadores de galactose adicionais foram capazes de crescer nesse açúcar quando a cadeia de transporte de elétrons foi bloqueada, enquanto a linhagem selvagem não cresceu. Isso indicou que a capacidade de transporte do açúcar pela levedura é importante no crescimento dependente do

metabolismo fermentativo. A questão importante a ser elucidada é se altas concentrações de lactose são capazes de induzir aumento na capacidade de transporte ou, se para tal, a levedura necessita, além de altas concentrações, de maior número de transportadores para aumentar o nível de saturação inerente da espécie em questão.

É importante destacar que o alto poder fermentativo de *S. cerevisiae* em elevadas concentrações de glicose é atribuído ao grande número de transportadores que essa levedura possui, próximo de 20, o que permite acumular alta concentração de glicose no interior da célula, levando à repressão da transcrição de genes envolvidos no metabolismo respiratório. Verifica-se, portanto, que ainda são necessários estudos que possam elucidar o real papel das altas concentrações de açúcar no direcionamento do metabolismo para a via fermentativa.

Os menores rendimentos celulares e os maiores parâmetros fermentativos da produção de etanol em condições microaeróbica e anaeróbica em relação à aeróbica indicaram que o nível de oxigênio é um fator importante na conduta metabólica adotada pela levedura. Os rendimentos de produção de etanol em relação a substrato ($Y_{P/S}$ máx)-(g g⁻¹) em microaerobiose e anaerobiose foram próximos ao teórico na presença de concentrações elevadas de açúcar. Porém, esses rendimentos foram menores nas fermentações com menores concentrações iniciais de substrato, confirmando que o nível de oxigênio é um fator primordial para a presença de fermentação alcoólica em *K. marxianus* UFV-3, mas que altas concentrações também exercem papel importante para direcionar o fluxo do metabolismo para a via fermentativa. As velocidades de consumo de lactose evidenciaram que os aumentos na concentração de substrato, juntamente com o baixo nível de oxigênio, proporcionam aumento na velocidade de consumo, para sustentar um fluxo glicolítico suficientemente alto para produzir energia. Isso foi confirmado pelo aumento da velocidade de produção de etanol naquelas condições. Portanto, leveduras respirofermentativas como *K. marxianus* UFV-3 parecem direcionar o metabolismo para a via fermentativa em presença de altas concentrações de substrato e, principalmente, em menor nível de oxigênio.

Vienne e Stockar (1985) observaram que a velocidade de consumo de lactose e de produção de etanol diminuiu com o aumento da concentração de

permeado de 46,74 g L⁻¹ a 150,23 g L⁻¹. Esses resultados foram obtidos em regime contínuo em uma taxa de diluição D de 0,2 h⁻¹, enquanto nos experimentos em batelada desta pesquisa a velocidade máxima específica de crescimento foi maior que 0,2 h⁻¹, com exceção das fermentações em microaerobiose e anaerobiose, com concentrações iniciais de lactose de 244,0 g L⁻¹ e 237,0 g L⁻¹, respectivamente. Segundo Mawson (1994), a concentração do permeado é importante para minimizar os custos da produção de etanol, porém estes não são significativamente reduzidos em concentrações de lactose superiores a 120 g L⁻¹. Os rendimentos máximos de etanol ($Y_{P/S}$ máx) nas fermentações microaeróbica e anaróbica, cujas concentrações iniciais de lactose foram de 127,0 g L⁻¹ e 133,0 g L⁻¹, respectivamente, com 72 horas de fermentação, apresentaram alto rendimento teórico (Tabela 10). Tais resultados são interessantes, pois, além de apresentarem elevados rendimentos teóricos, eles ocorreram no período onde a concentração de etanol foi máxima (Tabela 9) e a lactose foi completamente consumida em microaerobiose e praticamente quase toda consumida em anaerobiose. Ghaly e Taweel (1995), trabalhando com *Candida Pseudotropicalis*, também obtiveram altos rendimentos com concentrações iniciais de lactose de 100 g L⁻¹ e 150 g L⁻¹, mas ainda foram menores que os relatados neste estudo; além disso, parte da lactose no trabalho daqueles autores não havia sido consumida. Schaefer et al. (1985), trabalhando com permeado com concentração inicial de 100 g L⁻¹ de lactose e suplementado com extrato de levedura, obtiveram alto rendimento (0,49 g g⁻¹), porém foram inferiores aos rendimentos máximos obtidos neste estudo (0,5 a 0,535 g g⁻¹).

A maior produção de glicerol em anaerobiose e microaerobiose indicou a importância desse metabólito na fisiologia da célula, especificamente na reoxidação de NADH em baixas concentrações de oxigênio. Nissen et al. (2000) discutiram que, em condições anaeróbicas, em que a cadeia transportadora de elétrons não é funcional, a produção de glicerol é uma via importante para reoxidar NADH e evitar o desbalanço da razão NAD⁺/NADH.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

A levedura *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, isolada de laticínios e previamente selecionada pela alta atividade de betagalactosidase, foi submetida a altas concentrações de lactose em meio YNB, para verificar seu crescimento e metabolismo fermentativos. Fermentar altas concentrações de lactose é de suma importância na produção de etanol de permeado de soro de queijo, pois o caráter diluído da lactose no soro impõe sua concentração para viabilizar o processo de produção e, sobretudo, de destilação do álcool.

Embora o gênero *Kluyveromyces* seja considerado de metabolismo oxidativo, o potencial fermentativo de *K. marxianus* UFV-3, em altas concentrações de lactose e sob a condição microaeróbica, foi demonstrado pelos altos rendimentos de etanol obtidos no meio YNB. Os parâmetros fermentativos da produção de etanol foram quase sempre maiores na condição microaeróbica que na aeróbica. O potencial fermentativo de *K. marxianus* UFV-3 foi também confirmado nas fermentações conduzidas em permeado com concentrações iniciais de lactose acima de 50 g L⁻¹, como se verificou pelos altos rendimentos de etanol por substrato e por massa celular obtidos em microaerobiose e anaerobiose e pela capacidade de tolerar concentrações de até 80 g L⁻¹ de etanol. *K. marxianus* UFV-3 manteve aproximadamente 60% de crescimento em aerobiose e microaerobiose e 80% de crescimento em anaerobiose na presença de 50 g L⁻¹ de etanol. Na presença 80 g L⁻¹ de etanol,

K. marxianus UFV-3 manteve um crescimento de aproximadamente 15% em aerobiose e 25% em microaerobiose e anaerobiose.

Os rendimentos de etanol por substrato ($Y_{P/S}$) em permeado foram maiores que os obtidos em YNB. As fermentações em altas concentrações de permeado sob a microaerobiose e a anaerobiose exibiram altos rendimentos de etanol por substrato, próximos de 100% do teórico. As fermentações em permeado cujas concentrações iniciais de lactose foram acima de 130,0 g L⁻¹, sob as condições microaeróbica ou anaeróbica, apresentaram um $Y_{P/S}$ teórico de 96 a 99% com 72 horas de fermentação, quando o consumo de lactose foi de aproximadamente 100% e a produção de etanol, máxima. A fermentação microaeróbica foi mais promissora que a anaeróbica devido ao menor tempo de injeção de gás nitrogênio, isto é, 12 minutos em relação às 96 horas em anaerobiose.

Além dos rendimentos de etanol por substrato que foram maiores nas fermentações em permeado em relação às fermentações em YNB, outras diferenças entre esses dois meios de fermentação com concentrações iniciais de lactose similares foram o crescimento, o consumo de lactose e a produção de glicerol. O maior crescimento em permeado foi provavelmente resultado da maior concentração de fatores nutricionais do permeado. A maior concentração de glicerol no sobrenadante das fermentações em permeado coincidiu com o maior consumo de lactose, indicando que a redução na pressão osmótica do meio tenha induzido a liberação do glicerol, que antes atuava como soluto compatível intracelular. Em baixos níveis de oxigênio (microaerobiose e anaerobiose), verificaram-se maiores concentrações de glicerol, confirmando a importância do glicerol para manter o balanço da oxidorredução do metabolismo fermentativo.

A elevação da velocidade de consumo de lactose, bem como da produção de etanol em permeado, à medida que a concentração de substrato aumenta e o nível de oxigênio diminui, foi primordial para canalizar o fluxo metabólico de *K. marxianus* UFV-3 para a via fermentativa. Porém, o nível de oxigênio foi determinante para que os rendimentos de etanol fossem próximos do teórico, indicando que a concentração de oxigênio seja mais relevante que a de açúcar no direcionamento do metabolismo para a via fermentativa.

Conclui-se, com os dados deste estudo, que *K. maxianus* UFV-3 apresenta potencial de produção de etanol de permeado de soro de queijo. Novos estudos poderão contribuir para a melhoria do processo, por exemplo, para incrementar o fluxo de fermentação e produtividade volumétrica, através do aumento de transportadores da lactose na membrana, aumentando sua concentração intracelular e induzindo, assim, maior fluxo da via fermentativa em detrimento da via oxidativa. Novos estudos poderão também contribuir para estabelecer um processo mais eficiente de produção de etanol de soro de queijo, em regime de batelada, com alimentação contínua do permeado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, E.; LARSSON, C.; LIDÉN, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae*. Anaerobic growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3187-3195, 1996.

ANUÁRIO MILKBIZZ. São Paulo: Milkbizz, 1999. 326 p.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; VAN MARIS, A. J. A.; KÖTTER, P.; LUTTIK, M. A. H.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, T. J. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 15-37, 2001.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2nd. ed. New York: McGraw-Hill, 1986.

BAJPAI, P.; MARGARITIS, A. Ethanol inhibition kinetics of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem artichoke juice. **Applied Environmental Microbiology**, v. 44, p.1325-1329, 1982.

BARBA, D.; BEOLCHINI, F.; DEL RE, G.; DI GAICOMO, G.; VEGLIÓ, F. Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch na fed-batch operations. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 531-536, 2001.

BREUNIG, K. D.; BOLOTIN-FUKUHARA, M.; BIANCHI, M.M.; BOURGAREL, D.; FALCONDE, I. F.; FRONTALI, L.; GOFFRINI, P.; KRIJGER, J. J.; MAZZONI, C.; MILKOWSKI, C.; STEENSMA, H. Y.; WÉSOLOWSI-LOUVEL, M.; ZEEMAN, A. M. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26 , p. 771-780, 2000.

DALLAS, P.; LAGRANGE, V. Aplicações de derivados de soro em produtos lácteos. **Indústria de Laticínios**, v. 2, n. 13, p. 49-51, 1998.

FUKUHARA, H. The kluuver effect revisited. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 327-331, 2003.

FILHO, M. A. A nata do soro. **Jornal da Unicamp**, v. 194, p. 2, 14 a 20 de outubro de 2002. Disponível em: <<http://www.unicamp/unicamp-hoje/jornalPDF/194-pag2.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2003.

FORSUM, E. Nutritional evaluation of whey protein concentrates and their fractions. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n. 6, p. 665-670, 1974.

GHALY, A. E.; EL-TAWEEL, A. A. Effect of Micro-aeration on the growth of *Candida pseudotropicalis* and production of ethanol during batch fermentation of cheese whey. **Bioresource Technology**, v. 52, p. 203-217, 1995.

HEIPIEPER, H. J.; ISKEN, S.; SALIOLA, M. Ethanol tolerance and membrane fatty acid adaptation in *adh* multiple and null mutants of *Kluyveromyces lactis*. **Res. Microbiol.**, v. 15, p. 777-784, 2000.

KIERS, J.; ZEEMAN, A. M.; LUTTIK, M.; THIELE, C.; CASTRILHO, J. I.; STEENSMA, H. Y.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Regulation of Alcoholic Fermentation in Batch and Chemostat Cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. **Yeast**, v. 14, p. 459-469, 1998.

KOSIKOWSKI, F.V. Whey utilization and whey products. **J. Dairy Science**, v. 62, p. 1149-1160, 1979.

KOURKOUTAS, Y.; DIMITROPOLOU, S.; KANELLAKI, M.; MARCHANT, R.; NIGAM, P.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 177-181, 2002.

KUMAR, V.; RAMAKRISHNAM, S.; FEEN, I. F.; KNOWLES, J. K. C.; HAETLEY, B.S. *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting and *Aspergillus niger* -galactosidase grow on permeate. **Biotechnology**, v. 10, p. 82-85, 1992.

KURTZMAM, C.P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4nd. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

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

MEHAIA, M. A.; CHERYAN, M. Hollow fibre bioreactor for ethanol production: application to the conversion of lactose by *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 6, p. 117-120, 1984.

MILKOWSKI, C.; KRAMPE, S.; WEIRICH, J.; HASSE, V.; BREUNIG, K. D. Feedback regulation of glucose transporter gene transcription in *Kluyveromyces lactis* by glucose uptake. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n.18, p.5223-5229, 2001.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology reviews**, v. 21, p. 231-241, 1997.

NISSEN, T. L.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; NIELSEN, J.; VILLADESEN, J. Optimization of ethanol production in *saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic Engineering**, v. 2, p. 69-77, 2000.

PREEZ, J. C.; SCHEFFERS, L. Thematic section "Yeast fermentations and other yeast bioprocess". **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 131, 2003.

PULITI, P. Governo brasileiro busca entrar no mercado americano de álcool. **Estado de São Paulo**. São Paulo, 27.02.2002. Disponível em: <<http://www.petruscommodities.com.br/Frameset-1-htm>>. Acesso em: 07 fev. 2004.

RAPIN, J. D.; MARISON, I. W.; STOCKAR, U.V.; REILLY, J. P. Glycerol production by yeast fermentation of whey permeate. **Enzyme Microbial Technology**, v. 16, p.143-149, 1994.

ROLLAND, F.; WINDERICK, J.; THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing mechanisms in eucaryotic cells. **Trends Biochem Sci.**, v. 26, p. 310-317, 2001.

RUBIO-TEIXERIA, M.; ARÉVALO-RODRÍGUEZ, M.; LEQUERICA, J. L. Lactose utilization by *Saccharomyces crevisiae* strains expressing *Kluyveromyces lactis* LAC genes. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 97-106, 2000.

RUSSEL, I. Will a recombinant DNA yeast be able to solve whey disposal problems? **Trends Biotechnology**, v. 4, p. 107-108, 1986.

SCHAEFER, O.; VIENNE, P.; STOCKAR, U.V. Alcohol production from whey permeate by yeast and by a thermophile strain. **Conservation & Recycling**, v. 8, n. 1/2, p. 153-164, 1985.

SILVEIRA, B. W.; SAMPAIO, C.F.; PASSOS, F.M.L. Kinetic of growth of *Kluyveromyces lactis* in concentrated ultrafiltered cheese whey. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 21. **Resumos...** [S.l.: s.n.], 2000. p. 344.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

SISO, M. I. G.; RAMIL, E.; CERDÁN, M. E.; PICOS, M. A. F. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 585-591, 1996.

SISO, M. I. G.; PICOS, M. A. F.; RAMIL, E.; GONZÁLEZ - DOMÍNGUEZ, M.; TORRES, A. R.; CERDÁN, M. E. Respirofermentative metabolismo in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 699-705, 2000.

TIN, C.S. F.; MAWSON, A. J. Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 217-221, 1993.

VIENNE, P.; STOCKAR, U.V. An investigation of ethanol inhibition and other limitations occurring during the fermentation of concentrated whey permeate by *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, v. 7, n. 7, p. 521-526, 1985.

VIENNE, P.; STOCKAR, U.V. Metabolic, physiological and kinetic aspects of the alcoholic fermentation of whey permeate by *Kluyveromyces fragilis* NRRL 665 and *Kluyveromyces lactis* NCYC 571. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 287-293, 1985.

ZEIKUS, J. G. Microbial ecophysiology of whey biomethanation: Intermediary metabolism of lactose degradation in continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 180-187, 1986.

WANG, C. J.; JAYANATA, Y.; BAJPAI, K. R. Effect of multiple substrates in ethanol fermentations from cheese whey. **J. Ferment. Technol**, v. 65, n. 3, p. 249-253, 1987.

APÉNDICE

APÊNDICE A

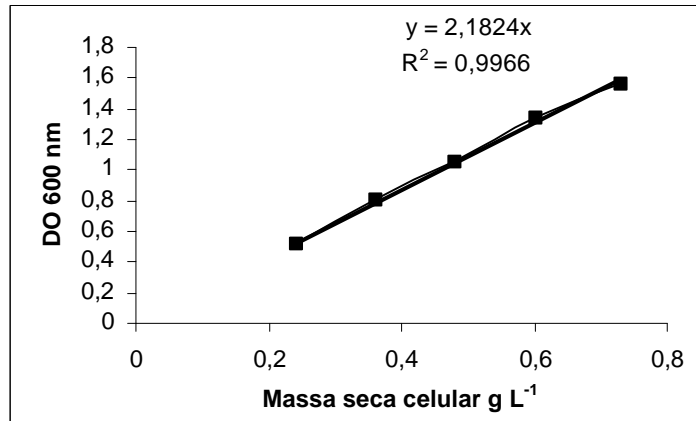


Figura 1A – Curva-padrão de massa seca celular de *K. marxianus* UFV-3 (g L⁻¹) em meio YNB sintético acrescido de 20 g L⁻¹ de lactose.

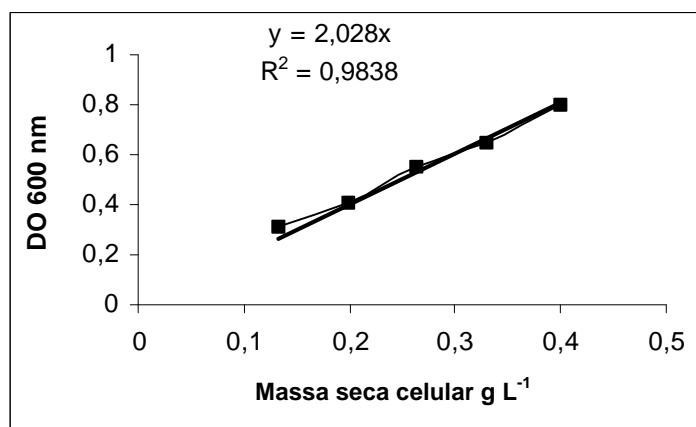


Figura 2A – Curva-padrão de massa seca celular de *K. marxianus* UFV-3 (g L⁻¹) em permeado de soro de queijo com concentração inicial de 20 g L⁻¹ de lactose.

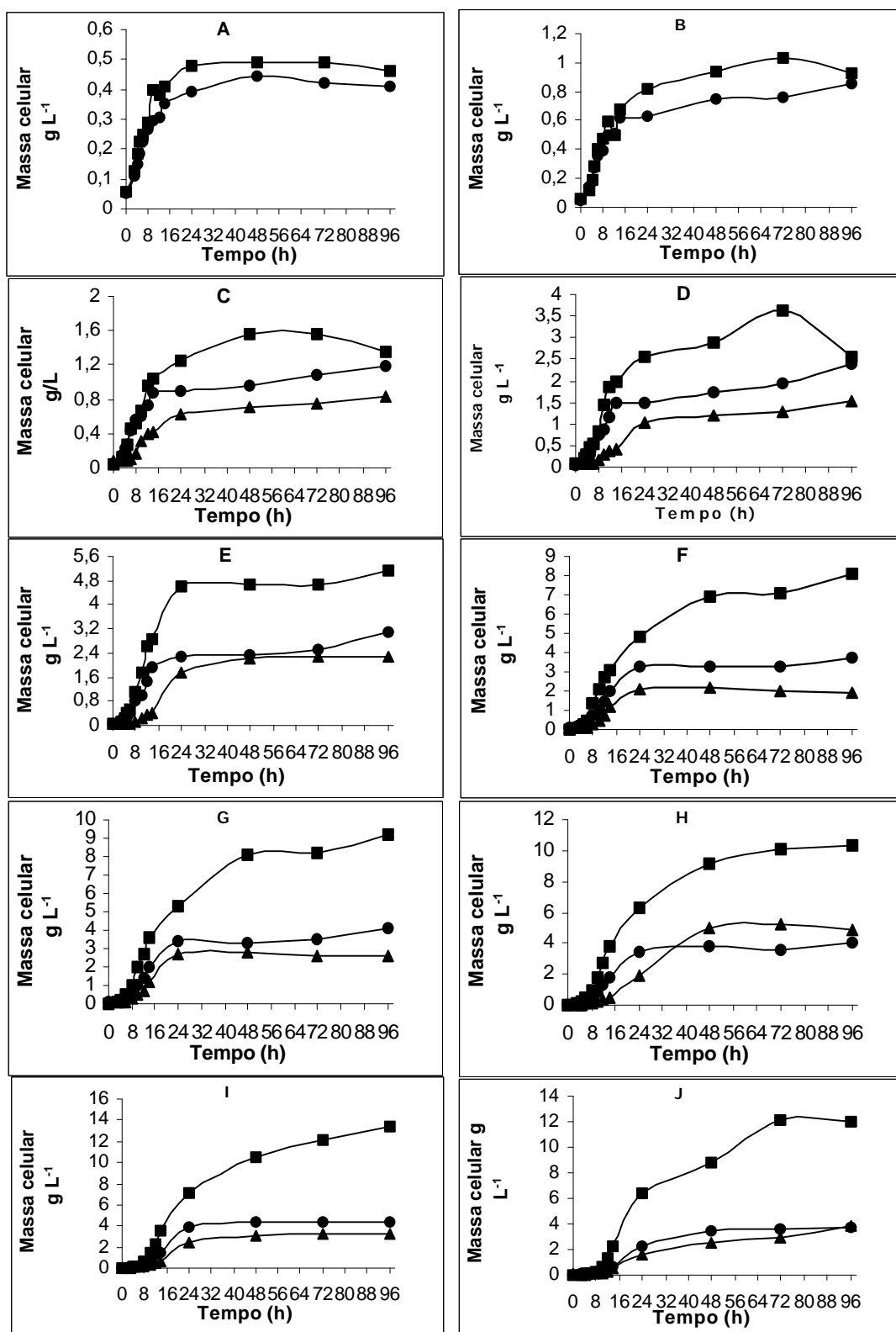


Figura 3A – Crescimento de *K. marxianus* UFV-3 nas fermentações realizadas em permeado com diferentes concentrações iniciais de lactose: 1,0 g L⁻¹ (A), 5,0 g L⁻¹ (B), 10,0 g L⁻¹ (C), 25,0 g L⁻¹ (D), 50,0 g L⁻¹ (E), 65,0 g L⁻¹ (F), 85,0 g L⁻¹ (G), 130,0 g L⁻¹ (H), 170,0 g L⁻¹ (I) e 240,0 g L⁻¹ (J), sob as condições aeróbica (■), microaeróbica (●) e anaeróbica (▲).