

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ENGENHARIA DE BIORREATORES CONTÍNUOS COM CÉLULAS
IMOBILIZADAS PARA A BIOCONVERSÃO DE SORO E PERMEADO DE SORO
DE QUEIJO À BIOETANOL**

Sabrina Gabardo

Porto Alegre
2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Escola de Engenharia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**ENGENHARIA DE BIORREATORES CONTÍNUOS COM CÉLULAS
IMOBILIZADAS PARA A BIOCONVERSÃO DE DE SORO E PERMEADO DE
SORO DE QUEIJO À BIOETANOL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química da UFRGS como um
dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em
Engenharia Química.

Sabrina Gabardo

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Msc.

Orientador: Prof. PhD. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosane Rech

Porto Alegre (RS), Brasil

Março de 2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Escola de Engenharia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese “Engenharia de biorreatores contínuos com células imobilizadas para a bioconversão de soro e permeado de soro de queijo à bioetanol”, elaborada por Sabrina Gabardo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Aline Schilling Cassini

Prof^a. Dr^a. Patrícia Valente da Silva

Prof^a. Dr^a. Giandra Volpato

AGRADECIMENTOS

Chegar neste momento e perceber que não faltam motivos para agradecer, que estive cercada por pessoas que tornaram essa caminhada mais leve e alegre, já é gratificante. Descrever isso em poucas linhas não é tarefa fácil para demonstrar minha eterna gratidão.

Agradeço ao meu orientador Marco Antônio Záchia Ayub pelos ensinamentos, pela dedicação, empenho e apoio realizados constantemente ao longo desse período. Pela compreensão, paciência e por sua amizade.

À minha co-orientadora Rosane Rech, por todo conhecimento transmitido, empenho e amizade, pela sempre pronta disposição no esclarecimento de dúvidas. Por toda dedicação e auxílio proporcionados incansavelmente durante todo esse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, por proporcionar condições para a realização deste trabalho, e à CAPES pela disponibilização da bolsa. Ao Patrício, pela pronta disposição e auxílio.

Aos colegas do Bioteclab pela amizade, cooperação e coleguismo. Em especial, à Débora Luvizetto Faccin pela amizade, disponibilidade e auxílio proporcionados em diversos momentos. Agradeço ao grupo pelos momentos alegres, de descontração e de apoio.

À minha querida bolsista Gabriela Feix Pereira, pela cooperação, auxílio, por estar comigo em todos os momentos, bons e nem tão bons assim, e pela amizade que se criou.

Às meninas do Laboratório de Enzimologia e ao professor Plinho Francisco Hertz pelas conversas, amizade e momentos de descontração, em especial à amiga Manuela Poletto Klein.

Aos meus amigos, por todo apoio, carinho e pela compreensão em muitos momentos que precisei estar ausente. Em especial à amiga Renata Dall' Agnol.

Aos meus queridos pais, Maria Helena e Hilário, faltam palavras de agradecimento. Muito obrigada por seus ensinamentos, pelo amor, paciência, e apoio, muitas vezes acreditando mais em mim do que eu mesma. A minha admiração por vocês é eterna. Vocês são exemplos para mim, meus verdadeiros mestres.

Aos meus irmãos Douglas e Cássio pelos bons e divertidos momentos, pelo apoio, carinho e amizade. Por acreditarem em meus ideais.

Às minhas queridas avós, Iolanda e Therezinha, pelas orações, torcida e carinho.

RESUMO

O soro e o permeado de soro de queijo, subprodutos da indústria de laticínios, constituem-se substratos alternativos, ricos em nutrientes e de grande potencial para a produção de etanol. Diante da necessidade de melhorias em processos fermentativos, a tecnologia de imobilização celular pode contribuir positivamente para processos mais eficazes e vantajosos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo aperfeiçoar a produção de etanol a partir de soro e permeado de soro de queijo por diferentes leveduras em biorreatores de células imobilizadas operados em regime batelada e em sistema contínuo, bem como representar matematicamente o bioprocessamento. Na primeira etapa deste trabalho, diferentes linhagens de *Kluyveromyces marxianus* e diferentes meios de cultivo foram testados em agitador rotacional e em biorreator de células imobilizadas, e os efeitos da taxa de diluição (D) e da concentração de substrato (C_{WP}) foram investigadas em biorreatores contínuos. Altos fatores de conversão ($Y_{EtOH/S}$) e de produtividade volumétrica (Q_P) foram obtidos pela linhagens *K. marxianus* CCT 4086 tanto em agitador rotacional quanto em biorreator com células imobilizadas em alginato de cálcio operado em regime batelada (0,47 g L⁻¹ e 2,53 g L⁻¹ h⁻¹). Diante disso, esta linhagem foi escolhida para os testes posteriores. Aumentos consideráveis nos parâmetros de fermentação ($Y_{EtOH/S}$ e Q_P) foram obtidos a partir do planejamento experimental hexagonal em biorreatores operados continuamente (0,51 g g⁻¹ e 6,01 g L⁻¹ h⁻¹). Melhorias no processo ainda foram alcançadas em biorreatores contínuos de dois estágios operados em sequência, em que alta produtividade volumétrica (6,97 g L⁻¹ h⁻¹) e concentração de etanol (70,4 g L⁻¹) foram observadas. Em uma segunda etapa deste trabalho, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram testadas para a bioconversão de soro e permeado de soro de queijo a etanol. Diferentes leveduras imobilizadas e estratégias de cultivo foram utilizadas para bioconverter meios não concentrados e concentrados, em biorreatores de leito fluidizado. Valores similares dos parâmetros fermentativos ($Y_{EtOH/S}$ e Q_P) foram obtidos para o monocultivo das linhagens de *S. cerevisiae* (CAT-1 e PE-2). O co-cultivo de *S. cerevisiae* CAT-1 e *K. marxianus* CCT 4086 aumentou em quatro vezes a produtividade volumétrica em permeado de soro de queijo e em 69 % em soro de queijo, mas não superou os altos valores obtidos pela monocultura de *K. marxianus* CCT 4086 (0,49 g g⁻¹ e 1,68 g L⁻¹ h⁻¹). Aumentos na concentração de etanol foram alcançados a partir de meio concentrado (79,1 g L⁻¹), e melhorias na produtividade volumétrica foram obtidas a partir de batelada repetida (2,8 g L⁻¹ h⁻¹). Em uma terceira etapa, foi realizada a modelagem matemática do bioprocessamento da produção de etanol por soro de queijo a partir de *K. marxianus* CCT 4086, linhagem esta que conferiu os melhores resultados ao longo deste trabalho. O sistema contínuo A-stat (*accelerostat technique*) foi utilizado, tanto para cultivos de células livres quanto imobilizadas, onde duas taxas de aceleração foram testadas. Quatro modelos matemáticos não estruturados foram analisados, levando em consideração a limitação pelo substrato e a inibição pelo produto. Os resultados mostraram que as taxas de diluição (D) e de aceleração (a) afetam a fisiologia e o metabolismo celular. O estado estacionário foi alcançado para a menor taxa de aceleração ($a = 0,0015$ h⁻²), e um alto fator de conversão foi obtido (0,52 g g⁻¹) nesta condição. A imobilização celular contribuiu para o aumento do fator de conversão em 23 % na condição de maior taxa de aceleração testada ($a = 0,00667$ h⁻²). Alto ajuste dos modelos preditivos para biomassa, substrato e produto foi obtido a partir da maior taxa de aceleração, contudo o fenômeno biológico foi melhor representado para a menor taxa de aceleração. Os modelos de Monod e de Levenspiel combinado com Ghose e Tyagi foram os mais apropriados para descrever o bioprocessamento.

Palavras-chave: soro e permeado de soro de queijo, etanol, imobilização celular, cultura contínua, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, modelagem de bioprocessos.

ABSTRACT

Whey and whey permeate, by-products of the dairy industry, are alternative substrates, rich in nutrients and with great potential for use in the ethanol production. Considering the need for improvements in fermentation processes, cell immobilization technology can positively contribute to more effective and advantageous bioprocesses. In this context, the aim of this work was to optimize the ethanol production from whey and whey permeate by different yeasts on immobilized batch fluidized bed bioreactors and in continuous systems, and also describe mathematically the bioprocess. In the first step, different strains of *K. marxianus* and cultivation media were tested in batch mode and the effects of dilution rate (D) and substrate concentration (C_{WP}) were investigated in continuous bioreactors. High ethanol yield ($Y_{EtOH/S}$) and ethanol productivities (Q_P) were obtained by *K. marxianus* CCT 4086, for both in shaker cultivation and in batch fluidized-bed bioreactors with immobilized cells in Ca-alginate (0.47 g L^{-1} e $2.53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). This strain was chosen for subsequent tests. Substantial increases in the fermentation parameters ($Y_{EtOH/S}$ e Q_P) were obtained from the hexagonal experimental design in continuous bioreactors (0.51 g g^{-1} e $6.01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Process improvements were achieved in two continuous fluidized-bed bioreactors operated in sequence, wherein high ethanol productivities ($6.97 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and concentrations (70.4 g L^{-1}) were obtained. Then, in a second step of this study, strains of *S. cerevisiae* were tested to bioconversion of lactose-hydrolysed whey and whey permeate into ethanol. Different immobilized strains in monoculture and co-culture were used to the bioconversion of not concentrated or concentrated mediums in batch fluidized bed bioreactors. Similar values of the fermentation parameters ($Y_{EtOH/S}$ e Q_P) were obtained for the strains *S. cerevisiae* (CAT-1 and PE-2). The co-culture of *S. cerevisiae* CAT-1 and *K. marxianus* CCT 4086 increased four times the ethanol productivity in lactose-hydrolyzed whey permeate and 69 % in lactose-hydrolyzed whey, but not attained the high values of *K. marxianus* CCT 4086 monoculture (0.49 g g^{-1} e $1.68 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Increases in the ethanol concentrations (79.1 g L^{-1}) were obtained from concentrated media, and improvement in ethanol productivities was obtained by repeated batch ($2.8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). In a third step, the mathematical modeling of the ethanol production from whey was performed, using *K. marxianus* CCT 4086 as biocatalyst due to the better results attained throughout of this work. The continuous A-stat system (accelerostat technique) was used for both free cell cultures and immobilized, and two acceleration rates were tested. Four unstructured mathematical models were analyzed, taking into account the limiting substrate and product inhibition. The results showed that the dilution rate (D) and the acceleration rate (a) affected cell physiology and metabolism. The steady state was attained for the lower acceleration rate ($a = 0.0015 \text{ h}^{-2}$), and in this condition a high ethanol yield was verified (0.52 g g^{-1}). Cell immobilization increased 23 % of the ethanol yield for the highest acceleration rate ($a = 0.00667 \text{ h}^{-2}$) tested. High fit of the predictive models of biomass, lactose and ethanol concentrations were obtained from the high acceleration rate, however the biological phenomenon was better described for the lower acceleration rate. Among the set of models evaluated, Monod and Levenspiel combined with Ghose and Tyagi models were found to be more appropriate for describing the bioprocess.

Keywords: whey and whey permeate, ethanol, cell immobilization, continuous culture, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, bioprocess modeling.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
NOMENCLATURA.....	xviii
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1 Soro de queijo e permeado de soro de queijo.....	4
1.1.1 Aplicações biotecnológicas de soro e de permeado de soro de queijo.....	5
1.1.2 Produção de etanol a partir de soro e de permeado de soro de queijo e sua relevância no mercado mundial.....	7
1.2 Leveduras produtoras de etanol.....	11
1.2.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	12
1.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.3 Imobilização celular.....	15
1.3.1 Envolvimento em alginato de cálcio.....	18
1.3.2 Efeitos da imobilização sobre a fisiologia de células.....	20
1.4 Biorreatores de células imobilizadas.....	21
1.5 Modelagem matemática do bioprocessos.....	26
CAPÍTULO II- MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1 Microrganismos e manutenção celular.....	31
2.2 Meios de cultivo.....	31
2.3 Imobilização celular: esferas de alginato de cálcio.....	32
2.4 Biorreator de coluna.....	33
2.4.1 Formas de condução do bioprocessos em biorreator de coluna.....	34
2.5. Avaliação da produção de etanol a partir de diferentes linhagens de <i>Kluyveromyces marxianus</i> em sistemas operados em regime batelada e em cultura contínua.....	35
2.5.1 Seleção de linhagens e meios de cultivo para a produção de etanol em agitador rotacional.....	36
2.5.2 Cultivos em biorreator de coluna de leito fluidizado sob diferentes formas de operação.....	37
2.6 Avaliação da produção de etanol a partir de diferentes linhagens de <i>Saccharomyces</i>	

<i>Cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> em sistemas operados em regime batelada e batelada repetida.....	40
2.6.1 Microrganismos.....	40
2.6.2 Meios de cultivo.....	40
2.6.3 Cultivos em biorreator de coluna de leito fluidizado.....	41
2.7 Avaliação da produção de etanol por sistema contínuo A-stat com células livres e imobilizadas e modelagem matemática do bioprocesso.....	42
2.7.1 Microrganismo e meio de cultivo.....	42
2.7.2 Sistema contínuo A-stat.....	43
2.7.3 Técnica de <i>Washout</i>	44
2.7.4 Modelagem matemática do bioprocesso.....	44
2.8 Métodos analíticos.....	48
2.8.1 Determinação de biomassa livre e imobilizada.....	48
2.8.2 Determinação de açúcares e etanol.....	48
INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS III, IV E V.....	49
CAPÍTULO III- DYNAMICS OF ETHANOL PRODUCTION FROM WHEY AND WHEY PERMEATE BY IMMOBILIZED STRAINS OF <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> IN BATCH AND CONTINUOUS BIOREACTORS.....	50
3.1 Introduction.....	52
3.2 Materials and methods.....	53
3.3 Results and discussion.....	57
3.4 Conclusions.....	68
CAPÍTULO IV- DYNAMICS OF IMMOBILIZED-CELLS SYSTEMS TO IMPROVE THE ETHANOL PRODUCTION FROM LACTOSE-HYDROLYZED WHEY AND WHEY PERMEATE ON BATCH FLUIDIZED BED BIOREACTORS.....	72
4.1 Introduction.....	74
4.2 Materials and methods.....	75
4.3 Results and discussion.....	78
4.4 Conclusions.....	88
CAPÍTULO V- THE MODELING OF ETHANOL PRODUCTION BY <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> USING WHEY AS SUBSTRATE IN CONTINUOUS A-STAT BIOREACTORS.....	91
5.1 Introduction.....	93

5.2 Materials and methods.....	95
5.3 Results and discussion.....	100
5.4 Conclusions.....	110
CAPÍTULO VI- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
PERSPECTIVAS.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
ANEXOS.....	136
ANEXO 1- Laudo do soro de queijo em pó fornecido pela empresa Elegê Laticínios S.A...	136
ANEXO 2- Laudo do permeado de soro de queijo em pó fornecido pela empresa Sooro.....	137
APÊNDICE.....	138
APÊNDICE A- BIOCONVERSÃO DE PERMEADO DE SORO DE QUEIJO A ETANOL.....	139
1 Introdução.....	140
2 Materiais e métodos.....	142
3 Resultados e discussão.....	143
APÊNDICE B- PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE PERMEADO E DE SORO DE QUEIJO EM BIORRETORES IMOBILIZADOS.....	149
1 Introdução.....	150
2 Materiais e métodos.....	152
3 Resultados e discussão.....	154
APÊNDICE C- BIOCONVERSÃO DE PERMEADO E SORO DE QUEIJO A ETANOL POR <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	159
1 Introdução.....	159
2 Materiais e métodos.....	160
3 Resultados e discussão.....	162
APÊNDICE D- APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE SORO E PERMEADO DE SORO DE QUEIJO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL POR <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	165
1 Introdução.....	165
2 Materiais e métodos.....	167
3 Resultados e discussão.....	168
APÊNDICE E- TESTES EM DIFERENTES SUPORTES E TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR	172

1 Introdução.....	172
2 Metodologia.....	173
3 Resultados e discussão.....	177

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I.....	4
Figura 1.1. Rota metabólica da fermentação da lactose em etanol.....	9
Figura 1.2. Métodos de imobilização celular: (A) ligação a superfícies sólidas, (B) aprisionamento em matrizes porosas, (C) floculação e (D) contenção por membranas.....	16
Figura 1.3. Formação de esferas de alginato de cálcio com células imobilizadas na matriz suporte.....	19
Figura 1.4. Biorreatores em coluna de células imobilizadas: (A) leito fixo ou empacotado, (B) leito fluidizado pela recirculação do meio, (C) leito fluidizado pelo sistema <i>airlift</i> , (D) leito fluidizado pelo sistema de coluna de bolhas.....	22
CAPÍTULO II.....	31
Figura 2.1 Processo de imobilização celular em esferas de alginato de cálcio	33
Figura 2.2. Biorreator de coluna de vidro utilizado neste trabalho.....	34
Figura 2.3. Formas de operação do biorreator de coluna de vidro: (A) regime batelada; (B) cultura contínua; (C) cultura contínua de dois estágios em sequência.....	35
Figura 2.4. Biorreator de leito fluidizado com células imobilizadas operado em regime batelada.....	38
Figura 2.5 Biorreator de coluna leito fluidizado com células imobilizadas operado continuamente.....	39
Figura 2.6. Sistema contínuo de produção de etanol utilizando a técnica A-stat com células livres.....	43
CAPÍTULO III.....	50
Figure 3.1. Profile of lactose consumption from whey under the experimental conditions of this work for the 2 groups of yeasts: group 1 (commonly used strains): <i>K. marxianus</i> CBS 6556, CCT 4086 and CCT 2653 (-■-) and group 2 (newly isolated): <i>K. marxianus</i> UFMG 95 302.2, 95 205.3 and 95 270.1 (-●-).....	60
Figure 3.2. Kinetics of lactose consumption (a), and ethanol production (b) of the three strains of <i>Kluyveromyces marxianus</i> in batch fluidized bed bioreactor at 30°C. <i>K. marxianus</i> CBS 6556 (-■-), <i>K. marxianus</i> CCT 4086 (-●-) and <i>K. marxianus</i> CCT 2653 (-▲-).....	62
Figure 3.3. Contour surface of ethanol yield (a), ethanol productivity (b) and residual sugar (c) from whey permeate fermentation by <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 on continuous	

fluidized-bed bioreactor at 30 °C as function of substrate concentration and dilution rate.....	65
CAPÍTULO IV.....	72
Figure 4.1. Kinetics of glucose and galactose consumption, and ethanol production in lactose-hydrolyzed whey (a) and lactose-hydrolyzed whey permeate (b) by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 on batch fluidized bed bioreactor at 30°C. Glucose (■), Galactose (●) and ethanol (▲).....	78
Figure 4.2. Kinetics of glucose and galactose consumption, and ethanol production in lactose-hydrolyzed whey (a) and lactose-hydrolyzed whey permeate (b) by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 on batch fluidized bed bioreactor at 30°C. Glucose (■), galactose (●) and ethanol (▲).....	79
Figure 4.3. Kinetics of glucose and galactose consumption, and ethanol production in lactose-hydrolyzed whey (a) and lactose-hydrolyzed whey permeate (b) by <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 on batch fluidized bed bioreactor at 30°C. Glucose (■), galactose (●) and ethanol (▲).....	81
Figure 4.4. Kinetics of glucose and galactose consumption, and ethanol production in lactose-hydrolyzed whey (a) and lactose-hydrolyzed whey permeate (b) by co-culture of <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 on batch fluidized bed bioreactor at 30°C. Glucose (■), galactose (●) and ethanol (▲).....	83
Figure 4.5. Kinetics of lactose, glucose and galactose consumption, and ethanol production in concentrated lactose-hydrolyzed whey by <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 monoculture (a), <i>K. marxianus</i> CCT 4086 (b) and co-culture of <i>K. marxianus</i> CCT 4086 and <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 (c) on immobilized batch bioreactor at 30°C. Lactose (*), glucose (■), galactose and (●) ethanol (▲).....	84
Figure 4.6. Repeated batches of fluidized bed cultivations of immobilized cells of <i>K. marxianus</i> CCT 4086 in concentrated lactose-hydrolyzed whey permeate at 30 °C: (a) kinetics of lactose, glucose and galactose consumption; (b) kinetics of total sugar consumption and ethanol production; (c) profile of ethanol productivity (Q_p) in the ten cycles batches. Lactose (*), glucose (■), galactose (●), total sugar (×), ethanol (▲), and ethanol productivity (◆)....	87
CAPÍTULO V.....	91
Figure 5.1. Continuous culture kinetics of biomass (A), lactose consumption (B), and ethanol production (C) in A-stat bioreactor with free cell culture of <i>K. marxianus</i> CCT 4086, at 30°C,	

using different constant acceleration rates: 0.00667 h ⁻² (<i>open circle</i>), and 0.0015 h ⁻² (<i>filled circle</i>).....	101
Figure 5.2. Comparison between the calculated specific growth rate (μ) from experimental data and the gradually increase of dilution rate (D) in the A-stat system with free cells culture of <i>K. marxianus</i> CCT 4086.....	103
Figure 5.3. Continuous culture kinetics profiles of (A) suspended biomass, lactose consumption, and ethanol production in A-stat bioreactor with immobilized <i>K. marxianus</i> CCT 4086, at 30°C, from constant acceleration rate of 0.00667 h ⁻² (B) and the biomass in the gel beads. Lactose (<i>circle</i>), ethanol (<i>diamond</i>), biomass (<i>asterisk</i>).....	104
Figure 5.4. Comparison of the experimental data with the models prediction curves of biomass, lactose and ethanol (A, B, C) without taking into account the m_s in r_s expression (Mon, Jrl, Hsw, LGT), and (D, E, F) considering m_s in r_s (Mon- m_s , Jrl- m_s , Hsw- m_s , LGT- m_s), in A-stat system ($a = 0.00667$ h ⁻²). Experimental data: lactose (<i>circle</i>); ethanol (<i>diamond</i>); biomass (<i>asterisk</i>). Models: Mon, Mon- m_s (—); Jrl, Jrl- m_s (-----); Hsw, Hsw- m_s (····); and LGT, LGT- m_s (----)......	107
Figure 5.5. Comparison of the experimental data with the models prediction curves of biomass, lactose and ethanol (A, B, C) without taking into account the m_s in r_s expression (Mon, Jrl, Hsw, LGT), and (D, E, F) considering m_s in r_s (Mon- m_s , Jrl- m_s , Hsw- m_s , LGT- m_s), in A-stat system ($a = 0.0015$ h ⁻²). Experimental data: lactose (<i>circle</i>), ethanol (<i>diamond</i>), biomass (<i>asterisk</i>). Models: Mon, Mon- m_s (—); Jrl, Jrl- m_s (-----); Hsw, Hsw- m_s (····); and LGT, LGT- m_s (----)......	109
APÊNDICE.....	138
<i>Apêndice A- Bioconversão de permeado de soro de queijo a etanol</i>	139
Figura 1. Cinética do consumo de lactose, produção de etanol e biomassa por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 crescida nos distintos meios de cultivo: permeado de soro de queijo (a); permeado de soro de queijo suplementado com extrato de levedura bruto (b); permeado de soro de queijo suplementado com extrato de levedura bruto e peptona (c). Lactose (■), etanol (●), biomassa (◆).....	145
<i>Apêndice B- Produção de etanol a partir de permeado e de soro de queijo em biorreatores imobilizados</i>	149
Figura 1. Representação esquemática do biorreator de coluna de leito fluidizado operado em regime batelada.....	154

Figura 2. Cinética do consumo de lactose e produção de etanol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 imobilizada, a 30 °C, em biorreator de leite fluidizado em meio soro de queijo (a) e meio permeado de soro de queijo (b). Lactose (■), etanol (●).....	156
<i>Apêndice C- Bioconversão de permeado e soro de queijo a etanol por Saccharomyces cerevisiae</i>	159
Figura 1. Cinética do consumo de glicose e galactose e produção de etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 em meio soro de queijo (a) e em permeado de soro de queijo (b). Glicose (■), Galactose (●), Etanol (▲).	163
<i>Apêndice D- Aproveitamento biotecnológico de soro e permeado de soro de queijo para a produção de etanol por Saccharomyces cerevisiae</i>	165
Figura 1. Cinética do consumo de glicose e galactose e produção de etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 em meio soro de queijo (a) e em permeado de soro de queijo (b). Glicose (■), Galactose (●), Etanol (▲).....	169
<i>Apêndice E- Testes em diferentes suportes e técnicas de imobilização celular</i>	172
Figura 1. Processo de imobilização celular em Lentikats®: gotejamento em placa de petri (a), estabilização e reentumescimento em solução estabilizadora (b), “lentilhas” prontas (c).....	174
Figura 2. Produção de etanol em biorreatores de leite fixo utilizando como material suporte esponjas de poliuretano (PUF), e poliéster (PE).....	176
Figura 3. Sistema de fermentação por células imobilizadas em Lentikats®: lentilhas e meio de cultivo adicionados em Duran (a), fermentação em incubadora para manutenção da temperatura e homogeneização do meio por agitador magnético (b).....	177
Figura 4. Perfil do consumo de lactose, produção de etanol e biomassa suspensa em biorreator de leite fixo contendo <i>K. marxianus</i> CCT 4086 imobilizada em PUF (a) e PE (b), a 30 °C.....	178
Figura 5. Perfil do consumo de lactose, produção de etanol e biomassa suspensa a partir de <i>K. marxianus</i> CCT 4086 imobilizada em Lentikats®, em cultivo em frasco agitado contendo permeado de soro de queijo como meio de cultivo, nas concentrações de 60 g L ⁻¹ (a), 120 g L ⁻¹ (b), 150 g L ⁻¹ (c), e 180 g L ⁻¹ (d), a 30 °C.....	179

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.....	4
Tabela 1.1. Vantagens e desvantagens das diferentes configurações de biorreatores de coluna com células imobilizadas.....	25
Tabela 1.2. Modelos cinéticos não estruturados descritos na literatura para velocidade específica de crescimento (μ).....	29
CAPÍTULO II.....	31
Tabela 2.1. Composição centesimal (%) de soro e permeado de soro de queijo em pó (base seca).....	32
Tabela 2.2. Planejamento experimental hexagonal para avaliar o efeito da taxa de diluição (D) e da concentração de permeado de soro de queijo (C_{WP}) em sistema contínuo.....	39
Tabela 2.3. Expressões para a taxa de consumo de substrato (r_s) e velocidade específica de crescimento (μ) utilizadas nos modelos propostos deste trabalho.....	46
Tabela 2.4. Balanço de massa para sistema contínuo A-stat a partir dos quatro modelos não estruturados.....	47
CAPÍTULO III.....	50
Table 3.1. Hexagonal experimental design used to study de effect of dilution rate (D) and whey permeate concentration (C_{WP}) on continuous fermentation.....	56
Table 3.2. Ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$ (g g ⁻¹)) and ethanol productivity (Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)) of strains of <i>Kluyveromyces marxianus</i> and varying fermentation media in orbital shaker cultures at 30 °C and 150 rpm.....	58
Table 3.3. Ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$), yield efficiency (η), and ethanol productivity (Q_P) of 3 best strains of <i>Kluyveromyces marxianus</i> under fluidized batch bioreactor cultivations.....	62
Table 3.4. Comparison of results obtained in this work with other reports in the literature for ethanol yields, ethanol productivities, and conversion efficiencies.....	63
Table 3.5. Regression coefficients of the variables and the regression parameters for ethanol yield, ethanol productivity, and residual sugar by <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 under continuous fluidized bed bioreactor cultivations.....	64
Table 3.6. Literature data on residual sugar during continuous cultivation.....	67
Table 3.7. Ethanol concentration, lactose consumption, ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$), and ethanol productivity (Q_P) obtained in the continuous fluidized bed bioreactor cultivations operated in	

sequence.....	68
CAPÍTULO IV.....	72
Table 4.1. Ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$), yield efficiency (η) and ethanol productivity (Q_P) of immobilized monoculture of two strains of <i>S. cerevisiae</i> , CAT-1 and PE-2, <i>K. marxianus</i> CCT 4086 monoculture, and co-culture immobilized <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 and <i>K. marxianus</i> CCT 4086 strains from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate in fluidized batch fermentation.....	80
Table 4.2. Ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$), yield efficiency (η), and ethanol productivity (Q_P) of <i>S.cerevisiae</i> , CAT-1 and <i>K. marxianus</i> CCT 4086 monocultures and the co-culture of <i>S.cerevisiae</i> CAT-1 and <i>K.marxianus</i> CCT 4086 in concentrated lactose-hydrolyzed whey permeate in batch fluidized bed bioreactors.....	85
CAPÍTULO V.....	91
Table 5.1.Expression for substrate consumption rate (r_s) and specific growth rate (μ) used in the proposed models.....	100
Table 5.2. Results for the parameters estimation with experimental data from the A-stat system ($a = 0.00667 \text{ h}^{-2}$).....	106
Table 5.3. Results for the parameters estimation with experimental data from the A-stat system ($a = 0.0015 \text{ h}^{-2}$).....	108
APÊNDICE.....	138
<i>Apêndice A- Bioconversão de permeado de soro de queijo a etanol.....</i>	139
Tabela 1. Fator de conversão de lactose a etanol ($Y_{P/S}$), eficiência de conversão (η) e produtividade volumétrica de etanol (Q_P) obtidos nos 3 meios de fermentação testados.....	146
<i>Apêndice B- Produção de etanol a partir de permeado e de soro de queijo em biorreatores imobilizados.....</i>	149
Tabela 1. Fator de conversão de lactose a etanol ($Y_{P/S}$), eficiência de conversão (η) e produtividade volumétrica (Q_P) em biorreator de leito fluidizado, a partir de meio de soro de queijo e meio permeado de soro de queijo.....	155
<i>Apêndice C- Bioconversão de permeado e soro de queijo a etanol por Saccharomyces cerevisiae.....</i>	159
Tabela 1. Fator de conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}$), eficiência de conversão (η) e produtividade volumétrica de etanol (Q_P) nos meios soro de queijo e permeado de soro de queijo previamente hidrolisados com β -galactosidase.....	162

Apêndice D- Aproveitamento biotecnológico de soro e permeado de soro de queijo para a produção de etanol por Saccharomyces cerevisiae.....165

Tabela 1. Fator de conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}$), eficiência de conversão (η) e produtividade volumétrica de etanol (Q_P) nos meios soro de queijo e permeado de soro de queijo previamente hidrolisados com β -galactosidase.....170

NOMENCLATURA

Lista de Símbolos

a	taxa de aceleração
CaCl_2	cloreto de cálcio
CO_2	gás carbônico
D	taxa de diluição
D_0	taxa de diluição inicial
g	grama
h	hora
H_2SO_4	ácido sulfúrico
K_p	constante de inibição do crescimento celular pelo produto
K_s	constante de saturação para o crescimento celular
L	litro
min	minuto
mL	mililitro
mg	miligramas
mm	milímetro
m_s	coeficiente de manutenção celular
NaOH	hidróxido de sódio
$^\circ \text{C}$	graus Celcius
P	concentração de produto
pH	potencial hidrogeniônico
$P_{x\text{max}}$	concentração de produto onde cessa o crescimento microbiano
r_p	taxa de formação de produto
rpm	rotações por minuto
r_x	taxa de crescimento celular
r_s	taxa de consumo de substrato
S	concentração de substrato
S_i	concentração de substrato na entrada do sistema
S_0	concentração de substrato na saída do sistema
t	tempo

μL	microlitro
X	concentração celular
$Y_{P/S}$	fator de conversão de substrato em produto
$Y_{X/S}$	fator de conversão de substrato em biomassa

Lista de Símbolos Gregos

α	constante associada ao crescimento celular para formação do produto
β	constante não associada ao crescimento celular para formação do produto
μ	velocidade específica de crescimento
μ_{max}	velocidade específica máxima de crescimento

Lista de Abreviaturas e Siglas

CBS	<i>Centraalbureau voar Schimmelcultures</i>
CCT	Coleção de Culturas Tropical
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DO	Densidade Óptica
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drog Administration</i>
<i>GAL2</i>	gene que codifica para a enzima galactose-permease
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
<i>LAC12</i>	gene que codifica para a enzima lactose-permease
<i>LAC4</i>	gene que codifica para a enzima β -galactosidase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
SEAPPA	Secretaria da Agricultura, Agropecuária, Pesca e Agronegócio
YEPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose growth medium</i>
YEP-Lactose	<i>Yeast Extract Peptone Lactose growth medium</i>

INTRODUÇÃO

O soro e o permeado de soro de queijo são os principais subprodutos da indústria de laticínios em decorrência da elevada carga orgânica e pelo grande volume em que são gerados. Estes subprodutos podem conduzir a sérios problemas ambientais quando descartados inadequadamente em cursos hídricos ou no solo. Contrariamente, apresentam grande potencial de aproveitamento em diversos processos biotecnológicos, uma vez que se constituem em substratos potenciais para a geração de diversos compostos de interesse, tais como o etanol.

A produção mundial de soro de queijo é estimada em cerca de 160 milhões de toneladas anuais, sendo o Brasil um dos países que contribui com parcela significativa para essa geração, apresentando uma taxa de incremento anual maior que o dobro da produção mundial. Além disso, o estado do Rio Grande do Sul situa-se como o segundo maior produtor de queijos do Brasil, com participação significativa em termos de geração deste subproduto. Embora aproximadamente metade do soro de queijo gerado seja destinada para formulações alimentícias e farmacêuticas, o restante do volume excedente é suficientemente grande para poder ser aproveitado em bioprocessos que visem à obtenção de produtos com alto valor agregado. Desta forma, processos que valorizam o soro de queijo estão sendo constantemente desenvolvidos, entre os quais, a recuperação das proteínas através do processo de separação por ultrafiltração, o qual gera grandes volumes remanescentes de lactose, também denominado de permeado. Este subproduto, assim como o soro de queijo, se caracteriza por ser rico em nutrientes, servindo, portanto, como fonte de carbono alternativa para o desenvolvimento de processos fermentativos e de engenharia de biossíntese. Estes subprodutos são obtidos a um baixo custo e contém apreciáveis quantidades de lactose, proteínas e sais minerais, o que os torna excelentes substratos para a realização de bioprocessos e para a produção de metabólitos como o etanol.

Estudos que visam o aproveitamento de subprodutos industriais, considerados como resíduos, para a produção de etanol vêm sendo constantemente realizados devido ao mercado crescente e a potencial redução dos custos de produção associada a sua utilização. O emprego de subprodutos industriais na produção de etanol proporciona diversas vantagens visto que além da matéria-prima ser menos onerosa, oferece simultaneamente à sua produção, o seu tratamento. O soro e permeado de soro de queijo, além de não requererem tratamentos prévios a sua utilização, visto serem fontes diretas de açúcar, podem auxiliar na produção de etanol,

contribuindo para a minimização de problemas de disposição pelas indústrias de laticínios, além de poder tornar a produção de etanol um processo menos oneroso.

A produção mundial de etanol foi de aproximadamente 85 bilhões de litros no ano de 2012, sendo o continente americano responsável por aproximadamente 90 % dessa produção. O Brasil situa-se como o segundo país maior produtor de etanol do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, que lidera essa produção. Além disso, sendo o país que mais exporta etanol no mundo, o Brasil se caracteriza pela produção crescente nos últimos anos, com contribuições significativas da região Centro-Sul, a qual é responsável por mais de 96 % dessa produção.

Diante da perspectiva de crescimento da demanda mundial de etanol e pela necessidade da geração de fontes alternativas de energia, as quais repercutem em menores prejuízos ambientais do que aquelas provindas de fontes fósseis, tecnologias capazes de melhorar o desempenho e a eficiência de processos fermentativos ganham importância fundamental no Brasil e no mundo. Contribuições significativas para a melhoria deste bioprocessos podem ser alcançadas através do emprego de técnicas de imobilização celular associadas com as vantagens provenientes de sistemas contínuos, e assim, levar ao desenvolvimento de processos mais eficientes e vantajosos.

Neste contexto, o **objetivo principal** deste trabalho foi aperfeiçoar a bioconversão de soro e permeado de soro de queijo, subprodutos da indústria de laticínios, em um produto de alta importância comercial mundial, o etanol.

Mais detalhadamente, os **objetivos específicos** são:

- ✓ avaliar a influência da suplementação dos meios de soro e permeado de soro de queijo para a produção de etanol por diferentes linhagens de *Kluyveromyces marxianus*;
- ✓ avaliar a bioconversão da lactose presente no permeado de soro de queijo a etanol por diferentes linhagens de *Kluyveromyces marxianus* imobilizadas em biorreatores de leiteo fluidizado operados em regime batelada;
- ✓ otimizar as condições de produção de etanol a partir do permeado de soro de queijo em biorreatores contínuos de célula imobilizada;
- ✓ avaliar e comparar a cinética de bioconversão da glicose e da galactose presentes no soro e permeado de soro de queijo a etanol a partir de diferentes espécies de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *K. marxianus*, em biorreator de células imobilizadas operado em regime batelada;

- ✓ avaliar a cinética de bioconversão dos monossacarídeos glicose e galactose presentes em permeado de soro de queijo a etanol por *K. marxianus* em biorreatores de leite fluidizado operados em regime batelada repetida;
- ✓ avaliar o perfil cinético de consumo de lactose, produção de etanol e crescimento celular em cultura de células livres e imobilizadas de *K. marxianus* a partir do aumento gradual da taxa de diluição a uma taxa de aceleração constante (sistema contínuo A-stat);
- ✓ construir modelos matemáticos preditivos de cinéticas de crescimento celular, consumo de substratos e formação de produtos em biorreatores de células livres a partir do sistema contínuo A-stat.

Este trabalho encontra-se estruturado em capítulos. O Capítulo I apresenta o embasamento teórico pertinente ao desenvolvimento deste estudo. No capítulo II consta uma abordagem geral dos materiais e métodos utilizados neste trabalho. Os capítulos III, IV e V estão na forma de artigos científicos publicados e submetidos para publicação. Neles estão descritas as metodologias empregadas na condução dos experimentos, bem como a análise e discussão dos resultados. No Capítulo VI são discutidas as considerações finais deste trabalho e as principais conclusões. Ao final, estão incluídos apêndices relevantes para a complementação do trabalho.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Soro de queijo e permeado de soro de queijo

O soro de queijo, um subproduto da indústria de laticínios, constitui-se como o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite, por coagulação ácida ou enzimática, durante o processo de produção de queijos. Caracterizado pela coloração amarelo-esverdeada, o soro de queijo representa 85 % a 95 % do volume de leite utilizado e retém aproximadamente 55 % dos nutrientes existentes no leite, contendo entre seus principais componentes a lactose (45-50 g L⁻¹), proteínas (6-8 g L⁻¹) e sais minerais (5-7 g L⁻¹), além de apreciáveis quantidades de vitaminas, ácidos orgânicos e aminoácidos (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010; PRAZERES et al., 2013).

A quantidade de soro gerada depende do tipo de queijo produzido e das técnicas de fabricação. Em média, para a fabricação de um quilo de queijo necessita-se de dez litros de leite, recuperando-se nove litros de soro (KOSIKOWSKI, 1979; KOUSHKI et al., 2012; CARVALHO et al., 2013). Processos que valorizam o soro de queijo estão sendo constantemente realizados, entre os quais, a recuperação das proteínas através do processo de separação por ultrafiltração, o qual gera grandes volumes remanescentes de lactose. Este subproduto é denominado de permeado de soro de queijo e se caracteriza por conter em sua composição nutricional uma quantidade de proteínas 10 vezes inferior ao do soro de queijo. Esta tecnologia beneficia cerca de 10 % do volume total de soro de queijo produzido no mundo (GUIMARÃES et al., 2010; KISIELEWSKA, 2012).

Embora cerca de 50 % do soro de queijo gerado seja utilizado para a formulação de produtos alimentícios (lácteos, de panificação, chocolate e biscoitos) e formulações farmacêuticas, o restante do volume excedente é suficientemente grande para poder ser aproveitado em outros processos (Manual de Referência para Produtos de Soro dos EUA, 1997; KOSSEVA et al., 2009). Em se tratando de disposição adequada, o soro de queijo constitui-se no subproduto mais preocupante da indústria de laticínios devido ao elevado teor de carga orgânica, que varia entre 30 g L⁻¹ e 50 g L⁻¹ de DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) e entre 60 g L⁻¹ e 80 g L⁻¹ de DQO (Demanda Química de Oxigênio), e também devido ao grande volume em que é gerado – fatores estes que, quando associados ao inadequado descarte e tratamento, podem levar a sérios problemas ambientais, tais como a destruição da flora e da fauna aquática (PRAZERES et al., 2013). Como o permeado de soro retém mais de 70 % dos sólidos totais presentes no soro (DQO de 60 g L⁻¹), este apresenta

problemas de disposição aproximadamente igual ao do soro de queijo (GUIMARÃES et al., 2010; KISIELEWSKA, 2012; PRAZERES et al., 2013).

A produção mundial de soro de queijo é estimada em cerca de 160 milhões de toneladas anuais, com uma taxa de crescimento anual de 2 % (GUIMARÃES et al., 2010). Somente no ano de 2012 a produção mundial de queijo foi de 17,3 milhões de toneladas, sendo que o mercado brasileiro contribuiu em aproximadamente 4 % desse total, produzindo 700 mil toneladas de queijo, o que corresponde à geração de 6,3 milhões de toneladas de soro. Não obstante, a produção de queijos no Brasil tem crescido nos últimos 10 anos a uma taxa anual de 4,6 %, representando um incremento maior que o dobro da taxa mundial. O Estado do Rio Grande do Sul contribui significativamente para a produção brasileira de queijos, sendo o segundo estado maior produtor, ficando atrás somente do estado de Minas Gerais (SIQUEIRA et al., 2010; MAPA/SPA, 2012). No ano de 2012 foram produzidos no estado do Rio Grande do Sul mais de 44 mil toneladas de queijo, o que corresponde a uma geração de 400.000 toneladas de soro, representando 6 % da produção de soro de queijo do Brasil (SEAPPA, 2015).

1.1.1 Aplicações biotecnológicas de soro e de permeado de soro de queijo

O soro e o permeado de soro de queijo são subprodutos ricos em nutrientes, constituindo-se como substratos alternativos e de baixo custo para a condução de bioprocessos. Diversas pesquisas têm demonstrado o potencial destes substratos para a produção de diferentes metabólitos, tais como a produção de enzimas (RECH e AYUB, 2007; GUPTE e NAIR, 2010; ZHOU et al., 2013), de ácidos orgânicos (KIM et al., 2006; PANESAR et al., 2007; RAMCHANDRAN et al., 2012), de biogás (AZBAR et al., 2009; NAJAFPOUR et al., 2010; KARGI e UZUNÇAR, 2012; PERNA et al., 2013), de polissacarídeos (SILVA et al., 2009), entre outros bioprodutos (SISO, 1996; KOUTINAS et al., 2009; RAGANATI et al., 2013; LOESER et al., 2014).

A tecnologia de produção de β -galactosidase, também conhecida como lactase, é um dos bioprocessos mais estudados e oportunamente aplicado com sucesso. A utilização desta enzima deve-se especialmente para fabricação de produtos com baixo teor de lactose. O estudo da produção de β -galactosidase foi realizado por Rech et al. (1999) utilizando duas linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, CBS 712 e CBS 6556, em soro de queijo (200 rpm, 30 °C, pH 5,5), onde foi verificado, entre outros fatores estudados, maior crescimento celular ao suplementar o meio de soro de queijo com extrato de levedura, especialmente para a

linhagem CBS 712. Resultados similares foram obtidos por Santiago et al. (2004), que verificaram melhorias no crescimento celular e na síntese da enzima β -galactosidase ao suplementarem extrato de levedura em meio de permeado de soro de queijo contendo diferentes concentrações de lactose (30°C, 150 rpm, pH 5,5) em cultivo com *K. marxianus* ATCC 46537. Contraditoriamente, Gupte e Nair (2010) verificaram que a suplementação de meio soro de queijo por diferentes fontes de nitrogênio em cultivo com *K. marxianus* NCIM 3551 não interferiu na produção dessa enzima (25 °C, pH 5,0). Na tentativa de aperfeiçoar a produção de β -galactosidase, outras estratégias vêm sendo pesquisadas, dentre as quais a aplicação da técnica de imobilização celular (BECERRA et al., 2001), emprego de cultivo em batelada alimentada (RECH e AYUB, 2007), cultura contínua (ORNELAS et al. 2008) e engenharia genética (OLIVEIRA et al., 2011; ZHOU et al., 2013).

Pesquisas sobre a produção de hidrogênio (H_2) a partir do soro de queijo vêm sendo realizadas com grande crescimento, especialmente nos últimos anos, abrangendo diferentes configurações de biorreatores e formas de operação. Estes estudos têm se mostrado bastante promissores, visto a necessidade sócio-ambiental por geração de energias menos poluentes e mais limpas. A utilização de soro de queijo em condições anaeróbias para a produção de hidrogênio (H_2) foi estudada por Azbar et al. (2009) empregando uma mistura de microrganismos sob condições termófilas em biorreatores contínuos operados sob diferentes taxas de diluição e carga orgânica (nutrientes presentes no soro de queijo). As maiores produtividades foram obtidas para as maiores taxas de diluição, sendo que a carga orgânica não influenciou nas taxas de produção. Em outro estudo, processo batelada foi utilizado para a produção de hidrogênio a partir de diferentes concentrações de soro de queijo desproteinado sob condições anaeróbias, utilizando bactérias termófilas (55 °C, pH 7,0), onde se verificou as maiores conversões e produtividades para as menores concentrações de açúcar testadas (KARGI et al., 2012). Hidrogênio foi obtido em biorreator de leito empacotado (fixo) operado de forma contínua a uma taxa de diluição constante, utilizando como material suporte polipropileno, a partir do crescimento de uma mistura de microrganismos sob diferentes concentrações de soro de queijo, a uma temperatura de 30 °C. As maiores produções de hidrogênio foram obtidas para as maiores concentrações de carga orgânica (nutrientes) e para valores de pH acima de 5,0 (PERNA et al., 2013).

Entre as possíveis aplicações biotecnológicas para a utilização do soro e permeado de queijo, encontra-se a produção de goma xantana, um polissacarídeo de grande aplicação em indústrias de alimentos, cosmética e química. Goma xantana foi produzida a partir de duas linhagens de *Xanthomonas campestris* (1230 e 1182) em soro de queijo *in natura* adicionado

de diferentes concentrações de sacarose e sais como o fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$). A maior produção obtida foi para o ensaio contendo apenas soro de queijo, sem a adição de sacarose, e com a adição de 2 % (m/v) de K_2HPO_4 e 0,1 % (m/v) de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, ou seja, o soro de queijo se mostrou como uma excelente fonte de carbono neste bioprocessamento (SILVA et al., 2009). Nesse mesmo sentido, o soro de queijo constituiu-se como uma fonte apropriada em nutrientes para a produção do polissacarídeo em estudo realizado por Nitschke et al. (2001) ao testar três diferentes meios de cultivo à base de soro de queijo (integral, desproteinado e hidrolisado com β -galactosidase) a partir de *Xanthomonas campestris* C₇L. A produção de goma xantana em soro de queijo *in natura* por duas linhagens de *X. campestris* (1320 e DSM 1706) demonstrou ser tão eficiente quanto em meio convencional a base de glicose, sugerindo o grande potencial de aproveitamento deste subproduto para a geração de produtos de maior valor agregado (GABARDO et al., 2010).

Diante destes e de outros estudos, fica evidenciado o potencial que o soro e o permeado de soro de queijo apresentam como substratos alternativos para a propagação de biomassa, processos fermentativos e geração de compostos de interesse. O desenvolvimento de tecnologias em processos fermentativos tais como aqueles que se destinam à produção de etanol a partir de substratos alternativos, tem apresentado grande interesse pela sociedade científica e se intensificado nos últimos anos.

1.1.2 Produção de etanol a partir de soro e de permeado de soro de queijo e sua relevância no mercado mundial

A bioconversão de soro e permeado de soro de queijo a etanol constitui-se em uma alternativa tecnológica promissora visto as vantagens nutricionais, ambientais e econômicas proporcionadas pelo aproveitamento destes subprodutos neste bioprocessamento. Em torno de 95 % da produção mundial de etanol é realizada via processo fermentativo a partir de cultivares agrícolas, a qual pode ocorrer através da fermentação direta de açúcares simples, tais como o açúcar de cana e de beterraba, ou a partir de materiais que contenham amido, como o milho e o trigo (ZAFAR e OWAIS, 2006; MUSSATTO et al., 2010).

O etanol apresenta diversas aplicações, podendo ser utilizado como biocombustível, além de ser amplamente empregado na indústria química, farmacêutica e na indústria alimentícia, seja na forma de matéria-prima ou como solvente (ZAFAR e OWAIS, 2006; MUSSATTO et al., 2010). A produção mundial de etanol foi de aproximadamente 85 bilhões

de litros no ano de 2012, sendo o continente americano responsável por aproximadamente 90 % dessa produção. O maior produtor são os Estados Unidos com uma produção de aproximadamente 53,0 bilhões de litros no ano de 2012, utilizando o milho como matéria-prima. Em segundo lugar encontra-se o Brasil, com uma produção de 22,7 bilhões de litros no ano de 2012 a partir da cana de açúcar, posicionando-se no cenário internacional com uma parcela bastante significativa (MAPA/ SPAE/DCCA, 2012; ICNA, 2013). A produção brasileira de etanol vem crescendo nos últimos anos – aumento de 50 % entre os anos de 2003 a 2012 – sendo significativas as contribuições da região Centro-Sul, a qual é responsável por mais de 96 % da produção brasileira (MAPA/ SPAE/DCCA, 2010; MAPA/ SPAE/DCCA, 2012). Além disso, o Brasil é o país que mais exporta etanol no mundo, sendo que somente no primeiro semestre de 2013 foram exportados 2,3 bilhões de litros, com mais de 60 % desse total destinado aos Estados Unidos (1,4 bilhões de litros) (MUSSATTO et al., 2010; MAPA/ SPAE/DCCA, 2013).

Devido à exaustão das reservas de combustíveis fósseis e principalmente pela preocupação ambiental decorrida da poluição ocasionada por esse tipo de energia, pesquisas têm sido impulsionadas no sentido de desenvolver tecnologias alternativas de geração de energia com a finalidade de reduzir essa dependência pelas fontes fósseis e consequentemente minimizar os danos ambientais. Acrescido a isso, a produção de etanol pelo método convencional a partir da cana de açúcar no Brasil também apresenta problemas de sustentabilidade podendo reduzir a biodiversidade, contaminar águas superficiais e liberar gases do efeito estufa em função da queima da palha (STRAPASSON e JOB, 2006). Diante desse contexto, a produção de etanol a partir de fontes alternativas de carbono surge como opção viável entre as fontes não convencionais de energia (ZAFAR et al., 2005; GABARDO et al., 2012). O soro e o permeado de soro de queijo se mostram como excelentes fontes de matéria-prima para a produção de etanol visto não serem onerosos e especialmente ricos em nutrientes. Além do mais, considerando que a quantidade disponível de lactose para a produção do etanol é maior que 4 milhões de toneladas por ano, e considerando uma eficiência de conversão de 85 %, se poderia obter uma produção cerca de 2,3 bilhões de litros de etanol anualmente (GUIMARÃES et al., 2010; MUSSATTO et al., 2010).

A fermentação da lactose presente no soro e permeado de soro de queijo a etanol é especialidade de poucas leveduras. Entre estes microrganismos encontram-se *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Candida pseudotropicalis* (FONSECA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010). Essa capacidade é devido à presença de dois genes, *LAC12* e *LAC4*, responsáveis pela codificação das enzimas lactose-permease e β -galactosidase,

respectivamente, as quais desempenham diferentes papéis. A lactose-permease intermedeia o transporte da lactose através da membrana citoplasmática para o interior da célula, e a β -galactosidase é responsável pela hidrólise da lactose (dissacarídeo) em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose. Essas duas fontes de açúcar são metabolizadas pela via glicolítica (Embden–Meyerhof–Parnas), contudo, antes de participar dessa rota metabólica, a galactose é convertida no intermediário glicolítico glicose-6-fosfato através da via Leloir, pela ação de quatro enzimas (galactoquinase, galactose-1-P uridiltransferase, UDP-galactose 4-epimerase e fosfoglicomutase) (FREY, 1996; RUBIO-TEIXEIRA, 2006; GUIMARÃES et al., 2010). Sob condições anaeróbicas o piruvato (produto da via glicolítica) é reduzido em etanol e gás carbônico (CO_2). A representação esquemática das rotas metabólicas envolvidas no processo da fermentação da lactose em etanol encontra-se ilustrada na Figura 1.1.

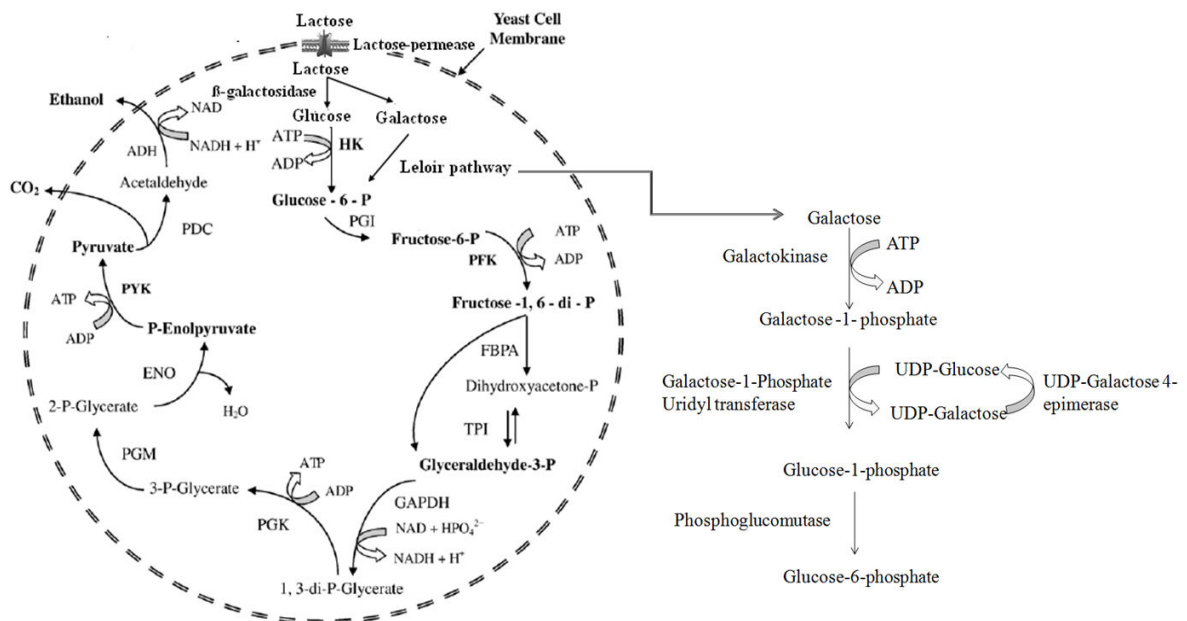


Figura 1.1. Rota metabólica da fermentação da lactose em etanol. HK: hexoquinase, UDP-glicose: uridina difosfo glicose, UDP-galactose: uridina difosfo lactose, PGI: fosfoglicose isomerase, PKF: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose- bifosfato aldolase, TPI: triose-fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fostato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfoglicerato mutase, ENO: enolase, PYK: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, ADH: álcool desidrogenase (Adaptado de FREY, 1996; RUBIO-TEIXEIRA, 2006; BAI et al., 2008).

A bioconversão de soro e permeado de soro de queijo a etanol tem sido interesse em diversas pesquisas, as quais têm utilizado estes subprodutos de formas diferenciadas, incluindo a utilização destes *in natura* (ZAFAR e OWAIS, 2006; SANSONETTI et al., 2009; CHRISTENSEN et al., 2011), em pó reconstituído (OZMIHCI e KARGI, 2007a, 2008; GABARDO et al., 2012, 2014) e concentrados (MARWAHA e KENNEDY, 1984; SILVEIRA et al., 2005; KARGI e OZMIHCI, 2006; DRAGONE et al., 2011). Além disso, diferentes configurações de biorreatores e formas de operação vêm sendo abordadas na tentativa de melhorar o desempenho deste bioprocesso, tais como fermentação em batelada (GHALY e EL-TAWEL, 1995; ZAFAR e OWAIS, 2006; SANSONETTI et al., 2009), fermentação em batelada alimentada (OZMIHCI e KARGI, 2007b; HADIYANTO et al., 2014), fermentação semi-contínua (STANISZEWSKI et al., 2009), fermentação contínua (GHALY e EL-TAWEL, 1997; OZMIHCI e KARGI, 2007c, 2008, 2009; CHRISTENSEN et al., 2011; KUMAR et al., 2011, SANSONETTI et al., 2013), fermentação com leveduras imobilizadas em diferentes suportes (SZAJANI et al., 1996; KOURKOUTAS et al., 2002; LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; OZMIHCI e KARGI, 2009; GABARDO et al., 2012), fermentação a partir de leveduras termotolerantes (BANAT et al., 1992; BRADY et al., 1994; BANAT e MARCHANT, 1995), fermentação através de *Sacharomyces cerevisiae* co-imobilizada com β -galactosidase (LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; STANISZEWSKI et al., 2007) e em co-cultivo com *Kluyveromyces marxianus* (GUO et al., 2010), e fermentação a partir leveduras modificadas geneticamente (DOMINGUES et al., 1999, 2001; GUIMARÃES et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Embora ainda não seja uma realidade mundial, a produção industrial de etanol a partir de soro e permeado de soro de queijo começa a se difundir e ganhar espaço no mercado, sendo produzido em países como a Irlanda, Nova Zelândia, Estados Unidos, Dinamarca e Alemanha. A primeira planta industrial construída para este fim ocorreu na Irlanda pelo grupo Carbery, em 1978. Em seguida, o processo Carbery passou a ser adotado por plantas de países como Nova Zelândia e Estados Unidos (PESTA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010). Atualmente 11 milhões de litros de etanol são produzidos anualmente por este processo na Irlanda. Além disso, somente na Nova Zelândia, 17 milhões de litros de etanol são produzidos anualmente pela empresa Anchor Ethanol, sendo o principal mercado a indústria farmacêutica, de cosméticos e de solventes. Neste mesmo contexto, uma nova planta industrial está sendo instalada nos Estados Unidos pelo grupo de laticínios Theo Müller com o objetivo de produzir 10 milhões de litros de etanol por ano para ser utilizado como biocombustível (GUIMARÃES et al., 2010).

1.2 Leveduras produtoras de etanol

O etanol é uma fonte de energia renovável que pode ser produzida pela fermentação de diferentes fontes de açúcares e microrganismos. As leveduras, especialmente linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, consistem na primeira escolha para a produção industrial de etanol, devido à capacidade fermentativa que apresentam, a alta tolerância ao etanol e a compostos inibitórios, e a sua capacidade de crescer rapidamente sob condições anaeróbias, características estas desejáveis em processos industriais (BAI et al., 2008; MUSSATTO et al., 2010). Contudo, a produção de etanol não se limita apenas às leveduras. A bactéria *Zymomonas mobilis* tem sido objetivo de recentes pesquisas, visto que apresenta algumas características superiores frente à *S. cerevisiae*, tais como maior taxa metabólica de glicose, maiores conversões e produtividades volumétricas (REBROS et al., 2005; BAI et al., 2008).

Em muitos casos, a matéria-prima é quem determina o tipo de microrganismo a ser utilizado neste bioprocessos. Linhagens de *S. cerevisiae* se caracterizam por assimilar uma grande variedade de açúcares, tais como glicose, frutose, sacarose, galactose e manose. Contudo, não são capazes de metabolizar pentoses e lactose. Matérias-primas como o açúcar de cana e de beterraba, assim como aquelas que contenham amido, tais como o milho e o trigo, podem ser metabolizados a etanol por estas linhagens, porém, antes disso, estes últimos precisam passar por pré-tratamentos, que podem ser tanto químico quanto enzimático, para a liberação dos açúcares diretamente fermentescíveis. Não diferente, a metabolização da lactose por estas linhagens também exige a necessidade de hidrólise, fato que coloca a produção de etanol por soro de queijo tão competitiva quanto aquela obtida a partir de milho ou trigo. Além disso, a produção de etanol por materiais lignocelulósicos, os quais se caracterizam por conter pentoses, assim como matérias-primas que contenham lactose, tem se beneficiado da engenharia genética para tornar linhagens de *S. cerevisiae* capazes de metabolizar estas duas fontes de carbono, o que contribui para ampliar as possibilidades de produção por estas duas fontes de carbono (JIN e JEFFRIES, 2004; PRASAD et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2008; MUSSATTO et al., 2010).

Entre as leveduras fermentadoras de xilose, pentose advinda do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, encontram-se *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* e *Candida sheratae*. Leveduras como *Candida maltosa* e *Candida guilliermondii* também tem sido alvo de pesquisas para a produção de etanol a partir de meios contendo pentoses (GUO et al., 2006; SCHIRMER-MICHEL et al., 2009). Além disso, consórcios entre leveduras fermentadoras de hexoses (glicose, manose e galactose) e de pentoses têm sido utilizados para

a obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (PRASAD et al., 2007), como é o caso do consórcio entre *Spathaspora arborariae* e *S. cerevisiae* em hidrolisado de casca de arroz (da CUNHA-PEREIRA et al., 2011).

Muito embora poucas linhagens de leveduras apresentem capacidade de metabolizar lactose a etanol, espécies do gênero *Kluyveromyces* são bem reconhecidas por esta característica. Além da lactose, esta espécie é capaz de fermentar açúcares presentes em outras matérias-primas, como a sacarose, glicose, galactose e xilose (PRASAD et al., 2007; MUSSATTO et al., 2010). A maior parte dos trabalhos utilizando espécies de *Kluyveromyces* se beneficia do seu potencial de metabolização da lactose, sendo menos frequentes os trabalhos que estudam a obtenção de etanol por outras fontes de carbono, tais como materiais lignocelulósicos (BALLESTEROS et al., 2004; GOSHIMA et al., 2013), melaço (NIGAM et al., 1998), açúcar de beterraba (ODA et al., 2010), celobiose (BANAT e MARCHANT, 1995), xilose (dos SANTOS et al., 2013; WANG et al., 2013), sacarose (ROCHA et al., 2011) e glicose (NOLAN et al., 1994; dos SANTOS et al., 2013).

1.2.1 *Kluyveromyces marxianus*

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é um fungo unicelular, nucleado e sem motilidade. Apresenta forma ovóide e sua reprodução pode ser sexuada (ascoporos) ou assexuada (brotamento). Foi descrita pela primeira vez em 1888 por E.C. Hansen, sendo isolada originalmente a partir de uvas, e depositada em 1922 por H. Schegg no Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), a qual recebe a denominação atual de *K. marxianus* CBS 712 (FONSECA et al., 2008; LANE et al., 2011). Além desta linhagem, uma diversidade de outras linhagens tem sido isoladas a partir de uma grande variedade de habitats, o que tem resultado em ampla diversidade metabólica entre as linhagens e um elevado grau de polimorfismo intra-específico, e conseqüentemente, levando a diferentes aplicações biotecnológicas (O'SHEA e WALSH, 2000; FONSECA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010).

Kluyveromyces marxianus é uma levedura aeróbia facultativa, que apresenta capacidade de produzir energia pelo metabolismo respiro-fermentativo, sendo geralmente classificada como “Crabtree negativa”. Este fenômeno consiste na característica de algumas leveduras em utilizar a via fermentativa para a geração de energia a partir de altas concentrações de açúcar, mesmo sob condições aeróbias (BELLAVÉ et al., 2004; FONSECA et al., 2008; LANE et al., 2011). Muito embora *K. marxianus* apresente essa classificação, a preferência pela via respiratória ou fermentativa depende da linhagem e das

condições de cultivo, fato que sugere esta classificação não totalmente compreendida por alguns autores (MERICCO et al., 2007, 2009; LANE et al., 2011).

A fisiologia da levedura *Kluyveromyces marxianus* é influenciada pela concentração inicial de substrato e do produto formado. De forma geral, as taxas de fermentação são reduzidas para concentrações de lactose acima de 100 g L⁻¹ a 150 g L⁻¹ ou até mesmo 200 g L⁻¹, e para produções de etanol com concentração acima de 50 g L⁻¹ (GUIMARÃES et al., 2010). Contudo, algumas linhagens têm apresentado capacidade de metabolizar lactose a etanol para concentrações de açúcar compreendidas entre 150 g L⁻¹ e 200 g L⁻¹ e de suportar os efeitos tóxicos do etanol, mesmo em concentrações elevadas (50 g L⁻¹ a 80 g L⁻¹) (SILVEIRA et al., 2005; KARGI e OZMIHCI, 2006; DRAGONE et al., 2011).

Além disso, a produção de etanol é influenciada pelas condições de oxigênio. *K. marxianus* é capaz de produzir altas concentrações de etanol em condições anaeróbias e aeróbias limitadas, contudo, pouca produção de etanol é verificada em condições aeróbias (SISO et al., 1996; SILVEIRA et al., 2005). Outra característica fisiológica e que deve ser mencionada é a habilidade que algumas linhagens de *K. marxianus* apresentam em crescer sob temperaturas que variam de 40 °C a 52 °C (BANAT et al., 1992; BANAT e MARCHANT, 1995). Esta capacidade é importante em processos industriais, especialmente para a produção de etanol, visto a economia em energia, uma vez que os custos de resfriamento são reduzidos e os riscos de contaminação também (FONSECA et al., 2008).

Devido a essas e outras características fisiológicas, tais como a alta taxa de crescimento específico, a alta capacidade de conversão de substrato em biomassa, a capacidade de metabolizar inulina, xilana e pectina, além de ser aceita como microrganismo seguro (*GRAS-Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, a utilização de *K. marxianus* tem sido interesse de outras diversas propostas industriais como, por exemplo, para a produção de enzimas, de ribonucleotídeos e de proteínas heterólogas (BELLAVAR et al., 2004; RUBIO-TEIXEIRA, 2006; LANE et al., 2011; FONSECA et al., 2013).

1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é pertencente ao filo Ascomycota e apresenta formato oval ou esférico. É um microrganismo unicelular, nucleado e sem motilidade, classificada como “Crabtree positiva” e respiro-fermentativa, ou seja, pode gerar energia pelo ciclo de Krebs ou pela fermentação (BAI et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010; LANE et al., 2011).

Esta espécie é a mais aplicada industrialmente para produção de etanol devido a sua boa capacidade fermentativa e tolerância ao etanol, permitindo a produção de até 20 % (v/v) de etanol. Além disso, apresenta crescimento rápido em condições anaeróbias, o que permite contornar problemas de oxigenação inerentes a grandes volumes de fermentação industrial, além de ser reconhecida como um microrganismo GRAS. Outra vantagem da sua utilização é pela possibilidade de utilizar sua biomassa para a alimentação animal (co-produto), permitindo economias no processo industrial da produção de etanol (GUIMARÃES et al., 2010). No Brasil, a produção industrial de etanol por *S. cerevisiae* ocorre em substratos como a cana de açúcar e melaço através do reciclo de células, o que garante alta densidade celular por biorreator, alcançando rapidamente (6 h a 11 h) altas concentrações de etanol (8 % a 11 % v/v) (BASSO et al., 2008).

Devido a suas características, *S. cerevisiae* tem sido objeto de muitos estudos para a produção de etanol, inclusive aqueles que objetivam o aproveitamento de subprodutos industriais, como o soro e permeado de soro de queijo. Contudo, esta espécie não é capaz de assimilar diretamente a lactose e fermentar a etanol, diferente do que ocorre com *K. marxianus*, devido a ausência dos genes *LAC12* e *LAC4*, os quais codificam as enzimas, lactose-permease e β -galactosidase, respectivamente (LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; SILVA et al., 2010). Por outro lado, *S. cerevisiae* apresenta capacidade de metabolizar a galactose através da galactose-permease, enzima codificada pelo gene *GAL2*, que permeia a entrada da galactose para o interior da célula, onde em seguida, esta é catabolizada pela via Leloir (descrito no item 2.3) (RUBIO-TEIXEIRA, 2005, 2006; TIMSON, 2007), além de ser capaz de metabolizar a glicose pela via glicolítica conforme já descrito anteriormente (BAI et al., 2008).

Ainda, é válido ressaltar que enquanto a *S. cerevisiae* se caracteriza por ser tolerante a altas concentrações de etanol, a *K. marxianus* se caracteriza por ser termotolerante. Além do mais, ocorre repressão catabólica da glicose sobre a utilização de galactose por *S. cerevisiae*, onde preferencialmente a glicose é metabolizada primeiramente (comportamento diáuxico), enquanto que para *K. marxianus* os monossacarídeos glicose e galactose podem ser metabolizados simultaneamente (BAI et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010).

Diferentes estratégias têm sido empregadas para tornar a bioconversão de soro de queijo a etanol por *S. cerevisiae* passível de ser realizada, como por exemplo, a hidrólise enzimática ou ácida da lactose presente no soro de queijo, resultando em seus monossacarídeos glicose e galactose (COTÉ et al., 2004), além da utilização de técnicas de engenharia genética, tornando linhagens de *S. cerevisiae* capazes de metabolizar lactose

(DOMINGUES et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2008; SILVA et al., 2010), além de co-imobilização da levedura com a enzima β -galactosidase (HAHN-HAGERDAL, 1985; LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; KISIELEWSKA, 2012) e o co-cultivo de *S. cerevisiae* com *K. marxianus* (GUO et al., 2010).

1.3 Imobilização celular

O processo de imobilização celular consiste no confinamento de células em uma estrutura física que obrigue as mesmas a permanecerem em certa região de espaço de modo a preservar a sua atividade catalítica (KAREL et al., 1985). Este processo geralmente simula o crescimento natural de células em superfícies ou no interior de estruturas naturais, embasado no fato de que muitos microrganismos apresentam a capacidade de se aderir a diferentes tipos de superfícies na natureza (KOURKOUTAS et al., 2004). Entre as diferentes técnicas de imobilização, encontram-se quatro categorias principais: 1) ligação a superfícies sólidas, 2) aprisionamento em matrizes porosas, 3) floculação (natural ou artificial), e 4) contenção por membranas (Figura 1.2) (PILKINGTON et al., 1998; ZANGH e FRANCO, 2002; KOURKOUTAS et al., 2004; MUSSATTO et al., 2010; KOSSEVA, 2011).

Em uma breve abordagem, o método de imobilização em superfícies sólidas consiste basicamente na interação entre a superfície celular e a superfície do suporte através de ligações iônicas ou adsorptivas, ou através de ligações covalentes. O aprisionamento em matrizes porosas, outra técnica de imobilização, caracteriza-se pela inclusão das células em uma matriz porosa que contenha poros menores que as células, viabilizando, dessa forma, a permanência dos biocatalisadores na matriz e a troca de fluidos (nutrientes e metabólitos) no compartimento. Já a floculação é baseada na capacidade de adesão e agregação que alguns tipos de células apresentam quando em suspensão, podendo ser de forma natural ou artificial (ligação cruzada promovida por agente químico). Outra forma de imobilização celular consiste na contenção por barreiras que pode ser realizada pelo uso de uma membrana microporosa ou pela compartimentação das células em uma microcápsula, ou ainda através de uma superfície decorrida da interação entre dois líquidos imiscíveis (KOURKOUTAS et al., 2004; VERBELEN et al., 2006; KOSSEVA et al., 2009).

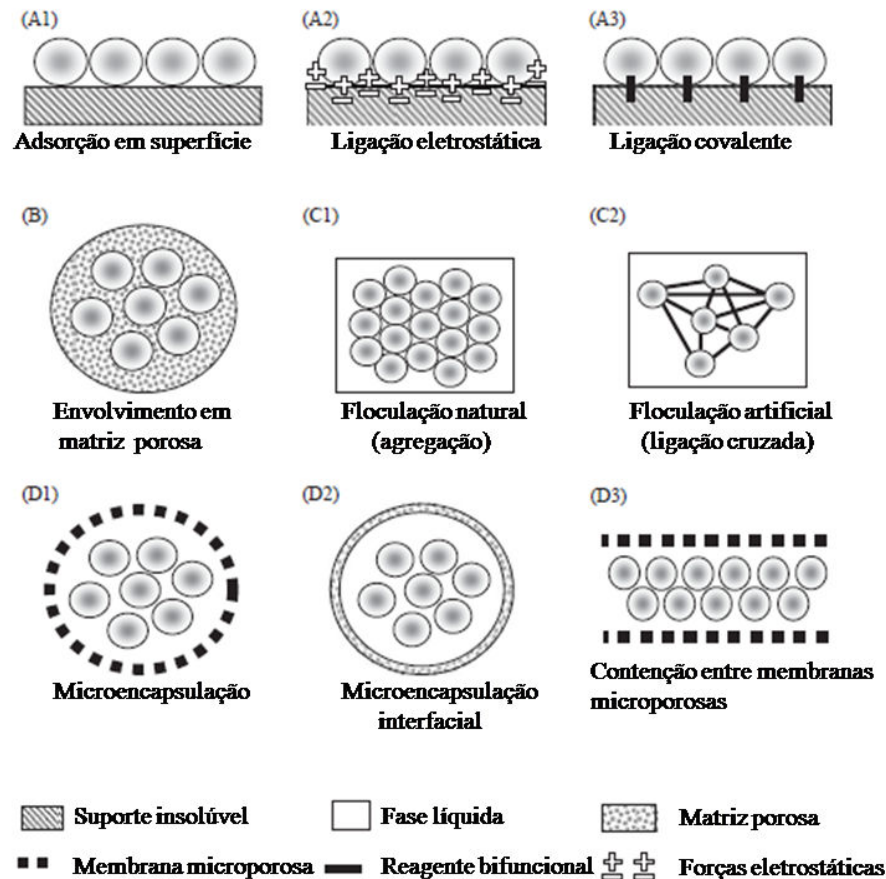


Figura 1.2. Métodos de imobilização celular: (A) ligação a superfícies sólidas, (B) aprisionamento em matrizes porosas, (C) floculação e (D) contenção por membranas (Adaptado de KOURKOUTAS et al., 2004).

Cada um desses métodos apresenta suas particularidades, com vantagens e desvantagens. O método de adesão a superfícies por interações iônicas caracteriza-se por ser simples e barato, contudo existe a possibilidade de perda dos biocatalisadores para o meio reacional, ao passo que, na adesão a superfície por meio de ligações covalentes, a interação biocatalisador-suporte é mais forte, mas existe risco de danos à membrana celular. Já na técnica de envolvimento, as células podem ser protegidas do estresse ambiental, contudo, algumas podem escapar para o meio externo, além de enfrentar problemas difusionais de transferência de massa. Já na técnica de floculação natural os flocos formados são instáveis e sensíveis a tensões de cisalhamento. E, por fim, a técnica de contenção por barreiras previne a perda de células para o meio externo, contudo, apresenta limitações de transferência de massa (GROBOILLOT et al., 1994; PARK e CHANG, 2000; KOURKOUTAS et al., 2004; VERBELEN et al., 2006).

A tecnologia de imobilização celular tem apresentado grande interesse pela comunidade científica nos últimos anos, especialmente para o seu emprego na área biotecnológica de biossíntese de produtos. A técnica de imobilização celular se caracteriza por inúmeras vantagens frente a processos com células livres, dentre as quais se destacam: 1) a alta densidade celular por unidade de volume do biorreator, o que reduz o tempo de fermentação e aumenta a produtividade, além de reduzir riscos de contaminação; 2) melhora na estabilidade do biocatalisador, promovendo proteção contra o estresse ambiental e maior tolerância por altas concentrações de substrato e pelo produto final; 3) facilidade de recuperação do produto com redução de operações unitárias; 4) permite o reaproveitamento da célula, assim como o sistema de operação contínua, 5) permite processos contínuos em altas taxas de diluição sem que ocorra lavagem de células; além de 6) possibilitar projetos de biorreator com menor escala, reduzindo custos de capital (ZHANG e FRANCO, 2002; JUNTER e JOUENNE, 2004; KOURKOUTAS et al., 2004; VERBELEN et al., 2006; MUSSATTO et al., 2010).

Diante das considerações abordadas, uma diversidade de pesquisas tem usufruído dos benefícios que essa tecnologia propicia, onde os mais variados tipos suporte têm sido empregados para a condução de diferentes bioprocessos, como por exemplo, para a produção de ácido lático através da imobilização das células em alginato (GARBAYO et al., 2004; GIVRY et al., 2008), em poliuretano (SUN et al., 1996; ROBLE et al., 2003), em álcool polivinílico (WANG et al., 2013) e em zeólita (DJUKIC-VUKOVIC et al., 2013); na produção de lactase empregando alginato (BECERRA et al., 2001), polietileno (MAHONEY et al., 2013) e quitosana (TALBERT e HOTCHKISS, 2012). De forma mais diversificada e difundida diferentes suportes e microrganismos têm sido utilizados para a produção de etanol, como por exemplo, a imobilização de diferentes linhagens de *K. marxianus*, tais como CBS 6556, CCT 4084, CCT 2653, DSMZ 7239 e de *S. cerevisiae* PTCC 5010 (Coleção de culturas Persa) no suporte de imobilização alginato de cálcio (CHRISTENSEN et al., 2011; GHORBANI et al., 2011; GABARDO et al., 2012), imobilização de *S. cerevisiae* ATCC 24553 em carragena (NIGAM, 2000), de *S. cerevisiae* em agar-agar (BEHERA et al., 2010), imobilização de *Zymomonas mobilis* CCM 2770 e *Kluyveromyces marxianus* DBKKUY-103 em álcool polivinílico (REBROS et al., 2005; NONTHASEN et al., 2015), de *S. cerevisiae* L-77 e L-73 em cerâmica (BOROVIKOVA et al., 2014), de *S. cerevisiae* SC 1 em celulose (SZAJANI et al., 1996; KOURKOUTAS et al., 2002), de linhagens de *S. cerevisiae* IR-2 e M30 em bucha vegetal (OGBONNA, et al., 1994; PHISALAPHONG et al., 2007), imobilização de *Kluyveromyces* sp. IPE453 em bagaço de cana de açúcar (KUMAR et al.,

2011), de *S. cerevisiae* em bagaço de sorgo (YU et al., 2007), de *S. cerevisiae* TISTR 5048 e CGMCC 2982 em sabugo de milho (LAOPAIBOON e LAOPAIBOON, 2012; YAN et al., 2012), entre outros suportes de imobilização.

1.3.1 Envolvimento em alginato de cálcio

O aprisionamento em matrizes porosas é um dos métodos de imobilização celular mais amplamente estudado, sendo a técnica de imobilização em alginato de cálcio uma das mais empregadas e difundidas devido às inúmeras vantagens que apresenta como matriz-suporte, cumprindo a maior parte dos pré-requisitos necessários para um suporte ideal. Os géis de alginato de cálcio são bastante interessantes pela facilidade da técnica, alta capacidade de retenção e preservação da viabilidade celular e por serem atóxicos e não onerosos (AMSDEM e TURNER, 1999; KOURKOUTAS et al., 2004; LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; GABARDO et al., 2011).

O alginato é um polissacarídeo natural extraído de algas marrons (*Phaeophyceae*) composto por monômeros de ácidos β -D-manurônico e α -L- gulurônico arranjados em uma cadeia linear pela ligação glicosídica $\beta(1-4)$. As diferenças na sequência e na composição desses monômeros, arranjados em blocos, pode ocasionar diferenças na flexibilidade do gel, visto que fatores como a espécie de alga em que foram extraídos e a região em que estas se encontram podem influenciar na sua composição. Uma característica importante do alginato para o processo de imobilização celular é a presença de grupos carboxílicos em sua estrutura, o que permite sua ligação com cátions (AMSDEM e TURNER, 1999; SERP et al., 2001).

O procedimento de imobilização consiste basicamente na mistura da suspensão celular com o alginato seguido do contato dessa mistura, através do gotejamento, com uma solução contendo íons divalentes, como por exemplo, o cálcio (Ca^{2+}), que leva a formação de um gel (gelificação) devido à ligação dos polieletrólitos dos grupos carboxílicos com os íons cálcio presentes em solução, formando uma rede tridimensional. O processo de formação de esferas de alginato de cálcio e a formação da rede tridimensional podem ser observados na Figura 1.3 (GROBOILLOT et al., 1994; AMSDEM e TURNER, 1999; SERP et al., 2001).

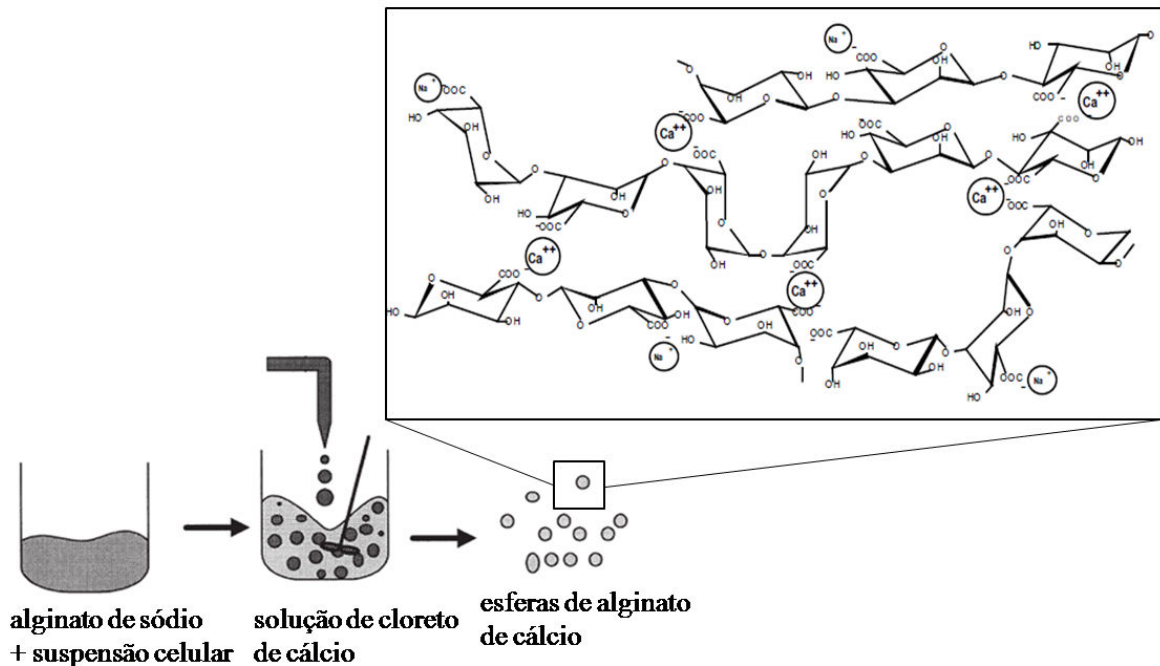


Figura 1.3. Formação de esferas de alginato de cálcio com células imobilizadas na matriz suporte (Adaptado de PARK e CHANG, 2000; COVIZZI et al., 2007).

A formação das esferas de alginato ocorre rapidamente, necessitando o simples contato entre as duas soluções, e sem alterações drásticas de temperatura e de pH, o que garante a conservação da atividade e da viabilidade dos microrganismos imobilizados. Além disso, estes géis se caracterizam por serem resistentes em ampla faixa de pH, que varia de 4,0 a 10,0. Fatores como concentração de cloreto exercem influência direta na resistência e no tamanho do gel formado, de forma que maiores concentrações levam a géis mais compactos e mais resistentes (VELINGS e MESTDAGH, 1995; CANILHA et al., 2007). Além disso, a grande disponibilidade e baixo custo deste gel no mercado possibilitam a sua utilização em grande escala. Contudo, este gel apresenta algumas limitações como, por exemplo, sua instabilidade na presença de agentes quelantes do íon cálcio, tais como fosfato, lactato e citrato, além das limitações de transferência de massa de substratos e produtos no interior da esfera (BICKERSTAFF, 1997; CANILHA et al., 2007; GABARDO et al., 2011).

Diante das vantagens proporcionadas pela técnica de envolvimento em alginato, trabalhos que abordam a sua utilização em bioprocessos têm sido cada vez mais frequentes, incluindo a sua utilização para a produção de ácido láctico pela imobilização de diferentes microrganismos como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e de *Lactobacillus bifermantans* (GARBAYO et al., 2004; GIVRY et al., 2008), para a produção de lactase pela imobilização de *K. lactis* NRRL-Y1140 (BECERRA et al.,

2001), para produção de glicoamilase immobilizando *K. lactis* JA6 (ALTERIIS et al., 2004), para a produção de invertase por *Lactobacillus brevis* Mm-6 immobilizada (AWAD et al., 2013), para a produção de xilitol pela imobilização de *Debaryomyces hansenii* (PEREZ-BIBBINS et al., 2013) e para produção de etanol por diferentes linhagens de *S.cerevisiae* e *K.marxianus* (GUNASEKARAN e KAMINI, 1991; NAJAFPOUR et al., 2004; LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; GUO et al., 2010; GABARDO et al., 2012, 2014), entre outros.

1.3.2 Efeitos da imobilização sobre a fisiologia de células

Uma vez que as células imobilizadas encontram-se fisicamente delimitadas pela matriz-suporte de imobilização, estas podem sofrer alterações em sua fisiologia, que podem ser tanto benéficas, quanto, em alguns casos, apresentar certas desvantagens. De forma geral, é difícil prever o tipo e a magnitude das possíveis alterações metabólicas provocadas pela imobilização celular. Um grande número de parâmetros tem sido considerado responsável por essas alterações, como por exemplo, as limitações de transferência de massa por difusão, a heterogeneidade da distribuição de células, alterações na permeabilidade da membrana celular, na disponibilidade de nutrientes, na expressão de enzimas e na proteção a compostos tóxicos (JAMAI et al., 2001; KOURKOUTAS et al., 2004; VERBELEN et al., 2006; BERLOWSKA et al., 2013). Além disso, cada método de imobilização apresenta suas particularidades em relação à influência na fisiologia das células. A floculação artificial, por exemplo, pode modificar quimicamente a estrutura da membrana celular em virtude da utilização de agentes químicos no processo, e por isso, afetar o metabolismo e crescimento celular. Já as células imobilizadas por ligação a superfícies sólidas (adsorção) podem apresentar limitações de transferência de massa em virtude do acúmulo de células no biofilme. Na técnica de envolvimento em matrizes porosas as células podem modificar seu metabolismo em função de possíveis mudanças nas propriedades físico-químicas do microambiente em que estas se encontram (GROBOILLOT et al., 1994; CARVALHO et al., 2006).

Sistemas de imobilização celular em alginato de cálcio são bem caracterizados por apresentar resistência na transferência de massa de substratos e produtos, fato que exerce influência sobre a fisiologia e sobre as transformações bioquímicas das células. Dificuldades na chegada de substratos para o interior das células podem afetar o seu crescimento e a produção de metabólitos, enquanto que dificuldades na transferência de produtos para o meio

externo, podem prejudicar as taxas metabólicas, visto que estes podem ser tóxicos às mesmas. Nestes sistemas de imobilização, as fases líquida (meio de cultivo) e sólida (suporte com células imobilizadas) se comunicam através de fenômenos difusivos. Diante disso, a resistência à transferência de massa pode ser decorrida tanto pela difusão externa quanto pela difusão interna, ou seja, pode ocorrer resistência à transferência de substratos e produtos em direção à partícula devido ao filme de fluido que se forma ao redor da partícula (difusão externa), assim como ser decorrida pela difusão interna, devido à resistência a transferência de massa no interior da própria esfera. Problemas difusivos em esferas de alginato são mais pronunciados pela difusão interna, a qual pode ser afetada pela quantidade de células, pela estrutura e tamanho da partícula, pela temperatura e pela concentração de alginato (MEHMETOGLU et al., 1990; ESTAPÉ et al., 1992; PILKINGTON et al., 1998; BARRANCO-FLORIDO et al., 2001; ZHANG e FRANCO, 2002; GABARDO et al., 2011).

Além dos fenômenos difusivos, outra abordagem que apresenta relevância na fisiologia das células é a heterogeneidade de distribuição celular no interior da partícula, a qual tem apresentado imparidades entre diferentes trabalhos. Conforme Zhang e Franco (2002), as células tendem a crescer em regiões próximas a superfície da esfera, com ausência ou até mesmo a morte destas no centro da partícula, o que afeta as propriedades de transferência de massa de substratos e produtos e a atividade fisiológica das células. Contudo, em trabalhos mais recentes abordados na literatura (NAJAFPOUR et al., 2004; LIU et al., 2008; GABARDO et al., 2012) foi demonstrado que as células podem crescer no espaço interno da partícula e inclusive migrar para a superfície externa, resultando na sua liberação para o meio. Dessa forma, pode-se dizer que estes sistemas podem adotar diferentes densidades, distribuições e formas de crescimento celular, as quais são dependentes de fatores físicos, como tipo e estrutura do gel, fatores químicos, como, por exemplo, composição do meio de cultivo, além dos fatores biológicos, como a quantidade de inóculo. Além disso, a relação entre esses fatores é determinante para a cinética de crescimento, para a transferência de massa e para a estabilidade do sistema (GROBOILLOT et al., 1994; AMSDEM e TURNER, 1999; ZHANG e FRANCO, 2002; KOURKOUTAS et al., 2004).

1.4 Biorreatores de células Imobilizadas

A escolha do biorreator é uma etapa de extrema importância em sistemas de células imobilizadas e deve ser realizada cautelosamente de forma a cumprir com os requerimentos exigidos pelo processo e pelas condições de cultivo. Fatores como o tipo de material suporte e

o método de imobilização a serem utilizados, a natureza do substrato, a cinética de reação envolvida, requerimentos de viabilidade celular e operacionais, a facilidade de regeneração do biocatalisador, requerimentos de transferência de massa, além da facilidade de projeto e os custos envolvidos são características relevantes para alcançar o êxito na escolha de um biorreator (BARON et al., 1996; PILKINGTON et al., 1998; KOSSEVA et al., 2009).

Os reatores de células imobilizadas podem ser divididos em três grandes categorias, de acordo com o padrão de escoamento: reatores de tanque agitado (STR), reatores de leito empacotado e reatores de leito fluidizado (FUKUDA, 1994; BARON et al., 1996). Além disso, reatores de membrana têm sido incluídos neste grupo por alguns autores (KOURKOUTAS et al., 2004; KOSSEVA et al., 2009). A configuração de biorreator em coluna tem se mostrado adequada para sistemas de confinamento celular (Figura 1.4) e por isso tem sido largamente empregada em bioprocessos (PRADELLA, 2001).

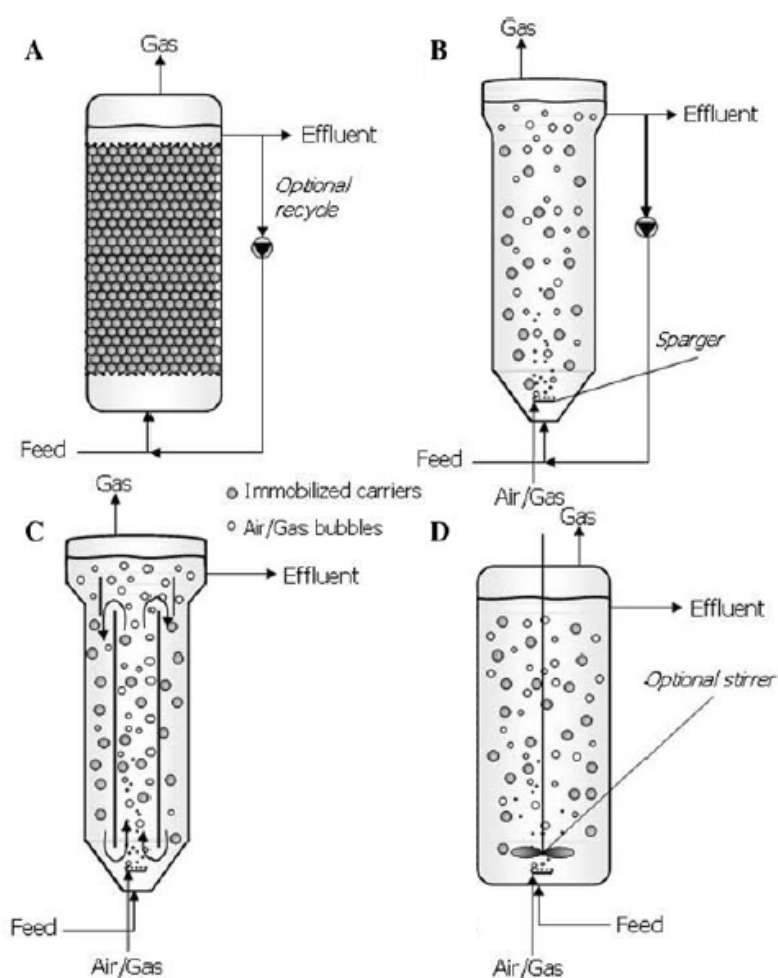


Figura 1.4. Biorreatores em coluna de células imobilizadas: (A) leito fixo ou empacotado, (B) leito fluidizado pela recirculação do meio, (C) leito fluidizado pelo sistema *airlift*, (D) leito fluidizado pelo sistema de coluna de bolhas (Adaptado de VERBELEN et al., 2006).

Embora reatores de tanque agitado (STR) sejam amplamente utilizados em sistemas de células em suspensão e apresentem fácil controle de pH e de temperatura, além de permitir um meio de cultivo com mistura completa, onde em condições ideais, este se caracteriza por não apresentar gradientes de concentração em toda a sua geometria, esta configuração é pouco empregada para sistemas imobilizados devido à tensão de cisalhamento exercida sobre as matrizes de imobilização, que podem ser sensíveis e pouco resistentes (GROBOILLOT et al., 1994; VERBELEN et al., 2006; KOSSEVA et al., 2009). Diante dessas características, este tipo de configuração é bem empregado em suportes de imobilização que apresentam alta resistência e flexibilidade, tais como a fibra de poliuretano (PUF) utilizada como suporte para a produção de ácido lático (KOSSEVA et al., 1995) e o álcool polivinílico (PVA) utilizado para a produção de etanol e de xilitol (RIVALDI et al., 2008; da CUNHA et al., 2009).

Outra modalidade de biorreator de células imobilizadas consiste em reatores de leito fixo ou empacotado (Figura 1.4a). Em condições ideais este tipo de reator se comporta como um reator de fluxo pistonado (*plug flow*), não havendo mistura longitudinal. Reatores de leito fixo têm sido amplamente empregados em bioprocessos e se caracterizam por serem reatores de coluna, na qual o material suporte é adicionado em seu interior e por onde passa o meio de alimentação de forma ascendente. A movimentação das partículas na coluna é sutil ou praticamente inexistente, ocorrendo gradiente de concentração ao longo do comprimento da coluna do biorreator. Este sistema permite o empacotamento de uma diversidade de suportes com variadas geometrias, além de outras vantagens como a simplicidade de operação, o baixo custo, altas taxas de conversão e produtividades volumétricas (VERBELEN et al., 2006; KOSSEVA et al., 2009). Apesar da simplicidade de projeto, este sistema apresenta algumas desvantagens como o acúmulo de gases e de biomassa suspensa, os quais podem levar à formação de caminhos preferenciais e prejudicar a transferência de massa e as taxas de produção. Este tipo de reator não é interessante para cultivos aerados devido à depleção rápida do oxigênio no início da coluna. Neste sentido, reatores de leito fixo têm sido largamente empregados em processos fermentativos (PRADELLA, 2001; VERBELEN et al., 2006; KOSSEVA et al., 2009).

Diferentemente de reatores de leito fixo, reatores de leito fluidizado se caracterizam pela a movimentação das partículas ao longo da coluna do biorreator devido à agitação do meio de cultivo, a qual pode ser obtida pela recirculação do meio (Figura 1.4b), ou ainda, através da injeção de ar ou de um gás inerte, como no caso de reatores *airlift* (Figura 1.4c) e de coluna de bolhas (Figura 1.4d). A transferência de massa é facilitada devido à homogeneização do meio e à movimentação das partículas, o que facilita a remoção de gases

e evita a decantação de células no fundo do biorreator. Dessa forma, pode-se dizer que os biorreatores de leito fluidizado representam a combinação entre reatores de mistura completa e de leito fixo, apresentando boas condições de mistura (característica de um STR) e baixas tensões de cisalhamento (característica de leito fixo). É válido ressaltar ainda que tanto o tamanho e a densidade do suporte quanto a taxa de fluxo de líquidos e gases que passam pela coluna devem ser levados em consideração para que a mistura possa ser a mais homogênea possível (GROBOILLOT et al., 1994; VERBELEN et al., 2006; KOSSEVA et al., 2009). A comparação entre esses sistemas está representada na Tabela 1.1.

A principal finalidade da utilização de biorreatores com células imobilizadas deve-se às vantagens que esses sistemas proporcionam especialmente quando acoplados com sistemas operados continuamente. Convencionalmente, o processo contínuo se caracteriza por ser um sistema aberto, em que na idealidade, a vazão de alimentação (entrada) é idêntica à vazão de retirada de meio (saída), mantendo assim, o volume de reação constante. Dessa forma, o estado estacionário é alcançado e as variáveis de estado permanecem constantes ao longo do tempo de operação (GHALY e EL-TAWEL, 1997; FACCIOTTI, 2001; KUMAR et al., 2011). Este sistema se caracteriza especialmente por permitir operar por longos períodos de tempo, em condições que permitem manter as células em um mesmo estado fisiológico e as taxas máximas do produto constantes (FACCIOTTI, 2001). Devido a isso, e quando associados com a técnica de imobilização celular, altas taxas de produção podem ser obtidas, levando a grandes incrementos na produtividade volumétrica e na conversão. Além disso, o processo contínuo permite minimização das perdas de produto visto o maior controle do processo. Nestes sistemas é possível obter biorreatores com menor escala e com menores custos de investimento (GHALY e EL-TAWEL, 1997; VERBELEN et al., 2006; KUMAR et al., 2011).

Tabela 1.1. Vantagens e desvantagens das diferentes configurações de biorreatores de coluna com células imobilizadas.

Fluidização	Vantagens	Desvantagens
	Leito Fixo	Leito Fixo
Inexistente	Desenho simples, Baixos requerimentos de energia.	Mistura pouco eficiente do meio de cultivo, Acúmulo de gases e de biomassa suspensa, Formação de caminhos preferenciais, Dificuldades de transferência de massa.
Existente	Leito Fluidizado	Leito Fluidizado
Recirculação de meio	Boas condições de mistura, Baixa tensão de cisalhamento, Sistemas em escala industrial disponíveis.	Ampliação de escala mais complexa frente ao biorreator de leito fixo.
<i>Airlift</i>	Baixa tensão de cisalhamento, Elevada transferência de massa, Custo reduzido de bombeamento comparado a fluidização pela recirculação de meio.	Ampliação de escala mais complexa frente ao biorreator de leito fixo.
Coluna de bolhas	Equipamento simples e de baixo custo, Elevada transferência de massa.	Elevados requerimentos de gases.

Fonte: KOSSEVA et al., 2009; DRAGONE et al., 2010.

Neste sentido, diferentes trabalhos têm sido reportados na literatura para a produção de etanol empregando o modo de operação contínua e utilizando variados suportes de imobilização. Altas eficiências de produção foram obtidas em biorreator de leito fixo operado continuamente para a produção de etanol por diferentes linhagens de *S. cerevisiae* e de *K. marxianus* em suportes como o alginato de cálcio (JUNTER e JOUENNE, 2004; LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; KUMAR et al., 2011; GABARDO et al., 2012),

carragena (NIGAM, 2000), em caroços de azeitona (OZMIHCI e KARGI, 2008; 2009), e em sorgo (JI et al., 2012). Além disso, a utilização de biorreatores de leite fluidizado empregando alginato (CHRISTENSEN et al., 2011; GABARDO et al., 2012, 2014), poliestireno e polietileno (BARROS e SILVA, 2012) como suportes tem sido estudada para a produção de etanol, assim como em reator de tanque agitado utilizando álcool polivinílico como material suporte (REBROS et al., 2005).

Plantas industriais de álcool e cervejarias vêm empreendendo esforços no sentido de implementar processos contínuos com células imobilizadas em escala industrial. A tecnologia da produção contínua de álcool a partir de células flocculentas em sistemas contínuos, desenvolvida pela Natrontec, já tem sido implementada em diversas plantas industriais brasileiras, apresentando consideráveis melhorias de eficiência sobre o processo tradicional Melle-Boinnot, além de permitir baixos custos de produção, operação e manutenção (ZANIN et al., 2000). Na China, plantas piloto e comercial já se encontram implementadas para a produção contínua de etanol com células flocculentas (BAI et al., 2008; MUSSATTO et al., 2010). Além disso, diversas cervejarias vêm adotando processos contínuos de produção, dentre os quais têm destaque aqueles desenvolvidos pela Kirin Brewery Company (Japão), o qual utiliza células imobilizadas em vidro poroso; processo desenvolvido pela Labbat Breweries (Canadá), a qual emprega carragena como suporte e pela companhia Meura Delta (Bélgica), a qual emprega carbeto de silício sinterizado como matriz de imobilização (VIRKAJÄRVI, 2001).

1.5 Modelagem matemática do bioprocesso

O etanol é um bioproduto de grande importância comercial mundial, com demanda crescente no mercado atual, sendo cada vez mais necessário e indispensável ampliar o conhecimento e as informações relevantes deste bioprocessos, visando à otimização e o desenvolvimento de novas estratégias tecnológicas que permitam aprimorar este processo. A modelagem matemática consiste em uma ferramenta fundamental para maximização das condições ótimas de operação e para o êxito da implantação de plantas industriais, contribuindo para eficientes configurações em larga escala (BONOMI e SCHMIDELL, 2001; de ANDRADE et al., 2013). Processos fermentativos se caracterizam por envolver complexas interações de fenômenos físico-químicos, bioquímicos e genéticos, e, devido a isso, os modelos são geralmente baseados em suposições simplificadas e na idealidade, fornecendo a representação de apenas algumas das propriedades do processo (BONOMI e SCHMIDELL,

2001; LONGHI et al., 2004; LUVIZETTO-FACCIN et al., 2012). Dessa forma, entende-se como modelagem matemática a tentativa de representar através de equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente no biorreator, associados às velocidades com que as transformações bioquímicas se processam. Entre os principais objetivos da modelagem, encontram-se: 1) prever o comportamento do processo, 2) organizar informações desconexas dos eventos em um conjunto coerente, 3) identificar quais componentes e interações são importantes em um sistema complexo, e 4) compreender as características qualitativas do processo (BONOMI e SCHMIDELL, 2001).

De forma geral, os modelos matemáticos mais amplamente empregados no estudo de processos fermentativos consistem em modelos fenomenológicos não estruturados e não segregados, devido a sua menor complexidade e número de variáveis requeridas, os quais levam em consideração a observação mais fundamental do comportamento metabólico, sem levar em conta, por exemplo, as variações dos componentes intracelulares (BONOMI e SCHMIDELL, 2001; ZAFAR et al., 2005; SANSONETTI, et al., 2011). Estes modelos fenomenológicos são regidos por equações cinéticas que podem considerar diferentes fenômenos que interferem no processo produtivo, tais como limitação do crescimento celular pelo substrato, inibição pelo substrato e pelo produto, morte celular e produção de produto metabólico associado e não associado ao crescimento celular (BONOMI e SCHMIDELL, 2001).

Entre os diversos modelos matemáticos, o modelo cinético de Monod é o mais comumente utilizado para descrever a taxa de crescimento celular em processos fermentativos. No entanto, este modelo é bastante simples, levando em consideração apenas o efeito da limitação pelo substrato, necessitando, portanto, ser modificado e ampliado frequentemente até se alcançar um modelo adequado para cada tipo de processo (GHALY e EL-TAWEL, 1997; ZAFAR et al., 2005; SANSONETTI, et al., 2011). Esse requerimento geralmente ocorre porque a ausência da inibição é uma situação pouco comum na prática, especialmente em processos regidos por regime batelada, em que o acúmulo de metabólitos acaba interferindo desfavoravelmente sobre o crescimento celular (BONOMI e SCHMIDELL, 2001). Diante desse contexto, uma diversidade de modelos cinéticos têm sido reportados na literatura para descrever estes fenômenos (Tabela 1.2), os quais podem levar em consideração a limitação e inibição pelo substrato, tais como as equações representadas pelos modelos de Aiba e de Luong, assim como levar em conta a limitação pelo substrato e inibição pelo produto, conforme representado nos modelos de Jerusalimsky, Hinshelwood, e de Levenspiel, ou ainda, considerando somente a inibição pelo produto, conforme descrito no

modelo de Ghose e Tyagi (GHALY e EL-TAWEL, 1997; BIROL et al., 1998; BONOMI e SCHMIDELL, 2001; STANISZEWSKI et al., 2009).

Diante disso, uma diversidade de modelos matemáticos tem sido proposta para descrever a produção de etanol a partir de diferentes modelos fenomenológicos e cinéticos, e a partir de diferentes considerações de balanço de massa (BIROL et al., 1998; LEKSAWASDI et al., 2001; AGUILAR-USCANGA, et al., 2011; SANSONETTI, et al., 2011; MUSTAFA et al., 2014). De forma geral, os sistemas operados em regime batelada têm sido mais amplamente investigados frente aos sistemas contínuos para a obtenção dos parâmetros cinéticos de fermentação e na predição dos modelos matemáticos, uma vez que estes sistemas são tradicionalmente empregados em processos industriais, sendo a forma mais simples de condução do bioprocessos, a qual envolve um menor número de variáveis e parâmetros (BIROL et al., 1998; OZMIHCI e KARGI, 2007a; KOSTOV et al., 2012; de ANDRADE et al., 2013).

Devido ao apelo ambiental, muitos trabalhos sobre modelagem matemática têm relatado a utilização de resíduos agroindustriais líquidos como substratos alternativos para a produção de etanol, tais como resíduo líquido de beterraba, em que os autores utilizaram a equação logística e o modelo modificado de Gompertz para descrever o crescimento celular e a produção de etanol por *S. cerevisiae* comercial, em processo operado em regime batelada (DODIC et al., 2012). Melaço de cana também foi empregado para descrever a cinética de *S. cerevisiae* M30 em processo batelada a partir do modelo modificado de Monod, em que os autores consideraram a inibição pelo substrato e produto, além da taxa de morte celular (PHISALAPHONG, et al., 2006). Além destes, bagaço de cana de açúcar hidrolisado enzimaticamente para a bioconversão em etanol por linhagem de *S. cerevisiae* foi empregado, em que a cinética preditiva do crescimento celular foi obtida a partir do modelo modificado de Monod, considerando a inibição pelo produto a partir da expressão de Levenspiel, e a taxa de formação de etanol descrita pela equação de Luedeking e Piret (de ANDRADE et al., 2013). Por fim, amido foi utilizado como meio de cultivo para prever a cinética de produção de etanol por *S. cerevisiae* em sistema batelada, a partir da equação de Haldane, que considera a inibição do crescimento celular pelo substrato (JANG e CHOU, 2012).

Tabela 1.2. Modelos cinéticos não estruturados descritos na literatura para velocidade específica de crescimento (μ).

Considerações	Modelo cinético
Limitação pelo substrato	
$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$	Monod
Limitação e inibição pelo substrato	
$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \exp \left(- \frac{S}{K_{s'}} \right)$	Aiba
$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{S}{S_{\max}} \right)$	Luong
Limitação pelo substrato e inibição pelo produto	
$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right)$	Jerusalimsky
$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - K_p P)$	Hinshelwood
$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n$	Levenspiel
Inibição pelo produto	
$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)$	Ghose e Tyagi

Fonte: Monod, 1950; Ghaly e El-Taweel, 1997; Birol et al., 1998; Bonomi e Schmidell, 2001.

Neste mesmo contexto, diferentes abordagens de modelos matemáticos têm sido descritos a partir de soro de queijo para a produção de etanol, sendo estudados em sua maior parte, a partir de sistemas operados em regime batelada. Modelo modificado de Monod foi utilizado para descrever o comportamento da produção, em batelada, de etanol por *K. marxianus* MTCC 1288 em soro de queijo, levando em consideração a inibição do crescimento celular tanto pelo substrato quanto pelo produto, através da adição das expressões dos modelos de Andrews e de Jerusalimsky, respectivamente (ZAFAR et al., 2005). Diferente proposta de modelagem foi realizada por Parrondo et al. (2000), em que os autores utilizaram modelo cinético não estruturado a partir da equação de Ricatti para descrever a

produção de etanol por *K. fragilis* CECT 1123 em permeado de soro de queijo. Além disso, modelo preditivo da produção de etanol em meio soro de queijo a partir da co-imobilização de *S. cerevisiae* B₄ e da enzima β -galactosidase em alginato de cálcio, também foi realizado, através da utilização do modelo modificado de Monod, com a adição dos termos de inibição do crescimento celular pelo substrato e pelo produto (STANISZEWSKI et al., 2007). Diferentemente dos trabalhos anteriores relatados, um modelo bioquímico estruturado foi utilizado para descrever a cinética de produção de etanol por *K. marxianus* CBS 397 a partir de soro de ricota, o qual levou em consideração os intermediários metabólicos gerados no processo (SANSONETTI, et al., 2011). Embora menos frequente, a utilização da cultura contínua para a produção de etanol por soro de queijo também tem sido relatada entre os trabalhos de modelagem. Entre estes, encontra-se o estudo do perfil da produção de etanol em soro de queijo pela co-imobilização de *S. cerevisiae* B₄ e β -galactosidase em esferas de alginato, a partir do processo semi-contínuo, em que os modelos de Monod e de Levenspiel foram empregados, bem como a inserção de equações que representam o efeito inibitório de compostos tóxicos e da repressão catabólica foram utilizadas (STANISZEWSKI et al., 2009). Além deste, outro trabalho utilizando sistema contínuo foi desenvolvido para prever a cinética de produção de etanol por *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619 em soro de queijo, em que os autores levaram em consideração a influência da limitação pelo substrato, inibição pelo substrato e produto e morte celular, além de utilizar a equação de Luedeking e Piret para descrever a taxa de geração de produto (GHALY e EL-TAWEL, 1997).

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e manutenção celular

Leveduras dos gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* foram utilizadas neste trabalho. Seis diferentes linhagens da espécie *Kluyveromyces marxianus* foram testadas: 1) *K. marxianus* CBS 6556 proveniente do *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (Holanda) e fornecida pelo Centro de Desenvolvimento Biotecnológico (SC, Brasil); 2) *K. marxianus* CCT 4086 e 3) *K. marxianus* var. *lactis* CCT 2653, ambas adquiridas da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (SP, Brasil); 4) *K. marxianus* UFMG 95 302.2; 5) *K. marxianus* UFMG 95 205.3, e 6) *K. marxianus* UFMG 95 270.1, cedidas pelo Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Minas Gerais (MG, Brasil).

Duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* empregadas em plantas industriais de etanol no Brasil também foram testadas neste trabalho: *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e PE-2, ambas cedidas pelo Departamento de Genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (PE, Brasil).

Estas linhagens foram estocadas em solução contendo 40 % de glicerol e mantidas a -20 °C. Para uso imediato, as linhagens de *K. marxianus* e *S. cerevisiae* foram mantidas em placas de Petri contendo meio nutritivo YEP-Lactose ou YEPD, respectivamente. Previamente a sua utilização, os meios de cultivos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. As linhagens foram inoculadas através da técnica de semeadura por esgotamento em estrias para a obtenção de colônias isoladas, incubadas em estufa a 30 °C, por 24 h, para o crescimento celular e, posteriormente armazenadas a 4 °C.

2.2 Meios de cultivo

Para o preparo dos inóculos e obtenção de biomassa necessária para o processo de imobilização celular, foram utilizados os meios YEP-Lactose ou YEPD, compostos de: extrato de levedura (10 g L⁻¹), peptona bacteriológica (20 g L⁻¹), lactose ou glicose (20 g L⁻¹), e pH ajustado para 7,0 com solução de NaOH 0,1 M.

Dois distintos meios de cultivo foram utilizados para o processo de fermentação: soro de queijo em pó, fornecido pela Elegê Laticínios S.A. (RS, Brasil), e permeado de soro de queijo em pó, adquirido da empresa Sooro (PR, Brasil). Para a preservação, ambos

permaneceram estocados em *freezer* a -16 °C. A composição centesimal desses dois substratos está representada na Tabela 2.1. O laudo técnico fornecido pelas empresas, contendo informações mais detalhadas de características organolépticas, físico-químicas e microbiológicas, encontram-se nos Anexos 1 e 2 deste documento. Este trabalho foi realizado a partir do mesmo lote para soro em pó, assim como para permeado de soro de queijo em pó.

Tabela 2.1. Composição centesimal (%) de soro e permeado de soro de queijo em pó (base seca).

Componentes	Soro de queijo	Permeado de soro de queijo
Lactose	79,0	92,4
Proteínas	12,5	1,8
Gordura	1,1	0,0
Sais minerais	7,5	4,9
Umidade	2,0	0,9

*Fonte: Elegê Laticínios S.A; Sooro.

A suplementação de soro e permeado de soro de queijo foi avaliada neste trabalho a partir da combinação de diferentes fontes de nitrogênio: extrato de levedura bruto e perptona bacteriológica, nas concentrações de 3 g L⁻¹ e de 5 g L⁻¹, respectivamente.

Previamente a sua utilização e com a finalidade de evitar a precipitação das proteínas durante o processo de esterilização (121 °C, 15 min), o soro de queijo foi hidrolisado com uma protease comercial (alcalase 2.4L, Novozymes, PR, Brasil) a uma temperatura de 55 °C, pH 8,5 por 3 h, na concentração de 1 mL de enzima para cada litro de meio.

2.3 Imobilização celular: esferas de alginato de cálcio

A imobilização das células foi realizada de acordo com metodologia modificada de Kierstan et al. (1977). Uma colônia isolada de cada linhagem de levedura investigada neste trabalho, foi transferida assepticamente para frascos cônicos de 2 L contendo 800 mL de meio YEP-Lactose ou glicose, para crescimento de *K. marxianus* ou *S. cerevisiae*, respectivamente, e, posteriormente, incubadas em agitador rotacional, sob agitação orbital de 180 rpm, a uma temperatura de 30 °C, por 15 h, até fase de crescimento exponencial. Em seguida, os meios de cultivo foram recolhidos e centrifugados a 3000 × g por 15 min, a 30 °C. Após, as células

foram lavadas por duas vezes com água destilada estéril, novamente centrifugadas ($3000 \times g$ por 15 min, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$) e ressuspendidas pela adição de 10 mL de água destilada estéril a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A suspensão celular prontamente preparada foi misturada em uma solução de alginato de sódio 40 g L^{-1} , previamente esterilizada a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Após este procedimento, a mistura composta da suspensão celular e do alginato de sódio foi adicionada por gotejamento, através de uma bomba peristáltica, em uma solução estéril de cloreto de cálcio $0,1\text{ M}$, mantida a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 2.1). Para a estabilização do sistema, as esferas permaneceram em banho-termostato a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min sob agitação branda. Em seguida à formação das esferas ($3,8\text{ mm}$ de diâmetro), estas foram recolhidas e lavadas novamente por três vezes com água destilada estéril a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantidas *overnight* em água peptonada (1 g L^{-1}) estéril contendo 10% em volume de cloreto de cálcio $0,1\text{ M}$. A concentração de células imobilizadas foi de $0,02\text{ g}$ de células (peso seco) para cada 1 mL de solução de alginato utilizado.



Figura 2.1 Processo de imobilização celular em esferas de alginato de cálcio (Fonte: o autor).

2.4 Biorreator de coluna

A condução do bioprocessamento para a produção de etanol foi realizada em biorreator de coluna de vidro projetado em nosso grupo de pesquisa, conforme observado na Figura 2.2.

Este apresenta diâmetro interno de 30 mm e altura de 240 mm na seção de fluidização, sendo revestido por uma camisa de água para controle da temperatura.

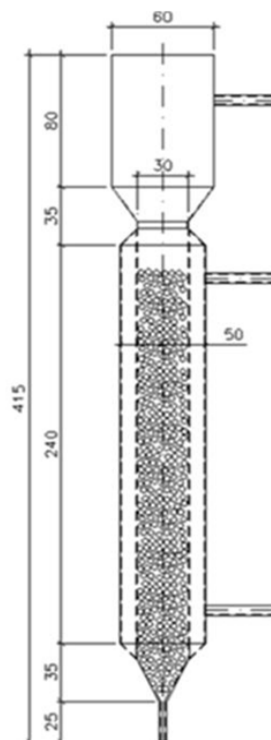


Figura 2.2. Biorreator de coluna de vidro utilizado neste trabalho.

2.4.1 Formas de condução do bioprocessamento em biorreator de coluna

O presente trabalho envolveu diferentes formas de condução do bioprocessamento para a produção de etanol, visando compreender os fenômenos cinéticos e a otimização do processo. Entre estes, encontram-se os sistemas de operação batelada, batelada repetida, cultura contínua, cultura contínua em sequência e cultura contínua A-stat. A representação esquemática de alguns desses processos encontra-se na Figura 2.3.

Biorreatores operados em regime batelada foram realizados para avaliar e conhecer o perfil cinético do consumo dos diferentes substratos e da produção de etanol a partir de diferentes linhagens e gêneros de leveduras, enquanto que a utilização de outras formas de operação, tais como batelada repetida e as diferentes formas de condução da cultura contínua foram realizadas na tentativa de melhorar a eficiência de cada processo. Todos estes sistemas foram realizados em leito fluidizado para obter melhores condições de mistura e de transferência de massa. A abordagem detalhada de cada um desses processos e dos sistemas experimentais será apresentada nos itens a seguir deste documento.

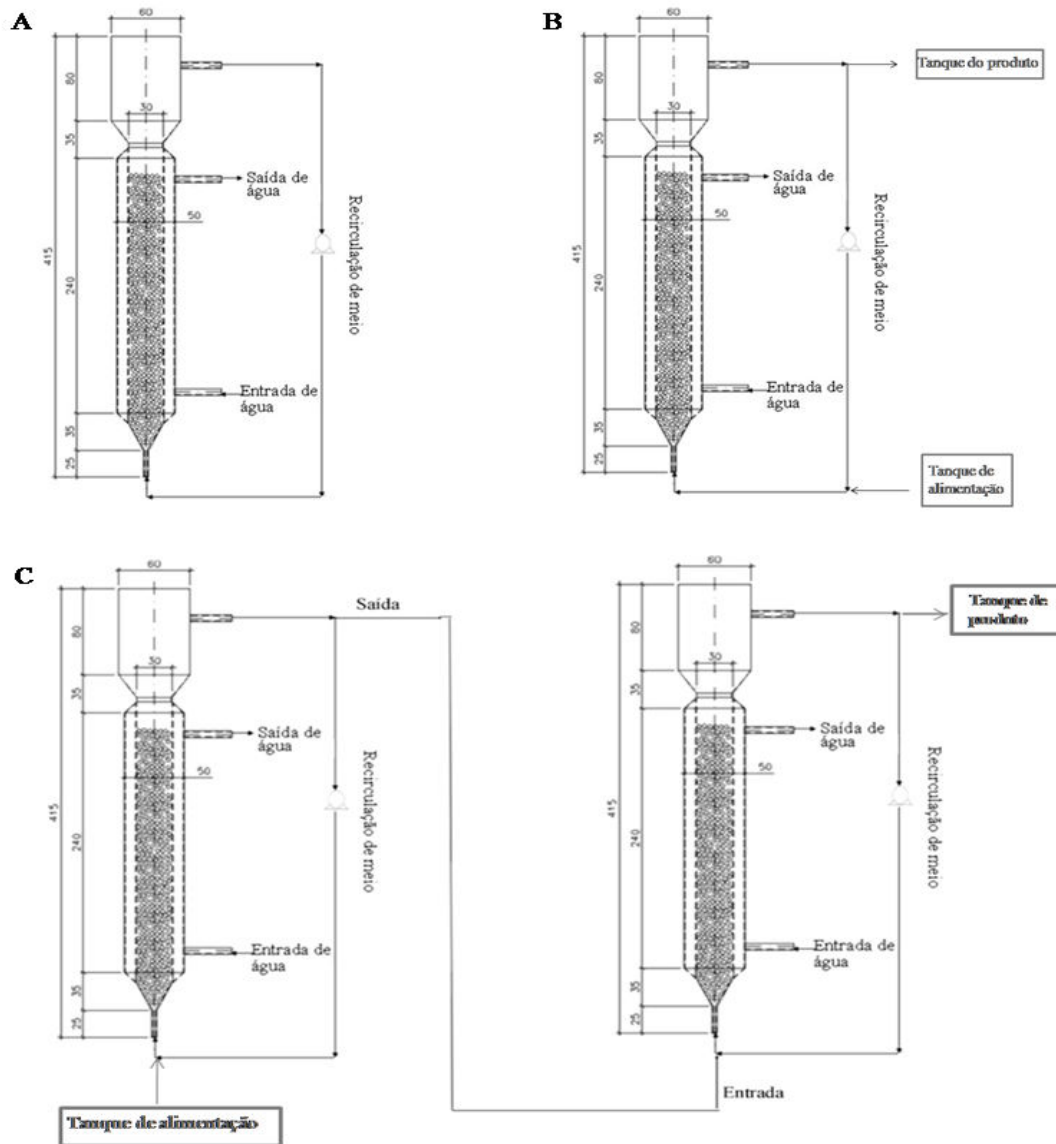


Figura 2.3. Formas de operação do biorreator de coluna de vidro: (A) regime batelada; (B) cultura contínua; (C) cultura contínua de dois estágios em sequência.

2.5. Avaliação da produção de etanol a partir de diferentes linhagens de *Kluyveromyces marxianus* em sistemas operados em regime batelada e em cultura contínua

Este experimento foi dividido em três etapas. Na primeira, foi realizada a seleção de seis diferentes linhagens de *K. marxianus* e seis diferentes meios de cultivo em agitador rotacional para avaliar a capacidade de bioconversão de lactose a etanol. Na segunda etapa experimental, foi realizado o estudo da produção de etanol em biorreatores de coluna de leito fluidizado com células imobilizadas, operados em regime batelada, utilizando as linhagens

que apresentaram a maior capacidade de bioconversão e o meio mais apropriado, verificados na etapa anterior. Biorreatores contínuos foram testados na terceira etapa experimental, utilizando a linhagem que apresentou os melhores resultados nas etapas anteriores, em que um planejamento experimental foi realizado para avaliar as variáveis do processo: taxas de diluição e concentração de meio de cultivo. Em seguida, biorreatores contínuos de dois estágios operados em sequência foram realizados para a otimização do bioprocessamento a partir dos resultados obtidos no planejamento experimental.

A análise dos resultados foi realizada a partir de análise de variância (ANOVA), teste de Tukey ou de regressão múltipla, utilizando o *software* Statistica 10.0 (StatSoft, Estados Unidos da América).

2.5.1 Seleção de linhagens e meios de cultivo para a produção de etanol em agitador rotacional

Seis diferentes linhagens de *K. marxianus* (item 2.1) foram testadas: *K. marxianus* CBS 6556, CCT 4086, CCT 2653, UFMG 95 302.2, UFMG 95 205.3 e UFMG 95 270.1.

Para a condução do experimento, estas linhagens foram transferidas assepticamente através de uma alçada para frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de meio YEP-Lactose (item 2.2) e crescidas em agitador rotacional, sob agitação orbital de 180 rpm, por 12 h, a 30 °C. Em seguida, a concentração celular foi ajustada para densidade óptica igual a 1 (DO, 600 nm) e os seis diferentes inóculos prontamente preparados foram imediatamente adicionados em seis diferentes meios de cultivo esterilizados (121 °C, 15 min), que são: 1) soro de queijo reconstituído (70 g L⁻¹ de soro de queijo em pó, contendo 56 g L⁻¹ de lactose, 9 g L⁻¹ de proteína, e 5 g L⁻¹ de minerais), 2) permeado de soro de queijo reconstituído (60 g L⁻¹ de soro de queijo em pó, contendo 56 g L⁻¹ de lactose, 1 g L⁻¹ de proteína e 3 g L⁻¹ de minerais), 3) soro de queijo adicionado de 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 4) permeado de soro de queijo adicionado de 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5) soro de queijo adicionado de 3 g L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g L⁻¹ de peptona bacteriológica, e 6) permeado de soro de queijo adicionado de 3 g L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g L⁻¹ de peptona bacteriológica. Para evitar a precipitação das proteínas durante o processo de esterilização (121 °C, 15 min), o soro de queijo foi hidrolisado com uma protease comercial (alcalase 2.4L, Novozymes, PR, Brasil) a uma temperatura de 55 °C, pH 8,5 por 3 h, na concentração de 1 mL de enzima para cada litro de meio.

A fermentação foi conduzida em frascos cônicos de 250 mL contendo 144 mL de meio de cultivo e 16 mL de inóculo, totalizando 160 mL de meio de fermentação, a 150 rpm e 30 °C, por 48 h e 168 h.

2.5.2 Cultivos em biorreator de coluna de leito fluidizado sob diferentes formas de operação

Os experimentos para a produção de etanol a partir de células imobilizadas foram realizados em biorreator de coluna de vidro (item 2.4). Este foi preenchido com 85 mL de esferas de alginato de cálcio (item 2.3), e com 250 mL de permeado de soro de queijo. A temperatura do biorreator foi mantida a 30 °C através da recirculação da água proveniente de um banho termostato para a camisa do biorreator. A fluidização do sistema foi realizada através da recirculação do meio de cultivo por meio de uma bomba peristáltica, sendo a vazão volumétrica utilizada de 250 mL min⁻¹ (fluxo ascendente).

Biorreatores operados em regime batelada (Figura 2.4) foram realizados utilizando como biocatalisadores as linhagens *K. marxianus* CBS 6556, CCT 4086 e CCT 2653 imobilizadas em alginato de cálcio. Permeado de soro de queijo 60 g L⁻¹ foi utilizado como meio de cultivo e o bioprocesso foi conduzido por 24 h. Estes experimentos foram realizados em duplicata.



Figura 2.4. Biorreator de leito fluidizado com células imobilizadas operado em regime batelada (Fonte: o autor).

Biorreatores contínuos de leito fluidizado foram realizados por um período de 128 h, onde três diferentes taxas de diluição ($0,1 \text{ h}^{-1}$, $0,2 \text{ h}^{-1}$, e $0,3 \text{ h}^{-1}$) e cinco diferentes concentrações de permeado de soro de queijo (60 g L^{-1} , 90 g L^{-1} , 120 g L^{-1} , 150 g L^{-1} , e 180 g L^{-1}) foram testadas, de acordo com planejamento experimental hexagonal (Tabela 2.2). A fermentação foi conduzida inicialmente na forma de batelada visando à acumulação de células e após a décima primeira hora, iniciou a alimentação no sistema contínuo (Figura 2.5), onde os resultados experimentais foram aproximados de uma equação polinomial quadrática:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot D + \beta_2 \cdot C_{WP} + \beta_{11} \cdot D^2 + \beta_{22} \cdot C_{WP}^2 + \beta_{12} \cdot D \cdot C_{WP} \quad (1)$$

Em que D e C_{WP} são as variáveis de regressão (taxa de diluição e concentração de permeado de soro de queijo) e Y representa as variáveis dependentes, neste caso, fator de conversão de lactose a etanol, produtividade volumétrica e açúcar residual. Os símbolos β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} e β_{12} são os coeficientes de regressão do modelo.

Tabela 2.2. Planejamento experimental hexagonal para avaliar o efeito da taxa de diluição (D) e da concentração de permeado de soro de queijo (C_{WP}) em sistema contínuo.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis não codificadas	
	x_1	x_2	D (h^{-1})	C_{WP} (g L^{-1})
1	1	-1	0,3	90
2	-1	-1	0,1	90
3	1	1	0,3	150
4	-1	1	0,1	150
5	0	-1,5	0,2	60
6	0	1,5	0,2	180
7	0	0	0,2	120
8	0	0	0,2	120
9	0	0	0,2	120



Figura 2.5 Biorreator de coluna leito fluidizado com células imobilizadas operado continuamente (Fonte: o autor).

Biorreatores contínuos de dois estágios operados em sequência foram realizados por um período de 128 h e com taxa de diluição (D) de $0,1 \text{ h}^{-1}$. A alimentação começou após 11 h de operação batelada, com uma concentração de permeado de soro de queijo de 150 g L^{-1} , em que a saída efluente do primeiro biorreator serviu como alimentação para o segundo biorreator. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

2.6 Avaliação da produção de etanol a partir de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* em sistemas operados em regime batelada e batelada repetida

Este experimento foi realizado utilizando diferentes estratégias de cultivo: monocultivo de *S. cerevisiae* e de *K. marxianus* e o co-cultivo de ambas, em meios soro e permeado de soro de queijo previamente hidrolisados com β -galactosidase, concentrados ou não concentrados, sem a adição de nutrientes. Estes experimentos foram conduzidos em biorreatores operados em regime batelada, utilizando células imobilizadas em alginato de cálcio. Para alcançar melhorias no processo, batelada repetida foi realizada a partir da estratégia de cultivo que apresentou a melhor capacidade de bioconversão.

2.6.1 Microrganismos

Duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* reconhecidamente produtoras de etanol e empregadas em plantas industriais de etanol no Brasil foram testadas neste trabalho: *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2 (item 2.1). Estas linhagens foram escolhidas devido a sua alta capacidade de produção de etanol e tolerância a concentrações elevadas de açúcar e de etanol. A linhagem *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 foi utilizada neste estudo para fins de comparação de cinética com as tradicionais *S. cerevisiae*, uma vez que o gênero *Kluyveromyces* é bem caracterizado pela capacidade de produzir etanol a partir de lactose e galactose. A escolha dessa linhagem foi devida à alta capacidade de bioconversão de lactose a etanol, previamente observada na etapa anterior (item 2.5).

2.6.2 Meios de cultivo

Soro e permeado de soro de queijo em pó (item 2.2) foram utilizados neste trabalho. Previamente a sua utilização, soro de queijo reconstituído (70 g L^{-1} , contendo 56 g L^{-1} de lactose, 9 g L^{-1} de proteína, e 5 g L^{-1} de minerais) e permeado de soro de queijo reconstituído (60 g L^{-1} , contendo 56 g L^{-1} de lactose, 1 g L^{-1} de proteína e 3 g L^{-1} de minerais) foram hidrolisados com β -galactosidase comercial (Maxilact LX 5000, atividade enzimática $\geq 5000 \text{ NLU g}^{-1}$, DSM Food Specialties, Holanda). Para tanto, um volume de $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ de enzima foi adicionado nos meios soro e permeado de soro que queijo e a mistura foi mantida a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, por 8 h, sob branda agitação. A hidrólise do meio permeado de soro de queijo concentrado (180 g L^{-1} de permeado de soro em pó) foi realizada de forma similar, em que um volume de $1,5 \text{ mL L}^{-1}$ de enzima foi adicionado ao meio, onde a reação ocorreu a partir das mesmas condições descritas. Para evitar a precipitação das proteínas durante o processo de esterilização ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min), o soro de queijo foi previamente hidrolisado com protease comercial (alcalase 2.4L, Novozymes, PR, Brasil) a uma temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 8,5 por 3 h, na concentração de 1 mL de enzima para cada litro de meio.

2.6.3 Cultivos em biorreator de coluna de leite fluidizado

Previamente ao início dos testes de fermentação, as linhagens de *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2 e *K. marxianus* CCT 4086 foram imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, de acordo a metodologia anteriormente descrita (item 2.3).

Os cultivos em biorreator de leite fluidizado operados em regime batelada ocorreram em biorreator de coluna de vidro (item 2.4). Este foi preenchido com 85 mL de esferas de alginato de cálcio e com 250 mL de meio de cultivo. A linhagem *S. cerevisiae* CAT-1 foi escolhida para os experimentos de co-cultivo, embora ambas as linhagens tenham apresentado comportamento similar em monocultura. Para os experimentos de co-cultivo, foram adicionados 42,5 mL de esferas correspondentes a cada levedura imobilizada (*S. cerevisiae* e *K. marxianus*), totalizando um volume final de 85 mL, enquanto que para o monocultivo, 85 mL de esferas da mesma linhagem foram adicionados no biorreator. Soro de queijo (70 g L^{-1}) e permeado de soro de queijo (70 g L^{-1} e 180 g L^{-1}) hidrolisados com β -galactosidase foram utilizados como meios de cultivo. Os experimentos foram realizados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, e a fluidização do sistema foi realizada através da recirculação do meio de cultivo por meio de uma bomba peristáltica, sendo a vazão volumétrica utilizada de 250 mL min^{-1} (fluxo ascendente).

Bateladas repetidas de leite fluidizado foram conduzidas de forma similar aos experimentos em batelada. Permeado de soro de queijo concentrado (180 g L^{-1}) e hidrolisado

com β -galactosidase foi utilizado como meio de cultivo nesta etapa experimental. Cada batelada foi realizada por um período de 24 h, em que após este período, o meio de cultivo foi drenado em sua totalidade, mantendo as esferas no interior do biorreator, e imediatamente o mesmo volume de meio e com igual concentração (180 g L^{-1}) foi adicionado no biorreator para iniciar o próximo ciclo. Este procedimento foi repetido por 10 ciclos, totalizando 240 h de cultivo. Este experimento foi conduzido utilizando *K. marxianus* CCT 4086 como biocatalisador.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* Statistica 10.0 (StatSoft, Estados Unidos da América).

2.7 Avaliação da produção de etanol por sistema contínuo A-stat com células livres e imobilizadas e modelagem matemática do bioprocessamento

Este experimento foi realizado para ampliar o conhecimento da produção de etanol em sistemas contínuos por *K. marxianus* CCT 4086, linhagem que apresentou alta capacidade de bioconversão ao longo desta pesquisa, e para descrever matematicamente o comportamento cinético. O sistema contínuo A-stat (*accelerostat technique*) é uma ferramenta bastante importante para auxiliar o entendimento do comportamento metabólico e fisiológico em uma ampla faixa de taxas de diluição em curto período de tempo. Duas taxas de aceleração foram testadas neste trabalho em sistema tanto de células livre quanto imobilizadas. Em seguida, a modelagem matemática do bioprocessamento foi estudada, a partir de quatro modelos cinéticos propostos em literatura.

2.7.1 Microrganismo e meio de cultivo

A linhagem *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 foi utilizada neste experimento. Para a condução do bioprocessamento, meio soro de queijo em pó reconstituído (70 g L^{-1} , contendo 56 g L^{-1} de lactose, 9 g L^{-1} de proteína, e 5 g L^{-1} de minerais), foi empregado. Previamente a sua esterilização, este foi hidrolisado com protease comercial (alcalase 2.4L, Novozymes, PR, Brasil) a uma temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 8,5 por 3 h, para evitar a precipitação das proteínas, na concentração de 1 mL de enzima para cada litro de meio.

2.7.2 Sistema contínuo A-stat

Dois sistemas de cultivo foram testados em biorreator contínuo A-stat e duas diferentes taxas de aceleração foram avaliadas. O sistema de células livres foi realizado através do preparo do inóculo, em que uma colônia isolada da linhagem foi transferida assepticamente para frasco cônico de 250 mL, contendo 50 mL de meio YEP-Lactose, e crescida em agitador rotacional, sob agitação orbital de 180 rpm, por 12 h, a 30 °C. Em seguida, a concentração celular foi ajustada para densidade óptica igual a 1 (DO, 600 nm), correspondendo a uma concentração de 1,4 g L⁻¹ de *K. marxianus* CCT 4086, e após, adicionada em um volume correspondente a 10 % do volume total de meio de cultivo (355 mL) (Figura 2.6).



Figura 2.6. Sistema contínuo de produção de etanol utilizando a técnica A-stat com células livres (Fonte: o autor).

Em cultivo com células imobilizadas, a coluna do biorreator foi preenchida com 85 mL de esferas de alginato de cálcio contendo as células em seu interior, previamente

preparadas (item 2.3), e 270 mL de meio foram adicionados, totalizando um volume de 355 mL no biorreator. A temperatura nos dois sistemas, tanto de células livres como imobilizadas, foi mantida a 30 °C e a fluidização e homogeneização do sistema foi realizada através da recirculação do meio de cultivo por meio de uma bomba peristáltica, com vazão volumétrica de 250 mL min⁻¹ (fluxo ascendente).

As culturas iniciaram no modo de operação batelada, sendo que após 24 h iniciou a alimentação para o sistema de células livres, e após 7 h iniciou a alimentação para o sistema de células imobilizadas. O gradual aumento da taxa de diluição (D) foi ajustado para duas taxas de aceleração (a): 0,0015 h⁻² e 0,00667 h⁻², e controlado pela unidade Biostat B (Braun Biotech International, Alemanha).

Os dois sistemas A-stat foram realizados em 30 h e 100 h, de acordo com as taxas de aceleração (0,00667 h⁻² e 0,0015 h⁻²), sendo as amostras coletadas em intervalos de 1 h para o cultivo de 30 h, e a cada 4 h, para o cultivo de 100 h.

2.7.3 Técnica de *Washout*

A técnica de “washout” foi realizada com a finalidade de calcular e comparar o valor da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) obtida em sistema contínuo convencional daquela obtida pelo sistema contínuo A-stat. Biorreatores contínuos de células livres foram preparados de acordo com o descrito anteriormente (item 2.7.2). A alimentação neste sistema iniciou após 24 h de operação batelada, em que a cultura foi mantida a uma taxa de diluição (D) de 0,05 h⁻¹ por 48 h para alcançar o estado estacionário. Após, a taxa de diluição (D) foi alterada abruptamente para 0,4 h⁻¹ e a queda de biomassa foi controlada por 4 h.

2.7.4 Modelagem matemática do bioprocesso

A modelagem matemática da produção contínua de etanol em sistema A-stat a partir do cultivo de células livres foi descrita utilizando a combinação de equações diferenciais para o crescimento celular, consumo de lactose e produção de etanol, em que o balanço de massa foi descrito correlacionando suas respectivas concentrações (X , S , P) às taxas cinéticas (r_x , r_s , r_p), de acordo com as seguintes equações:

$$\frac{dX}{dt} = -DX + r_x \quad (2)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_i - S_0) - r_s \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = -DP + r_p \quad (4)$$

Em que a taxa de diluição (D) no sistema A-stat varia com o tempo (t), conforme a equação:

$$D = D_0 + at \quad (5)$$

E onde, r_x , r_s , r_p são taxa de crescimento celular, taxa de consumo de substrato e taxa de produção de etanol, respectivamente. Estas taxas foram descritas conforme o exposto a seguir, e a designação da simbologia encontra-se na seção Nomenclatura deste documento:

$$r_x = \mu X \quad (6)$$

$$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X \quad (7)$$

ou

$$r_s = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) X \quad (8)$$

$$r_p = (\alpha\mu + \beta) X \quad (9)$$

Neste trabalho, a taxa de consumo de substrato (r_x) foi equacionada de duas formas (Eqs. 7 e 8). A primeira, leva em conta a metabolização do substrato apenas para o crescimento celular, enquanto que a segunda considera também a utilização do substrato para a manutenção celular (m_s). Em relação à taxa de formação de produto (r_p) esta foi descrita conforme a expressão de Luedeking e Piret (Eq. 9), onde α é a constante associada ao crescimento celular para a formação do produto e β a constante não associada ao crescimento celular para a formação do produto.

Neste trabalho, a modelagem foi realizada a partir de quatro diferentes modelos cinéticos não estruturados descritos na literatura: Monod (Eq. 10), Jerusalimsky (Eq. 11), Hinshelwood (Eq. 12) e a combinação dos modelos de Levenspiel com Ghose e Tyagi (Eq. 13). Estes modelos diferiram na expressão da velocidade específica de crescimento celular (μ) e na taxa de consumo de substrato (r_x), sendo que a combinação das diferentes expressões de μ com as duas propostas de r_x utilizadas neste trabalho, resultou em oito modelos matemáticos (Tabela 2.3). Um resumo contendo o balanço de massa para sistema contínuo A-stat a partir dos quatro modelos não estruturados encontra-se na Tabela 2.4.

A estimação dos parâmetros dos modelos foi realizada a partir do *software* EMSO (SOARES e SECCHI, 2003), utilizando o método dos poliedros flexíveis (NELDER e MEAD, 1965).

Tabela 2.3. Expressões para a taxa de consumo de substrato (r_s) e velocidade específica de crescimento (μ) utilizadas nos modelos propostos deste trabalho.

Modelo	Taxa de consumo de substrato		Velocidade específica de crescimento	
MON	$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X$	(7)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$	(10)
MON- M_S	$r_s = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) X$	(8)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$	(10)
JRL	$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X$	(7)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right)$	(11)
JRL- M_S	$r_s = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) X$	(8)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right)$	(11)
HSW	$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X$	(7)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - K_p P)$	(12)
HSW- M_S	$r_s = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) X$	(8)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - K_p P)$	(12)
LGT	$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X$	(7)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)$	(13)
LGT- M_S	$r_s = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) X$	(8)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)$	(13)

MON e MON- m_s : Modelo de Monod sem considerar e considerando o coeficiente de manutenção; JRL e JRL- m_s : modelo de Jerusalimsky sem considerar e considerando o coeficiente de manutenção; HSW e HSW- m_s : Modelo de Hinshelwood sem considerar e considerando o coeficiente de manutenção; LGT e LGT- m_s : Modelo de Levenspiel combinado com Ghose e Tyagi sem considerar e considerando o coeficiente de manutenção.

Tabela 2.4. Balanço de massa para sistema contínuo A-stat a partir dos quatro modelos não estruturados.

	Biomassa (dX/dt)	Substrato (dS/dt)	Produto (dP/dt)
Monod	$\frac{dX}{dt} = -(D_0 + at)X + \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) X$	$\frac{dS}{dt} = (D_0 + at)(S_i - S_0) - \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) X$ $\frac{dS}{dt} = (D_0 + at)(S_i - S_0) - \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) X + m_s X$	$\frac{dP}{dt} = -(D_0 + at)P + \alpha \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) X + \beta X$
Jerusalimsky	$\frac{dX}{dt} = -(D_0 + at)X + \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right) X$	$\frac{dS}{dt} = (D_0 + at)(S_i - S_0) - \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right) X$ $\frac{dS}{dt} = (D_0 + at)(S_i - S_0) - \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right) X + m_s X$	$\frac{dP}{dt} = -(D_0 + at)P + \alpha \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right) X + \beta X$
Hinshelwood	$\frac{dX}{dt} = -(D_0 + at)X + \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - K_p P) X$	$\frac{dS}{dt} = (D_0 + at)(S_i - S_0) - \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - K_p P) X$ $\frac{dS}{dt} = (D_0 + at)(S_i - S_0) - \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - K_p P) X + m_s X$	$\frac{dP}{dt} = -(D_0 + at)P + \alpha \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - K_p P) X + \beta X$
Levenspiel combinado com Ghose e Tyagi	$\frac{dX}{dt} = -(D_0 + at)X + \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) X$	$\frac{dS}{dt} = (D_0 + at)(S_i - S_0) - \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) X$ $\frac{dS}{dt} = (D_0 + at)(S_i - S_0) - \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) X + m_s X$	$\frac{dP}{dt} = -(D_0 + at)P + \alpha \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) X + \beta X$

2.8 Métodos analíticos

2.8.1 Determinação de biomassa livre e imobilizada

A determinação da concentração de biomassa suspensa foi realizada pela correlação de curva de calibração densidade óptica (600 nm) *versus* peso seco (g L^{-1}). Amostras em duplicata foram coletadas, centrifugadas ($3000 \times g$, 15 min), lavadas e novamente centrifugadas ($3000 \times g$, 15 min) e ressuspendidas para o mesmo volume inicial, para posterior leitura em espectrofotômetro. A concentração de biomassa imobilizada foi realizada através do rompimento das esferas de alginato de cálcio com solução tampão de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,2). Cinco esferas foram dissolvidas em 10 mL de tampão através da agitação abrupta por 15 min em vórtex para acelerar o processo de rompimento (GABARDO et al., 2011). Em seguida, a concentração celular foi determinada de acordo com a recente descrição. Em alguns momentos, a técnica de gravimetria também foi utilizada para a determinação de biomassa. Neste caso, 10 mL de biomassa foram coletados em duplicata; em seguida estas foram centrifugadas ($3000 \times g$, 15 min), lavadas, novamente centrifugadas ($3000 \times g$, 15 min) e colocadas para secar a $75 \text{ }^\circ\text{C}$, até atingirem massa constante. A concentração de biomassa é obtida pela diferença de massa entre o tubo de centrífuga vazio (previamente seco em estufa a $75 \text{ }^\circ\text{C}$) e o tubo de centrífuga contendo a biomassa, considerando o volume coletado.

2.8.2 Determinação de açúcares e etanol

As amostras foram coletadas em duplicata, centrifugadas ($3000 \times g$, 15 min), e o sobrenadante foi filtrado em membranas de acetato de celulose ($0,22 \mu\text{m}$) para posterior análise. As concentrações de lactose, glicose, galactose e etanol foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, Japão), com detector de índice de refração (IR) e coluna Bio-Rad Aminex HPX 87H ($300 \text{ mm} \times 7,8 \text{ mm}$), utilizando solução de ácido sulfúrico 5 mM (H_2SO_4) como fase móvel na vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ a $45 \text{ }^\circ\text{C}$, e um volume de injeção de amostra de $20 \mu\text{L}$.

INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS III, IV E V

Os Capítulos III, IV e V estão apresentados na forma de artigos científicos. Em cada um destes capítulos consta a introdução, os materiais e as metodologias empregadas, juntamente com a discussão dos resultados obtidos e as conclusões pertinentes a cada etapa de trabalho desenvolvida.

No primeiro artigo (Capítulo III - “Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors”), foi realizada a otimização do processo de produção de etanol em biorreatores contínuos de células imobilizadas através do emprego de planejamento experimental utilizando diferentes taxas de diluição e diferentes concentrações de substrato, onde o aperfeiçoamento dos parâmetros fermentativos foi obtido em biorreatores contínuos em sequência embasado nos dados anteriores obtidos pela análise estatística. Previamente a isso, a seleção da linhagem de *K. marxianus* com maior capacidade de bioconversão e do meio de cultivo foram realizados. Este artigo encontra-se publicado no periódico ***Renewable Energy***, 69: 89-96, 2014. Doi: 10.1016/j.renene.2014.03.023.

O segundo artigo (Capítulo IV – “Dynamics of immobilized-cells systems to improve the ethanol production from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate on batch fluidized bed bioreactors”) foi realizado na tentativa de aperfeiçoar a produção de etanol por cepas convencionalmente utilizadas em plantas industriais de etanol do Brasil e comparar a cinética de fermentação destas com linhagens de *K. marxianus*. Monocultivo de *Saccharomyces cerevisiae* e de *K. marxianus*, assim como o co-cultivo de ambas, foram realizados, assim como testes em biorreatores operados em regime batelada repetida a partir de meio concentrado foram feitos com a finalidade de melhorias no processo fermentativo. Este artigo foi submetido ao periódico ***Renewable Energy***.

No terceiro artigo (Capítulo V – “The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors”) foi realizada a modelagem matemática do bioprocesso a partir do sistema contínuo A-stat (aumento gradual da taxa de diluição) para duas taxas de aceleração. Sistemas de células livres e imobilizadas foram investigados. A modelagem matemática do bioprocesso foi realizada a partir de quatro modelos cinéticos descritos em literatura, variando nas expressões para a velocidade específica de crescimento e para a taxa de consumo de substrato. Este artigo foi submetido ao periódico ***Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology***.

**CAPÍTULO III - DYNAMICS OF ETHANOL PRODUCTION FROM WHEY
AND WHEY PERMEATE BY IMMOBILIZED STRAINS OF *KLUYVEROMYCES
MARXIANUS* IN BATCH AND CONTINUOUS BIOREACTORS**

Artigo publicado no periódico *Renewable Energy* (ISSN: 0960-1481), 69: 89-96, 2014. Doi:
10.1016/j.renene.2014.03.023

Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors

Sabrina Gabardo¹, Rosane Rech², Carlos Augusto Rosa³, and Marco Antônio Záchia Ayub^{1,2*}

¹Biotechnology & Biochemical Engineering Laboratory (BiotecLab), ²Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul; Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. ³Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais.

ABSTRACT

We investigated the bioconversion of whey and whey permeate into ethanol by *Kluyveromyces marxianus* immobilized in Ca-alginate, in both batch and continuous cultivations. Different strains of *K. marxianus* and cultivation media were tested in batch mode and the effects of dilution rate (D) and substrate concentration were investigated in continuous bioreactors. In shaker cultivations, the highest ethanol yield (0.51 g g^{-1}) and ethanol productivities ($0.77 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to $1.15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) were obtained by strains CBS 6556, CCT 4086, and CCT 2653 in raw (not supplemented) whey permeate. These strains were immobilized in Ca-alginate beads and cultivated in batch fluidized-bed bioreactors, where the highest ethanol productivity ($2.53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was observed for strain CCT 4086. The effects of D (0.1 h^{-1} to 0.3 h^{-1}) and whey permeate concentration (C_{WP} , 60 g L^{-1} to 180 g L^{-1}) were also investigated in continuous fluidized-bed bioreactors using *K. marxianus* CCT 4086, and the highest ethanol productivity ($6.01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was achieved at D of 0.3 h^{-1} and C_{WP} of 150 g L^{-1} , whereas the highest ethanol yield (0.51 g g^{-1}) and concentration (42.8 g L^{-1}) were observed for D of 0.1 h^{-1} and C_{WP} of 90 g L^{-1} . Two continuous fluidized-bed bioreactors operated in sequence were tested, showing increased ethanol productivities and concentrations to $6.97 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and 70.4 g L^{-1} , respectively. Continuous immobilized-cell bioreactor showed promising results to improve the performance of ethanol production from whey fermentation processes.

KEYWORDS: Whey; whey permeate; ethanol; *Kluyveromyces marxianus*; immobilized cells; continuous fluidized-bed bioreactors.

(*) Corresponding author: e-mail: mazayub@ufrgs.br

3.1 Introduction

The evolution of ethanol fermentation process, and the growing concern with environmentally sound technologies are stimulating the research on new strategies for energy generation, particularly with respect to renewable, alternative sources such as agricultural crops, lignocellulosic biomass, and waste materials [1-3]. High ethanol productivity from low cost feedstock, in addition to lower investment and operational costs, are aspects of interest in this kind of bioprocess. Continuous fermentation (CF) offers several advantages compared to batch mode, such as the improvement on ethanol yield and the reduction of fermentation time and product losses. In CF, product formation rate can be controlled and maintained at desired levels [4-6]. Cell immobilization techniques can improve CF by enhancing ethanol productivity and protecting cells from inhibitory products and environmental variations, resulting on smaller bioreactor volumes and lower operational costs [5, 7-9].

Several approaches for ethanol production in continuous cell-immobilized bioreactors have been tested, using different supports such as cellulose beads [10], k-carrageenan [11], calcium alginate [12, 13], sorghum bagasse [14], sugarcane bagasse chips [6], among others. However, these researches were mainly conducted using *Saccharomyces cerevisiae* as biocatalyst and molasses or glucose as substrates. Only recently, studies on ethanol production using whey or whey permeate as carbon sources in continuous cell immobilized systems were reported [15-17]. Although yeasts showing the ability to metabolize the lactose present in whey and whey permeate are rather rare, strains belonging to the genus *Kluyveromyces* have been well characterized on their abilities of using lactose as a source of energy, with strains of *K. marxianus* being studied because of their potential bioconversion of this sugar into ethanol [18-20].

Whey and whey permeate are by-products of the dairy industry, which are inexpensive and abundant, rich in nutrients that could be used as substrates for ethanol production. Whey permeate contains approximately 70 % of whey total solids, having the same disposal problems of the whey. Presently, about 50 % of the total worldwide production of whey is

disposed in wastewater treatment plants or sub-utilized in farms, whereas 10 % being transformed into whey protein concentrates, with whey permeate as a remaining by-product [8, 20-22]. Direct fermentation of whey and whey permeate is not economically feasible because the low ethanol concentration and high distillation costs of diluted fermentation broths [15, 23]. However, dried or evaporated whey permeate might be an attractive raw material for ethanol fermentation because of the advantages of its utilization, such as the high concentrations of lactose and other nutrients, yielding high ethanol productions [23].

The aims of this research were to investigate the use of *K. marxianus* to convert whey or whey permeate into ethanol using continuous fluidized-bed Ca-alginate immobilized-cell bioreactors. To optimize this bioprocess, a two-stage continuous fluidized-bed bioreactors operating in sequence, were tested. Screening of *K. marxianus* strains and media were also evaluated in shaker flask and in batch fluidized-bed immobilized-cells bioreactors.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Microorganisms

Six strains of *Kluyveromyces marxianus* were used in this work. *K. marxianus* CBS 6556 was obtained from Centraalbureau voor Schimmel-Cultures (Amsterdam, The Netherlands); *K. marxianus* CCT 4086 and *K. marxianus* var. *lactis* CCT 2653 were provided by Tropical Culture Collection of André Tosello Foundation (Campinas, Brazil); and *K. marxianus* UFMG 95 302.2, *K. marxianus* UFMG 95 205.3, and *K. marxianus* UFMG 95 270.1 were supplied by Laboratory of Taxonomy, Biodiversity and Biotechnology of Fungi from Department of Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Brazil. It is important to note that the last three strains were recently isolated from natural environments and have never been tested in bioprocesses before. The strains were maintained on agar slants at 4 °C, as reported elsewhere [24].

3.2.2 Experimental system

The experiments were carried out in three steps. At first, a screening among six strains of *K. marxianus* and six different media were performed in rotary shaker to evaluate the lactose bioconversion into ethanol. In the second set of experiments, batch fluidized-bed bioreactors with cells entrapped in 4 % (mass fraction) Ca-alginate beads were studied with

the strains that showed the highest bioconversion capacity in the media previously tested in the first step. Finally, fermentations were carried out in continuous fluidized-bed bioreactors using the best strain, immobilized in 4 % Ca-alginate, under three different dilution rates and five whey permeate concentrations. A two-stage bioreactors operated in sequence, where the feeding flow of the second stage was the effluent of the first, was investigated based on the better results of ethanol yield and ethanol productivity attained in the third step.

Results were evaluated by analysis of variance (ANOVA), Tukey test, or multiple regression using Statistica 10.0 software (StatSoft, USA).

3.2.3 Shaker flask cultivation

Inocula were prepared by transferring isolated yeast colonies to a 250 mL conical flasks containing 50 mL of YEP-lactose medium (yeast extract, 10 g L⁻¹; bactopectone, 20 g L⁻¹; lactose, 20 g L⁻¹), pH 7.0, and incubated in an orbital shaker at 180 rpm for 12 h at 30 °C. Cell concentration was adjusted for optical density (OD, 600 nm) of 1, which corresponded to 1.4 g L⁻¹ for strains of *K. marxianus* CBS 6556, CCT 4086, CCT 2653 and UFMG 95 270.1, 1.5 g L⁻¹ for *K. marxianus* UFMG 95 302.2 and 1.6 g L⁻¹ for *K. marxianus* UFMG 95 205.3.

Supplementation of the main carbon sources (whey and whey permeate) were tested, totalizing 6 culture media compositions: 1) whey (W); 2) whey permeate (WP); 3) whey added of 3 g L⁻¹ raw yeast extract (WY); 4) whey added of 3 g L⁻¹ raw yeast extract and 5 g L⁻¹ bactopectone (WYP); 5) whey permeate added of 3 g L⁻¹ raw yeast extract (WPY); and 6) whey permeate added of 3 g L⁻¹ raw yeast extract, and 5 g L⁻¹ bactopectone (WPYP). Reconstituted whey (70 g L⁻¹ of whey powder; Elegê Laticínios S.A., Teutônia, Brazil) was used for experiments, which has the equivalent of 60 g L⁻¹ of lactose, 9 g L⁻¹ of protein, and 1 g L⁻¹ of minerals. Whey proteins were hydrolyzed using a commercial protease (Alcalase 2.4L, 2.4 UA-A/g, Novozymes, Araucária, Brazil) at pH 8.5, 55 °C for 3 h, in order to avoid protein precipitation during the sterilization process (121 °C, 15 min). Reconstituted whey permeate (Sooro, PR, Brazil) was used at concentration of 60 g L⁻¹, corresponding to 59 g L⁻¹ of lactose, 1 g L⁻¹ of protein, and 1.8 g L⁻¹ of minerals.

The fermentations were performed in conical flasks of 250 mL containing 144 mL of cultivation medium and 16 mL of inoculum, totalizing 160 mL of fermentation medium at 150 rpm and 30 °C.

3.2.4 Immobilization technique

Immobilization techniques followed procedures previously optimized and described in earlier works of the group [17]. The diffusivity coefficients for lactose and ethanol, under the conditions used in this work, were determined to be $4.84 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ and $1.46 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectively [25]. Yeasts were grown in 2 L flasks containing 800 mL of YEP-lactose medium (yeast extract, 10 g L^{-1} ; bactopectone, 20 g L^{-1} ; lactose, 20 g L^{-1}), pH 7.0 and $30 \text{ }^\circ\text{C}$, in an orbital shaker at 180 rpm for 15 h in order to obtain exponential-phase cells. At the end of cultivation, cells were harvested by centrifugation ($3\ 000 \text{ g}$, 15 min), washed and resuspended in 10 mL of sterile distilled water at $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

The cell suspension was added to a sterile solution of sodium alginate (40 g L^{-1}) to a final biomass concentration of 20 g L^{-1} . The mixture was immediately dropped through a 14 G needle (2.1 mm of diameter) using a peristaltic pump into a flask containing 0.1 M CaCl_2 sterile solution at $35 \text{ }^\circ\text{C}$, and gently agitated for 30 minutes to stabilize the system. Average alginate beads of 3.8 mm of diameter were obtained. The beads were washed thrice with distilled water at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ and kept in peptone water with 0.1 M CaCl_2 overnight. Then, the beads were washed thrice with sterile distilled water at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ and transferred into the bioreactors.

3.2.5 Bioreactor cultivations

Bioreactor experiments were performed in glass column bioreactors (fluidized section column, 30 mm internal diameter, and 180 mm height), described elsewhere [17] using reconstituted whey permeate as fermentation medium. The bioreactors were filled with 85 mL of alginate beads and 250 mL of fermentation medium. Temperature was controlled at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ by circulating water from a thermostat bath in the bioreactor jacket. The growth medium was recirculated through the column by a peristaltic pump, promoting the fluidization of alginate beds (upward flow).

Batch cultivations were carried out in duplicate to evaluate the strains ability of lactose consumption and ethanol production.

Continuous fluidized-bed fermentations were performed at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ for 128 h under 3 different dilution rates (0.1 h^{-1} , 0.2 h^{-1} , and 0.3 h^{-1}) and 5 concentrations of whey permeate (60 g L^{-1} , 90 g L^{-1} , 120 g L^{-1} , 150 g L^{-1} , and 180 g L^{-1}) according to a hexagonal experimental design (Table 3.1). The fluidization was carried out by medium recirculation through the bioreactor using a peristaltic pump. Cultures were started in batch mode in order to allow for

cell accumulation in the system and then feeding was started at the 11th hour. The experimental results were approximated by a quadratic polynomial equation (Equation 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot D + \beta_2 \cdot C_{WP} + \beta_{11} \cdot D^2 + \beta_{22} \cdot C_{WP}^2 + \beta_{12} \cdot D \cdot C_{WP} \quad (1)$$

Where D and C_{WP} are the regression variables (dilution rate and whey permeate concentration) and Y represents the dependent variables, in this case, ethanol yield, productivity, or residual sugar. The symbols $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}$ and β_{12} are the regression coefficients of the model.

Table 3.1. Hexagonal experimental design used to study de effect of dilution rate (D) and whey permeate concentration (C_{WP}) on continuous fermentation.

Assay	Coded variables		Uncoded variables	
	x_1	x_2	D (h ⁻¹)	C_{WP} (g L ⁻¹)
1	1	-1	0.3	90
2	-1	-1	0.1	90
3	1	1	0.3	150
4	-1	1	0.1	150
5	0	-1.5	0.2	60
6	0	1.5	0.2	180
7	0	0	0.2	120
8	0	0	0.2	120
9	0	0	0.2	120

Continuous fluidized-bed bioreactors in sequence were carried out at 30 °C for 128 h under D of 0.1 h⁻¹. The culture was started in batch mode and then feeding was started at the 11th hour for both bioreactors. The first bioreactor was fed with C_{WP} of 150 g L⁻¹, and its effluent flow was the feeding of the second vessel. This experiment system was performed in duplicates.

3.2.6 Analytical determinations

Samples were collected from the top of bioreactors in batch fermentations or from the out stream of the continuous bioreactors, centrifuged (3 000 g, 15 min) and the supernatant was analyzed for sugar and ethanol concentrations. The concentration of suspended cells that were freed from the alginate spheres was determined by absorbance at 600 nm and correlated with dry cell weight (g L^{-1}). Lactose, galactose, glucose, and ethanol concentrations were determined by HPLC (Shimadzu, Japan) with refractive index detector and Bio-Rad HPX-87H column (300 mm \times 7.8 mm) using 5 mM sulfuric acid as eluent at 45 °C, flow rate of 0.6 mL min^{-1} and sample volumes of 20 μL .

3.3 Results and discussion

3.3.1 Screening of *K. marxianus* strains and fermentation media

This set of experiments was performed to determine the effect of medium supplementation on the capacity of lactose bioconversion to ethanol by six different strains of *K. marxianus*. The strains *K. marxianus* UFMG 95 302.2, UFMG 95 205.3 and UFMG 95 270.1 were recently isolated from natural environments and have never been tested in bioprocesses before.

The lactose metabolism and bioconversion to ethanol differed substantially among the strains. The ethanol yields (Table 3.2) were dependent on strains and media supplementation. The highest ethanol yields ($Y_{\text{EtOH/S}}$) were observed for commercial strains of *K. marxianus* (CBS 6556, CCT 4086, and CCT 2653) in all fermentation media, ranging from 0.34 g g^{-1} to 0.51 g g^{-1} , whereas, low ethanol yields were found for the strains UFMG 95 302.2, UFMG 95 205.3, and UFMG 95 270.1 (0.17 g g^{-1} to 0.38 g g^{-1}). The lowest ethanol yields ($Y_{\text{EtOH/S}}$) were observed for strains UFMG 95 205.3 and UFMG 95 270.1 where both bactopectone and yeast extract were used (Table 3.2). This phenomenon occurred probably due to the substrate imbalance or inhibition, because whey is already rich in nutrients and the addition of nitrogen sources, such as raw yeast extract and bactopectone, could lead to cell metabolism

Table 3.2. Ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$ (g g⁻¹)) and ethanol productivity (Q_P (g L⁻¹ h⁻¹)) of strains of *Kluyveromyces marxianus* and varying fermentation media in orbital shaker cultures at 30 °C and 150 rpm.

Strains	Fermentation media											
	W		WY		WYP		WP		WPY		WPYP	
	$Y_{EtOH/S}$	Q_P	$Y_{EtOH/S}$	Q_P	$Y_{EtOH/S}$	Q_P	$Y_{EtOH/S}$	Q_P	$Y_{EtOH/S}$	Q_P	$Y_{EtOH/S}$	Q_P
KM CBS 6556	0.50±0.02	1.00±0.09	0.39±0.00	0.65±0.16	0.38±0.03	0.58±0.01	0.51±0.01	1.13±0.04	0.47±0.02	1.10±0.06	0.50±0.00	1.02±0.14
KM CCT 4086	0.48±0.08	0.65±0.11	0.40±0.01	1.63±0.03	0.43±0.01	0.72±0.05	0.51±0.03	1.14±0.03	0.50±0.01	1.15±0.00	0.49±0.03	1.02±0.04
KM CCT 2653	0.49±0.02	1.00±0.08	0.35±0.05	0.69±0.07	0.34±0.01	0.68±0.02	0.51±0.03	0.77±0.02	0.51±0.02	0.79±0.04	0.48±0.06	0.66±0.00
KM UFMG 95 302.2	0.30±0.08	0.08±0.00	0.19±0.01	0.09±0.01	0.21±0.03	0.13±0.02	0.38±0.16	0.18±0.08	0.28±0.04	0.18±0.05	0.30±0.04	0.13±0.02
KM UFMG 95 205.3	0.32±0.00	0.11±0.01	0.18±0.03	0.13±0.03	0.19±0.09	0.12±0.00	0.37±0.01	0.15±0.03	0.25±0.03	0.12±0.02	0.35±0.04	0.17±0.05
KM UFMG 95 270.1	0.30±0.07	0.12±0.01	0.18±0.01	0.11±0.01	0.17±0.01	0.12±0.02	0.39±0.07	0.11±0.03	0.25±0.04	0.14±0.02	0.34±0.02	0.21±0.00

W: whey; WY: whey supplemented with raw yeast extract; WYP: whey supplemented with raw yeast extract and bactopectone; WP: whey permeate; WPY: whey permeate supplemented with raw yeast extract; WPYP: whey permeate supplemented with raw yeast extract and bactopectone.

impairment, affecting product formation. *K. marxianus* NRRL-1195 also showed repression of ethanol fermentation when nitrogen and phosphorus sources were added in whey, on a rotatory shaker at 28 °C, 150 rpm for 72 h [26]. Surprisingly, for all tested strains (Table 3.2), the yields of ethanol were slightly higher in cultivations using WP than for W medium, reaching 0.51 g g⁻¹ for strains CBS 6556, CCT 4086, and CCT 2653, with high conversion efficiencies (η) of 95 % of the theoretical yield. The values obtained when using W medium were 0.50 g g⁻¹, 0.48 g g⁻¹ and 0.49 g g⁻¹ respectively (conversion efficiencies of 94 %, 89 %, and 91 %), suggesting good prospects of application of the whey permeate without supplementations as substrate in this bioprocess. These results compare well with those reported in the literature. Conversion efficiencies of 97 % and 83 % were obtained using Scotta and whey media, respectively, in orbital shaker cultures of *K. marxianus* at 37 °C, 150 rpm for 18 h [27]. Ethanol yields ranging from 0.51 g g⁻¹ to 0.52 g g⁻¹ were obtained for *K. marxianus* UFV-3 under hypoxic and anoxic conditions, respectively, in whey permeate (lactose concentration of 50 g L⁻¹) [28]. Ethanol yield of 0.51 g g⁻¹ was obtained using raw whey in batch fermentations using *K. marxianus* DSMZ 7239 at 30 °C and 100 rpm [16]. The ethanol yields obtained in this work using strains CBS 6556, CCT 4086, and CCT 2653 in WP are higher when compared to other researches using the *Kluyveromyces* yeasts. Ethanol concentration of 20.2 g L⁻¹, corresponding 74 % of the theoretical yield, was observed for *K. marxianus* NCYC 179 in whey permeate (lactose concentration of 50 g L⁻¹) at 30 °C, 200 rpm for 24 h [29]. Several *Kluyveromyces* strains (IBM1, IBM2, IBM3, IBM4, and IBM5) were investigated for ethanol production at 45 °C (200 rpm for 140 h), and the highest ethanol concentration (17 g L⁻¹) was reported for strain IBM2 in whey permeate (lactose concentration of 40 g L⁻¹), representing 83 % of the theoretical yield [30].

The highest ethanol productivities (Q_P) were obtained for strains *K. marxianus* CBS 6556, CCT 4086, and CCT 2653, whereas the lower productions were found for strains *K. marxianus* UFMG 95 302.2, UFMG 95 205.3, and UFMG 95 270.1, confirming their slower metabolism and lack of adaptation to laboratory cultivation. The best productivity obtained in this work is similar to the highest ethanol productivities reported in the literature. Silva et al. [31], showed a productivity of 1.2 g L⁻¹ h⁻¹ in a study using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* and deproteinized concentrate cheese whey in rotary shaker at 30 °C and 150 rpm. Dragone et al. [23] investigated ethanol production from deproteinized cheese whey powder using *K. fragilis* in various lactose concentration, temperature and inocula concentrations, and attained ethanol productivities ranging from 0.23 g L⁻¹ h⁻¹ to 1.27 g L⁻¹ h⁻¹. A low ethanol productivity (0.2 g L⁻¹ h⁻¹) was found using *K. marxianus* MTCC 1288 on whey (50 g L⁻¹) in

shaker flask at 34 °C [32], which is similar to the productivities observed for strains UFMG 95 302.2, 95 205.3 and 95 270.1 in this work.

The marked differences in the results for growth and product formation can be evidenced by the kinetic profiles of sugar consumption of the traditional and recently isolated strains of *K. marxianus*. In Fig. 3.1 is presented the mean sugar consumption of the two yeast groups, showing that *K. marxianus* CBS 6556, CCT 4086, and CCT 2653 depleted lactose in 24 h of fermentation, whereas for the strains UFMG 95 302.2, UFMG 95 205.3, and UFMG 95 270.1 (isolated yeasts) the lactose was not entirely consumed. This marked difference might have occurred due to a low ethanol tolerance of the UFMG strains, which showed growth in batch shaker cultures containing up to 10 g L⁻¹ of alcohol (results not shown), being repressed above this threshold. Another hypothesis could be the low lactose affinity for the lactose-permease enzymes of these strains, coded by the LAC12 gene [18, 19], which has been reported for some strains of *K. marxianus* [33, 34].

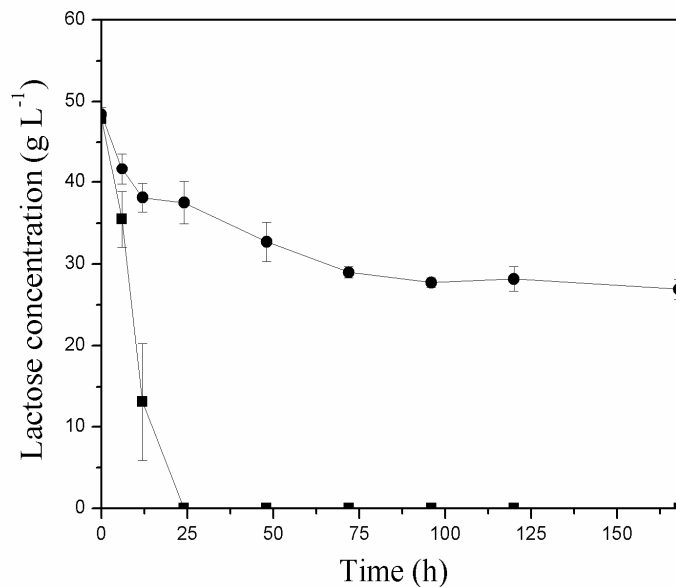


Figure 3.1. Profile of lactose consumption from whey under the experimental conditions of this work for the 2 groups of yeasts: group 1 (commonly used strains): *K. marxianus* CBS 6556, CCT 4086 and CCT 2653 (-■-) and group 2 (newly isolated): *K. marxianus* UFMG 95 302.2, 95 205.3 and 95 270.1 (-●-).

3.3.2 Immobilized batch fluidized bed bioreactors

Strains *K. marxianus* CBS 6556, CCT 4086, and CCT 2653, showing the best results on WP, were chosen for the batch fluidized-bed bioreactor systems. These experiments were carried out at 30 °C for 24 h in order to evaluate the capacity of the yeasts to convert WP lactose into ethanol when immobilized in Ca-alginate beads.

The profiles of lactose and ethanol concentration are presented in Fig. 3.2. The strains CBS 6556 and CCT 4086 completely depleted lactose after 12 h of cultivation, whereas strain CCT 2653 showed slower sugar consumption rate, consuming 93 % of initial lactose in 24 h (Fig. 3.2a). High ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$) were observed for the first two strains, 0.45 g g⁻¹ and 0.47 g g⁻¹, respectively, with yield efficiencies (η) of 84 % and 89 % of the theoretical value (Table 3.3), while strain CCT 2653 produced ethanol to yields of 0.33 g g⁻¹. The highest ethanol concentration and productivity were achieved for strain CCT 4086 (Fig. 3.2b), 28.0 g L⁻¹ and 2.53 g L⁻¹ h⁻¹, compared to 1.96 g L⁻¹ h⁻¹ for CBS 6556 and 0.75 g L⁻¹ h⁻¹ for CCT 2653 (Table 3.3). Physiological differences between CBS 6556 and CCT 4086, including sugar consumption profiles, have been reported by [35]. The more contrasting differences of physiology of CCT 2653 compared with the other two strains (CBS 6556 and CCT 4086) might be explained by its taxonomy, which classifies it as *K. marxianus* var. *lactis*, instead of var. *marxianus*. The physiological characteristics of the *K. lactis* group are generally associated with low ethanol productions [20]. The expression of genes involved in the lactose fermentation by *K. lactis*, such as *LAC4* and those involved in Leloir pathway (*RAG6*, *GAL7* and *GAL10*), and the production of enzymes such as β -galactosidase and pyruvate decarboxylase, were observed in physiology studies comparing *K. marxianus* and *K. lactis* [36].

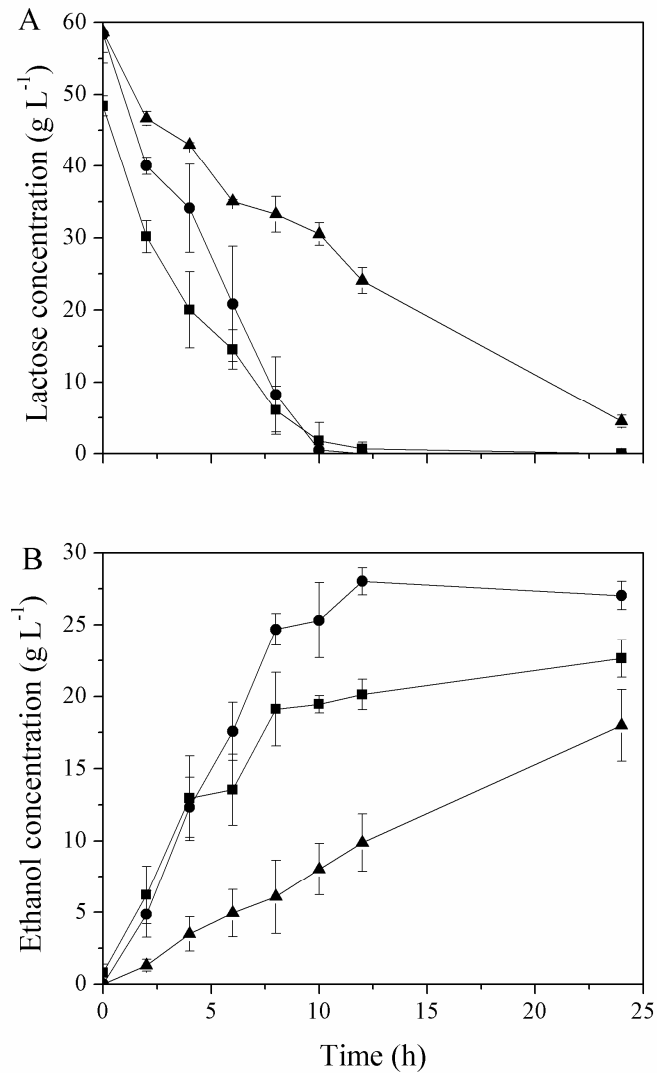


Figure 3.2. Kinetics of lactose consumption (a), and ethanol production (b) of the three strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch fluidized bed bioreactor at 30°C. *K. marxianus* CBS 6556 (-■-), *K. marxianus* CCT 4086 (-●-) and *K. marxianus* CCT 2653 (-▲-).

Table 3.3. Ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$), yield efficiency (η), and ethanol productivity (Q_P) of 3 best strains of *Kluyveromyces marxianus* under fluidized batch bioreactor cultivations.

Yeast	$Y_{EtOH/S}$ (g g ⁻¹)	η (%)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
CBS 6556	0.45±0.00	83.6±0.31	1.96±0.06
CCT 4086	0.47±0.05	89.2±9.08	2.53±0.26
CCT 2653	0.33±0.04	61.8±7.82	0.75±0.15

In this work, it was obtained the highest ethanol yields compared to the literature, concerning similar bioreactor systems and yeasts (Table 3.4), indicating the improvement in the fermentation conditions. Diverse factors could explain these results, ranging from physiological characteristics of strains, to diffusivity phenomena, to aspects of bioreactor geometry and operation. *K. marxianus* species are characterized by substantial degree of intraspecific polymorphism (genetic and physiological), which results in a high metabolic diversity [19]. In this work we carried out cultivations in fully controlled bioreactors, whereas in others researches (Table 3.4), the experimental system consisted of shaker flasks. The column bioreactor design in this work allows for a high volume of spheres (compared to medium volume) than that possible in a shaker flask [37, 38], and the fluidization of the system can contribute to homogeneous conditions, hence improving the mass transfer phenomena.

Table 3.4. Comparison of results obtained in this work with other reports in the literature for ethanol yields, ethanol productivities, and conversion efficiencies.

Yeast	Substrate	$Y_{EtOH/S}$ (g g ⁻¹)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	η (%)	Reference
<i>K. marxianus</i>					
CBS 6556	Whey permeate	0.45	1.96	83.6	This work
CCT 4086		0.47	2.53	89.2	
CCT 2653		0.33	0.75	61.8	
<i>K. marxianus</i> NCYC 179	Whey permeate	0.42	-	78.0	[29]
<i>K. marxianus</i> TY-3	Whey	0.34	0.31	63.0	[37]
<i>K. fragilis</i> NRRL 665	Synthetic medium	0.44	0.76	83.0	[38]
<i>K. marxianus</i>					
CBS 6556	Whey	0.45	0.96	83.3	[17]
CCT 4086		0.43	0.81	79.1	
CCT 2653		0.45	0.84	83.3	

3.3.3 Continuous fluidized bed bioreactor cultivations

In this set of experiments, the effects of different D and C_{WP} on ethanol production during continuous cultivation of *K. marxianus* CCT 4086 were tested following a hexagonal experimental design (Table 3.1), and results are presented in Table 3.5 and Fig. 3.3, respectively.

Table 3.5. Regression coefficients of the variables and the regression parameters for ethanol yield, ethanol productivity, and residual sugar by *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 under continuous fluidized bed bioreactor cultivations.

	<i>Ethanol yield</i>		<i>Ethanol productivity</i>		<i>Residual sugar</i>	
	Coefficient	<i>P</i>	Coefficient	<i>P</i>	Coefficient	<i>P</i>
β_0	0.749	< 0.001	-	-	-72.637	0.0001
β_1	-1.628	0.029	16.004	0.002	164.971	0.009
β_{11}	2.468	0.120	-	0.002	-	-
β_2	-0.001	0.003	0.056	0.010	0.742	< 0.0001
β_{22}	-	-	-0.001	0.011	-	-
β_{12}	-	-	-0.084	-	-	-
Regression						
<i>p</i> -value	0.002		0.001		< 0.0001	
F	24.950		52.284		117.885	
R ²	0.937		0.981		0.975	
LOF*	0.577		0.876		0.388	

**p*-value of lack of fit.

Ethanol yield increased inversely with the D and C_{WP} (Fig. 3.3a). The highest ethanol yield, 0.51 g g⁻¹, was achieved with D of 0.1 h⁻¹ and C_{WP} of 90 g L⁻¹, with ethanol production of 42.8 g L⁻¹ (calculated data). The lowest ethanol yields were observed for the highest D and C_{WP} (0.32 g g⁻¹ and 0.34 g g⁻¹, respectively). This behavior is suggesting that catabolite repression is in place when sugar feeding is above D of 0.2 h⁻¹, somewhat a low value for *Kluyveromyces* yeasts. It is known that the metabolism of *K. marxianus* is regulated by the amount of available sugar. At high medium sugar content, high maintenance requirements are necessary because of factors such as osmotic pressure, demanding higher retention time or low dilution rates to allow proper bioconversion of sugar into final products [15]. A similar behavior was observed by other researches. For instance, *K. marxianus* DSMZ-7239, immobilized in olive pits, cultivated in a continuous packed-bed bioreactor, showed ethanol yields of 0.32 g g⁻¹ and 0.54 g g⁻¹ at D of 0.057 h⁻¹ and 0.02 h⁻¹, respectively, [39]. When increased whey concentration (from 50 to 200 g L⁻¹) was used, there was a decrease in ethanol

yields, from 0.52 g g⁻¹ to 0.17 g g⁻¹ at D of 0.02 h⁻¹[15]. Continuous cultivation of *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619 in 50 g L⁻¹ of whey also showed an increase in ethanol yield from 0.25 g g⁻¹ to 0.37 g g⁻¹ with decreased D from 0.05 h⁻¹ to 0.02 h⁻¹ [4]. Contrasting with our results, ethanol yield was not affected by D (0.5 h⁻¹ to 1.25 h⁻¹) and sugar concentration (50 g L⁻¹ to 150 g L⁻¹ of glucose) during continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IIPE453 immobilized on bagasse chips in a packed bed bioreactor [6].

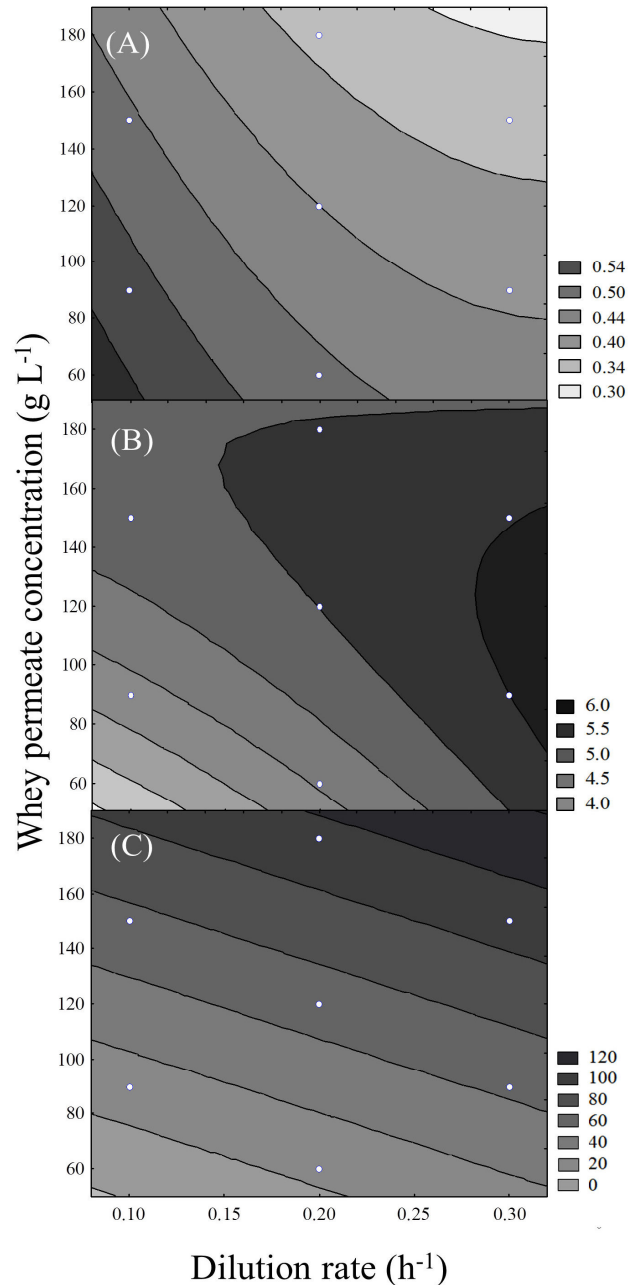


Figure 3.3. Contour surface of ethanol yield (a), ethanol productivity (b) and residual sugar (c) from whey permeate fermentation by *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 on continuous fluidized-bed bioreactor at 30 °C as function of substrate concentration and dilution rate.

Fig. 3.3b shows the ethanol productivity (Q_P) as function of C_{WP} and D . Ethanol productivity increased proportionally with dilution rate and whey permeate concentration up to approximately 150 g L^{-1} . The highest ethanol productivities ($6.01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $5.96 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) were obtained at the highest D (0.3 h^{-1}), however, these conditions presented low ethanol yields (0.34 g g^{-1} and 0.38 g g^{-1}). The highest ethanol yield (0.51 g g^{-1}) was obtained under conditions of the lowest C_{WP} and D (90 g L^{-1} and 0.1 h^{-1}), reaching 95 % of maximum theoretical yield, and 93 % of lactose consumption. Comparatively, Christensen et al. [16] reported that an increase of ethanol productivity from $2.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to $4.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ was possible varying the D from 0.04 h^{-1} to 0.2 h^{-1} in the continuous cultivation of non-sterilized whey using *K. marxianus* DSMZ 7239 immobilized in Ca-alginate. In a previous work of our group [17], continuous cultures of *K. marxianus* CBS 6556 immobilized in Ca-alginate showed maxima ethanol productivities of $3.2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $3.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at the highest D (0.3 h^{-1}) for packed and fluidized bed operations, respectively. Ozmihci and Kargi [39] reported ethanol productivities varying from $0.28 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to $0.58 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ depending of D (0.015 h^{-1} to 0.06 h^{-1}) in packed bed column continuous cultures of *K. marxianus* immobilized in olive pits using whey as substrate. Finally, ethanol productivities by *K. marxianus* IMB3 varied from $2.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to $5.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ proportionally with D from 0.05 h^{-1} to 0.2 h^{-1} on continuous fermentation using synthetic medium and glucose as carbon source [40]. The highest ethanol productivities in this work were possible due to the optimization of fermentation conditions obtained in the hexagonal experimental design, which coupled high substrate concentration with relatively high dilution rates. This is an important difference when compared with other researches, in which the influences of substrate concentration and of dilution rate were analyzed separately. Moreover, the fluidized bed system in this work might have probably improved the mass transfer mechanisms when compared with packed bed bioreactors used in some researches and, consequently, higher values of fermentative parameters were attained.

Fig. 3.3c shows the residual sugar as function of whey permeate concentration and dilution rate. As expected, residual sugar was affected by increasing whey permeate concentration and dilution rates (Table 3.5). The lowest residual sugar of 6.3 g L^{-1} was obtained with D of 0.1 h^{-1} and 90 g L^{-1} of C_{WP} , up to a maximum of 92.6 g L^{-1} for D of 0.2 h^{-1} and C_{WP} of 180 g L^{-1} . Table 3.6 presents a comparison of results among several researches operated under similar conditions. High substrate concentrations can lead to inhibitory effects of cell growth and reduce fermentation rates, often related to changes in sugar-carriers affinities, osmotic sensitivity, and low tolerances to high ethanol concentration [20, 28].

Generally, initial lactose concentrations above 100 g L^{-1} have been reported to result in high residual sugar concentrations and inhibitory effects for *K. marxianus* strains [15, 28, 32, 41].

Table 3.6. Literature data on residual sugar during continuous cultivation.

Yeast	Substrate (g L^{-1})	D (h^{-1})	Residual Sugar (g L^{-1})	Reference
<i>K. marxianus</i> CCT 4086	Whey permeate (60-180)	0.1-0.3	6.3-92.6	This work
<i>K. marxianus</i> IMB3	Glucose (75)	0.05-0.15	48.0-56.0	[42]
<i>K. marxianus</i> IPE453	Glucose (50-150)	0.5	6.8-69.0	[6]
<i>C. pseudotropicalis</i> ATCC 8619	Lactose (50-150)	0.02	1.0-25.5	[4]
<i>K. marxianus</i> DSMZ 7239	Whey (50)	0.057 - 0.02	15.0-18.5	[39]

3.3.4 Sequential continuous fluidized bed bioreactor cultivations

From the previous set of experiments, it was clear the physiological limitations of *K. marxianus* towards lactose concentration, even at relatively low dilution rates. Therefore, in order to improve lactose bioconversion into ethanol, it was performed a sequential two-bioreactors cultivation in which the feeding of the second tank was provided by the effluent of the first. This was carried out based on the satisfactory results reached in previously hexagonal experimental design at conditions of 150 g L^{-1} of C_{WP} and 0.1 h^{-1} of D ($Y_{EtOH/S} = 0.47 \text{ g g}^{-1}$ and $Q_P = 5.33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Notwithstanding, at these conditions the residual sugar was of 53.3 g L^{-1} . Thus, this remaining sugar could be used as the feeding stream in a second bioreactor in order to exhaust the residual sugar, and with this, improve the overall yields of conversion. Results are presented in Table 3.7, showing that *K. marxianus* CCT 4086 was able to metabolize the lactose in the second stage, even in the presence of ethanol concentrations of 52.4 g L^{-1} . The overall ethanol yield of 0.48 g g^{-1} and productivity of $6.97 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ were achieved, with only 3 g L^{-1} of remaining sugar at the second bioreactor downstream. Ethanol concentration obtained in this system was 24 % higher than the one-stage bioreactor (at D of 0.1 h^{-1} and 150 g L^{-1} of C_{WP}) reaching 70.4 g L^{-1} . *K. marxianus* CCT 4086 showed a high ethanol tolerance, indicating that this strain is not inhibited by the

product. Ethanol productivity, obtained in the two-stages continuous bioreactors, is one of the highest so far reported in the literature using *K. marxianus* and whey as substrate on continuous systems [15-17].

Table 3.7. Ethanol concentration, lactose consumption, ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$), and ethanol productivity (Q_P) obtained in the continuous fluidized bed bioreactor cultivations operated in sequence.

Bioreactor	Lactose consumption (g L ⁻¹)	Ethanol (g L ⁻¹)	$Y_{EtOH/S}$ (g g ⁻¹)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1 st stage	89.0	52.4	0.47	5.26
2 nd stage	58.0	18.0	-	-
Overall	147.0	70.4	0.48	6.97

3.4 Conclusions

Screening of strains of *K. marxianus* and media based on residual whey and whey permeate demonstrated the ability to use this system to produce ethanol. Media supplementation was tested and results showed that this is not necessary, allowing the direct utilization of these by-products, with cost savings from an industrial perspective. Batch fluidized bed bioreactors of Ca-alginate immobilized-cells showed to reduce fermentation time and improved ethanol yields, compared to shaker cultivations. The continuous culture of immobilized-cells considerably enhanced ethanol productivities and yields. A two-stage sequential continuous culture was employed to improve sugar consumption, further improving the overall ethanol productivity.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq and CAPES (Brazil) for the financial support of this research and scholarships for the first author.

References

1. Sansonetti S., Hogley T.J., Calabro V., et al. A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: A batch fermentation and kinetic study. *Bioresource Technol* 2011; 102(16):7513-7520.
2. Cheng J.J., Timilsina G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renew Energy* 2011; 36(12):3541-3549.

3. Yu J.L., Yue G.J., Zhong J., et al. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* to modified bagasse for ethanol production. *Renew Energy* 2010; 35(6):1130-1134.
4. Ghaly A.E., ElTaweel A.A. Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. *Biomass Bioenergy* 1997; 12(6):461-472.
5. Verbelen P., De Schutter D., Delvaux F., et al. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett* 2006; 28(19):1515-1525.
6. Kumar S., Singh S.P., Mishra I.M., et al. Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IPE453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor. *J Petroleum Technol Altern Fuels* 2011; 2(1):1-6.
7. Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I., et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 2004; 21(4):377-397.
8. Kosseva M., Panesar P., Kaur G., et al. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *Int J Biol Macromol* 2009; 45(5):437-447.
9. Mussatto S.I., Dragone G., Guimaraes P.M.R., et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol Adv* 2010; 28(6):817-830.
10. Szajani B., Buzas Z., Dallmann K., et al. Continuous production of ethanol using yeast cells immobilized in preformed cellulose beads. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996; 46(2):122-125.
11. Nigam J.N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *J Biotechnol* 2000; 80(2):189-193.
12. Najafpour G., Younesi H., Ismail K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol* 2004; 92(3):251-260.
13. Lewandowska M., Kujawski W. Ethanol production from lactose in a fermentation/pervaporation system. *J Food Eng* 2007; 79(2):430-437.
14. Yu J.L., Zhang X., Tan T.W. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *J Biotechnol* 2007; 129(3):415-420.
15. Ozmihci S., Kargi F. Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: effects of feed sugar concentration. *J Chem Technol Biotechnol* 2009; 84(1):106-111.
16. Christensen A.D., Kadar Z., Oleskiewicz-Popiel P., et al. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011; 38(2):283-289.
17. Gabardo S., Rech R., Ayub M.A.Z. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. *J Chem Technol Biotechnol* 2012; 87(8):1194-1201.
18. Rubio-Teixeira M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol Adv* 2006; 24(2):212-225.
19. Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C., et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 79(3):339-354.
20. Guimaraes P., Teixeira J., Domingues L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv* 2010; 28(3):375-384.
21. Siso M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technol* 1996; 57(1):1-11.
22. Rech R., Ayub M.A.Z. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochem* 2007; 42(5):873-877.

23. Dragone G., Mussatto S.I., Silva J., et al. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass Bioenergy* 2011; 35(5):1977-1982.
24. Furlan S.A., Carvalho-Jonas M.F., Merkle R., et al. Aplicação do sistema Microtiter Reader na seleção de microrganismos produtores de β galactosidase. *Braz Arch Biol Technol* 1995; 38(4):1261-1268
25. Gabardo S., Rech R., Ayub M.A.n.Z.c. Determination of Lactose and Ethanol Diffusion Coefficients in Calcium Alginate Gel Spheres: Predicting Values To Be Used in Immobilized Bioreactors. *J Chem Eng Data* 2011; 56(5):2305-2309.
26. Kargi F., Ozmihci S. Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. *Enzyme Microb Technol* 2006; 38(5):711-718.
27. Sansonetti S., Curcio S., Calabro V., et al. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass Bioenergy* 2009; 33(12):1687-1692.
28. Silveira W.B., Passos F., Mantovani H.C., et al. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme Microb Technol* 2005; 36(7):930-936.
29. Marwaha S.S., Kennedy J.F. Ethanol-production from whey permeate by immobilized yeast-cells. *Enzyme Microb Technol* 1984; 6(1):18-22.
30. Banat I.M., Marchant R. Characterization and potential industrial applications of 5 novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains. *World J Microbiol Biotechnol* 1995; 11(3):304-306.
31. Silva A., Guimares P.M.R., Teixeira J.A., et al. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010; 37(9):973-982.
32. Zafar S., Owais M., Salleemuddin M., et al. Batch kinetics and modelling of ethanolic fermentation of whey. *Int J Food Sci Technol* 2005; 40(6):597-604.
33. Gasnier B. Characterization of low-affinity and high-affinity glucose transports in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Biochim Biophys Act* 1987; 903(3):425-433.
34. Postma E., Vandenbroek P.J.A. Continuous-culture study of the regulation of glucose and fructose transport in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *J Bacteriol* 1990; 172(6):2871-2876.
35. Rocha S.N., Abrahao-Neto J., Gombert A.K. Physiological diversity within the *kluyveromyces marxianus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek International J Gen Molec Microbiol* 2011; 100(4):619-630.
36. Diniz, R.H.S., Silveira, W.B., Fietto, L.G., et al. The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek International J Gen Molec Microbiol* 2011; 101(3): 541-550.
37. Guo X.W., Zhou J., Xiao D.G. Improved Ethanol Production by Mixed Immobilized Cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from Cheese Whey Powder Solution Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160(2):532-538.
38. Gunasekaran P., Kamini N. High ethanol productivity from lactose by immobilized cells of *Kluyveromyces-fragilis* and *Zymomonas-mobilis*. *World J Microbiol Biotechnol* 1991; 7(5):551-556.

39. Ozmihci S.,Kargi F. Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. *Biochem Eng J* 2008; 42(2):180-185.
40. Hack C.J.,Marchant R. Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998; 20(6):323-327.
41. Ozmihci S.,Kargi F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme Microb Technol* 2007; 41(6-7):876-880.
42. Banat I.M., Nigam P., Singh D., et al. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. *World J Microbiol Biotechnol* 1998; 14(6):809-821.

CAPÍTULO IV - DYNAMICS OF IMMOBILIZED-CELLS SYSTEMS TO IMPROVE THE ETHANOL PRODUCTION FROM LACTOSE-HYDROLYZED WHEY AND WHEY PERMEATE ON BATCH FLUIDIZED BED BIOREACTORS

Este artigo foi submetido ao periódico *Renewable Energy*.

Dynamics of immobilized-cells systems to improve fuel-ethanol production from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate in batch fluidized bed bioreactors

Sabrina Gabardo¹, Gabriela Feix Pereira¹, Manuela P. Klein², Rosane Rech³, Plinho F. Hertz³ and Marco Antônio Záchia Ayub*^{1,3}

¹Biotechnology & Biochemical Engineering Laboratory (BiotecLab), ²Enzymology Laboratory, ³Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul; Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 6685; fax: +55 51 3308 7048.

ABSTRACT

We studied the dynamics of mono and co-cultures of Ca-alginate immobilized-cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* grown in batch fluidized bed bioreactors, using lactose-hydrolyzed whey (LHW) and lactose-hydrolyzed whey permeate (LHWP) media. *S. cerevisiae* CAT-1 and PE-2 showed similar ethanol yields and ethanol productivities: 0.44 g g⁻¹ and 0.78 g L⁻¹ h⁻¹ (LHW) and 0.35 g g⁻¹ and 0.32 g L⁻¹ h⁻¹ (LHWP). Compared to that, the co-culture of *S. cerevisiae* CAT-1 and *K. marxianus* CCT 4086 showed ethanol productivities two to four times higher: 1.32 g L⁻¹ h⁻¹ (LHW) and 1.30 g L⁻¹ h⁻¹ (LHWP). However, monocultures of *K. marxianus* CCT 4086 produced the best results in both media, with yields varying from 0.47 g g⁻¹ to 0.49 g g⁻¹, productivities varying from 1.39 g L⁻¹ h⁻¹ to 1.68 g L⁻¹ h⁻¹, in LHWP and LHW, respectively. When concentrated lactose-hydrolyzed (180 g L⁻¹) whey permeate was used, ethanol production, yields, and productivities, reached 79.1 g L⁻¹, 0.46 g g⁻¹, and 1.65 g L⁻¹ h⁻¹ in *K. marxianus* CCT 4086 monoculture. Repeated batches of fluidized bed bioreactor led to improvements in ethanol productivity from concentrated LHWP, reaching the maximum of 2.8 g L⁻¹ h⁻¹.

Keywords: Fuel-Ethanol; lactose-hydrolyzed whey; lactose-hydrolyzed whey permeate; immobilized cells; *Saccharomyces cerevisiae*; *Kluyveromyces marxianus*.

(*) Corresponding author: e-mail: mazayub@ufrgs.br

4.1 Introduction

Environmental concerns about the use of fossil fuels and the amounting agro-industrial residues have put growing pressure on research for innovative technologies for energy production and waste reuse. Cheese whey (or whey), and whey permeate are by-products of dairy industries, presenting potential sources of environmental pollution when improperly discarded. These products have the potential to be used in bioprocess because of their unique composition characteristics. Whey is a rich substrate for ethanol fermentation because of its high lactose content (45–50 g L⁻¹), protein (6–8 g L⁻¹), lipids (4–5 g L⁻¹), and mineral salts (5–7 g L⁻¹). Whey permeate, the product of protein removal from whey, has a lactose content (around of 45 g L⁻¹) and mineral salts (3–5 g L⁻¹), and could also be considered for bioprocesses as a source of cheap substrate [1–3]. Direct fermentation of the liquid slurry of whey and whey permeate is not economically feasible because of their low sugar concentrations, implying high distillation costs [2, 4]. However, dried or evaporated whey and whey permeate might be attractive raw materials for ethanol fermentation because these materials have a characteristically low water content and high lactose concentrations, being cheap and extremely convenient for storage, transportation, and use [4]. In this context, the production of ethanol from whey is expected to become increasingly important.

Several yeasts have shown the ability to metabolize the lactose present in whey and whey permeate, but traditional yeasts used for industrial fermentation processes showing high ethanol and sugar tolerance, such as *Saccharomyces cerevisiae*, cannot use lactose as carbon source, because they lack lactose permease and β -galactosidase enzymes [5, 6]. Therefore, a preliminary reaction of enzymatic or chemical hydrolysis of lactose is required in order to use whey or whey permeate as substrate for ethanol production using *S. cerevisiae* [7, 8]. One possibility is the pre-treatment of whey and whey permeate with β -galactosidase, which catalyzes the hydrolysis of lactose liberating an equimolecular mixture of glucose and galactose [9]. Biological alternative technologies for this enzymatic reaction relies on the use of yeast strains capable of metabolizing lactose, such as the genus *Kluyveromyces*, and the use of co-cultures of different strains, including *S. cerevisiae* [5–8]. The genus *Kluyveromyces* has been well characterized concerning its ability to use lactose, and several strains of *Kluyveromyces marxianus* have successfully been used to convert whey and/or whey permeate into ethanol [1, 5, 10, 11]. The co-culture of *K. marxianus* and *S. cerevisiae* is a strategy to the ethanol production allowing coupling the advantages of these two strains: the

adapted growth of *Kluyveromyces* in lactose, and the high ethanol tolerance and faster glucose consumption of *Saccharomyces* strains [1, 12].

Cell immobilization, a strategy of cell confinement in appropriate inert supports, can contribute to bioprocesses optimization because of their characteristics such as high productivity, lower fermentation time, small operational volume, cell protection against inhibitory products, reduced contamination risks, and ease downstream processing [13, 14]. The ethanol production using cell immobilized bioreactors has been developed in recent years using different immobilization strategies and supports such as agar [15], alginate [10, 16, 17], sorghum bagasse [18], and sugarcane bagasse [19]. Among these, the use of alginate is the most widespread technique because this material is non-toxic, inexpensive, allows for high cell density entrapment and it is simple to prepare [13, 14, 20].

In this context, the aims of this research were to analyze several possibilities of using lactose-hydrolyzed whey (LHW) and lactose-hydrolyzed whey permeate (LHWP) as substrates for fuel-ethanol production using different yeast strains, as mono cultures of *S. cerevisiae* or *K. marxianus*, and also as co-cultures of both yeasts. The cultures were run using Ca-alginate immobilized-cells systems in batch and repeated-batches in fluidized bed bioreactors. Fermentative parameters of ethanol production, yields, and productivities were evaluated.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Yeasts, cell maintenance, and materials

The yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and PE-2, and *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 were used in this research. The *S. cerevisiae* strains were chosen because of their good ethanol and sugar tolerance [1, 21]. Although they are commercially available, the stocks used by us were kindly supplied by the Department of Genetics from the Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil). The *K. marxianus* CCT 4086 was provided by the Tropical Culture Collection of André Tosello Foundation (Campinas, Brazil). This strain of *K. marxianus* was chosen because it demonstrated a high capacity of lactose bioconversion into ethanol [10]. Cells were kept frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, in a 60% cell suspension in glycerol, whereas for immediate use, cells were kept on YEPD or YEP-Lactose agar slants at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ [22].

All chemicals used in this research were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil, or St. Louis, USA), unless otherwise indicated.

4.2.2 Lactose hydrolysis in whey and in whey permeate

Dried whey (powder) and dried whey permeate were used in this research (Elegê Laticínios S.A., and Sooro, Brazil, respectively). Reconstituted whey composition was: 56 g L⁻¹ of lactose, 9 g L⁻¹ of protein, and 5 g L⁻¹ of minerals; reconstituted whey permeate composition was: 56 g L⁻¹ of lactose, 1 g L⁻¹ of protein, and 3 g L⁻¹ of minerals. Lactose hydrolysis was performed using a commercial β -galactosidase (Maxilact LX 5000, enzymatic activity of ≥ 5000 NLU g⁻¹, DSM Food Specialties, Heerlen, The Netherlands). A volume of 0.5 mL L⁻¹ of enzyme was added to reconstituted whey (70 g L⁻¹ whey powder) or to whey permeate (60 g L⁻¹ whey permeate powder) and the mixture was kept at 25 °C, under slow agitation, reaching a maximum hydrolysis efficiency of >90 % around 8 h of reaction. For the hydrolysis of concentrated whey permeate (180 g L⁻¹ whey permeate powder), a volume of 1.5 mL L⁻¹ of enzyme was used, and the reaction was performed under the same conditions above described. Samples were periodically withdrawn, filtered through a 0.22 μ m acetate cellulose membrane in order to remove proteins that may cause interference with the analysis, and the glucose liberation was determined using an enzymatic kit (Labtest Diagnóstica S. A., Brazil).

4.2.3 Yeast cells immobilization

The yeast strains were immobilized by entrapment in Ca-alginate beads. *S. cerevisiae* and *K. marxianus* strains were grown in 2L flasks filled with 800 mL of YEPD or YEP-Lactose media (yeast extract, 10 g L⁻¹; bactopectone, 20 g L⁻¹; glucose or lactose, 20 g L⁻¹), respectively, pH 7.0 and 30 °C, in an orbital shaker at 180 rpm for 15 h in order to obtain exponential-phase cells. At this point, cells were harvested by centrifugation (3000 \times g, 15 min), washed twice and resuspended in 10 mL of sterile distilled water at 4 °C. The cell suspension was added to a sterile solution of sodium alginate (40 g L⁻¹) to a final biomass concentration of 20 g L⁻¹. The mixture was immediately dropped through a 14 G needle (2.1 mm of diameter) using a peristaltic pump into a 0.1 M CaCl₂ sterile solution at 35 °C, and gently agitated for 30 min to stabilize the system. The beads were washed thrice with distilled water at 4 °C and kept in peptone water (1 g L⁻¹) with 0.1 M CaCl₂ overnight. Then, the beads

were washed thrice with sterile distilled water at 4 °C and transferred into the bioreactors. The alginate beads average diameter was 3.8 mm.

4.2.4 Bioreactor cultivations

Batch fluidized bed cultivations were performed in glass column bioreactors [10] filled with 85 mL of alginate beads and 250 mL of medium. In the co-culture experiment, the glass column was filled with 42.5 mL of beads of each of yeasts. Lactose-hydrolyzed whey or whey permeate were used as culture media without any addition of other nutrients. Previously to the sterilization process (121 °C, 15 min), whey proteins were hydrolyzed with a commercial protease (Alcalase 2.4L, 2.4 UA-A/g, Novozymes, Araucária, Brazil) at pH 8.5, 55 °C for 3 h, in order to avoid protein precipitation. The cultures were carried out at 30 °C and fluidization was performed by recirculating the culture medium upward through the column by a peristaltic pump at a flow rate of 250 mL min⁻¹.

Repeated batches of fluidized bed cultivations were carried out in a similar mode to the batch fluidized bed cultivations. Concentrated lactose-hydrolyzed whey permeate was used as culture medium. After 24 h, all cultivation broth was drained and the immobilized cells were retained in the bioreactor. The same amount of concentrated lactose-hydrolyzed whey permeate was immediately replaced to start the next cycle. This procedure was repeated for ten cycles, completing a total of 240 h of cultivation.

All experiments were carried out in duplicates. The ethanol productivities (Q_P) and yields ($Y_{EtOH/S}$) in batch fluidized bed cultivations were calculated considering the maximum ethanol concentration in the process.

Obtained data throughout the work were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) using Statistica 10.0 software (StatSoft, USA).

4.2.5 Analytical determinations

Samples were collected from the top of bioreactors using a sterile needle, centrifuged (3000 × g, 15 min) and the supernatants were analyzed for sugar and ethanol concentrations. Lactose, galactose, glucose, and ethanol concentrations were determined by HPLC (Shimadzu, Japan) with refractive index detector and Bio-Rad HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm) using 5 mM sulfuric acid as eluent at 45 °C, flow rate of 0.6 mL min⁻¹ and sample volumes of 20 µL.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Dynamics of cultures in LHW and LHWP in the batch fluidized bed bioreactors with mono and co-cultures of *S. cerevisiae* and *K. marxianus*

Strains *S. cerevisiae* CAT-1 and PE-2 are widely used for ethanol production in Brazil because they present high ethanol resistance and yields from sugarcane fermentation [21]. However, these strains were never tested on hydrolysed lactose. The batch kinetics of Calcium alginate immobilized cells of CAT-1 and PE-2 in the fluidized bed bioreactors using LHW and LHWP are presented in Fig. 4.1 and 4.2.

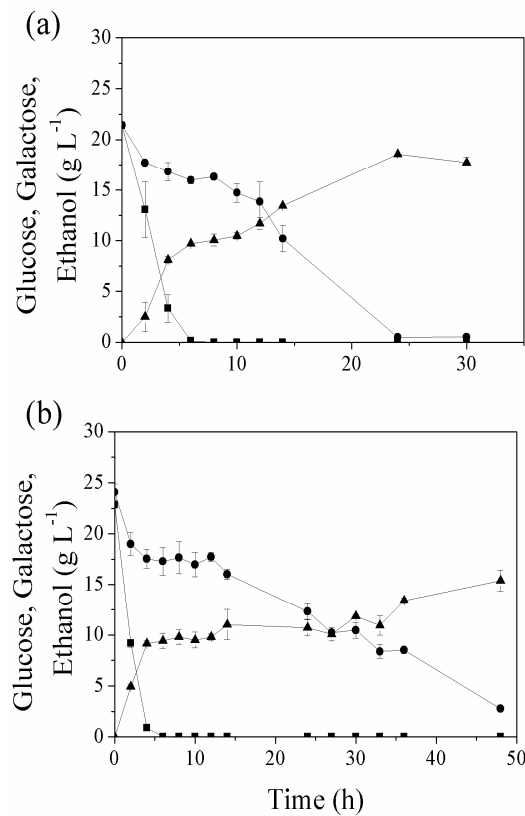


Figure 4.1. Kinetics of glucose and galactose consumption, and ethanol production in lactose-hydrolyzed whey (a) and lactose-hydrolyzed whey permeate (b) by *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 on batch fluidized bed bioreactor at 30°C. Glucose (■), galactose (●) and ethanol (▲).

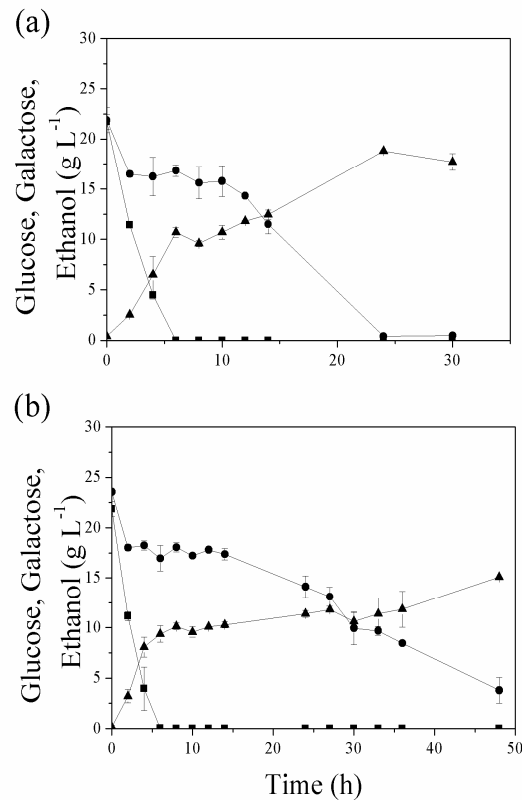


Figure 4.2. Kinetics of glucose and galactose consumption, and ethanol production in lactose-hydrolyzed whey (a) and lactose-hydrolyzed whey permeate (b) by *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 on batch fluidized bed bioreactor at 30°C. Glucose (■), galactose (●) and ethanol (▲).

The two strains showed similar diauxic growth kinetics in the liberated mixture of glucose and galactose in media. The conversion of galactose into glycolytic intermediate needs energy and additional catabolic steps, since the glycolytic enzymes are not galactose specific, thus the Leloir pathway is switched on in order to convert galactose into glucose 6-phosphate, which is in turn metabolized in the glycolysis pathway and finally reduced to ethanol [12, 23]. Maximal ethanol concentrations of 18.6 g L⁻¹ and 18.8 g L⁻¹ were observed for *S. cerevisiae* CAT-1 and PE-2, respectively, in LHW medium. When LHWP was used, the consumption of galactose was slower compared to LHW, and ethanol concentrations were lower, reaching maximal concentrations of 15.4 g L⁻¹ and 15.1 g L⁻¹ for *S. cerevisiae* CAT-1 and PE-2, respectively. One possible explanation for these differences is the fact that whey is a richer medium in minerals and protein than whey permeate, containing all necessary nutrients for cell growth and product formation [24]. For both *S. cerevisiae* strains, the highest ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$) and ethanol productivities (Q_P) were observed in LHW medium (Table 4.1), reaching 0.44 g g⁻¹ and 0.78 g L⁻¹ h⁻¹, compared to only 0.36 g g⁻¹ and

0.31 g L⁻¹ h⁻¹ in LHWP. It is clear that these yeast strains require richer nutrient media, especially in nitrogen, in order to efficiently convert galactose into ethanol. This behaviour was also observed for recombinant *S. cerevisiae* T1-E, which showed higher ethanol production when deproteinized whey was supplemented with corn liquor [25]. Comparatively with the results obtained in our work, Ramakrishnan and Hartley [26], reported ethanol yields of 0.48 g g⁻¹ in cultures of recombinant *S.cerevisiae* GRF167 strain in synthetic medium containing glucose and galactose (20 g L⁻¹). Also working with recombinant strains of *S. cerevisiae* (strain T1), obtained 0.40 g L⁻¹ h⁻¹ of ethanol productivity and 60 % of yield efficiency in lactose (50 g L⁻¹) [27]. It is important to stress that these recent reports used recombinant strains and did not use cell immobilization, factors that can result in physiological and mass transfer differences.

Table 4.1. Ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$), yield efficiency (η) and ethanol productivity (Q_P) of monocultures of *S.cerevisiae*, CAT-1 and PE-2, *K. marxianus* CCT 4086, and for the co-culture of immobilized *S.cerevisiae* CAT-1 and *K. marxianus* CCT 4086 in lactose-hydrolyzed whey and whey permeate in batch fluidized bed bioreactors.

Yeast	$Y_{EtOH/S}$ (g g ⁻¹)		η (%)		Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	
	LHW	LHWP	LHW	LHWP	LHW	LHWP
CAT-1	0.44 ^{ab}	0.35 ^c	86.0	68.4	0.78 ^c	0.32 ^d
PE-2	0.43 ^{ab}	0.36 ^c	83.6	70.4	0.78 ^c	0.31 ^d
CCT 4086	0.49 ^a	0.47 ^a	96.0	90.2	1.68 ^a	1.39 ^b
CAT-1/CCT 4086	0.44 ^{ab}	0.40 ^{bc}	86.0	79.2	1.32 ^b	1.30 ^b

Different letters for the same variable ($Y_{EtOH/S}$ or Q_P) means significant difference by Tukey Test ($p < 0.05$). LHW: Lactose-hydrolyzed whey; LHWP: Lactose-hydrolyzed whey permeate

Because the yeasts of genus *Kluyveromyces* have been extensively used for the fermentation of non-hydrolysed whey, we decided to test *K. marxianus* CCT 4086 in monocultures on LHW and LHWP in order to compare the fermentation kinetics with previous cultivation strategies. Results are shown in Fig. 4.3. The profile of the glucose and galactose consumption were quite similar in LHW and LHWP media, indicating that the *K. marxianus* CCT 4086, strongly contrasting with *S. cerevisiae*, is adapted to grow in media containing lower amounts of nitrogen and minerals, such as LHWP. Another important difference was that the sugars were metabolized simultaneously, with maximal ethanol productions of 22.9 g L⁻¹ and 20.9 g L⁻¹ in LHW and LHWP, respectively. *K. marxianus* CCT 4086 monoculture produced high ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$) and productivity (Q_P) in both media,

reaching of 0.49 g g^{-1} and $1.68 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in LHW and 0.47 g g^{-1} and $1.39 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in LHWP, respectively (Table 4.1). *Kluyveromyces* strains are adapted to galactose metabolism and the expressions of *GAL* genes are not repressed by glucose, allowing the simultaneous glucose and galactose consumption, hence reducing fermentation time [1]. The characteristics of *GAL* genes expression in these yeasts, especially the promoter regions, are important factors influencing galactose repression metabolism. There are several binding sites of glucose-triggered transcriptional repression in *S. cerevisiae*, whereas in *Kluyveromyces* there is only one [1, 12]. The slower galactose metabolism in *S. cerevisiae* can be explained by the low galactose affinity for the galactose-permease and the low expression of *GAL2* gene, thus the reduced enzymes activities involved in Leloir pathway [12, 23].

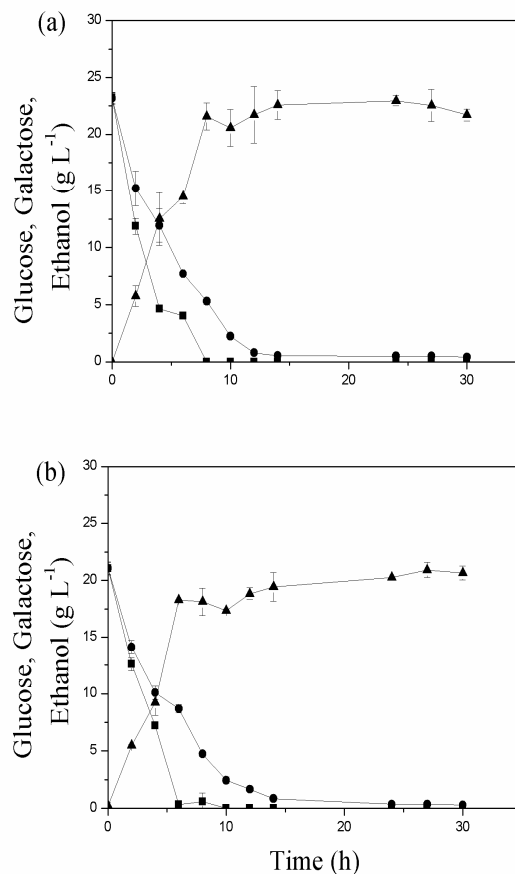


Figure 4.3. Kinetics of glucose and galactose consumption, and ethanol production in lactose-hydrolyzed whey (a) and lactose-hydrolyzed whey permeate (b) by *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 on batch fluidized bed bioreactor at 30°C. Glucose (■), galactose (●) and ethanol (▲).

Results obtained in this work were higher than other reports using *K. marxianus* in whey or permeate, although most of the reports were conducted in shaker instead of

bioreactors. For instance, Marwaha & Kennedy [28], obtained yields of 0.40 g g^{-1} with Ca-alginate immobilized *K. marxianus* NCYC 179 cultures in 50 g L^{-1} whey permeate. Lins & Leão [20] reported low efficiencies of conversion (70 %) by immobilized *K. marxianus* CBS 6164 growing in skimmed milk medium. Guo et al. [29] observed low ethanol yields (0.34 g g^{-1}) and productivities ($0.30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) using whey as substrate (100 g L^{-1}) with *K. marxianus* TY-3 immobilized in Ca-alginate. Different results reflect physiological characteristics of varying strains of *K. marxianus*, which show substantial degree of intraspecific polymorphism [30] and because of physiological behaviour caused by bioreactor cultivations greatly differing from shaker flask.

The kinetics of the co-cultures of *S. cerevisiae* CAT-1 and *K. marxianus* CCT 4086 in LHW and LHWP are shown in Fig. 4.4. These experiments were carried out to investigate the effects of combining these two different yeasts on the sugar consumption profile and ethanol production. As expected, glucose and galactose were metabolized simultaneously, contrasting with the monocultures of *S. cerevisiae* strains, because *Kluyveromyces* is not repressed, as stated above. Consumption of glucose and galactose were fast in LHW medium, with ethanol concentration peaking at 21.4 g L^{-1} . Again, the yeasts metabolism were slower in LHWP, but still all sugars were consumed, and maximal ethanol concentration of 20.8 g L^{-1} was achieved. In LHW medium, ethanol yields of 0.44 g g^{-1} was obtained, corresponding to 86% of the theoretical, and an ethanol productivity of $1.32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, represented an increase of 69 % comparing to *Saccharomyces* monocultures. However, the effect of the co-culture on the fermentative parameters was more pronounced in LHWP, with an increase of 14 % in ethanol yields (from 0.35 g g^{-1} to 0.40 g g^{-1}) and approximately four times higher productivity ($0.31 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to $1.30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). The results reflect the absence of the diauxic metabolism in the co-culture, which reduced the fermentation time. Comparatively, Guo et al. [29], reported ethanol yields and productivity of 0.43 g g^{-1} and $0.88 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ by immobilized co-culture of *K. marxianus* TY-3 and *S. cerevisiae* AY-5 in 100 g L^{-1} of whey.

Differences in the fermentation kinetics and ethanol yields from monocultures and co-culture are strongly related with differences of *GAL* genes and carbon metabolism of genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*. One of the most important of these is glucose repression of galactose utilization in *Saccharomyces* strains, as mentioned before and discussed.

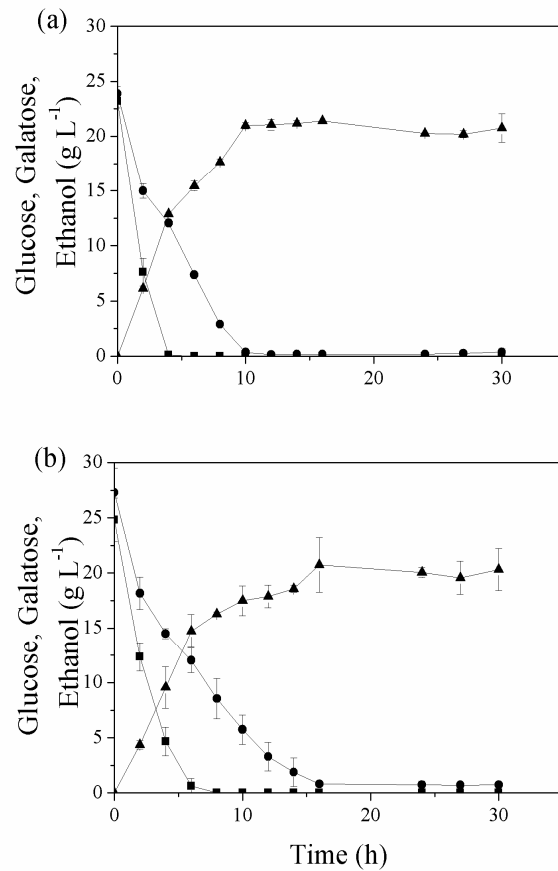


Figure 4.4. Kinetics of glucose and galactose consumption, and ethanol production in lactose-hydrolyzed whey (a) and lactose-hydrolyzed whey permeate (b) by co-culture of *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 and *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 on batch fluidized bed bioreactor at 30°C. Glucose (■), galactose (●) and ethanol (▲).

4.3.2 Dynamics of cultures in concentrated LHWP in batch fluidized bed bioreactors with mono and co-cultures of *S. cerevisiae* and *K. marxianus*

Concentrated lactose-hydrolyzed whey permeate (180 g L⁻¹) was tested as substrate in order to increase ethanol productivity and determine the behavior of the strains under high sugar and ethanol concentrations. Whey permeate was chosen because it showed to be an appropriate substrate when used in the co-culture fermentation and because it has a lower cost than whey. The kinetics of sugars consumption and ethanol production in the monoculture of *S. cerevisiae* CAT-1 or *K. marxianus* CCT 4086 and the co-culture of these two strains are shown in Fig. 4.5.

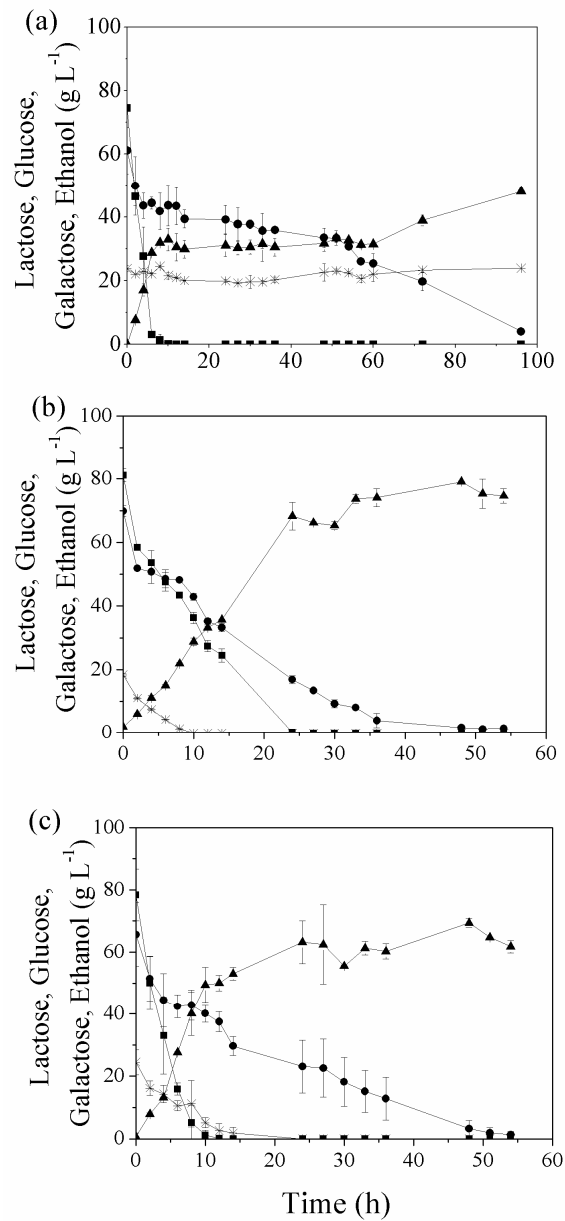


Figure 4.5. Kinetics of lactose, glucose and galactose consumption, and ethanol production in concentrated lactose-hydrolyzed whey by *S. cerevisiae* CAT-1 monoculture (a), *K. marxianus* CCT 4086 (b) and co-culture of *K. marxianus* CCT 4086 and *S. cerevisiae* CAT-1 (c) on immobilized batch bioreactor at 30°C. Lactose (*), glucose (■), galactose (●) and ethanol (▲).

In this set of experiments, lactose was not completely hydrolyzed, with a residual concentration of 20 g L⁻¹. The β -galactosidase was probably inhibited by the high

concentration of liberated products. For the commercial source of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* used in this work, glucose is a non-competitive inhibitor, whereas galactose acts as a competitive inhibitor [31]. Results show that, although in monoculture *S. cerevisiae* CAT-1 (Fig. 4.5a) consumed glucose faster than *K. marxianus* CCT 4086 (Fig. 4.5b) and than in the co-culture (Fig. 4.5c), galactose consumption was slow, as expected. The highest ethanol concentration in *S. cerevisiae* CAT-1 monoculture was 48.0 g L⁻¹ in 96 h, and only 30.4 g L⁻¹ was produced in the first 12 h of cultivation, which was mainly from glucose. *K. marxianus* CCT 4086 metabolized the total sugars, lactose, glucose and galactose simultaneously (Fig. 4.5b), reaching ethanol concentrations of 79.1 g L⁻¹. In the co-culture, lactose, glucose and galactose were also metabolized simultaneously, reaching the maximal ethanol concentration of 69.4 g L⁻¹. The ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$) and productivities (Q_P) of *S. cerevisiae* CAT-1 monoculture were lower (0.36 g g⁻¹ and 0.50 g L⁻¹ h⁻¹) than for *K. marxianus* CCT 4086 monoculture (0.46 g g⁻¹ and 1.65 g L⁻¹ h⁻¹) and than for the co-culture (0.42 g g⁻¹ and 1.44 g L⁻¹ h⁻¹) (Table 4.2).

Table 4.2. Ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$), yield efficiency (η), and ethanol productivity (Q_P) of *S. cerevisiae*, CAT-1 and *K. marxianus* CCT 4086 monocultures and the co-culture of *S. cerevisiae* CAT-1 and *K. marxianus* CCT 4086 in concentrated lactose-hydrolyzed whey permeate in batch fluidized bed bioreactors.

Yeast	$Y_{EtOH/S}$ (g g ⁻¹)	η (%)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
CAT-1	0.36 ^b	71.6	0.50 ^c
CCT 4086	0.46 ^a	90.3	1.65 ^a
CAT-1/CCT 4086	0.42 ^{ab}	81.5	1.44 ^b

Different letters for the same variable ($Y_{EtOH/S}$ or Q_P) means significant difference by Tukey Test ($p < 0.05$).

Comparatively, the results obtained in this research fare well against other reports on the literature. Using recombinant *S. cerevisiae* T1-E to ferment concentrated whey permeate (150 g L⁻¹ of lactose) in shaker flask (30 °C, 150 rpm), Silva et al. [25] reported an ethanol productivity of 1.2 g L⁻¹ h⁻¹. Guimarães et al. [6] reported ethanol productivities of 1.5 g L⁻¹ h⁻¹ using recombinant *S. cerevisiae* T1-E in synthetic lactose medium (150 g L⁻¹) in shaker cultivation (30 °C, 150 rpm). *K. fragilis* (Kf1) showed the ability to convert concentrated whey permeate (150 g L⁻¹ of lactose) into 55.9 g L⁻¹ of ethanol in shaker cultivation at 30 °C, reaching yields of 0.37 g g⁻¹ and productivity of 1.27 g L⁻¹ h⁻¹ [4]. The same authors obtained theoretical yield to 77.4 % when the lactose concentration was increased to 200 g L⁻¹, reaching an ethanol concentration of 80.9 g L⁻¹. Kargi & Ozmihi [32],

reported yields of 0.54 g g^{-1} and final ethanol concentrations of approximately 81 g L^{-1} when using *K. marxianus* NRRL-1195 strain in batch cultivations on concentrated whey (150 g L^{-1} of lactose). Finally, ethanol yields (0.53 g g^{-1} and 0.51 g g^{-1}) and ethanol productivities ($1.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $1.0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) were reported for batch fermentations of 170 g L^{-1} of lactose (whey permeate) using *K. marxianus* UFV-3, reaching final ethanol concentrations of 76 g L^{-1} and 80 g L^{-1} [33].

4.3.3 Reusability of immobilized cells: repeated batches of fluidized bed bioreactors using concentrated LHWP as substrate

Cost reductions in bioprocesses are extremely important to turn biofuels competitive against fossil sources. The use of the same biocatalysts were tested in this work by repeated batches experiments using immobilized *K. marxianus* CCT 4086 in order to investigate the reusability and stability of beads. The kinetics of sugars consumption and ethanol production for the ten cycles are shown in Fig. 4.6. Lactose and glucose were rapidly and totally consumed, in all cycles tested (Fig. 4.6a), whereas galactose was slowly metabolized. In the first cycle, lactose and glucose were exhausted in 24 h. From the second cycle on, sugars were depleted more rapidly, showing cell adaptation to medium and conditions. This behavior can also be associated with high cell density into the bead spheres, as it has been previously observed [10]. This behavior can be evidenced by faster galactose utilization from the seventh cycle on. Likewise, the ethanol production increased along cycles (Fig. 4.6b), being 44 % higher at the end of the tenth cycle in relation to the start of cultivation. The gradual increase of ethanol concentration along of the ten cycles led to improvements in ethanol productivities, varying of $1.9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the first cycle to $2.8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the tenth cycle (Fig. 4.6c).

Although not directly comparable with results in this research, other yeasts, substrates, and material supports were also investigated by several authors in repeated batches cultures and results showed the same profile of increment in sugar consumption, ethanol concentration, productivities, and yields along subsequent batches [18, 34-39]. Higher values of ethanol concentration, productivities, and yields were obtained in this work when compared with other researches using repeated batches using immobilized cell cultures on whey as substrate. Ethanol concentrations varying from 41.0 g L^{-1} to 51.0 g L^{-1} and an overall productivity of $0.65 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ were observed in repeated batches of immobilized recombinant *S. cerevisiae* T1-E in deproteinized whey supplemented with corn liquor [25]. Guo et al. [29] reported ethanol productivities $0.80 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to $0.88 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for immobilized co-cultures of *K.*

marxianus TY-3 and *S. cerevisiae* AY-5 growing in whey. Our results are also higher than those demonstrated for the traditional industrial whey-to-ethanol Carbery process, in plants of New Zealand and The United States of America, where *K. marxianus* is used in repeated batches processes, showing ethanol production of 2.5 % to 3.5 % (volume fraction) and average productivity of $1.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [25, 40]. Therefore, our results strongly suggest that the ethanol production from concentrated whey permeate using immobilized *K. marxianus* CCT 4086 can be economically competitive for fuel ethanol production.

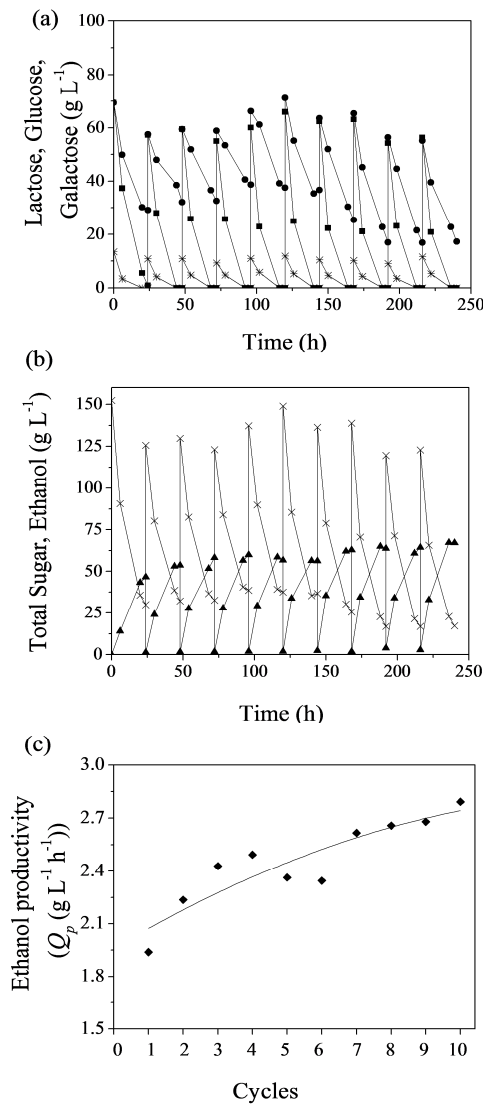


Figure 4.6. Repeated batches of fluidized bed cultivations of immobilized cells of *K. marxianus* CCT 4086 in concentrated lactose-hydrolyzed whey permeate at 30 °C: (a) kinetics of lactose, glucose and galactose consumption; (b) kinetics of total sugar consumption and ethanol production; (c) profile of ethanol productivity (Q_p) in the ten cycles batches. Lactose (*), glucose (■), galactose (●), total sugar (×), ethanol (▲), and ethanol productivity (◆).

4.4 Conclusions

Although *S. cerevisiae*, in special its industrially-adapted strains such as those used in this research, are the choice yeasts for the production of ethanol, for the bioconversion of whey or whey permeate, it is required the hydrolysis of these substrates in order to allow their utilization. Alternatively, *K. marxianus* can readily be used without substrate treatments being required and the ethanol production by this yeast is even higher, under conditions as used in this work. The use of immobilized cell bioreactors allowed the reuse of the biocatalyst, further increasing ethanol production, yields, and productivities, in both concentrated and non-concentrated media from these residue sources. Reuse showed adaptability of cells to environmental process, fact that can be further exploited in scaling-up this process. Considering the positive results obtained in this work when compared with industrial whey-to-ethanol production already in place, this technology could potentially be scaled-up for industrial fuel ethanol plants.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq and CAPES (Brazil) for the financial support of this research and scholarships (first and second authors).

References

- [1] Guimaraes P, Teixeira J, Domingues L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv* 2010; 28(3):375-84.
- [2] Ozmihci S, Kargi F. Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: effects of feed sugar concentration. *J Chem Technol Biotechnol* 2009;84(1):106-11.
- [3] Siso MIG. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour Technol* 1996;57(1):1-11.
- [4] Dragone G, Mussatto SI, Silva J, Teixeira JA. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass Bioenergy* 2011;35(5):1977-82.
- [5] Rubio-Teixeira M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol Adv* 2006;24(2):212-25.
- [6] Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L. Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 2008;30(11):1953-8.
- [7] Lewandowska M, Kujawski W. Ethanol production from lactose in a fermentation/pervaporation system. *J Food Eng* 2007;79(2):430-7.

- [8] Tahoun MK, El-Nemr TM, Shata OH. Ethanol from lactose in salted cheese whey by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Res Technol* 1999;208(1):60-4.
- [9] Grosova Z, Rosenberg M, Rebroš M. Perspectives and applications of immobilised beta-galactosidase in food industry - a review. *Czech J Food Sci* 2008;26(1):1-14.
- [10] Gabardo S, Rech R, Ayub MAZ. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. *J Chem Technol Biotechnol* 2012;87(8):1194-201.
- [11] Gabardo S, Rech R, Rosa CA, Ayub MAZ. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renew Energy* 2014;69:89-96.
- [12] Rubio-Texeira M. A comparative analysis of the genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Yeast Res* 2005;5(12):1115-28.
- [13] Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat I, Marchant R, Koutinas A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 2004;21(4):377-97.
- [14] Verbelen P, De Schutter D, Delvaux F, Verstrepen K, Delvaux F. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett* 2006;28(19):1515-25.
- [15] Nigam J, Gogoi B, Bezbaruah R. Alcoholic fermentation by agar-immobilized yeast cells. *World J Microbiol Biotechnol* 1998;14(3):457-9.
- [16] Christensen AD, Kadar Z, Oleskowicz-Popiel P, Thomsen MH. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011;38(2):283-9.
- [17] Najafpour G, Younesi H, Ismail K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 2004;92(3):251-60.
- [18] Yu JL, Zhang X, Tan TW. A novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *J Biotechnol* 2007;129(3):415-20.
- [19] Kumar S, Singh SP, Mishra IM, Adhikari DK. Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IPE453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor. *J Petroleum Technol Alternative Fuels*. 2011;2(1):1-6.
- [20] Lins A, Leao M. Removal of skim milk lactose by fermentation using free and immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells. *World J Microbiol Biotechnol* 2002;18(3):187-92.
- [21] Basso LC, de Amorim HV, de Oliveira AJ, Lopes ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res* 2008;8(7):1155-63.
- [22] Furlan SA, Carvalho-Jonas MF, Merkle R, Bértoli GB, Jonas R. Aplicação do sistema Microtiter Reader na seleção de microrganismos produtores de β galactosidase. *Brazilian Arch Biol Technol* 1995;38(4):1261-8
- [23] Timson DJ. Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology In: Global Sci Book*. 2007;1(1):63-73.
- [24] Parrondo J, Garcia LA, Diaz M. Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. *Brazilian J Chem Eng* 2009;26(3):445-56.
- [25] Silva A, Guimares PMR, Teixeira JA, Domingues L. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010;37(9):973-82.
- [26] Ramakrishnan S, Hartley BS. Fermentation of lactose by yeast-cells secreting recombinant fungal lactase. *Appl Env Microbiol* 1993;59(12):4230-5.

- [27] Domingues L, Dantas MM, Lima N, Teixeira JA. Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnol Bioeng* 1999;64(6):692-7.
- [28] Marwaha SS, Kennedy JF. Ethanol-production from whey permeate by immobilized yeast-cells. *Enz Microb Technol* 1984;6(1):18-22.
- [29] Guo XW, Zhou J, Xiao DG. Improved Ethanol Production by Mixed Immobilized Cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from Cheese Whey Powder Solution Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;160(2):532-8.
- [30] Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;79(3):339-54.
- [31] Bellaver LH, de Carvalho NMB, Abrahao-Neto J, Gombert AK. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Res* 2004;4(7):691-8.
- [32] Kargi F, Ozmihci S. Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. *Enz Microb Technol* 2006;38(5):711-8.
- [33] Silveira WB, Passos F, Mantovani HC, Passos FML. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enz Microb Technol* 2005;36(7):930-6.
- [34] Sakurai A, Nishida Y, Saito H, Sakakibara M. Ethanol production by repeated batch culture using yeast cells immobilized within porous cellulose carriers. *J Biosci Bioeng* 2000;90(5):526-9.
- [35] Athanasiadis I, Boskou D, Kanellaki M, Koutinas AA. Effect of carbohydrate substrate on fermentation by kefir yeast supported on delignified cellulosic materials. *J Agric Food Chem* 2001;49(2):658-63.
- [36] Abe A, Furukawa S, Watanabe S, Morinaga Y. Yeasts and Lactic Acid Bacteria Mixed-Specie Biofilm Formation is a Promising Cell Immobilization Technology for Ethanol Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 2013;171(1):72-9.
- [37] Fan C, Qi K, Xia XX, Zhong JJ. Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. *Bioresour Technol*. 2013;136:309-15.
- [38] Watanabe I, Miyata N, Ando A, Shiroma R, Tokuyasu K, Nakamura T. Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Bioresour Technol* 2012;123:695-8.
- [39] Rattanapan A, Limtong S, Phisalaphong M. Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations of blackstrap molasses using immobilized yeast cells on thin-shell silk cocoons. *Appl Energy*. 2011;88(12):4400-4.
- [40] Ling K. Whey to ethanol: a biofuel role for dairy cooperatives? USDA Rural Development (Report 214):Washington, DC; 2008.

**CAPÍTULO V - THE MODELING OF ETHANOL PRODUCTION BY
KLUYVEROMYCES MARXIANUS USING WHEY AS SUBSTRATE IN
CONTINUOUS A-STAT BIOREACTORS**

Este artigo foi submetido ao periódico *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*

The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors

Sabrina Gabardo¹, Gabriela Feix Pereira¹, Rosane Rech², and Marco Antônio Záchia Ayub*^{1,2}

¹Biotechnology & Biochemical Engineering Laboratory (BiotecLab), ²Food Science & Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul; Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 6685; fax: +55 51 3308 7048.

ABSTRACT

We investigated the kinetics of whey bioconversion into ethanol by *Kluyveromyces marxianus* in continuous bioreactors using the “accelerostat technique” (A-stat). Cultivations using free and Ca-alginate immobilized cells were evaluated using two different acceleration rates (a). The kinetic profiles of these systems were modeled using four different unstructured models, differing in the expressions for the specific growth (μ) and substrate consumption rates (r_s), taking into account substrate limitation and product inhibition. Experimental data showed that the dilution rate (D) directly affected cell physiology and metabolism. The specific growth rate followed the dilution rate ($\mu \approx D$) for the lowest acceleration rate ($a = 0.0015 \text{ h}^{-2}$), condition in which the highest ethanol yield (0.52 g g^{-1}) was obtained. Higher acceleration rate ($a = 0.00667 \text{ h}^{-2}$) led to a lower ethanol yield (0.40 g g^{-1}) in the free cells system, but when the immobilized cells were used, ethanol yields increased by 23 % (0.49 g g^{-1}). Among the models evaluated, Monod and Levenspiel combined with Ghose and Tyagi models were found to be more appropriate for describing the kinetics of whey bioconversion into ethanol. These results may be used in scaling up the process for ethanol production from whey.

KEYWORDS: Bioprocess modeling; ethanol; *Kluyveromyces marxianus*; continuous fermentation; A-stat control; whey.

* Corresponding author. E-mail address: mazayub@ufrgs.br (MAZ Ayub)

NOMENCLATURE

a	acceleration rate (h^{-2})
D	dilution rate (h^{-1})
D_0	initial dilution rate (h^{-1})
K_p	product inhibition for growth (g L^{-1})
K_s	saturation growth constant (g L^{-1})
m_s	maintenance energy coefficient ($\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$)
P	product concentration (g L^{-1})
P_{xmax}	product concentration where microbial growth ceases (g L^{-1})
r_p	product formation rate ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$)
r_x	cell growth rate ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$)
r_s	substrate consumption rate ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$)
S	substrate concentration (g L^{-1})
S_i	inlet substrate concentration (g L^{-1})
S_0	outlet substrate concentration (g L^{-1})
t	time (h)
X	cell concentration (g L^{-1})
$Y_{P/S}$	yield coefficient for product on substrate (g g^{-1})
$Y_{X/S}$	yield coefficient for cells on substrate (g g^{-1})

Greek Symbols

α	growth-associated constant for product formation (g g^{-1})
β	non-growth-associated constant for product formation ($\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$)
μ	specific growth rate (h^{-1})
μ_{max}	maximum specific growth rate (h^{-1})

5.1 Introduction

Ethanol is the major biofuel on the market worldwide, and the knowledge of variables and parameters involved in the process of ethanol production is of foremost importance for the development of new production technologies [5,46]. This renewable energy source can be produced by fermentation process using different raw materials and microorganisms, being the use of agro-industrial residues a recent subject of researches [33,22,15,7,56]. Whey, which is a by-product (sometimes a waste material) of dairy industries, is an abundant and

inexpensive substrate, rich in nutrients, which has the potential to be used for ethanol fermentation because of its unique composition: high lactose content ($45\text{--}50\text{ g L}^{-1}$), protein ($6\text{--}8\text{ g L}^{-1}$), lipids ($4\text{--}5\text{ g L}^{-1}$), and mineral salts ($5\text{--}7\text{ g L}^{-1}$) [18,49,39,15,24].

Different technologies have been studied to improve the ethanol fermentation processes. Cell immobilization can contribute to bioprocesses optimization because of the unique characteristics of biocatalyst entrapment, such as high productivity, small operational volume, cell protection against inhibitory products, and reduced contamination risks [25,54]. When immobilization techniques are coupled with continuous operation of bioreactors, the product formation rate can be controlled and maintained at desired levels [26,54,16]. The continuous cultivation operated under acceleration stat (A-stat) control, is quite advantageous compared to classical continuous systems, because it enables the evaluation of cell physiology under a wide range of dilution rates in a short time [2,40,53,3,1]. This technique, first described by Paalme and Vilu [42], consists in a smooth change of the dilution rate, which increases linearly at a constant acceleration rate, allowing a gradual adaptation of cell metabolism to the changes in growth rates and environmental conditions, thus keeping the system under steady state condition, resulting in an unlimited number of steady state points [23,41].

Several approaches for ethanol production in continuous cell-immobilized bioreactors have been investigated using different support materials and substrates [52,36,34,28,57,26], but only recently researches have reported the use of whey to ethanol production on immobilized continuous systems [39,6,14,15]. Considering the ever increasing demand on ethanol production, various mathematical models have been attempted to predict the effect of fermentation variables on cell growth, substrate utilization rate, and ethanol production rate [16,4,46], allowing for better processes design. Mathematical modeling allows studying the optimal operational conditions of the process, thus being important to achieve efficient configurations for large scale productions, and to provide the understanding of the interaction of several process parameters. However, only a few studies have so far been described using mathematical models for continuous ethanol production using whey as substrate [16,51,43,47].

Unstructured phenomenological models are widely applied in fermentation processes because of their manageable complexity and number of variables required, giving the most fundamental observation concerning microbial metabolism [47,4,29]. The usual approach for mathematical modeling in bioprocess is based on Monod kinetics to represent the cellular growth rate. Nevertheless, this mathematical model is the simplest type and quite often it must

be modified and extended in order to adequately represent the process kinetic model. In this way, the ethanol kinetic models are generally reported including terms considering the substrate limitation, substrate and/or product inhibition, and of cell death, factors that are known to affect the ethanol productivity [16,4,31,32,17,20].

In this context, the aims of this research were to mathematically model the process of continuous ethanol production from whey in continuous A-stat bioreactors using *K. marxianus* as biocatalyst. Several models were evaluated, taking into account different mathematical expressions and physiological considerations. To evaluate the adaptation of cell metabolism, two different acceleration rates were tested and different strategies of cultivation, using free and immobilized cells, were carried out.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Yeasts, cell maintenance, and materials

Kluyveromyces marxianus CCT 4086 was provided by the Tropical Culture Collection of André Tosello Foundation (Campinas, Brazil). This strain was chosen because it has shown a high capacity for lactose bioconversion into ethanol as it has been observed in our recent publications [14,15]. For cell maintenance, the strain was kept frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, in a 60% cell suspension in glycerol, whereas for immediate use, cells were kept on YEP-Lactose agar slants at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ [12].

All chemicals used in this research were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil, or St. Louis, USA), unless otherwise indicated.

5.2.2 Immobilization technique

Immobilization techniques followed procedures previously optimized and described in earlier works of the group [14]. *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 was grown in 2 L flasks containing 800 mL of YEP-lactose medium (yeast extract, 10 g L^{-1} ; bactopectone, 20 g L^{-1} ; lactose, 20 g L^{-1}), pH 7.0 and $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, and incubated in an orbital shaker at 180 rpm for 15 h in order to obtain exponential-phase cells. At this point, cells were harvested by centrifugation ($3\ 000 \times g$, 15 min), washed and resuspended in 10 mL of sterile distilled water at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The cell suspension was added to a sterile solution of sodium alginate (40 g L^{-1}) to a final biomass concentration of 20 g L^{-1} . The mixture was immediately dropped through a 14 G needle (2.1

mm of diameter) using a peristaltic pump into a flask containing 0.1 M CaCl₂ sterile solution at 35 °C, and gently agitated for 30 min to stabilize the system. The beads were washed thrice with distilled water at 4 °C and kept in peptone water with 0.1 M CaCl₂ overnight. Then, the beads were washed thrice with sterile distilled water at 4 °C and transferred into the bioreactors. Average alginate beads of 3.8 mm of diameter were obtained.

5.2.3 *A-stat bioreactor cultivations*

The medium used in the bioreactor experiments was reconstituted whey (70 g L⁻¹ of whey powder; Elegê Laticínios S.A, Teutônia, Brazil), containing the equivalent as 56 g L⁻¹ of lactose, 9 g L⁻¹ of protein, and 5 g L⁻¹ of minerals. Previously to the sterilization process (121 °C, 15 min), whey proteins were hydrolyzed with a commercial protease (Alcalase 2.4L, 2.4 UA-A/g, Novozymes, Araucária, Brazil) at pH 8.5, 55 °C for 3 h, in order to avoid protein precipitation.

Bioreactor experiments were performed in glass column bioreactors (fluidized section column, 30 mm internal diameter, and 240 mm height), described elsewhere [14]. Cultivations were carried out using two different cell systems: free and immobilized cell cultures.

The inocula of the bioreactors with free cells were prepared by transferring isolated yeast colonies in 250 mL conical flasks containing 50 mL of YEP-lactose medium (yeast extract, 10 g L⁻¹; bactopectone, 20 g L⁻¹; lactose, 20 g L⁻¹), pH 7.0, and incubated in an orbital shaker at 180 rpm for 12 h at 30 °C. Cell concentration was adjusted for optical density (OD, 600 nm) of 1, which corresponded to 1.4 g L⁻¹ of *K. marxianus* CCT 4086, and then added to the bioreactors as volume fractions of 10 % of the total culture volume bioreactor volume, corresponding to 355 mL.

For the immobilized cell bioreactors, the columns were filled with 85 mL of alginate beads previously prepared as described above and with 270 mL of fermentation medium to a final volume of 355 mL. Temperature of both bioreactors systems was controlled at 30 °C by circulating water from a thermostat bath into the bioreactor jacket. The medium was recirculated through the column by a peristaltic pump, promoting the homogenization and the fluidization of the system (upward flow).

Cultures were started in batch mode in order to allow for cell accumulation in the system and the feeding was started in the 24th h of cultivation for free cells, and in the 7th h for the immobilized cells culture. A smooth increase in dilution rate was set for two constant

acceleration rates (a): 0.0015 h^{-2} and 0.00667 h^{-2} and controlled in Biostat B (Braun Biotech International, Germany), so that dilution rate (D) changed with time as follows:

$$D = D_0 + at \quad (1)$$

Where D_0 is initial dilution rate (h^{-1}) and t is the running time (h).

A-stat systems were performed for 30 h or 100 h, according to the different acceleration rates (0.00667 h^{-2} or 0.0015 h^{-2}) and the samples were taken at regular intervals (1 h or 4 h).

5.2.4 Washout technique

Bioreactors to operate with free cells cultures were prepared as described in the previous section. The feeding started at the end of the batch mode (24th h) and the cell culture was maintained in dilution rate (D) of 0.05 h^{-1} for 48 h to assure the steady state. Then, the dilution rate (D) was abruptly shifted to 0.4 h^{-1} , and the decrease of the biomass concentration was controlled for 4 h. The calculated μ_{max} was obtained by plotting the natural logarithm of the cell concentration ($\ln X$) against time (t) with washout rate ($\mu_{max} - D$) as the slope.

5.2.5 Analytical determinations

Samples were collected from the out stream of the A-stat continuous bioreactors, centrifuged ($3\ 000 \times g$, 15 min) and the supernatant was analyzed for sugar and ethanol concentrations. The concentration of suspended cells was determined by absorbance at 600 nm and correlated with dry cell weight (g L^{-1}). The concentration of cells in alginate spheres was analyzed dissolving five beads with a diameter of 3.8 mm into 10 mL of sodium citrate buffer 0.1 M (pH 6.2) and vortex agitated by 15 min to accelerate their breakup [13]. Cell concentration was determined as described above. Lactose and ethanol concentrations were determined by HPLC (Shimadzu, Japan) with refractive index detector and Bio-Rad HPX-87H column ($300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$) using 5 mM sulfuric acid as eluent at $45 \text{ }^\circ\text{C}$, flow rate of 0.6 mL min^{-1} and sample volumes of $20 \text{ }\mu\text{L}$.

5.2.6 Mathematic models

The ethanol bioprocess involves complex interactions of physicochemical, biochemical, and genetic phenomena, and thus, some simplifications are necessary to describe

the kinetics models. In this work, the models were based on the following assumptions: (1) the biotic phase is unique (unstructured model); (2) the cultivation medium in the bioreactor was well mixed; (3) the elemental composition of biomass does not change significantly; (4) there is no intracellular carbohydrate storage; (5) cells did not die or become non-viable; (6) lactose is anaerobically metabolized; (7) the nitrogen is not a substrate-limited parameter; and (8) the main product is the ethanol.

The mathematical models of the lactose bioconversion into ethanol in the continuous bioreactors using free cells were described using the combination of differential equations for cell growth, lactose consumption, and ethanol production. The mass balance was described correlating the cells (X), substrate (S), and product (P) concentrations with the kinetics rates (r_x, r_s, r_p), given by Eqs. (2)-(4):

$$\frac{dX}{dt} = -DX + r_x \quad (2)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_i - S_0) - r_s \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = -DP + r_p \quad (4)$$

where r_x, r_s, r_p were cell growth, substrate consumption, and ethanol formation rates, respectively. The remaining symbols are as defined in Nomenclature section.

The cell growth (r_x) is given by Eq. (5). The substrate consumption rate was described in two different modes: in the first, as function of the specific growth rate (μ), according Eq. (6); and then, as function of both the specific growth rate (μ) and of the maintenance energy coefficient (m_s), as described in Eq. (7).

$$r_x = \mu X \quad (5)$$

$$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X \quad (6)$$

and

$$r_s = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) X \quad (7)$$

In this work, four different kinetic models for specific growth rate described in literature were analyzed: Monod (Eq. 8), Jerusalimsky (Eq. 9), Hinshelwood (Eq. 10), and the combination of the Levenspiel model with Ghose and Tyagi (Eq. 11).

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (8)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right) \quad (9)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - K_p P) \quad (10)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) \quad (11)$$

The ethanol formation rate (r_p) was described as Luedeking and Piret expression [30], where α is the growth-associated constant for product formation and β is non-growth-associated constant for product formation, as shown in Eq. (12).

$$r_p = (\alpha\mu + \beta)X \quad (12)$$

Where α and β are defined as:

$$\alpha = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \quad (13)$$

$$\beta = Y_{P/S} m_s \quad (14)$$

Where $Y_{P/S}$ is defined as the yield coefficient for product on substrate and $Y_{X/S}$ as the yield coefficient for cells on substrate.

The eight different models used in this work are the combination between the two different equations of substrate consumption rate (Eqs. (6) and (7)) with the four equations proposed for specific growth rate (Eqs. (8)-(11)), as shown in Table 5.1.

The parameter estimation was carried out from the derivation of experimental data using the software EMSO (Environment for Modeling, Simulation and Optimization) [50], from the Flexible Polyhedron method [35].

Table 5.1. Expression for substrate consumption rate (r_s) and specific growth rate (μ) used in the proposed models.

MODEL	SUBSTRATE CONSUMPTION RATE	SPECIFIC GROWTH RATE
MON	$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X$ (6)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$ (8)
MON- M_S	$r_s = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) X$ (7)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$ (8)
JRL	$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X$ (6)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right)$ (9)
JRL- M_S	$r_s = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) X$ (7)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right)$ (9)
HSW	$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X$ (6)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - K_p P)$ (10)
HSW- M_S	$r_s = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) X$ (7)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - K_p P)$ (10)
LGT	$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X$ (6)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)$ (11)
LGT- M_S	$r_s = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s \right) X$ (7)	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)$ (11)

5.3 Results and discussion

5.3.1 Continuous A-stat bioreactors using free and immobilized cells cultivations

In order to study the kinetic behavior of *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 on continuous ethanol production on whey for a wide range of dilution rates in a short time, the accelerostat technique (A-stat) was carried out using two different acceleration rates. The high (0.00667 h^{-2}) and the low acceleration rates (0.0015 h^{-2}) were maintained constant up to the point of achieving a final dilution rate of 0.2 h^{-1} . The kinetics profile of biomass, lactose

consumption, and ethanol production in the bioreactor with free cell culture are shown in Fig. 5.1.

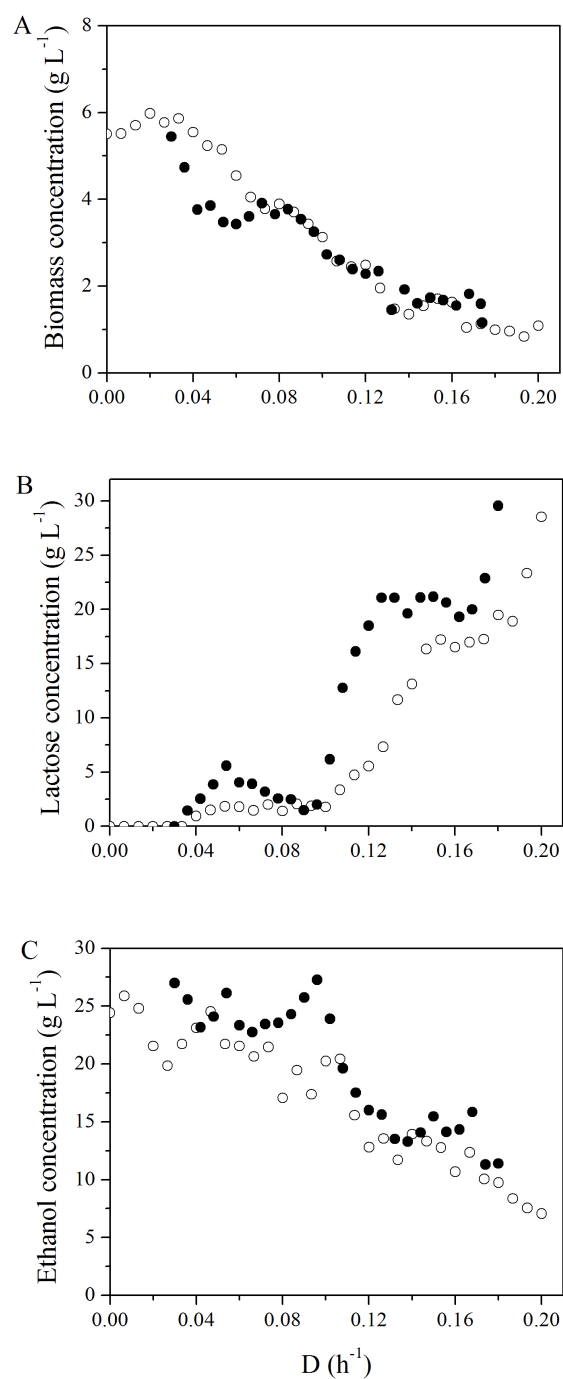


Figure 5.1. Continuous culture kinetics of biomass (A), lactose consumption (B), and ethanol production (C) in A-stat bioreactor with free cell culture of *K. marxianus* CCT 4086, at 30°C, using different constant acceleration rates: 0.00667 h^{-2} (open circle), and 0.0015 h^{-2} (filled circle).

Similar culture behavior was observed for both acceleration rates tested. A phenomenon not totally elucidated, but most likely linked to physiological shift was observed, in which a transition phase always occurred for the dilution rates interval between 0.1 h^{-1} and $0.13\text{-}0.15 \text{ h}^{-1}$. Biomass curves showed a gradual decreased inversely with D , for both acceleration rates (Fig. 5.1a). The lactose consumption and ethanol production were almost constant until $D=0.1 \text{ h}^{-1}$. Thereafter, an abrupt increase of the lactose concentration (1.9 g L^{-1} to 17.2 g L^{-1} for $a= 0.00667 \text{ h}^{-2}$, and 0.0 g L^{-1} to 20.6 g L^{-1} for $a = 0.0015 \text{ h}^{-2}$) and a substantial decrease of ethanol concentration (20.2 g L^{-1} to 12.8 g L^{-1} for $a = 0.00667 \text{ h}^{-2}$, and 25.8 g L^{-1} to 13.3 g L^{-1} for $a = 0.0015 \text{ h}^{-2}$) were observed for $D > 0.1 \text{ h}^{-1}$ (Fig. 5.1b, and c). Despite of these changes in concentrations, cell washout was not observed, and a second cell metabolism stabilization appears to be reached for D between 0.15 h^{-1} and 0.17 h^{-1} . One hypothesis for this behavior is a possible metabolic imbalance caused by growth rates of 0.1 h^{-1} to 0.15 h^{-1} , which can be caused on a possible low expression of *LAC* genes, or because changes of lactose affinity for the lactose-permease and also of the reduced activities of enzymes involved in Leloir and glycolytic pathway [9,44,45,11]. Some researches reported the influence of dilution rate on the cell morphology, where small changes in growth rate can result in significant transitions in morphology [37,19]. However, in this work no changes in cell morphology were observed for dilution rates between 0.05 h^{-1} and 0.1 h^{-1} . The predominant yeast and elongated yeast morphology for *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 were verified. This observation was also reported by O' Shea and Walsh [37] using the same strain *K. marxianus* CCT 4086 (NRRLy2415) and for similar dilution rates.

The A-stat culture operated at the low acceleration rate (0.0015 h^{-2}), showed a similar behaviour of classical chemostat steady state, with agreement between calculated specific growth rate (μ) and dilution rate (D) of the system (average deviation around of 12 %) (Fig.5.2). The largest deviation of the calculated specific growth rate (μ) occurred under $D=0.1 \text{ h}^{-1}$ (Fig. 5.2), which matches the abrupt increase in substrate concentration. For the high acceleration rate (0.00667 h^{-2}), the equilibrium between D and μ was not reached, since this acceleration rate was higher than the necessary stabilization of the cell metabolism. This behaviour showed great influence in the value of the yield coefficient for product on substrate ($Y_{P/S}$), that reached 0.40 g g^{-1} for the highest acceleration rate, and 0.52 g g^{-1} for the lowest acceleration rate. The effect of acceleration rates on the specific growth rate was reported in other researches, showing that lower acceleration rates lead to the approximation of steady state [3,1,23,53]. Therefore, it is clear that the choice of acceleration rate is a critical step in A-stat systems. Some researches suggested that the acceleration rate depends on maximum

specific growth rate (μ_{max}) and it would be best operated in the range of $0.01-0.04\mu_{max}$ [3,23,40]. Considering the μ_{max} of 0.15 h^{-1} calculated in this work, the acceleration rates used ($a = 0.00667 \text{ h}^{-2}$ and $a = 0.0015 \text{ h}^{-2}$) are in agreement with these considerations.

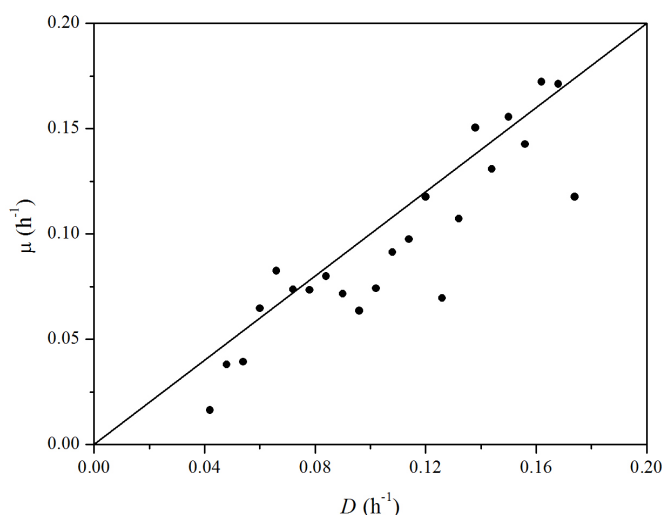


Figure 5.2. Comparison between the calculated specific growth rate (μ) from experimental data and the gradually increase of dilution rate (D) in the A-stat system with free cells culture of *K. marxianus* CCT 4086.

The A-stat bioreactor with immobilized cell showed a different kinetic profile when compared with free cell culture (Fig. 5.3a). For this bioreactor, the lactose and ethanol concentrations were practically constant and the transition phase was not observed in this condition. The ethanol concentration was kept at about 22.4 g L^{-1} , and a slow increase of lactose concentration was verified for dilution rates above of 0.14 h^{-1} , increasing from 1.5 g L^{-1} to 5.5 g L^{-1} in the final dilution rate (0.2 h^{-1}), which is much lower than concentration observed in the free cells bioreactor (17.2 g L^{-1}). The cell leakage of the beads increased gradually with dilution rate (Fig. 5.3a), and this is associated with the increase of cell concentration inside gel spheres (Fig. 5.3b). The high cell density in the bioreactor is an important characteristic of cell-immobilized systems, leading to several advantages, such as high productivities, reduction of the contamination risks and time of cultivation [25]. In this study, these advantages were observed for the cell-immobilized bioreactor, which led to an increase of 23 % in the $Y_{P/S}$ when compared with the free cell culture for the same acceleration rate (0.00667 h^{-2}), reaching 0.49 g g^{-1} . The differences in kinetic profiles for free and immobilized cells bioreactors can be associated with the improvement of the biocatalyst

stability, and with the changes in the physicochemical properties of the microenvironment and in the cell membrane, causing change in permeability, in the membrane composition and the availability of the nutrients [21,25,54].

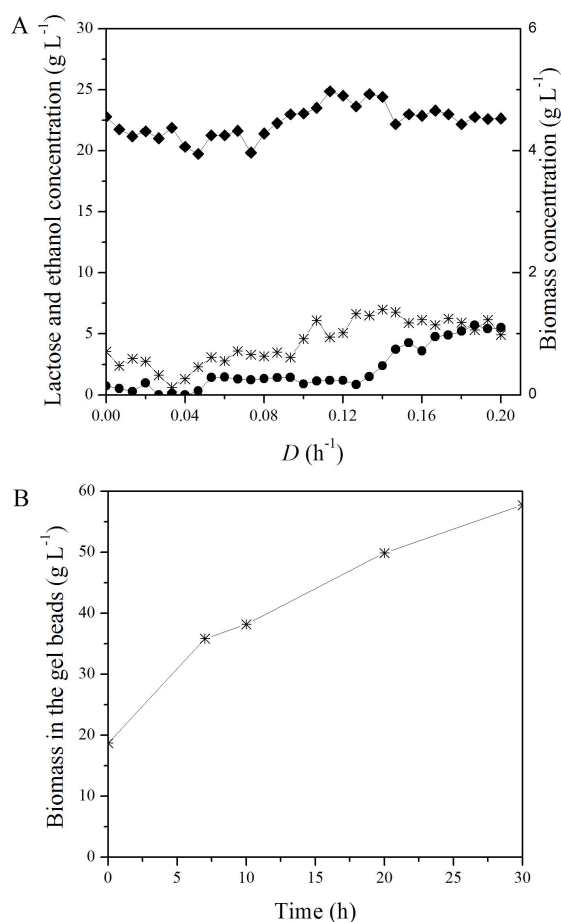


Figure 5.3. Continuous culture kinetics profiles of (A) suspended biomass, lactose consumption, and ethanol production in A-stat bioreactor with immobilized *K. marxianus* CCT 4086, at 30°C, from constant acceleration rate of 0.00667 h⁻² (B) and the biomass in the gel beads. Lactose (*circle*), ethanol (*diamond*), biomass (*asterisk*).

5.3.2 Parameter estimation of the continuous A-stat system

The A-stat system was applied to evaluate the kinetic parameters of fermentation by *K. marxianus* CCT 4086 on why because it is a powerful technique for the quantitative study of cell physiology, being more informative than the conventional continuous system. The most

important aspect of this technique is the need to calculate the macroscopic growth parameters (rates of consumption and formation) in conditions wherein biomass, substrate and product concentration are constantly changing. When compared to other operational modes, such as batch culture, the values of the calculated parameters are much more precise because the change in concentrations are much smaller throughout of the cultivation [41].

Mathematically modeling this system can contribute to understand the interaction of the variables and parameters involved in the process, being an important tool to improve this bioprocess, from the study of the optimal operational conditions and subsequently achieve efficient configurations for scaling up [8,10]. In this work, we evaluated four different kinetic models. The models of Jerusalimsky (Eq. 9), Hinshelwood (Eq. 10), and the combination of the Levenspiel model with Ghose and Tyagi (Eq. 11) take into consideration an additional term compared with the Monod model, which is the product inhibition term, represented by K_s or P_{xmax} . This term is important because of high ethanol concentrations may present a negative effect on the specific growth rate, substrate consumption, and product formation rates [4,55].

The values of the parameters estimated based on experimental data in free cell bioreactor using an acceleration rate of 0.00667 h^{-2} are shown in Table 5.2. A satisfactory coefficient of determination (R^2) was obtained for all set of the ethanol kinetic models tested, corresponding to 0.98, 0.94 and 0.91 for biomass, lactose, and ethanol, respectively, indicating a suitable fit of the different models predicted with the experimental data. The consideration of maintenance energy coefficient (m_s) term on expressions of substrate consumption rates (r_s) increased the values of parameters such as the maximum specific growth rate (μ_{max}), yield coefficient for cells from substrate ($Y_{X/S}$), and decreased the growth-associated constant for product formation (α) of the Luedeking and Piret expression. The m_s is the energy utilized for the cell vital process, and an increase in μ_{max} and $Y_{X/S}$ means that more substrate is being consumed for biomass generation and maintenance and less being converted to ethanol, which also explains the decrease in α value.

Table 5.2. Results for the parameters estimation with experimental data from the A-stat system ($a = 0.00667 \text{ h}^{-2}$).

Model	μ_{max} (h^{-1})	K_s (g L^{-1})	K_p (g L^{-1})	P_{xmax} (g L^{-1})	Y_{XS} (g g^{-1})	m_s ($\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	α (g g^{-1})	B ($\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	$R^2 X$	$R^2 S$	$R^2 P$
Mon	0.12	19.3	--	--	0.019	--	15.5	0.003	0.97	0.94	0.91
Mon- m_s	0.16	23.6	--	--	0.027	0.27	11.0	0.080	0.98	0.94	0.91
Jrl	0.12	11.0	91.7	--	0.025	--	11.8	0.0009	0.97	0.94	0.91
Jrl- m_s	0.16	13.1	78.1	--	0.035	0.28	8.3	0.090	0.97	0.94	0.91
Hsw	0.12	17.4	0.0012	--	0.021	--	13.8	0.005	0.97	0.94	0.91
Hsw- m_s	0.16	17.5	0.0010	--	0.030	0.27	9.1	0.080	0.97	0.94	0.91
LGT	0.12	15.8	--	782.6	0.020	--	12.7	0.016	0.97	0.94	0.91
LGT- m_s	0.25	57.5	--	745.9	0.018	0.28	16.5	0.090	0.98	0.94	0.91

The values of K_p and P_{xmax} (Table 5.2) suggest that did not occur product inhibition, because the expression that represent this effect (second term of the μ expressions) approached the value of 1, which indicates a negligible effect. Consequently, this resulted in the similarity among the curves of the different predicted models (Fig.5.4).

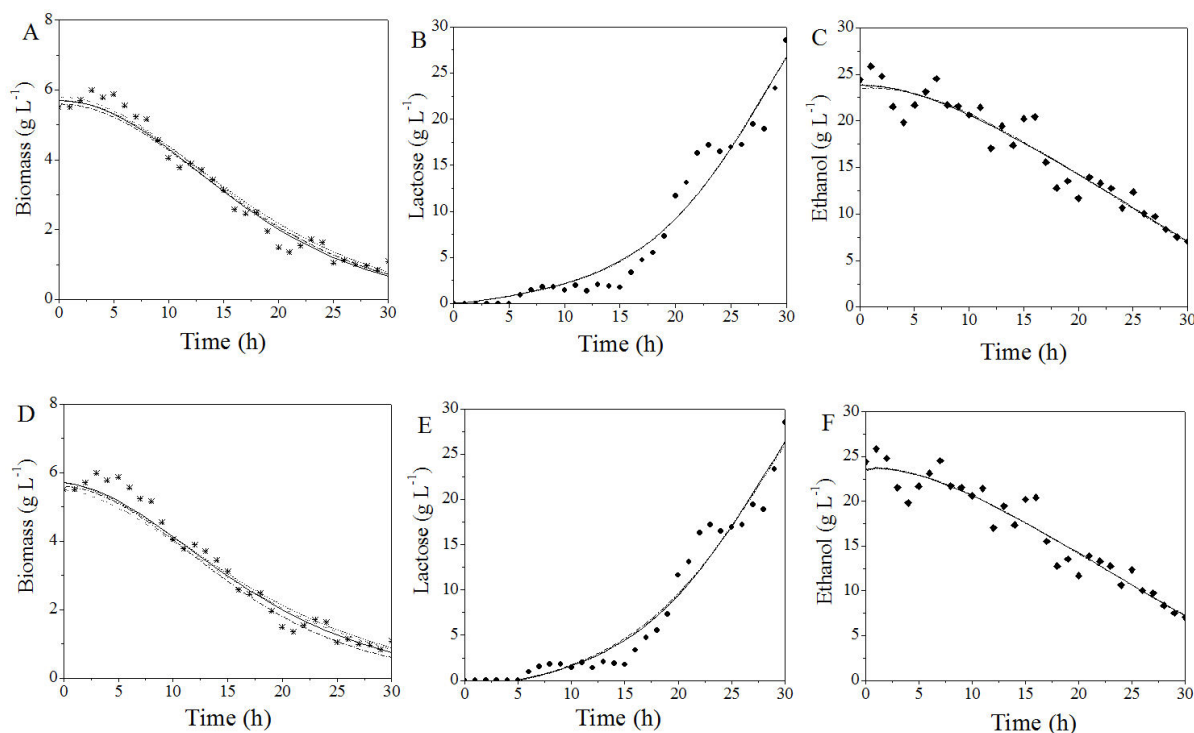


Figure 5.4. Comparison of the experimental data with the models prediction curves of biomass, lactose and ethanol (A, B, C) without taking into account the m_s in r_s expression (Mon, Jrl, Hsw, LGT), and (D, E, F) considering m_s in r_s (Mon- m_s , Jrl- m_s , Hsw- m_s , LGT- m_s), in A-stat system ($a = 0.00667 \text{ h}^{-2}$). Experimental data: lactose (circle); ethanol (diamond); biomass (asterisk). Models: Mon, Mon- m_s (—); Jrl, Jrl- m_s (.....); Hsw, Hsw- m_s (---); and LGT, LGT- m_s (-·-·-·-).

Although the coefficients of determination (R^2) for $a = 0.0015 \text{ h}^{-2}$ (Table 5.3) were lower than for $a = 0.00667 \text{ h}^{-2}$, an ideal cell metabolism was observed, considering the goodness fit of μ with D . Furthermore, the values of $Y_{P/S}$ calculated from different kinetic models showed a satisfactory approximation of the value determined experimentally, differing in the order of 1.8% to 4.8% of the data value. The estimated μ_{max} values from the models using the lower acceleration rate (Table 5.3) were higher than the expected calculated value from the washout technique (0.15 h^{-1}).

Table 5.3. Results for the parameters estimation with experimental data from the A-stat system ($a = 0.0015 \text{ h}^{-2}$).

Model	μ_{max} (h^{-1})	K_s (g L^{-1})	K_p (g L^{-1})	P_{xmax} (g L^{-1})	$Y_{X/S}$ (g g^{-1})	m_s ($\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	α (g g^{-1})	β ($\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	$R^2 \text{ X}$	$R^2 \text{ S}$	$R^2 \text{ P}$
Mon	0.30	23.3	--	--	0.05	--	9.7	0.014	0.75	0.80	0.81
Mon- m_s	0.26	18.5	--	--	0.06	0.015	8.2	0.015	0.78	0.79	0.80
Jrl	0.27	14.6	119.6	--	0.07	--	7.3	0.040	0.74	0.78	0.82
Jrl- m_s	0.28	15.5	106.4	--	0.05	0.0001	9.9	0.004	0.73	0.78	0.80
Hsw	0.35	27.4	0.0053	--	0.07	--	6.9	0.033	0.81	0.78	0.80
Hsw- m_s	0.25	15.8	0.0026	--	0.04	0.42	14.6	0.20	0.50	0.78	0.79
LGT	0.26	16.7	--	999.1	0.08	--	6.3	0.02	0.84	0.78	0.80
LGT- m_s	0.25	16.4	--	996.4	0.06	0.02	8.4	0.003	0.76	0.77	0.79

Some other authors also reported higher μ_{max} from the A-stat technique than values obtained in the washout [2,41], and these differences might be a consequence of the difficulty to fit model curves in the region of metabolic imbalance. As well as for higher acceleration rate, the values of K_p and P_{xmax} (Table 5.3) indicate that did not occur inhibition of cell growth by product, resulting in convergent curves for all different modes evaluated (Fig. 5.5). The kinetic models allowed observe that the substrate consumption rate (r_s) and product formation rate (r_p) increased gradually until D equal to 0.1 h^{-1} , and after this, in the transition region ($0.1 \text{ h}^{-1} < D < 0.15 \text{ h}^{-1}$), a smaller increased of r_p was obtained. This behavior might indicate that occurs a change in the carbon flux (metabolism imbalance region), in which the substrate was metabolized mainly for cell vital process maintenance to overcome the stressing condition found in the environment, in detriment of the ethanol formation, as it was described above.

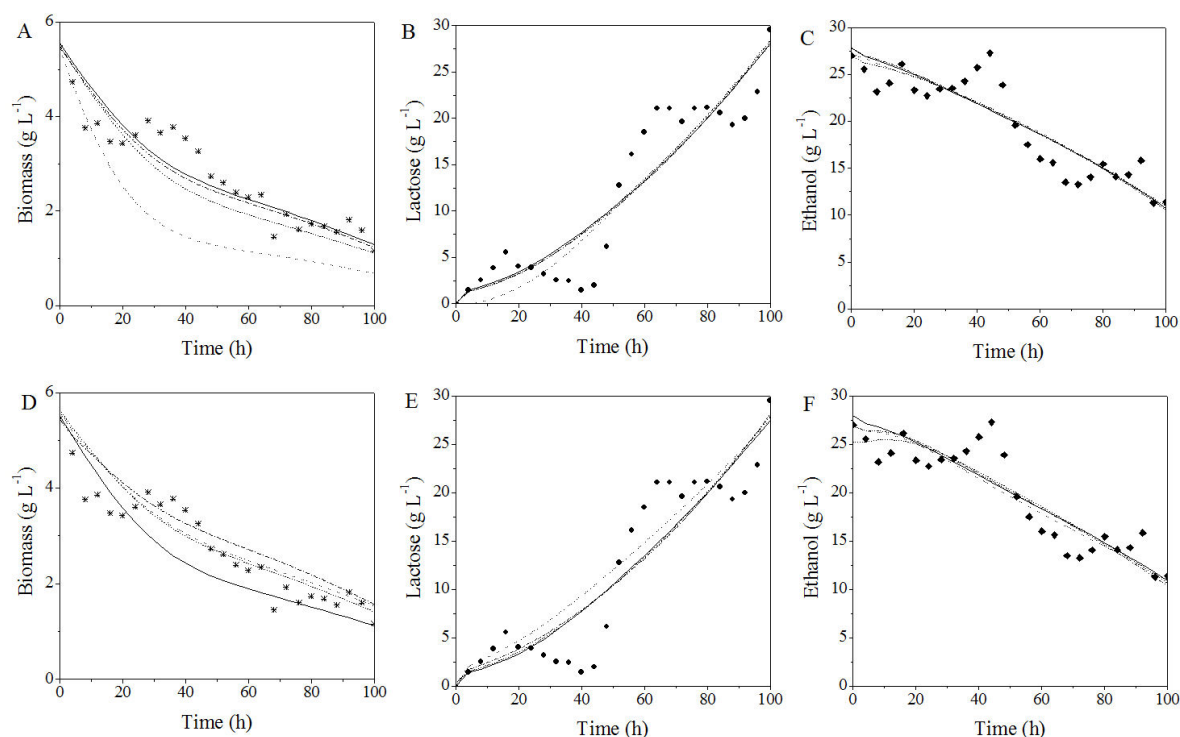


Figure 5.5. Comparison of the experimental data with the models prediction curves of biomass, lactose and ethanol (A, B, C) without taking into account the m_s in r_s expression (Mon, Jrl, Hsw, LGT), and (D, E, F) considering m_s in r_s (Mon- m_s , Jrl- m_s , Hsw- m_s , LGT- m_s), in A-stat system ($a = 0.0015 \text{ h}^{-2}$). Experimental data: lactose (*circle*), ethanol (*diamond*), biomass (*asterisk*). Models: Mon, Mon- m_s (—); Jrl, Jrl- m_s (.....); Hsw, Hsw- m_s (— · — ·); and LGT, LGT- m_s (— · — · — ·).

Of all evaluated models, the Monod (Mon- m_s , Eq. (8)) and Levenspiel combined with Ghose and Tyagi models (Eq. (11)) showed the best representations of the biological phenomenon. A good agreement of the estimated parameters with experimental data and a considerable fitting quality was obtained for these two models. The parameter values indicate consistency with other reports using different strains of *Kluyveromyces marxianus* cultured on whey, in particular for K_s values of 16.0 g L⁻¹, 20 g L⁻¹, and 22.6 g L⁻¹ were observed for *K. marxianus* MTCC 1288, *K. marxianus* CBS 6556, and *K. marxianus* CBS 397 strains, respectively, using unstructured modified Monod model [58], multi-route unstructured model [29], and biochemically structured model [46]. The K_s values in this work indicate that the cell growth was not limited by substrate concentration, constant defined as the sugar concentration when μ is half of μ_{max} . The μ_{max} value obtained is consistent with the some reported in the literature, varying from 0.14 h⁻¹ to 0.4 h⁻¹ depending on the different models used and strain of *Kluyveromyces*. For instance, the Riccati kinetic equation produced a μ_{max} of 0.14 h⁻¹ from *K. fragilis* CECT 1123; the modified Monod model a μ_{max} of 0.4 h⁻¹ from *K. marxianus* MTCC 1288; and the structured biochemically model a μ_{max} of 0.17 h⁻¹ from *K. marxianus* CBS 397 [43,46,48,58]. However, lower values were reported in the studies of Ghaly and El-Taweel [16] and Ozmihci and Kargi [38], that showed a lower μ_{max} , ranging from 0.051 h⁻¹ and 0.094 h⁻¹, respectively, both applying the modified Monod model. These differences might be attributed to the substantial degree of intraspecific polymorphism in *K. marxianus* strains, which can result in different metabolic diversities [27,11].

Although the consistence of parameters values obtained, especially for the two best models, in describing the biological phenomenon, modeling difficulties were found to describe the metabolic imbalance region, thus, improvements are needed in order to describe the cell metabolic imbalance, a phenomenon not yet totally understood by us. Almost certainly, proteomics and metabolomics of cells along the entire time span of cultures might be necessary to fully understand the transition physiology obtained under the conditions of this work. It would also be interesting to compare results obtained for *K. marxianus* with those obtained for other yeast species growing under similar conditions.

5.4 Conclusions

The A-stat technique proved to be a powerful tool for the physiological study of *K. marxianus* in continuous cultures for ethanol production. This strategy allowed the knowledge of the cellular metabolism regarding sugar consumption, product formation, and cell growth on a wide range of dilution rates, accurately predicting the cell behavior on different

environmental changes. The acceleration rates directly influenced the cell adaptation and the equilibrium between μ and D was observed from a lowest acceleration, condition in which the highest ethanol yield was obtained. Cell immobilization technique improved the efficiency of the system, increasing the ethanol yield. The low acceleration rate led to a better description of biological phenomenon using the models. The predictive curves of the different models showed a considerable fit with the experimental curves of biomass, substrate and product concentrations, but improvements on the models are needed in order to be possible the description of the metabolic imbalance region with better accuracy.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq and CAPES (Brazil) for the financial support of this research and scholarships for the first author.

References

1. Adamberg K, Lahtvee P-J, Valgepea K, Abner K, Vilu R (2009) Quasi steady state growth of *Lactococcus lactis* in glucose-limited acceleration stat (A-stat) cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek International J Gen Mol Microbiol* 95:219-226. doi:10.1007/s10482-009-9305-z
2. Albergaria H, Duarte LC, Amaral-Collaco MT, Girio FM (2000) Study of *Saccharomyces uvarum* CCM1 885 physiology under fed-batch, chemostat and accelerostat cultivation techniques. *Food Technol Biotechnol* 38:33-38
3. Barbosa MJ, Hoogakker J, Wijffels RH (2003) Optimisation of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique. *Biomol Eng* 20:115-123. doi:10.1061/s1389-0344(03)00033-9
4. Birol G, Doruker P, Kirdar B, Onsan ZI, Ulgen K (1998) Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem* 33:763-771. doi:10.1016/s0032-9592(98)00047-8
5. Cheng JJ, Timilsina GR (2011) Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renew Energy* 36:3541-3549. doi:10.1016/j.renene.2011.04.031
6. Christensen AD, Kadar Z, Oleskowicz-Popiel P, Thomsen MH (2011) Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiol Biotechnol* 38:283-289. doi:10.1007/s10295-010-0771-0
7. da Cunha-Pereira F, Hickert LR, Sehnem NT, de Souza-Cruz PB, Rosa CA, Ayub MAZ (2011) Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresour Technol* 102:4218-4225. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.060
8. de Andrade RR, Maugeri Filho F, Maciel Filho R, da Costa AC (2013) Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. *Bioresour Technol* 130:351-359. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.045

9. Diniz RHS, Silveira WB, Fietto LG, Passos FML (2011) The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:541-550. doi:10.1007/s10482-011-9668-9
10. Dodic JM, Vucurovic DG, Dodic SN, Grahovac JA, Popov SD, Nedeljkovic NM (2012) Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. *Appl Energy* 99:192-197. doi:10.1016/j.apenergy.2012.05.016
11. Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:339-354. doi:10.1007/s00253-008-1458-6
12. Furlan SA, Carvalho-Jonas MF, Merkle R, Bértoli GB, Jonas R (1995) Aplicação do sistema Microtiter Reader na seleção de microrganismos produtores de β galactosidase. *Braz Arch Biol Technol* 38:1261-1268
13. Gabardo S, Rech R, Ayub MAZ (2011) Determination of Lactose and Ethanol Diffusion Coefficients in Calcium Alginate Gel Spheres: Predicting Values To Be Used in Immobilized Bioreactors. *Journal of Chemical & Engineering Data* 56:2305-2309. doi:10.1021/je101288g
14. Gabardo S, Rech R, Ayub MAZ (2012) Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. *J Chem Technol Biotechnol* 87:1194-1201. doi:10.1002/jctb.3749
15. Gabardo S, Rech R, Rosa CA, Ayub MAZ (2014) Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renew Energy* 69:89-96. doi:10.1016/j.renene.2014.03.023
16. Ghaly AE, ElTaweel AA (1997) Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. *Biomass Bioenergy* 12:461-472. doi:10.1016/s0961-9534(97)00012-3
17. Ghose TK, Tyagi RD (1979) Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnol Bioeng* 21:1401-1420
18. Guimaraes P, Teixeira J, Domingues L (2010) Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv* 28:375-384. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.002
19. Hill GA, Robinson CW (1988) Morphological behavior of *saccharomyces-cerevisiae* during continuous fermentation. *Biotechnol Lett* 10:815-820. doi:10.1007/bf01027579
20. Hinshelwood CN (1946) *Kinetics of bacterial cell*. Oxford University Press
21. Jamai L, Sendide K, Ettayebi K, Errachidi F, Hamdouni-Alami O, Tahri-Jouti MA, McDermott T, Ettayebi M (2001) Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiol Lett* 204:375-379. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10913.x
22. Kargi F, Ozmihci S (2006) Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. *Enz Microb Technol* 38:711-718. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.11.006
23. Kasemets K, Drews M, Nisamedtinov I, Adamberg K, Paalme T (2003) Modification of A-stat for the characterization of microorganisms. *J Microb Method* 55:187-200. doi:10.1016/s0167-7012(03)00143-x

24. Kosseva M, Panesar P, Kaur G, Kennedy J (2009) Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *Int J Biol Macromols* 45:437-447. doi:10.1016/j.ijbiomac.2009.09.005
25. Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat I, Marchant R, Koutinas A (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 21:377-397. doi:10.1016/j.fm.2003.10.005
26. Kumar S, Singh SP, Mishra IM, Adhikari DK (2011) Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IPE453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor. *J Pet Technol Altern Fuels* 2:1-6
27. Lane MM, Burke N, Karreman R, Wolfe KH, O'Byrne CP, Morrissey JP (2011) Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 100:507-519. doi:10.1007/s10482-011-9606-x
28. Lewandowska M, Kujawski W (2007) Ethanol production from lactose in a fermentation/pervaporation system. *J Food Eng* 79:430-437. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.01.071
29. Longhi LsGS, Luvizetto DbJ, Ferreira LS, Rech R, Ayub MAZ, Secchi AR (2004) A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31:35-40. doi:10.1007/s10295-004-0110-4
30. Luedeking R, Piret EL (2000) A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH (Reprinted from *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, vol 1, pg 393, 1959). *Biotechnol Bioeng* 67:636-644. doi:10.1002/(sici)1097-0290(20000320)67:6<636::aid-bit3>3.0.co;2-u
31. Monod J (1950) The growth of bacterial culture. *Annual Review of Microbiology* 3:371-394
32. Moser A (1985) Kinetics of batch fermentations. *Biotechnology* ed. H.J. Rehm and G. Reed:243-283
33. Mussatto SI, Dragone G, Guimaraes PMR, Silva JPA, Carneiro LM, Roberto IC, Vicente A, Domingues L, Teixeira JA (2010) Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol Adv* 28:817-830. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.001
34. Najafpour G, Younesi H, Ismail K (2004) Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 92:251-260. doi:10.1016/j.biortech.2003.09.009
35. Nelder JA, Mead R (1965) A simplex-method for function minimization. *Comput J* 7:308-313
36. Nigam JN (2000) Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *J Biotechnol* 80:189-193. doi:10.1016/s0168-1656(00)00246-7
37. O'Shea DG, Walsh PK (2000) The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:316-322
38. Ozmihci S, Kargi F (2007) Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: effects of hydraulic residence time. *Bioprocess Biosystem Eng* 30:79-86. doi:10.1007/s00449-006-0101-0
39. Ozmihci S, Kargi F (2009) Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: effects of feed sugar concentration. *J Chem Technol Biotechnol* 84:106-111. doi:10.1002/jctb.2013

40. Paalme T, Elken R, Vilu R, Korhola M (1997) Growth efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose/ethanol media with a smooth change in the dilution rate (A-stat). *Enz Microb Technol* 20:174-181. doi:10.1016/s0141-0229(96)00114-7
41. Paalme T, Kahru A, Elken R, Vanatalu K, Tiisma K, Vilu R (1995) The computer-controlled continuous culture of *Escherichia coli* with smooth change of dilution rate (A-stat). *J Microbiol Method* 24:145-153. doi:10.1016/0167-7012(95)00064-x
42. Paalme T, Vilu R (1992) A new method of continuous cultivation with computer-controlled change of dilution rate. In: Karim MN, Stephanopoulos G (eds) *Modeling and Control of Biotechnical Processes*. Pergamon Press Ltd. Headington Hill Hall, Oxford, England. pp 299-301
43. Parrondo J, Garcia LA, Diaz M (2000) Production of an alcoholic beverage by fermentation of whey permeate with *Kluyveromyces fragilis* I: Primary metabolism. *J Instit Brewing* 106:367-375
44. Rocha SN, Abrahao-Neto J, Gombert AK (2011) Physiological diversity within the *kluyveromyces marxianus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of Gen Mol Microbiol* 100:619-630. doi:10.1007/s10482-011-9617-7
45. Rubio-Teixeira M (2006) Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol Adv* 24:212-225. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.10.001
46. Sansonetti S, Hobley TJ, Calabro V, Villadsen J, Sin G (2011) A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: A batch fermentation and kinetic study. *Bioresour Technol* 102:7513-7520. doi:10.1016/j.biortech.2011.05.014
47. Sansonetti S, Hobley TJ, Curcio S, Villadsen J, Sin G (2013) Use of continuous lactose fermentation for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* for verification and extension of a biochemically structured model. *Bioresour Technol* 130:703-709. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.080
48. Silveira WB, Passos F, Mantovani HC, Passos FML (2005) Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enz Microb Technol* 36:930-936. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.01.018
49. Siso MIG (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour Technol* 57:1-11. doi:10.1016/0960-8524(96)00036-3
50. Soares RDP, Secchi AR (2003) EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation. *Comput Aided Chem Eng*. 14: 947-952
51. Staniszewski M, Kujawski W, Lewandowska M (2009) Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – Kinetic model predictions considering glucose repression. *J Food Eng* 91:240-249. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.08.026
52. Szajani B, Buzas Z, Dallmann K, Gimesi I, Krisch J, Toth M (1996) Continuous production of ethanol using yeast cells immobilized in preformed cellulose beads. *Appl Microbiol Biotechnol* 46:122-125
53. van der Sluis C, Westerink BH, Dijkstal MM, Castelein SJ, van Boxtel AJB, Giuseppin MLF, Tramper J, Wijffels RH (2001) Estimation of steady-state culture characteristics during acceleration-stats with yeasts. *Biotechnol Bioeng* 75:267-275. doi:10.1002/bit.1181
54. Verbelen P, De Schutter D, Delvaux F, Verstrepen K, Delvaux F (2006) Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett* 28:1515-1525. doi:10.1007/s10529-006-9132-5

55. Yang K-M, Lee N-R, Woo J-M, Choi W, Zimmermann M, Blank LM, Park J-B (2012) Ethanol reduces mitochondrial membrane integrity and thereby impacts carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 12:675-684. doi:10.1111/j.1567-1364.2012.00818.x
56. Yu JL, Yue GJ, Zhong J, Zhang X, Tan TW (2010) Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* to modified bagasse for ethanol production. *Renew Energy* 35:1130-1134. doi:10.1016/j.renene.2009.11.045
57. Yu JL, Zhang X, Tan TW (2007) An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *J Biotechnol* 129:415-420. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.01.039
58. Zafar S, Owais M, Salleemuddin M, Husain S (2005) Batch kinetics and modelling of ethanolic fermentation of whey. *International J Food Sci Technol* 40:597-604. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.00957.x

CAPÍTULO VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi realizado visando o aperfeiçoamento do processo da produção de etanol a partir de dois importantes subprodutos da indústria de laticínios, o soro e o permeado de soro de queijo, proporcionando o aproveitamento alternativo dos mesmos e contribuindo para a geração de uma fonte de energia renovável e menos poluente que as convencionais fontes de energia. Para tanto, uma série de etapas foram desenvolvidas neste trabalho, abrangendo desde experimentos com diferentes gêneros de leveduras e diferentes espécies dentro do mesmo gênero, testes com suplementação de meios de cultivo e a partir de diferentes concentrações de substrato, utilização da técnica de imobilização celular, melhorias do processo a partir de ferramenta estatística e por diferentes formas de condução do bioprocessamento, tais como biorreatores operados em regime batelada, batelada repetida, cultura contínua, cultura contínua com biorreatores de dois estágios operados em sequência e sistema contínuo A-stat, além da modelagem matemática do bioprocessamento. Cada etapa foi de fundamental importância para que resultado final desta pesquisa fosse alcançado, especialmente em termos de melhorias na eficiência do processo e dos parâmetros fermentativos.

Em um primeiro momento, esta pesquisa buscou aprimorar a produção de etanol através da utilização de biorreatores imobilizados operados continuamente. Para tanto, inicialmente foi realizada a seleção de diferentes linhagens de *K. marxianus*, assim como do meio de cultivo, através de testes em agitador rotacional e em biorreatores de leiteo fluidizado operados em regime batelada. Em seguida, a produção de etanol foi otimizada em biorreatores contínuos de célula imobilizada, a partir da linhagem e do meio de cultivo previamente selecionados na etapa anterior. Neste caso, melhorias foram alcançadas através do emprego de diferentes taxa de diluição (D) e de diferentes concentrações de permeado (C_{WP}), assim como pelo uso do sistema contínuo de dois estágios em sequência. Com esse conjunto de experimentos foi possível definir a levedura que apresentou a melhor capacidade de bioconversão no bioprocessamento (*K. marxianus* CCT 4086), além de possibilitar melhorias consideráveis em termos de concentração de produto e de produtividade volumétrica, onde altos valores foram obtidos e a viabilidade do sistema contínuo foi observada.

Em um segundo momento da pesquisa, a produção de etanol foi realizada a partir de cepas convencionalmente utilizadas em plantas industriais de etanol do Brasil na tentativa de se beneficiar das vantagens que estas linhagens apresentam. Para tanto, a cinética de fermentação de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliada e comparada

com *K. marxianus* CCT 4086, a partir de testes em monocultivo e co-cultivo, tanto em soro quanto em permeado de soro de queijo previamente hidrolisados com β -galactosidase, concentrados ou não concentrados, sem suplementação, em biorreatores imobilizados de leito fluidizado operados em regime batelada e batelada repetida. Os resultados mostraram que a linhagem de *K. marxianus* CCT 4086 foi superior para a produção de etanol a partir destes meios frente a linhagens de *S. cerevisiae*, mesmo sendo estas últimas tradicionalmente empregadas em plantas industriais de etanol por sua capacidade em metabolizar altas concentrações de açúcar. Além disso, a forma de operação batelada repetida utilizando *K. marxianus* CCT 4086 como biocatalisador levou a melhorias significativas na produtividade volumétrica, indicando ser este bioprocessos a partir desta linhagem bastante competitivo frente às recentes plantas industriais de etanol a partir de soro de queijo no mundo.

Diante do potencial de bioconversão que a linhagem *K. marxianus* CCT 4086 apresentou ao longo desta pesquisa, esta linhagem foi escolhida para o estudo da modelagem matemática do bioprocessos, visando prever o comportamento cinético e a estimação dos parâmetros para fins posteriores de escalonamento. Nesta terceira etapa, os experimentos foram realizados em sistema contínuo *A-stat* (*accelerostat technique*), caracterizado pelo aumento gradual da taxa de diluição (D) a partir de uma taxa de aceleração constante (a). Este sistema tem a vantagem de permitir estudar o comportamento celular em diferentes taxas de diluição por um curto período de tempo, fato que em sistema contínuo convencional isto não é possível. Sistemas de células livres e imobilizadas foram testados e o comportamento cinético foi avaliado a partir de duas taxas de aceleração (a). A modelagem matemática do bioprocessos foi realizada a partir de quatro modelos cinéticos descritos em literatura, variando nas expressões para a velocidade específica de crescimento (μ) e para a taxa de consumo de substrato (r_s). Os resultados mostraram que a técnica de imobilização celular leva a melhorias no processo, tais como o aumento do fator de conversão. Além disso, o estado estacionário foi alcançado para a cultura de células livres crescidas na menor taxa de diluição, enquanto para a maior taxa de diluição, este fenômeno não foi observado, e, devido a isso, a descrição matemática do modelo pôde ser melhor representada para a condição de menor aceleração, em que os valores estimados pelos modelos matemáticos coincidem com os valores dos parâmetros calculados experimentalmente e com a literatura.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são bastante promissores, visto que o emprego tanto de soro de queijo quanto de permeado de soro de queijo para a produção de etanol mostraram ser satisfatórios em condições de meio não suplementado. Isto significa que estes dois subprodutos industriais apresentam possibilidade de aproveitamento diretamente de suas

fontes, sem quaisquer maiores investimentos em fontes nutrientes. Além disso, alta concentração de etanol foi obtida em condições de meio mais concentrado, indicando que ambos os gêneros de leveduras são capazes de metabolizar altas concentrações de açúcares e tolerar altas concentrações de etanol, não havendo inibição pelo produto. Esta característica é própria do gênero *Saccharomyces*, porém é especialidade de poucas linhagens de *Kluyveromyces marxianus* e está relacionada ao elevado grau de polimorfismo intra-específico entre estas últimas, o que resulta em ampla diversidade metabólica.

Este estudo mostrou que a linhagem *K. marxianus* CCT 4086 consiste em uma potencial candidata para o emprego em plantas industriais de etanol a partir de soro e permeado de soro de queijo. Além disso, esta linhagem mostrou ser tão ou mais eficiente na bioconversão dos monossacarídeos obtidos a partir da hidrólise enzimática da lactose quando comparada às linhagens de *S. cerevisiae*, especialmente para a metabolização da galactose. Este resultado é devido às diferenças genéticas existente entre os dois gêneros, o que refletiu diretamente na velocidade metabólica dos açúcares e no tempo de cultivo, e conseqüentemente, na produtividade de etanol. Adicionado a isso, a linhagem *K. marxianus* CCT 4086 apresentou alta capacidade de bioconversão tanto em biorreatores contínuos quanto operados em batelada repetida, sistemas estes que proporcionaram melhorias nos parâmetros fermentativos quando comparados aos biorreatores de célula imobilizada operados em regime batelada. No sistema contínuo, a principal contribuição para estas melhorias foi devido ao estudo das variáveis do processo, taxa de diluição e concentração de permeado de soro de queijo, o qual permitiu otimizar a produção de etanol através da utilização de sistema contínuo em sequência, alcançando altas concentrações de etanol, altas conversões e produtividades volumétricas. No sistema em batelada repetida, a adaptação celular ao longo de cada ciclo levou a melhorias no consumo dos açúcares, especialmente de galactose, aumentando com isso a concentração de etanol e a produtividade volumétrica do sistema. Este último parâmetro cinético (produtividade volumétrica) superou os valores obtidos em plantas industriais de etanol por soro de queijo no mundo em países como Nova Zelândia e Estados Unidos da América. Além disso, superou também em termos de concentração de etanol produzido, visto a capacidade de metabolização de altas concentrações de açúcar pela linhagem. Estes dois fatores contribuem para reforçar a hipótese da produção industrial de etanol por *K. marxianus* CCT 4086 como um processo tecnicamente competitivo. Neste sentido, a modelagem matemática pode contribuir para a obtenção de informações necessárias para futuro escalonamento do processo a partir da otimização das condições operacionais do sistema. Embora o ajuste dos modelos matemáticos tenha sido adequado, dificuldades foram

encontradas para descrever a região de transição metabólica, e, portanto, melhorias ainda necessitam ser feitas para descrever este desequilíbrio metabólico.

Em conclusão, tanto o soro quanto o permeado de soro de queijo apresentam alto potencial de aproveitamento, servindo como fontes alternativas de carbono e de baixo custo para a produção de etanol, representando um processo interessante tanto do ponto de vista tecnológico, ambiental quanto econômico. Além disso, quando a sua produção é associada ao processo de biorreatores com células imobilizadas operados em regime contínuo ou em batelada repetida, juntamente com a utilização de substrato na forma concentrada, altos fatores de conversão e de produtividade volumétrica podem ser obtidos, além de propiciar altas concentrações de etanol, tornando este processo bastante vantajoso e competitivo. A linhagem *K. maxianus* CCT 4086 apresenta potencial para ser empregada em plantas industriais de etanol, e por isso, a modelagem matemática do bioprocessos consiste em uma ferramenta fundamental que pode contribuir positivamente para ampliações de escala deste bioprocessos.

PERSPECTIVAS

O presente trabalho demonstrou o potencial biotecnológico da produção de etanol por soro e permeado de soro de queijo, especialmente a partir de *K. marxianus* CCT 4086, linhagem que apresentou alta capacidade de bioconversão. Melhorias ainda podem ser feitas visando aprimorar ainda mais este bioprocessos. Dessa forma, o avanço nos estudos pode ser realizado a partir de algumas sugestões:

Estudar os fenômenos fisiológicos e bioquímicos envolvidos durante a produção de etanol por *K. marxianus* CCT 4086 em sistema A-stat através da investigação da expressão gênica, análises proteômicas, metabolômicas e de atividade enzimática relacionada às vias Leloir e glicolítica, assim como estudos do mecanismo de transporte de lactose.

Melhorar o modelo matemático proposto, com a adição de equações ou termos que melhor representem os fenômenos decorridos da região de desequilíbrio metabólico.

Testar a produção de etanol por soro ou permeado de soro de queijo em escala piloto a partir de um novo projeto de biorreator com maior controle do processo e das variáveis que envolvem a fermentação.

Estudar a viabilidade econômica do processo de produção de etanol por soro ou permeado de soro de queijo.

Testar outros diferentes suportes e técnicas de imobilização celular com potencial de aplicação em escala industrial e avaliar a influência destes sobre a cinética de fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-USCANGA, M.G.; GARCIA-ALVARADO, Y.; GOMEZ-RODRIGUEZ, J.; PHISTER, T.; DELIA, M.L.; STREHAIANO, P. Modelling the growth and ethanol production of *Brettanomyces bruxellensis* at different glucose concentrations. **Letters in Applied Microbiology**, v.53, p.141-149, 2011.
- ALTERIIS, E; SILVESTRO, G; POLETTO, M., et al. *Kluyveromyces lactis* cells entrapped in Ca-alginate beads for the continuous production of a heterologous glucoamylase. **Journal of Biotechnology**, v.109, p. 83–92, 2004
- AMSDER, B; TURNER, N. Diffusion Characteristics of Calcium Alginate Gels. **Biotechnology and Bioengineering**, v.65, n. 5, p. 605-610, 1999.
- AZBAR, N.; TUBA, F. C. D.; KESKIN, T.; KORKMAZ, K.S.; SYED, H.M. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p.7441-7447, 2009.
- AWAD, G. E. A.; AMER, H.; EL-GAMMAL, E. W., et al. Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads. **Carbohydrate Polymers**, v.93, p.740-746, 2013.
- BAI, F.W;ANDERSON, W.A; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 14, p. 89-105, 2008.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J., ET al. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v.39, p.1843-1848, 2004.
- BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. 1992. Isolation of thermotolerant fermentative yeast capable of growth at 52°C and ethanol production at 48 °C e 50 °C. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p. 259-263, 1992.
- BANAT IM, MARCHANT R. Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.11, p. 304–306, 1995.
- BARON, G.V; WILLAERT, R.G; BACKER, L.U.C. Immobilized cell reactors. In: WILLAERT, R.G. **Immobilized living cells systems: Modelling and experimental methods**. London: John Willey & Sons, p. 67-95, 1996.
- BARRANCO-FLORIDO, E; GARCÍA-GARIBAY, M; GOMEZ-RUIZ, L; AZAOLA, A. Immobilization sistem of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 37, p.513-519, 2001.
- BARROS, A. R.; SILVA, E. L. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v.61, p.59-65, 2012.

BASSO, L. C.; de AMORIM, H. V.; de OLIVEIRA, A.J., et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p.1155-1163, 2008.

BECERRA, M; BAROLI, B; FADDA, A.M; MENDEZ, J.B; SISO, M.I.G. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v 29, p.506–512, 2001.

BEHERA, S.; KAR, S.; MOHANTY, R. C., et al. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. **Applied Energy**, v.87, p.96-100, 2010.

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

BERLOWSKA, J.; KREGIEL, D.; AMBROZIAK, W. Physiological tests for yeast brewery cells immobilized on modified chamotte carrier. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.104, p.703-714, 2013.

BICKERSTAFF, G.F. Immobilization of enzymes and cells. Totowa: Humana Press, 1997. 367p.

BIROL, G.; DORUKER, P.; KIRDAR, B.; ONSAN, Z.I.; ULGEN, K. Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v.33, p. 763-771, 1998.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.A; AQUARONE, E; BORZANI,W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., v. 2, p.123-178, 2001.

BOROVIKOVA, D.; SCHERBAKA, R.; PATMALNIEKS, A.; RAPOPORT, A. Effects of yeast immobilization on bioethanol production. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.61, p.33-39, 2014.

BRADY D., MARCHANT R, MCHALE L., MCHALE A.P. Production of ethanol by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 737–740, 1994.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Biocatalisadores imobilizados. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.38, p.48-57, 2007.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: Uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v.23, p.60-70, 2006.

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

CHRISTENSEN, A. D.; KADAR, Z.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; THOMSEN, M. H. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p.283-289, 2011.

COTE, A., W. A. BROWN, ; VAN WALSUM, G.P.; et al. Hydrolysis of lactose in whey permeate for subsequent fermentation to ethanol. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1608-1620, 2004.

COVIZZI, L.G. GIESE, E.C; GOMES, E; DEKKER, R.F.H; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.28, p. 143-160, 2007.

da CUNHA, M. A. A.; CONVERTI, A.; SANTOS, J.C., et al. PVA-Hydrogel Entrapped *Candida Guilliermondii* for Xylitol Production from Sugarcane Hemicellulose Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.157, p. 527-537, 2009.

da CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L. R; SEHNEM, N.T, et al. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v.102, p. 4218-4225, 2011.

de ANDRADE, R.R.; MAUGERI FILHO, F.; MACIEL FILHO, R.; DA COSTA, A.C. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. **Bioresource Technology**, v.130, p.351-359, 2013.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 33, p. 1-18, 2007.

DJUKIC-VUKOVIC, A. P.; MOJOVIC, L. V.; JOKIC, B. M., et al. Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. **Bioresource Technology**, v. 135, p.454-458, 2013.

DODIC, J.M.; VUCUROVIC, D.G.; DODIC, S.N.; GRAHOVAC, J.A.; POPOV, S.D.; NEDELJKOVIC, N.M. Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. **Applied Energy**, v.99, p.192-197, 2012.

DOMINGUES, L; TEIXEIRA, J.A; LIMA, N. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.621-626, 1999.

DOMINGUES, L; LIMA, N; TEIXEIRA, J.A. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. **Biotechnology Bioengineering**, v. 72, p. 507-514, 2001.

dos SANTOS, V. C.; BRAGANCA, C. R. S.; PASSOS, F. J. V., et al. Kinetics of growth and ethanol formation from a mix of glucose/xylose substrate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.103, p.153-161, 2013.

DRAGONE, G.; BRÁNYIK, T.; TEIXEIRA, J.A.; de ALMEIDA-SILVA, J.B. Produção de cerveja pelo processo contínuo. In: FILHO, V.; GASTONI, W. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., p.51-67, 2010.

DRAGONE G.; MUSSATTO S.I.; SILVA, J., et al. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. **Biomass & Bioenergy**, v.35, p.1977-1982, 2011.

ESTAPÉ, D; GÒDIA, F; SOLÀ, F. Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 396-401, 1992.

FACCIOTTI, M.C.R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.A; AQUARONE, E; BORZANI,W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., v. 2, p.223-246, 2001.

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

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

FREY, P.A. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB Journal*, v.10, p. 461–470, 1996.

FUKUDA, H. Immobilized microorganism bioreactor. In: ANSEJO, J.A; MERCHUK, J.C. *Bioreactor system design*. New York: Marcel Dekker, p.339-375, 1994.

GABARDO, S.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z.; MACIEL, F. L. Aproveitamento biotecnológico de soro de queijo para a produção de goma xantana. **Anais do 2º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente**, 8 p., 2010.

GABARDO, S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Determination of Lactose and Ethanol Diffusion Coefficients in Calcium Alginate Gel Spheres: Predicting Values To Be Used in Immobilized Bioreactors. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.56, p.2305-2309, 2011.

GABARDO, S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p.1194-1201, 2012.

GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v.69, 89-96, 2014.

GARBAYO I, VILCHEZ C, VEGA JM, et al. Influence of immobilization parameters on growth and lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus*

bulgaricus co-immobilized in calcium alginate gel beads. **Biotechnology Letters**, v. 26, p.1825-1827, 2004.

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

GHALY, A.E; EL-TAWEL, A.A. Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. **Biomass and Bioenergy**, v. 12, p. 461-472, 1997.

GHORBANI, F.; YOUNESI, H.; SARI, A. E., et al. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Renewable Energy**, v.36, p.503-509, 2011.

GIVRY, S.; PREVOT, V.; DUCHIRON, F. Lactic acid production from hemicellulosic hydrolyzate by cells of *Lactobacillus bifementans* immobilized in Ca-alginate using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 745-752, 2008.

GOSHIMA, T.; TSUJI, M.; INOUE, H., et al. Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass by a Novel *Kluyveromyces marxianus* Strain. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.77, p.1505-1510, 2013.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14 (2), p. 75-107, 1994.

GUIMARÃES, P,M,R; TEIXEIRA, J.A; DOMINGUES, L. Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p.1953-1958, 2008.

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

GUNASEKARAN, P.; KAMINI, N. R. High ethanol productivity from lactose by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.7, p. 551-556, 1991.

GUO, C.; HE, P.; LU,D.; SHEN, A.; JIANG, N. Cloning and molecular characterization of a gene coding D-xylulokinase (CmXYL3) from *Candida maltosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.139-150, 2006.

GUO X., ZHOU J, XIAO D. Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p. 532–538, 2010.

GUPTE, A.M; NAIR, J.S. β -Galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.69, p.855-859, 2010.

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

HAHN-HAGERDAL, B. Comparison between immobilized *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae* coimmobilized with beta-galactosidase, with respect to continuous ethanol-production from concentrated whey permeate. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, p.914-916, 1985.

Instituto CNA. Portal de Inteligência Competitiva do Agro Brasileiro. Painele de Inteligência Competitiva. **Relatório de Inteligência: do bagoço ao posto**, 2013. Disponível em: <<http://www.icna.org.br/sites/default/files/relatorio/RELAT%C3%93RIO%20DO%20AGRO%20NEG%C3%93CIO%20-%20janeiro%20de%202013.pdf>>. Acessado em 03 de fevereiro de 2015.

JAMAI, L.; SENDIDE, K.; ETTAYEBI, K., et al. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Microbiology Letters**, v.204, p.375-379, 2001

JANG, M.F.; CHOU, Y.S. Modeling and optimization of bioethanol production via a simultaneous saccharification and fermentation process using starch. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.88, p.1164-1174, 2013.

JI, H.; YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. Characteristics of an Immobilized Yeast Cell System Using Very High Gravity for the Fermentation of Ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.168, p.21-28, 2012.

JIN, Y. S.; JEFFRIES, T. W. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v.6, p.229–238, 2004.

JUNTER, G; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse. **Biotechnology advances**, v. 22, p. 633-658, 2004.

KAREL, S.F., LIBICKI, S.B., ROBERTSON, C.R. The immobilization of whole cells-engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v. 40, p.1321–1354, 1985.

KARGI F., OZMIHCI S. Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.711-718, 2006.

KARGI, F.; UZUNÇAR, S. Simultaneous hydrogen gas formation and COD removal from cheese whey wastewater by electrohydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p.11656-11665, 2012.

KARGI, F.; EREN, N.S.; OZMIHCI, S. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p.2260-2266, 2012.

KILONZO, P.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. **Bioresource Technology**, v.102, p.3662-3672, 2011.

KIM, H.O; WEE, Y.J; KIM, J.N; YUN, J.S; RYU, H.W. Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus* sp RKY2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 131, p. 694-704, 2006.

KISIELEWSKA, M. Ultrasonic Stimulation of Co-Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells and β -Galactosidase Enzyme for Enhanced Ethanol Production from Whey Ultrafiltration Permeate. **Polish Journal of Environmental Studies**, v.21, p. 387-393, 2012.

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

KOSSEVA, M.R; PANESAR, P.S; KAUR, G; KENNEDY, J. F. Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules** , v.45, p. 437-447, 2009.

KOSSEVA, M. R. Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1089-1118, 2011.

KOSTOV, G.; POPOVA, S.; GOCHEV, V.; KOPRINKOVA-HRISTOVA, P.; ANGELOV, M.; GEORGIEVA, A. modeling of batch alcohol fermentation with free and immobilized yeasts *Saccharomyces cerevisiae* 46 EVD. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.26, p.3021-3030, 2012.

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.

KOURKOUTAS, Y; BEKATOROU, A; BANAT, I.M; MARCHANT, R; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p. 377-397, 2004.

KOUSHKI, M.; JAFARI, M.; AZIZI, M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. **Journal of Food Science and Technology**, v.49, p. 614-619, 2012.

KOUTINAS, A.A.; PAPAPOSTOLOU, H.; DIMITRELLOU, D.; KOPSAHELIS, N.; KATECHAKI, E.; BEKATOROU, A.; BOSNEA, L.A. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. **Bioresource Technology**, v.100, p.3734-3739, 2009.

KUMAR, S; SINGH, S. P; MISHRA, I. M.; ADHIKARI, D. K. Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IPE453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor. **Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels**, v. 2, p.1-6, 2011.

LANE, M. M.; BURKE, N.; KARREMAN, R., et al. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.100, p.507-519, 2011.

LAOPAIBOON, L.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice in repeated-batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on corncob. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.28, p.559-566, 2012.

LEKSAWASDI, N.; JOACHIMSTHAL, E.L.; ROGERS, P.L. Mathematical modelling of ethanol production from glucose/xylose mixtures by recombinant *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.23, p.1087-1093, 2001.

LEWADOWSKA, M. e KUJAWSKI, W. Ethanol production from lactose in a fermentation/pervaporation system. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p.430-437, 2007.

LIU, C.H; WU, J.Y; SHANG, J.S. Diffusion characteristics and controlled release of bacterial fertilizers from modified calcium alginate capsules. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1904–1910, 2008.

LOESER, C.; URIT, T.; BLEY, T. Perspectives for the biotechnological production of ethyl acetate by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p.5397-5415, 2014.

LONGHI, L.S.G.S.; LUVIZETTO, D.B.J.; FERREIRA, L.S.; RECH, R.; AYUB, M.A.Z.; SECCHI, A.R. A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.35-40, 2004.

LUVIZETTO-FACCIN, D.J.; CORREA, M.P.; RECH, R.; AYUB, M.A.Z.; SECCHI, A.R.; CARDOZO, N.S.M. Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.87, p.325-333, 2012.

MAHONEY, K. W.; TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M., et al. Effect of polyethylene glycol tether size and chemistry on the attachment of lactase to polyethylene films. **Journal of Applied Polymer Science**, v.127, p.1203-1210, 2013.

Manual de referência para produtos de soro dos EUA. US Dairy Export Council. São Paulo, 1997.

MAPA/SPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- Secretaria de Produção e Agroenergia. **Produção Brasileira de Etanol**, 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/producao/atualizacao_20_01_2011/Producao_Etanol_Brasil_Total.pdf>. Acessado em 28 de novembro 2013.

MAPA/SPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- Secretaria de Produção e Agroenergia. **Anuário estatístico da Agroenergia**, 2012. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/anuario_agroenergia_web_2012.pdf>. Acessado em 03 de fevereiro de 2015.

MAPA/SPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- Secretaria de Produção e Agroenergia. **Exportações Brasileiras de Etanol**, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/comercio_exterior_brasileiro/etanol/NOVEMBRO_2013/exp_etanol_pais_2013.pdf>. Acessado em 28 de novembro 2013.

MAPA/SPA – Secretaria de Política Agrícola. **Sumário Executivo: Complexo Leite**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 7 p. 2012.

MARWAHA, S. S; KENNEDY, J. F. Ethanol production from whey permeate by immobilized yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 18-22, 1984.

MEHMETOGLU, U. Effective diffusion-coefficient of sucrose in calcium alginate gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, p.124-126, 1990.

MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J., et al. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **Febs Journal**, v. 274, p. 976-989, 2007.

MERICO, A.; GALAFASSI, S.; PISKUR, J., et al. The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p.749-756, 2009.

MONOD, J. The growth of bacterial culture. **Annual Review of Microbiology**, v.3, p.371-394, 1950.

MUSSATTO S. I.; DRAGONE G.; GUIMARAES P.M.R., et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v.28, p.817-830, 2010.

MUSTAFA, I.H.; ELKAMEL, A.; LOHI, A.; IBRAHIM, G.; ELNASHAIE, S.S.E.H. Structured Mathematical Modeling, Bifurcation, and Simulation for the Bioethanol Fermentation Process Using *Zymomonas mobilis*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.53, p.5954-5972, 2014.

NAJAFPOUR G. YOUNESI H., SYAHIDAH K.; ISMAIL, K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v.92, p. 251–260, 2004.

NAJAFPOUR, G. D; KOMEILI, M.; TAJALLIPOUR, M.; ASADI, M. Bioconversion of cheese whey to methane in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 24, p. 111-117, 2010.

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

NIGAM J.; GOGOI B.; BEZBARUAH R. Alcoholic fermentation by agar-immobilized yeast cells. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p.457-459, 1998.

NIGAM, J.N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. **Journal of Biotechnology**, v.80, p.189–193, 2000.

NITSCHKE, M; RODRIGUES, V; SCHINATTO, L.F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. Campestris* C₇L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 82-85, 2001.

NOLAN, A. M.; BARRON, N.; BRADY, D., et al. Ethanol-production at 45-degrees by an alginate-immobilized thermotolerant strain of *Kluyveromyces-marxianus* following growth on glucose-containing media. **Biotechnology Letters**, v.16, p. 849-852, 1994.

NONTHASEN, K.; PIYATHEERAWONG, W.; THANONKEO, P. Efficient entrapment of *Kluyveromyces marxianus* DBKKUY-103 in polyvinyl alcohol hydrogel for ethanol production from sweet sorghum juice. **Turkish Journal of Biology**, v39, p.119-128, 2015.

ODA, Y.; NAKAMURA, K. ; SHINOMIYA, N., et al. Ethanol fermentation of sugar beet thick juice diluted with crude cheese whey by the flex yeast *Kluyveromyces marxianus* KD-15. **Biomass and Bioenergy**, v.34, p.1263-1266, 2010.

OGBONNA, J. C.; LIU, Y. C.; LIU, Y. K., et al. Loofa (*luffa-cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell immobilization. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.78, p.437-442, 1994.

OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. M. R.; DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v.29, p.600-609, 2011.

ORNELAS, A.P; SILVEIRA, W.B; SAMPAIO, F.C; PASSOS, F. M. L. The activity of beta-galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 4, p.1008-1013, 2008.

O'SHEA, D.G.; WALSH, P.K. The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.316-322, 2000.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2978–2984, 2007a.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 169–174, 2007b.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 876-880, 2007c.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. **Biochemical Engineering Journal**, v.42, p. 180-185, 2008.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in packed-column bioreactor: effects on feed sugar concentration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 106-111, 2009.

PANESAR, P.S; KENNEDY, J.F; GANDHI, D.N; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 2, p. 1-14, 2007.

PARK, J. K.; CHANG H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v. 18, p.303-319, 2000.

PARRONDO, J.; GARCIA, L.A.; DIAZ, M. Production of an alcoholic beverage by fermentation of whey permeate with *Kluyveromyces fragilis* I: Primary metabolism. **Journal of the Institute of Brewing**, v.106, p.367-375, 2000.

PESTA, G.; MEYER-PITTROFF, R; RUSS, W. Utilization of Whey. In: **Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry**. Springer Science-Business Media. Nova York, p.193-207, 2007.

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

PHISALAPHONG, M.; BUDIRAHARJO, R.; BANGRAK, P., et al. Alginate-loofa as carrier matrix for ethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.104, p. 214-217, 2007.

PILKINGTON, P.H; MARGARITIS, A; MENSOUR, A. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, p. 237-255, 1998.

PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.A; AQUARONE, E; BORZANI,W. **Biociencia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., v. 2, p. 355-372, 2001.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H.C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resources Conservation and Recycling**, v.50, p. 1-39, 2007.

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

PEREZ-BIBBINS, B.; MANUEL, S. J.; TORRADO, A., et al. Culture parameters affecting xylitol production by *Debaryomyces hansenii* immobilized in alginate beads. **Process Biochemistry**, v.48, p.387-397, 2013.

PERNA, V.; CASTELLO, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C., et al. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p.54-62, 2013.

RAGANATI, F.; OLIVIERI, G.; PROCENTESE, A.; RUSSO, M. E., et al. Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor. **Bioresource Technology**, v.38, p. 259–265, 2013.

RAMCHANDRANA, L.; SANCILOLO, P.; VASILJEVIC, T.; BROOME, M.; POWELL, I.; DUKE, M. Improving cell yield and lactic acid production of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* by a novel submerged membrane fermentation process. **Journal of Membrane Science**, v. 403, p.179-187, 2012.

REBROS, M.; ROSENBERG, M.; STLOUKAL, R., et al. High efficiency ethanol fermentation by entrapment of *Zymomonas mobilis* into LentiKats. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, p. 412–416, 2005.

RECH, R; CASSINI, C.F; SECCHI, A.R; AYUB, M.A.Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of b-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

RECH, R; AYUB, M.A.Z. 2007. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. **Process Biochemistry**, v. 42, p.873–877, 2007.

RIVALDI, J.D; SARROUH, B.F; da SILVA, S.S. An Evaluation of Different Bioreactor Configurations with Immobilized Yeast for Bioethanol Production. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 6, A 115, 2008.

ROBLE, N. D.; OGBONNA, J. C.; TANAKA, H., et al. L-lactic acid production from raw cassava starch in a circulating loop bioreactor with cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*). **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1093-1098, 2003.

ROCHA, S. N.; ABRAHAO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.100, p.619-630, 2011.

RUBIO-TEXEIRA, M. A comparative analysis of the genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces marxianus*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 1115-1128, 2005.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnology Advances**, v.24, p.212–25, 2006.

SANSONETTI, S; CURCIO, S; CALABRO, V; IORIO, G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p.1687–1692, 2009.

SANSONETTI, S.; HOBLEY, T.J.; CALABRO, V.; VILLADSEN, J.; SIN, G. A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: A batch fermentation and kinetic study. **Bioresource Technology**, v.102, p.7513-7520, 2011.

SANSONETTI, S.; HOBLEY, T.J.; CURCIO, S.; VILLADSEN, J.; SIN, G. Use of continuous lactose fermentation for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* for

verification and extension of a biochemically structured model. **Bioresource Technology**, v.130, p.703-709, 2013.

SANTIAGO, P.A; MARQUEZ, L.D.S; CARDOSO, V.L; RIBEIRO, E.J. Estudo da produção da β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kuyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SCHIRMER-MICHEL, A.C.; FLORES, S.H.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.84, 223–228, 2009.

SEAPPA. Secretaria da Agricultura, Agropecuária, Pesca e agronegócio. Seção de Epidemiologia e Estatística. **Comunicação pessoal**, Fev., 2015.

SERP, D; CANTANA, E; HEINZEN, C; STOCKAR, U.V; MARISON, I.W. Characterization of an Encapsulation Device for the Production of Monodisperse Alginate Beads for Cell Immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n.1, p.41-53, 2001.

SILVA, M.F; FORNARI, R.C.G; MAZUTTI, M.A; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F; CICHOSKI, A.J.; CANSIAN, R.L; DI LUCCIO, M; TREICHEL, H. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 119-123, 2009.

SILVA, A., GUIMARES P. M. R., TEIXEIRA J. A., et al. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.973-982, 2010.

SILVEIRA W. B.; PASSOS, F. J.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kuyveromyces marxianus* UFV-3: A flux of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen level. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 141-209, 2005.

SINGH, A.; SHARMA, P.; SARAN, A. K., et al. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. **Renewable Energy**, v.50, p.488-493, 2013.

SIQUEIRA, K. B.; CARNEIRO, A.V.; ALMEIDA, M.F.; SOUZA, R. C. S. N. P. O mercado lácteo brasileiro no contexto mundial. **Circular Técnica Embrapa**, 104. Juiz de Fora, MG. 12 p., 2010.

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

SOARES, R.D.P., SECCHI, A.R. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation. **Computer Aided Process Engineering**, v.14, p.947-952, 2003.

SOUPIONI, M.; GOLFINOPOULOS, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A.A. Study of whey fermentation by kefir immobilized on low cost supports using C-14-labelled lactose. **Bioresource Technology**, v.145, p.326-330, 2013.

STANISZEWSKI, M.; KUJAWSKI, W.; LEWANDOWSKA, M. Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – Kinetic model predictions. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p.618-625, 2007.

STANISZEWSKI, M.; KUJAWSKI, W.; LEWANDOWSKA, M. Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – Kinetic model predictions considering glucose repression. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p.240-249, 2009.

STRAPASSON, A. B.; JOB, L. C. M. A. Etanol, meio ambiente e tecnologia: Reflexões sobre a experiência brasileira. In: **Revista de Política Agrícola**. Secretaria de Política Agrícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, p.51-63, 2006.

SUN, Y.; LI, Y. L.; YANG, H., et al. Characteristics of immobilized *Rhizopus oryzae* in polyurethane foam cubes. **Biotechnology Techniques**, v.10, p.809-814, 1996.

SZAJANI, B; BUZAS, Z; DALLMANN, K, GIMESI, I; KRISCH, J; TÓTH, M. Continuous production of ethanol using yeast cells immobilized in preformed cellulose beads. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p.122-125, 1996.

TALBERT, J. N.; HOTCHKISS, J. H. Chitosan-tethered microspheres for lactase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 78, p.78-84, 2012.

TIMSON, D. J. Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and and Molecular Biology**. In: **Global Science Books**, v.1, p.63-73, 2007.

VELINGS, N.M e MESTDAGH, M.M. Physico-Chemical properties of alginate gel beads. **Polymers gels and Networks**, v. 3, p. 311-330, 1995.

VERBELEN, P.J; SCHUTTER, D.P; DELVAUX, F.P; VERTREPEN, K.J. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1515-1525, 2006.

VIRKAJÄRVI, I. Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast. **Technical Research Centre of Finland**, v.430, 87 p., 2001.

WANG, L.; WU, D.; TANG, P.; FAN, X.; YUAN, Q. Xylitol production from corn cob hydrolysate using polyurethane foam with immobilized *Candida tropicalis*. **Carbohydrate Polymers**, v.90, p.1106-1113, 2012.

WANG, R. L.; LI, L. L.; ZHANG, B., et al. Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of a xylose isomerase pathway. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.40, p.841-854, 2013.

YAN, S.; CHEN, X.; WU, J., et al. Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.94, p.829-838, 2012.

YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. AN novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v.129, p.415–420, 2007.

ZAFAR, S.; MOHAMMAD, O.; MOHAMMED, S.; HUSAIN, S. Batch Kinetics and modeling of ethanolic fermentation of whey. **International Journal of Food Science and Technology**, v.40, p. 597-604, 2005.

ZAFAR, S; OWAIS, M. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. **Biochemistry Engineering**, v. 27, p. 295-298, 2006.

ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BOM, E.P.S., et al. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p.1147-1161, 2000.


ZHANG, W.; FRANCO, C. Characterizing the heterogeneity of an immobilized cell gel matrix. **Engineering in Life Science**, v. 2, p. 409-414, 2002.

ZHOU, H. X.; XU, J. L.; CHI,Z.; LIU,G.L.; CHI, Z.M. β -Galactosidase over-production by a *mig1* mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. **Biochemical Engineering Journal**, v.76, p.17-24, 2013.

ANEXOS

ANEXO I

Laudo do soro de queijo em pó fornecido pela empresa Elegê Laticínios S.A (RS, Brasil).

 BR Foods S/A
Unidade de Ijuí

Certificado de Análise

Identificação do Produto

Descrição do Produto	Soro de Leite em Pó
Marca	Elegê
Lote	221-1
Data de Fabricação	15/10/2011
Data de Validade	10/10/2012

Características Organolépticas

1. Cor:	Levemente Amarelado
2. Sabor/Odor:	Próprios

Características Físico-Químicas do Produto

Análise	Padrão	Resultado Obtido
1. Teor de Gordura (%)	< 3,0	1,12
2. Densidade (g/cm ³)	< 0,720	0,612
3. Acidez (%)	0,02 – 0,10	0,070
4. pH	6,0 – 6,8	6,44
5. Cloretos (%)	< 6,0	2,46
6. Umidade (%)	< 3,0	2,03
7. Insolubilidade (ml/24°C)	< 1,0 ml	< 0,5
8. Partículas Queimadas	A - B	A
9. Lactose (%)	75,0 – 81,0	79,0
10. Proteínas (%)	11,0 – 14,0	12,5
11. Sais Minerais (%)	< 9,0	7,5

Características Microbiológicas do Produto

Análise	Padrão	Resultado Obtido
11. Contagem de Mesófilos (UFC/g)	< 3,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²
12. Coliformes Totais (UFC/g)	< 1,0 x 10 ²	< 1,0 x 10 ²
13. Coliformes 45°C (UFC/g)	< 1,0 x 10 ¹	< 1,0 x 10 ¹
14. Bolores (UFC/g)	< 5,0 x 10 ¹	< 5,0 x 10 ¹
15. Leveduras (UFC/g)	< 5,0 x 10 ¹	< 5,0 x 10 ¹
16. Staphylococcus aureus (UFC/g)	< 1,0 x 10 ²	< 1,0 x 10 ²
17. Salmonella sp	Ausência em 25g	Ausência em 25g
19. Bacillus cereus (UFC/g)	< 5,0 x 10 ²	< 1,0 x 10 ¹
20. Listeria sp	Ausência em 25g	Ausência em 25g

Obs –Soro de leite em pó dentro dos padrões estabelecidos pela BR Foods. O laudo refere-se aos paletes 24 a 29.

Ijuí, 20 de Outubro de 2011.

Leila Sartori
Leila Sartori
Garantia da Qualidade


ANEXO II

Laudo do permeado de soro de queijo em pó fornecido pela empresa Sooro (PR, Brasil).

	CERTIFICADO DE ANÁLISE Laboratório de Controle de Qualidade Concentrado Ind. de Produtos Lácteos Ltda.
---	---

Produto: Permeado de Soro de Leite em Pó	Data: 17/10/11
Cliente: Marco Antonio Zachia Ayub	
AMOSTRA	

PARÂMETROS	ESPECIFICAÇÃO	VALORES ANÁLISE
Lote		05-SP
Quantidade kg		25
Data de fabricação		14/09/11
Validade	01 ano após a data de fabricação	14/09/12
Aspecto	Pó uniforme sem grumos	Característicos, conforme especificação
Cor	Branco a amarelado.	Branco a amarelado, conforme especificação
Sabor/ Odor	Levemente lácteos	Característicos, conforme especificação
Umidade (%)	Máximo 4,0	0,88
Acidez (% ácido láctico)	Máximo 2,0	1,2
Gordura (%)	Máximo 1,5	0,0
pH	6,0 - 6,7	6,32
Cinzas (sais minerais %)	Máximo 6,0	4,92
Proteína (%)	Máximo 3,0	1,77
Lactose (%)	Mínimo 80,0	92,43
Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	Máximo 5×10^4	$4,2 \times 10^4$
St. Aureus coagulase positivo (UFC/g)	Máximo 100	$<1,0 \times 10^2$
Coliformes totais (UFC/g)	Máximo 100	$2,0 \times 10^1$
Coliformes fecais (UFC/g)	Máximo 10	$<1,0 \times 10^1$
Bolores e leveduras (UFC/g)	Máximo 50	$<1,0 \times 10^1$
Salmonela (valor garantido)	Ausência	Ausente


 Ana Claudia Waclawik
 Garantia da Qualidade

APÊNDICES

Este apêndice compreende os resultados não apresentados nos manuscritos, abordando a parte experimental preliminar necessária para a condução e otimização dos processos em biorreatores. Parte de um destes trabalhos coincide com alguns resultados apresentados no primeiro artigo (Capítulo III), contudo, informações adicionais e que não constaram no mesmo são aqui descritas e discutidas. O primeiro trabalho avalia a influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre o perfil da cinética de crescimento celular, produção de etanol e consumo de lactose em cultura de células livres de *K. marxianus* CCT 4086 em meio de permeado de soro de queijo. Neste primeiro trabalho, a cinética de crescimento celular foi apresentada e discutida, assim como os gráficos contendo o perfil da cinética foram abordados. O segundo trabalho compara a bioconversão de lactose presente no soro e no permeado de soro de queijo em etanol através de *K. marxianus* CCT 4086 imobilizada em alginato de cálcio em biorreatores de leito fluidizado operado em batelada, apresentando o perfil de cinética de consumo de lactose e produção de etanol para cada um dos meios testados. O terceiro e quarto trabalho tem por finalidade comparar a cinética de produção de etanol e consumo de glicose e galactose a partir de células livres de *Saccharomyces cerevisiae*, CAT-1 e PE-2, crescidas em soro e em permeado de soro de queijo previamente hidrolisados com β -galactosidase, em agitador rotacional. Estes trabalhos serviram como etapa preliminar para a posterior condução em biorreatores de células imobilizadas.

Todos estes trabalhos compõem a modalidade de artigos completos publicados em Anais de congresso. Os trabalhos intitulados “Bioconversão de permeado de soro de queijo a etanol” e “Produção de etanol a partir de permeado e de soro de queijo em biorreatores imobilizados” foram publicados nos Anais do **7º Congresso Internacional de Bioenergia** em novembro de 2012, sendo o primeiro apresentado na forma de pôster, e o segundo, na forma de apresentação oral.

Os trabalhos intitulados “Bioconversão de permeado de soro de queijo a etanol por *Saccharomyces cerevisiae*” e “Aproveitamento biotecnológico de soro e permeado de soro de queijo para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*” foram publicados nos Anais do **XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, e do **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ)**, nos anos de 2013 e 2014, respectivamente. Ambos os trabalhos foram apresentados na forma de pôster.

APÊNDICE A

BIOCONVERSÃO DE PERMEADO DE SORO DE QUEIJO A ETANOL

Bioconversão de permeado de soro de queijo a etanol

Sabrina Gabardo¹, Rosane Rech², Marco Antônio Záchia Ayub³

¹Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, MSc., sabrinagabardo@gmail.com, ² Engenheira Química, Dr^a, rrech@ufrgs.br, ³ Engenheiro Químico, PhD, mazayub@ufrgs.br

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos-UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.:51 3308 6685; fax:51 3308 7048.

RESUMO

A tecnologia de processos fermentativos associada à preocupação ambiental tem incentivado pesquisas a desenvolver novas estratégias de geração de energia. A utilização de substratos alternativos na produção de biocombustíveis, especialmente o etanol, tem sido significativa nos últimos anos em decorrência da redução dos custos de produção associada a sua utilização. O permeado de soro de queijo, um subproduto industrial, constitui-se como um substrato rico em nutrientes e de grande potencial para a produção de etanol. Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo produzir etanol utilizando permeado de soro de queijo por meio da linhagem *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, testando diferentes condições de suplementação e comparar a capacidade de bioconversão nos distintos meios de cultivo. As condições de cultivo em estufa orbital agitada ocorreram a uma temperatura de 30 °C por um período de 48 h, a uma velocidade de agitação de 150 rpm. A eficiência de conversão variou entre 91 % e 95 % e a produtividade volumétrica variou entre 1,02 g L⁻¹ h⁻¹ e 1,15 g L⁻¹ h⁻¹ para os três meios testados, sendo a maior concentração de etanol de 27,5 g L⁻¹.

Palavras Chave: Etanol, Permeado de soro de queijo, Subprodutos industriais.

ABSTRACT

BIOCONVERSION OF CHEESE WHEY PERMEATE INTO ETHANOL

Ethanol fermentation processes associated with the environmental concern has stimulated research to develop new strategies for energy generation. The utilization of alternative substrates for the production of biofuels, particularly ethanol, has been significant in recent years due to the reduction of production costs associated with its use. Cheese whey permeate is an industrial by-product, which is a rich substrate in nutrients and good potential for the production of ethanol. In this context, the aim of this work was to produce ethanol by bioconversion of lactose present in permeate whey medium by *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, testing different conditions of supplementation and compare yields obtained by different medium. Shaker flask cultivation conditions for the production of ethanol tested were 30 °C, at a speed of agitation of 150 rpm for 48 hours cultures. The conversion efficiency varied between 91 % and 95 %, and the volumetric productivity varied between 1.02 g L⁻¹ h⁻¹ and 1.13 g L⁻¹ h⁻¹ for the three medium, with highest concentration of ethanol of 27.5 g L⁻¹.

Keywords: *Ethanol, Cheese whey permeate, Industrial by-products.*

1 Introdução

O processo fermentativo de obtenção de etanol vem sendo amplamente discutido pela comunidade científica, especialmente em relação a tecnologias de processo e sustentabilidade (SANSONETTI et al., 2011). O aproveitamento de subprodutos industriais, considerados como resíduos, para a produção de etanol tem sido significativo nos últimos anos devido ao mercado crescente e a potencial redução dos custos de produção associada a sua utilização. O emprego desses substratos na produção de etanol proporciona diversas vantagens visto que, além da matéria-prima ser menos onerosa, oferece simultaneamente à sua produção, o tratamento desse resíduo, com redução de seu impacto ambiental (GABARDO et al., 2012).

Resíduos de biomassa, tais como aqueles compostos de materiais lignocelulósicos, tem sido bastante estudados para a produção de etanol. Contudo estes materiais devem passar por tratamentos prévios antes de sua devida utilização, visto que o processo requer a separação da lignina-celulose e hidrólise da celulose para a posterior liberação de açúcares fermentescíveis (KARGI e OZMIHCI, 2006). A utilização de permeado de soro de queijo, um subproduto

industrial, além de não requerer tratamentos prévios, auxilia na produção de etanol e pode, ainda, solucionar um problema grave de geração de subprodutos das indústrias de laticínios.

O soro de queijo se caracteriza por ser rico em nutrientes, contendo apreciáveis quantidades de lactose (45-50 g L⁻¹), proteínas (6-8 g L⁻¹), e sais minerais (8-10 % do extrato seco). Processos que valorizam o soro de queijo estão sendo constantemente realizados, entre os quais, a recuperação das proteínas através do processo de separação por ultrafiltração, o qual gera grandes volumes remanescentes de lactose, também denominado de permeado. Este produto (permeado), assim como o soro de queijo, continua sendo um poluente importante visto que retém mais de 70 % dos sólidos totais presentes no soro de queijo, sendo o grande responsável pela carga poluente do soro. Dessa forma, o permeado apresenta problemas de disposição, tanto em termos de volume produzidos como de carga orgânica aproximadamente igual ao do soro de queijo (SISO, 1996; DOMINGUES et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2010). Caracterizado por elevados valores de demanda bioquímica de oxigênio (30-50 g L⁻¹), o soro de queijo apresenta potencial poluidor aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico. Em média, para a fabricação de 1 kg de queijo necessita-se de 10 L de leite, recuperando-se 9 L de soro (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010).

A produção mundial anual de soro de queijo é estimada em 100 milhões de toneladas, sendo que o Brasil contribui em aproximadamente 6 % para essa geração (GUIMARÃES et al., 2010; MAPA/SPA, 2010). Somente o estado do Rio Grande do Sul contribuiu, entre os anos de 2009 e 2010, em 5 % da produção brasileira de soro (SEAPPA, 2010). Sendo a quantidade de lactose disponível no mundo para a produção de etanol maior que 4 milhões de toneladas por ano, é sugestivo o grande potencial de aproveitamento desta fonte de carbono alternativa para a condução de bioprocessos, como por exemplo, a produção do etanol, representando baixos custos para a obtenção do produto final e garantindo um processo mais sustentável.

A substituição de compostos tradicionalmente utilizados como fontes de carbono por substratos menos onerosos, tais como o permeado de soro de queijo, pode constituir-se em uma alternativa interessante visando reduzir custos para obtenção do produto final e contribuir para a minimização dos impactos ambientais. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo produzir etanol através do permeado de soro de queijo por meio da linhagem *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, testando diferentes condições de suplementação do meio de fermentação e comparar a capacidade de bioconversão nos distintos meios.

2 Materiais e métodos

2.1 Permeado de soro de queijo

O permeado de soro de queijo em pó foi fornecido pela Sooro (PR, Brasil). Para sua preservação, o permeado foi estocado em freezer a -16 °C.

2.2 Microrganismo

Para a realização dos experimentos foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, adquirida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (SP, Brasil).

2.3 Manutenção e renovação das culturas microbianas

A linhagem foi mantida em placas de Petri contendo meio nutritivo YEP-Lactose, composto de extrato de levedura (10 g L⁻¹), peptona bacteriológica (20 g L⁻¹), lactose (20 g L⁻¹), e ágar (20 g L⁻¹), pH ajustado para 7,0 com solução de NaOH 0,1 M. Previamente a sua utilização, o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. A linhagem foi plaqueada em meio YEP-Lactose, e incubada em estufa a 30 °C por 24 h para o crescimento celular e, posteriormente armazenada a 4 °C. A cada 30 dias as culturas foram renovadas via repique.

2.4 Preparo do pré- inóculo

Uma colônia isolada foi transferida assepticamente para 50 mL de meio YEP-Lactose líquido estéril em frascos Erlenmeyer de 250 mL. A linhagem foi incubada em agitador rotacional N711[®] (Nova Técnica Equipamentos para Laboratório, SP, Brasil), e mantida sob agitação orbital de 180 rpm, a uma temperatura de 30 °C (\pm 0,2 °C), por 12 h. Em seguida, os inóculos foram preparados através da padronização da concentração celular para densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) igual a 1.

2.5 Fermentação em frascos agitados

O cultivo foi conduzido em frascos cônicos de 250 mL contendo 144 mL de meio de fermentação esterilizado (121°C por 15 min), pH 7,0. Em seguida, 16 mL de inóculo foram adicionados ao meio, totalizando um volume de fermentação de 160 mL. Três meios de cultivo foram testados: permeado de soro de queijo (60 g L⁻¹); permeado de soro de queijo (60 g L⁻¹) suplementado com extrato de levedura bruto (3 g L⁻¹) e; permeado de soro de queijo (60 g L⁻¹) suplementado com extrato de levedura bruto (3 g L⁻¹) e peptona bacteriológica (5 g L⁻¹). Os Erlenmeyers contendo as culturas foram incubados em agitador orbital modelo N711[®], a uma temperatura de 30 ° C (± 0,2 °C), sob agitação de 150 rpm por 48 h.

2.6 Métodos analíticos

Amostras de 3 mL do meio fermentativo foram coletadas em 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h e 48 h de cultivo para determinação da concentração de lactose, etanol e biomassa. O preparo das amostras foi realizado através da centrifugação a 3000 × g por 15 min, 4 °C (Brinkmann Instruments Inc., Eppendorf Bench Centrifuge, modelo 5410, Alemanha) para separar as células do meio de cultivo e o sobrenadante foi analisado. A concentração de lactose e etanol foi analisada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu) utilizando detector de índice de refração (IR) e coluna Bio-Rad Aminex HPX 87H, a 45 °C, utilizando solução 0,005 M de ácido sulfúrico (H₂SO₄) como fase móvel e fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e 20 µL de volume de amostra. A concentração celular foi determinada através da medição da absorbância em 600 nm e correlacionada ao peso seco (g L⁻¹) por meio de curva de calibração.

3 Resultados e discussão

A capacidade de bioconversão da lactose, açúcar presente no permeado de soro de queijo, em etanol a pela linhagem *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 foi verificada para os três meios de fermentação testados. A maior parte das espécies de *Kluyveromyces* se caracteriza pela capacidade de utilizar a lactose como fonte de energia, metabolizando-a na forma dos monossacarídeos glicose e galactose, através da via glicolítica (Embden–Meyerhof–Parnas). Contudo, antes de participar dessa rota metabólica, a galactose é convertida no intermediário glicolítico glicose-6-fosfato através da via Leloir, pela ação de

três de enzimas (galactoquinase, galactose-1-P uridiltransferase e UDP-galactose 4-epimerase) (FREY, 1996; RUBIO-TEIXEIRA, 2006; FONSECA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010).

A cinética de consumo de lactose, produção de etanol e biomassa para os três meios de fermentação estudados pode ser observada na Figura 1. Verifica-se que a lactose foi praticamente consumida em sua totalidade nas primeiras 12 h de cultivo para os meios contendo suplementação de extrato de levedura bruto e para meio o suplementado com extrato de levedura bruto e peptona. Para o meio composto por apenas permeado de soro de queijo, o açúcar foi totalmente consumido em 24 h de fermentação. Em relação à biomassa, a concentração foi menor para o meio sem suplementação, isto é, composto apenas por permeado de soro de queijo. Uma explicação para este acontecimento deve-se ao fato de que o extrato de levedura e a peptona servem como uma mistura complexa de nutrientes, composta por fontes de nitrogênio, vitaminas, sais, entre outros, contendo todos os constituintes celulares necessários para o crescimento celular (PARRONDO et al., 2009). Em relação à concentração de etanol, pode-se observar que esta foi máxima em 24 h para os três meios de fermentação testados e bastante similar (27,3 g L⁻¹ em permeado de soro; 27,5 g L⁻¹ em permeado de soro suplementado com extrato de levedura e 24,2 g L⁻¹ em permeado de soro suplementado com extrato de levedura e peptona). Muito embora a composição do meio a base de permeado de soro seja composta por menor quantidade de proteína, assim como de outros nutrientes quando comparado aos outros dois meios de fermentação, isto revela a capacidade que a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 apresenta em converter a lactose a etanol em meios pouco ricos de nutrientes. Paralelamente com este trabalho, outros estudos constataram este fato. Sansonetti e seus colaboradores (2009) compararam a produção de etanol a partir de soro de queijo, permeado de soro de queijo e soro de queijo de ricota, sendo estes dois últimos caracterizados por pouca quantidade de proteína, em incubadora rotacional a 150 rpm, 37 °C por 18 h. Os autores verificaram que o meio a base de soro de queijo de ricota apresentou melhor desempenho na produção de etanol frente aos outros dois meios testados, sendo que em 13 h de cultivo o açúcar foi consumido em sua totalidade, com produção de 23,0 g L⁻¹, atingindo uma eficiência de conversão de 97 %. Marwaha e Kennedy (1984) testaram a bioconversão de lactose presente no permeado de soro de queijo a etanol a partir de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 179 crescida a 30 °C, a uma velocidade de agitação de 200 rpm por 24 h a partir de meio contendo 50 g L⁻¹ de lactose, e obtiveram 20,9 g L⁻¹ de etanol, sugerindo a utilização de permeado de soro sem suplementação como bastante promissora.

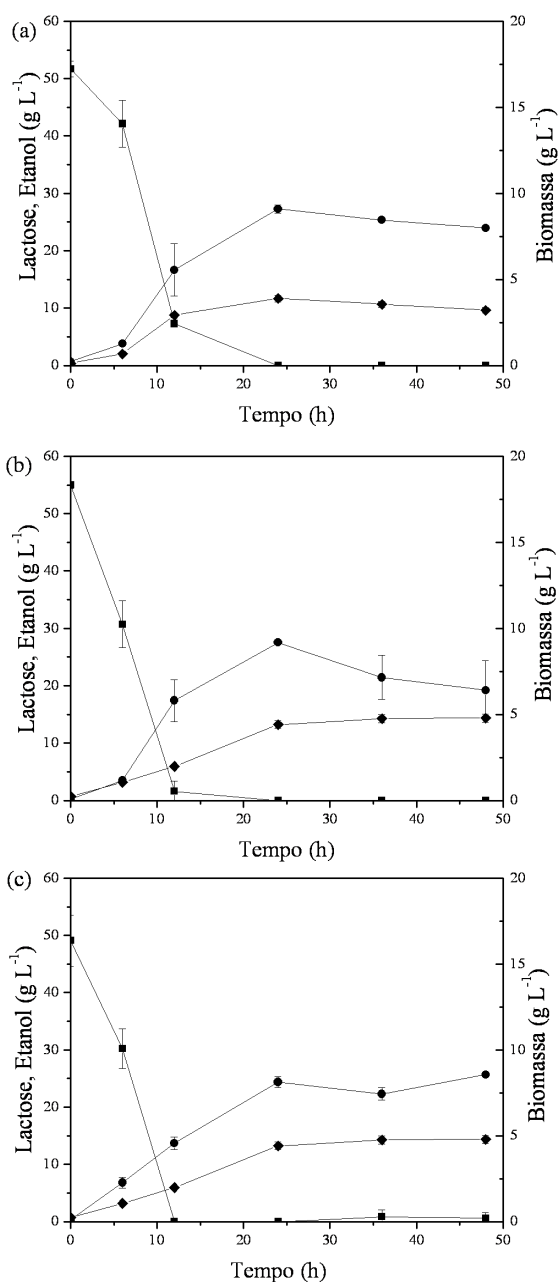


Figura 1. Cinética do consumo de lactose, produção de etanol e biomassa por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 crescida nos distintos meios de cultivo: permeado de soro de queijo (a); permeado de soro de queijo suplementado com extrato de levedura bruto (b); permeado de soro de queijo suplementado com extrato de levedura bruto e peptona (c). Lactose (■), etanol (●), biomassa (◆).

Acrescido a isso, neste trabalho a utilização de permeado de soro para a produção de etanol atingiu altos valores do fator de conversão de lactose a etanol ($0,51 \text{ g g}^{-1}$), correspondendo a 95 % da conversão teórica, assim como altos valores de produtividade volumétrica de etanol (Q_P) foram encontrados, variando de $1,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a $1,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$

(Tabela 1). Além disso, não foi evidenciada diferença significativa na produção de etanol para os distintos meios estudados, a um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). Estes valores são superiores aos encontrados por Banat e Marchant (1995), os quais obtiveram uma eficiência de conversão de 83 % ao testar a produção de etanol a partir de permeado de soro utilizando *Kluyveromyces marxianus* IBM2, uma levedura termotolerante, crescida a 45 °C, 200 rpm por 48 h de cultivo. Valores do fator de conversão similares a este trabalho foram encontrados por Silveira et al. (2005) ao estudar a bioconversão da lactose presente no permeado de soro a etanol por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 sob condições de anoxia e hipoxia, obtendo valores de 0,52 g g⁻¹ e 0,51 g g⁻¹, respectivamente.

Tabela 1. Fator de conversão de lactose a etanol ($Y_{P/S}$), eficiência de conversão (η) e produtividade volumétrica de etanol (Q_P) obtidos nos 3 meios de fermentação testados.

Meio de fermentação	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	Eficiência de conversão (%)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
P ^a	0,51	95	1,14
PE ^b	0,50	93	1,15
PEP ^c	0,49	91	1,02

^a Permeado de soro (P)

^b Permeado de soro suplementado com extrato de levedura bruto (PE)

^c Permeado de soro suplementado com extrato de levedura bruto e peptona (PEP)

No presente trabalho, fica evidenciado o potencial de aproveitamento do permeado de soro de queijo neste bioprocessos. A linhagem *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 apresentou boa capacidade de bioconversão de lactose a etanol, para os três diferentes meios de cultivo testados, atingindo uma eficiência de conversão com valores próximos à conversão teórica, assim como altas produtividades volumétricas foram observadas. A utilização do permeado de soro, como fonte alternativa de carbono para a produção de etanol, consiste em uma proposta bastante interessante em se tratando de questões técnicas, econômicas e ambientais. O aproveitamento do permeado de soro de queijo em processos fermentativos, pode minimizar o seu potencial poluidor, além de tornar a produção de etanol um processo menos oneroso, deixando este processo potencialmente competitivo economicamente. Altos valores de fator de conversão de lactose a etanol ($Y_{P/S}$) foram encontrados, para os três meios de cultivo testados, chegando a 95 % do valor teórico de conversão, assim como altos valores de produtividade volumétrica (Q_P) foram observados.

Referências

BANAT IM, MARCHANT R. Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.11, p. 304–306, 1995.

DOMINGUES, L; LIMA, N; TEIXEIRA, J.A. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. **Biotechnology Bioengineering**, v. 72, p. 507-514, 2001.

FREY, P.A. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB Journal*, v.10, p. 461–470, 1996.

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

GABARDO, S; RECH, R; AYUB, M.A.Z. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 87, p. 1194-1201, 2012.

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

KARGI, F; OZMIHCI, S. Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 711-718, 2006.

MAPA/SPA – Secretaria de Política Agrícola. **Sumário Executivo: Complexo Leite**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 7 p. 2010.

MARWAHA, S.S; KENNEDY, J.F. Ethanol production from whey permeate by immobilized yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 18-22, 1984

PARRONDO, J; GARCÍA, L.A; DÍAZ, M. Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.26, p. 445-456, 2009.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnology Advances**, v.24, p.212–25, 2006.

SILVEIRA W. B.; PASSOS, F. J.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen level. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 141-209, 2005.

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

SANSONETTI, S; CURCIO, S; CALABRO, V; IORIO, G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p.1687–1692, 2009.

SANSONETTI, S; HOBLEY, T.J; CALABRO, V; VILLADSEN, J; SIN, G. A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: A batch fermentation and kinetic study. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7513-7520, 2011.

APÊNDICE B

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE PERMEADO E DE SORO DE QUEIJO EM BIORREATORES IMOBILIZADOS

Produção de etanol a partir de permeado e de soro de queijo em biorreatores imobilizados

Sabrina Gabardo¹, Gabriela Feix Pereira², Rosane Rech³, Marco Antônio Záchia Ayub⁴

¹Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, MSc., sabrinagabardo@gmail.com, ²Graduanda em Biotecnologia, gabi.feix@hotmail.com, ³Engenheira Química, Dr^a, rrech@ufrgs.br, ⁴Engenheiro Químico, PhD, mazayub@ufrgs.br

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos-UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.:51 3308 6685; fax:51 3308 7048.

RESUMO

O desenvolvimento de pesquisas para a produção de biocombustíveis alternativos tem sido bastante significativo nos últimos anos, sendo o etanol uma opção viável entre as fontes não convencionais de energia. A utilização de substratos alternativos e de baixo custo para a produção de etanol vem sendo recentemente estudada com resultados promissores. O permeado de soro de queijo e o soro de queijo constituem-se como resíduos de baixo valor agregado e potencialmente poluentes. Entretanto, são substratos ricos em nutrientes e de grande potencial para bioprocessos. Diante da necessidade de melhorias em processos fermentativos, a tecnologia de imobilização celular pode contribuir positivamente para bioprocessos mais eficazes e vantajosos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a bioconversão do permeado e do soro de queijo em etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, imobilizada em alginato de cálcio em biorreatores de leite fluidizado. Os cultivos foram realizados a 30 °C durante 24 h. A eficiência de conversão variou entre 87 % e 89 % e a produtividade volumétrica variou entre 2,33 g L⁻¹ h⁻¹ a 2,49 g L⁻¹ h⁻¹, sendo a maior concentração de etanol de 28,0 g L⁻¹.

Palavras Chave: Etanol, Biorreator imobilizado, Subprodutos industriais.

ABSTRACT

*ETHANOL PRODUCTION BY PERMEATE AND CHEESE WHEY IN IMMOBILIZED
BIOREACTORS*

The development of research for alternative biofuels production has been quite significant in recent years, with ethanol being a feasible option among unconventional sources of energy. The utilization of alternative, low cost substrates for the production of ethanol has been recently studied with promising results. Cheese whey permeate and cheese whey are low added-value, which are potentially pollutants. However, they are substrate rich in nutrients and great potential for use in bioprocesses. The need for improvements in fermentation processes and cell immobilization technology can positively contribute to more effective and advantageous bioprocesses. In this context, the aim of this work was to evaluate and compare the bioconversion of permeate and cheese whey into ethanol by *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, immobilized in calcium alginate in fluidized bed bioreactors. The cultivations were conducted at 30 °C for 24 h. The conversion efficiency varied between 87 % and 89 %, and the volumetric productivity varied between 2.33 g L⁻¹ h⁻¹ and 2.49 g L⁻¹ h⁻¹, with highest concentration of ethanol of 28.0 g L⁻¹.

Keywords: *Ethanol, Immobilized bioreactor, Industrial by-products.*

1 Introdução

O desenvolvimento de novos processos fermentativos tem sido impulsionado pela diversidade e versatilidade de microrganismos, aliadas ao aproveitamento de diferentes substratos e tecnologias (MAZID, 1993). Diversas pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de desenvolver tecnologias alternativas de geração de energia com a finalidade de reduzir a dependência das fontes fósseis e conseqüentemente à minimização de danos ambientais (CANACKI e SANLI, 2008). O aproveitamento de subprodutos industriais, considerados como resíduos, para a produção de etanol tem sido significativo nos últimos anos devido ao mercado crescente e a potencial redução dos custos de produção associada a sua utilização. O emprego desses substratos na produção de etanol proporciona diversas vantagens visto que além da matéria-prima ser menos onerosa, oferece simultaneamente à sua produção, o tratamento desse resíduo, com redução de seu impacto ambiental.

Com a perspectiva de crescimento da demanda de álcool combustível, tecnologias capazes de melhorar o desempenho do processo ganham importância fundamental no Brasil e no mundo (BRITO, 2003). A produção mundial de etanol foi de aproximadamente 65 bilhões de litros no ano de 2008, sendo o continente Americano responsável pela maior parte dessa produção. Somente o Brasil é responsável pela produção de aproximadamente 17,8 bilhões desse total (DEMIRBAS, 2007; GUIMARÃES et al., 2010). O emprego de substratos alternativos de baixo custo, tais como o permeado e o soro de queijo, além de auxiliar na produção de etanol, pode, ainda, minimizar problemas ambientais através de seu aproveitamento em um novo processo produtivo, um dos atuais pilares da sustentabilidade.

O soro de queijo representa o principal e mais problemático subproduto das indústrias de laticínios em decorrência de sua elevada carga orgânica e grande volume gerado. Caracterizado por elevados valores de demanda bioquímica de oxigênio (30-50 g L⁻¹), o soro de queijo apresenta potencial poluidor aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010). Processos que valorizam o soro de queijo estão sendo constantemente realizados, entre os quais, a recuperação das proteínas através do processo de separação por ultrafiltração, o qual gera grandes volumes remanescentes de lactose, também denominado de permeado. Este produto (permeado), assim como o soro de queijo, continua sendo um poluente importante visto que retém mais de 70 % dos sólidos totais presentes no soro de queijo, sendo o grande responsável pela carga poluente do soro. Dessa forma, o permeado apresenta problemas de disposição, tanto em termos de volume produzidos como de carga orgânica aproximadamente igual ao do soro de queijo (SISO, 1996; DOMINGUES et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2010).

O aproveitamento do permeado e do soro de queijo em novos processos produtivos ainda não é uma realidade mundial, muito embora a abordagem destes como um resíduo industrial venha sendo oportunamente abandonada (GABARDO et al., 2012). Estes subprodutos apresentam um grande potencial de aproveitamento, e, além disso, no Brasil, estes podem ser obtidos a um baixo custo, fato que estimula a utilização em diversos bioprocessos, tais como aqueles que remetem a conversão da lactose para a produção de metabólitos de interesse, como o etanol. (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010).

Nesse sentido, a substituição de compostos tradicionalmente utilizados como fontes de carbono por substratos menos onerosos, tais como o permeado e o soro de queijo, pode constituir-se em uma alternativa interessante visando reduzir custos para obtenção do produto final e contribuir para a minimização dos impactos ambientais. Diante da necessidade de aperfeiçoamentos na condução de bioprocessos, o emprego de técnicas de imobilização

celular pode contribuir significativamente e positivamente para o desenvolvimento de processos mais eficazes e bastante vantajosos.

A tecnologia de imobilização celular tem sido amplamente estudada e difundida nas últimas décadas, favorecendo numerosos processos biotecnológicos devido às vantagens que estes sistemas proporcionam, como, por exemplo, o aumento da produtividade, diminuição do tempo de fermentação e redução dos riscos de contaminação, além de possibilitar projetos de biorreator com menor escala, reduzindo, portanto, os custos de processo (KOURKOUTAS et al., 2004; GABARDO et al., 2012). Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo o aproveitamento do permeado e do soro de queijo, como substratos alternativos para a bioconversão da lactose em um produto de alto valor agregado e de grande importância comercial mundial, o etanol, a baixos custos de produção, aliando para tanto, as vantagens da técnica de imobilização celular em biorreatores de leito fluidizado operados em regime batelada.

2 Materiais e métodos

2.1 Permeado e soro de queijo

O permeado de soro de queijo em pó foi fornecido pela Sooro (PR, Brasil) e o soro de queijo em pó fornecido pela Elegê Laticínios S.A. (RS, Brasil). Para sua preservação, ambos permaneceram estocados em freezer a -16 °C.

2.2 Microrganismo

Para a realização dos experimentos foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, adquirida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (SP, Brasil).

2.3 Pré-inóculo e preparo da suspensão celular

Uma colônia isolada foi transferida assepticamente para 800 mL de meio YEP-Lactose (extrato de levedura, 10 g L⁻¹; peptona bacteriológica, 20 g L⁻¹ e lactose, 20 g L⁻¹, pH 7,0) em frascos Erlenmeyer de 2 L, e posteriormente, incubada em agitador rotacional N711[®] (Nova

Técnica Equipamentos para Laboratório, SP, Brasil), sob agitação orbital de 180 rpm, a uma temperatura de 30 °C ($\pm 0,2$ °C), por 15 h. Após o período de crescimento exponencial, os meios de cultivo foram recolhidos e centrifugados a $3000 \times g$ (Hitachi Himac CR21E[®], Hitachi, Tóquio, Japão) por 15 min a 30 °C. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes com água destilada estéril, novamente centrifugadas ($3000 \times g$ por 15 min a 30 °C), e ressuspendidas pela adição de 10 mL de água destilada estéril a 4 °C.

2.4 Técnica de Imobilização celular

A imobilização das células foi realizada de acordo com metodologia modificada de Kierstan et al. (1977). A suspensão celular prontamente preparada foi misturada em uma solução de alginato de sódio 40 g L^{-1} , previamente preparada e esterilizada a 121 °C por 15 min. Após este procedimento, a mistura composta da suspensão celular e do alginato de sódio foi adicionada por gotejamento, através de uma bomba peristáltica, em uma solução estéril de cloreto de cálcio 0,1 M, mantida a 35 °C. Em seguida à formação das esferas (3,8 mm de diâmetro), estas foram recolhidas e lavadas novamente por três vezes com água destilada estéril a 4 °C. Para a estabilização do sistema, as esferas permaneceram em banho-maria a 35 °C por 30 min sob agitação branda. A concentração de células imobilizadas foi de 0,02 g de células (peso seco) para cada 1 mL de solução de alginato utilizado.

2.5 Cultivos em biorreator com células imobilizadas

O experimento foi realizado empregando permeado (60 g L^{-1}) e soro de queijo (70 g L^{-1}), pH 7,0, como meios de fermentação. Para evitar a precipitação das proteínas durante o processo de esterilização (121 °C, 15 min), o soro de queijo foi previamente hidrolisado com uma protease comercial (alcalase 2.4L, Novozymes, PR, Brasil) a uma temperatura de 55 °C, pH 8,5 por 3 h.

A fermentação em batelada foi realizada utilizando biorreator de coluna de vidro revestido por uma camisa de água para possibilitar a manutenção da temperatura (Figura 1). O biorreator foi preenchido com 85 mL de esferas de alginato de cálcio, e por 250 mL de meio de fermentação. Os sistemas foram acondicionados em banho-maria para a manutenção da temperatura a 30 °C durante 24 h de cultivo. A fluidização do sistema foi realizada através de uma bomba peristáltica com uma vazão volumétrica de 250 mL min^{-1} .

2.6 Métodos analíticos

As concentrações de lactose e etanol foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu) utilizando detector de índice de refração (IR) e coluna Bio-Rad Aminex HPX 87H, a 45 °C, utilizando solução de ácido sulfúrico 0,005 M (H₂SO₄) como fase móvel na vazão de 0,6 mL min⁻¹, e 20 µL de volume de amostra. A concentração celular foi determinada através da medição da absorvância em 600 nm e correlacionada ao peso seco (g L⁻¹) por meio de curva de calibração.

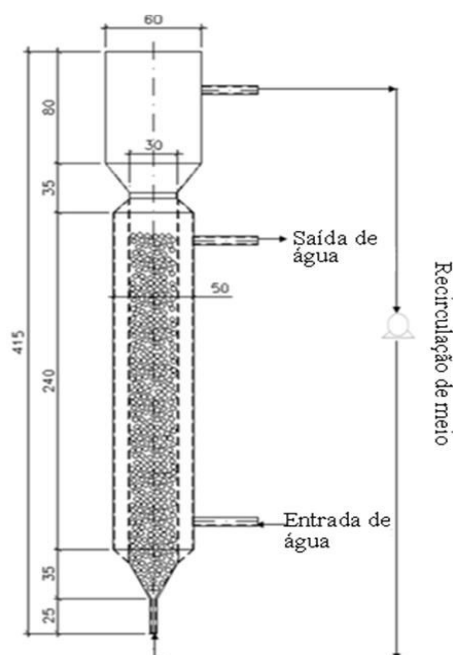


Figura 1. Representação esquemática do biorreator de coluna de leito fluidizado operado em regime batelada.

3 Resultados e discussão

Este experimento foi realizado para determinar a bioconversão de lactose presente no permeado e em soro de queijo a etanol em biorreatores de leito fluidizado com *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 imobilizada em alginato de cálcio 4 %, em regime de operação batelada. O perfil de consumo de lactose e produção de etanol em permeado e em soro de queijo nestes biorreatores imobilizados pode ser observado na Figura 2. A lactose foi praticamente consumida em 8 h de cultivo em meio de soro de queijo, enquanto que em meio de permeado de soro esta foi consumida em sua totalidade em 10 h. Contudo, em relação à

produção de etanol, esta foi maior para o meio em permeado de soro, com uma concentração de máxima de $28,0 \text{ g L}^{-1}$ em 12 h de cultivo, enquanto em meio de soro de queijo, esta foi de $20,4 \text{ g L}^{-1}$ para o mesmo tempo de fermentação. Embora a lactose tenha sido assimilada mais rapidamente em meio soro de queijo do que em permeado de soro, a produção de etanol foi menor em soro de queijo. Uma explicação para este acontecimento se deve ao fato do meio de soro de queijo ser mais rico em nutrientes, favorecendo primeiramente o crescimento celular e a metabolização do açúcar (PARRONDO et al., 2009). A conversão de lactose a etanol da levedura *K. marxianus* CCT 4086 tanto nos meios permeado de soro quanto em soro de queijo foi bastante similar, $0,48 \text{ g g}^{-1}$ e $0,47 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente, o que representa uma eficiência de conversão (η) de 89 % e 87 %, respectivamente (Tabela 1). Em relação à produtividade volumétrica (Q_p) obtida no presente trabalho, esta também foi semelhante para os dois meios de cultivo testados, chegando a $2,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em permeado de soro e $2,49 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em soro de queijo. Neste sentido, fica evidenciado o potencial de aproveitamento do permeado de soro de queijo neste bioprocesso, visto que a levedura apresentou capacidade metabólica em converter a lactose em etanol a partir de um meio não tão rico em nutrientes.

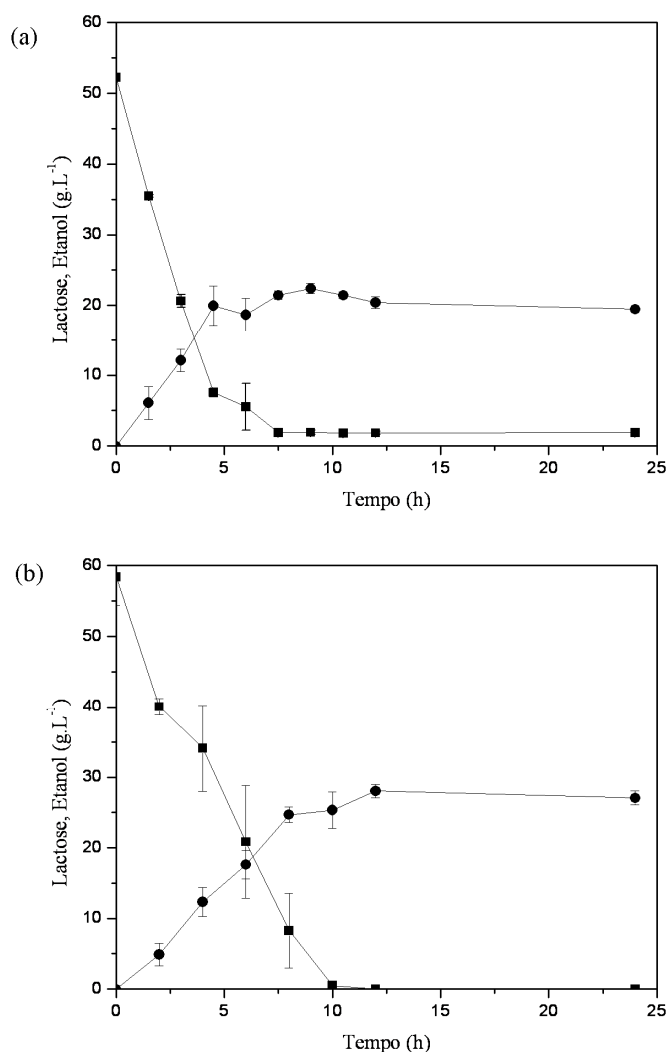


Figura 2. Cinética do consumo de lactose e produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 imobilizada, a 30 °C, em biorreator de leito fluidizado em meio soro de queijo (a) e meio permeado de soro de queijo (b). Lactose (■), etanol (●).

Tabela 1. Fator de conversão de lactose a etanol ($Y_{P/S}$), eficiência de conversão (η) e produtividade volumétrica (Q_P) em biorreator de leito fluidizado, a partir de meio de soro de queijo e meio permeado de soro de queijo.

Meio de fermentação	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	Eficiência de conversão (%)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Permeado de soro de queijo	0,48	89	2,33
Soro de queijo	0,47	87	2,49

Os resultados obtidos no presente trabalho se mostraram ligeiramente maiores que outros estudos reportados em literatura utilizando a técnica de imobilização celular. Lins e

Leão (2002) estudaram a produção de etanol em leite desnatado utilizando *K. marxianus* CBS 6164 imobilizada em alginato de cálcio 2 % a uma temperatura de 30 °C em cultivo batelada, e obtiveram uma eficiência de conversão de 80 %. Gunasekaran e Kamini (1991) utilizaram alginato de cálcio 3,5 % para imobilizar *K. fragilis* NRRL 665 para a produção de etanol, em cultivo batelada com meio sintético, contendo 200 g L⁻¹ de lactose, e reportaram uma produtividade volumétrica de 0,88 g L⁻¹ h⁻¹ e um fator de conversão de 0,44 g g⁻¹. Guo et al. (2010) co-imobilizaram *K. marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* em esferas de alginato de cálcio para a obtenção de etanol a partir do soro de queijo (100 g L⁻¹ de lactose) e obtiveram uma eficiência de conversão de 79,9 % com uma produtividade volumétrica de 0,88 g L⁻¹ h⁻¹. Marwaha e Kennedy (1984) testaram a bioconversão de lactose presente no permeado de soro de queijo a etanol a partir de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 179 imobilizada em diferentes concentrações de alginato de cálcio (1 a 2,5 %) e de carragena (1 a 2,5 %), crescida a 30 °C, a uma velocidade de agitação de 200 rpm por 24 h a partir de meio contendo 50 g L⁻¹ de lactose, e obtiveram conversão de 0,42 g g⁻¹ para as diferentes concentrações de alginato testadas e uma conversão que variou de 0,39 g g⁻¹ a 0,42 g g⁻¹ a partir da levedura imobilizada em carragena. Todos estes experimentos foram conduzidos em frascos agitados, enquanto no presente trabalho, uma representação mais realista do processo, foi utilizada através do emprego de sistema de biorreatores.

Dessa forma, conclui-se neste trabalho que o emprego tanto do permeado de soro de queijo quanto do soro de queijo, como fontes alternativas de carbono para a produção de etanol, apresentam grande potencial de aproveitamento neste bioprocessos e, quando aliado a técnica de imobilização celular, se mostram uma opção bastante vantajosa e especialmente interessante. Adicionalmente, a utilização destes subprodutos industriais, pode minimizar o impacto ambiental ocasionado pela disposição inadequada, além de tornar a produção de etanol um processo menos oneroso e bastante vantajoso em termos de produtividade, especialmente através do emprego de biorreatores imobilizados. Neste trabalho, a linhagem de *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 apresentou potencial para bioconversão de lactose a etanol em ambos os meios de cultivo, atingindo boa eficiência de conversão (87 % a 89 %) e altas produtividades volumétricas (2,33 g L⁻¹ h⁻¹ a 2,49 g L⁻¹ h⁻¹).

Referências

BRITO, A. Leveduras na produção de álcool. **Jornal da Universidade de Campinas**, junho de 2003.

CANAKCI, M.; SANLI, H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. **Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 431-441, 2008.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 33, p. 1-18, 2007.

DOMINGUES, L; LIMA, N; TEIXEIRA, J.A. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. **Biotechnology Bioengineering**, v. 72, p. 507-514, 2001.

GABARDO, S; RECH, R; AYUB, M.A.Z. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 87, p. 1194-1201, 2012.

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

GUNASEKARAN, P.; KAMINI, N.R.High ethanol productivity from lactose by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.7, p. 551-556, 1991.

GUO, X.; ZHOU, J.;XIAO,D. Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.532–538, 2010.

KOURKOUTAS, Y; BEKATOROU, A; BANAT, I.M; MARCHANT, R; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p. 377-397, 2004.

LINS, A.C; LEÃO, M.H.M.R. Removal of skim milk lactose by fermentation using free and immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.187-192, 2002.

MARWAHA, S.S; KENNEDY, J.F. Ethanol production from whey permeate by immobilized yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 18-22, 1984

MAZID, M. A. Biocatalysts and immobilized enzyme/cell bioreactors. **Biotechnology**. v. 11, p. 690-695, 1993.

PARRONDO, J; GARCÍA, L.A; DÍAZ, M. Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.26, p. 445-456, 2009.

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

APÊNDICE C

BIOCONVERSÃO DE PERMEADO E SORO DE QUEIJO A ETANOL POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Bioconversão de permeado e soro de queijo a etanol por *Saccharomyces cerevisiae*

S. GABARDO¹, G.F. PEREIRA¹, M.P. KLEIN¹, P.F. HERTZ¹, R.RECH¹, M.A.Z.AYUB¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
E-mail para contato: sabrinagabardo@gmail.com

RESUMO – A tecnologia de processos fermentativos associada à preocupação ambiental tem incentivado pesquisas a desenvolver novas estratégias de geração de energia. A utilização de substratos alternativos na condução de bioprocessos tem sido significativa nos últimos anos em decorrência da redução de custos e minimização dos danos ambientais. O soro e o permeado de soro de queijo, subprodutos industriais, constituem-se como substratos ricos em nutrientes e de grande potencial para a produção de etanol. Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo produzir etanol através da bioconversão da glicose e galactose presente no soro e permeado de soro de queijo por *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e comparar a produção obtida nos distintos meios. As condições de fermentação ocorreram a uma temperatura de 30 °C por um período de 48 horas, a uma velocidade de agitação de 150 rpm. A eficiência de conversão variou entre 79,9 % e 82,4 % e a produtividade volumétrica variou entre 0,34 g L⁻¹ h⁻¹ e 0,37 g L⁻¹ h⁻¹, sendo a maior concentração de etanol de 17,7 g L⁻¹.

1 Introdução

A responsabilidade ambiental e as tecnologias de controle da poluição estão conduzindo o setor de alimentos a investir, cada vez mais, na redução da emissão de seus resíduos. (AMANTE et al., 1999). A indústria de laticínios constitui uma parcela importante da indústria alimentícia, sendo significativa a sua contribuição em termos de poluição. O soro de queijo representa o principal e mais problemático subproduto das indústrias de laticínios em decorrência de sua elevada carga orgânica e grande volume gerado. Caracterizado por elevados valores de demanda bioquímica de oxigênio (30-50 g L⁻¹), o soro de queijo apresenta potencial poluidor aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico. Processos que

valorizam o soro de queijo estão sendo constantemente realizados, entre os quais, a recuperação das proteínas, o qual gera grandes volumes remanescentes de lactose, também denominado de permeado. Este produto (permeado), assim como o soro de queijo, continua sendo um poluente importante visto que retém mais de 70 % dos sólidos totais presentes no soro de queijo (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010).

A produção mundial anual de soro de queijo é estimada em 100 milhões de toneladas, sendo que o Brasil contribui em aproximadamente 6 % para essa geração (GUIMARÃES et al., 2010; MAPA/SPA, 2010). Sendo a quantidade de lactose disponível no mundo maior que 4 milhões de toneladas por ano, é sugestivo o grande potencial de aproveitamento desta fonte de carbono alternativa para a produção do etanol, representando baixos custos para a obtenção do produto final e garantindo um processo mais sustentável. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo produzir etanol através de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em meio soro e permeado de soro de queijo previamente hidrolisados com β -galactosidase e comparar a capacidade de bioconversão nos distintos meios.

2 Materiais e métodos

2.1 Permeado e soro de queijo

O permeado de soro de queijo em pó foi fornecido pela Sooro (PR, Brasil) e o soro de queijo em pó fornecido pela Elegê Laticínios S.A. (RS, Brasil). Para sua preservação, ambos permaneceram estocados em freezer a -16 °C.

2.2 Microrganismo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 foi cedida pelo Departamento de Genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

2.3 Fermentação em frascos agitados

Para o preparo do pré-inóculo, uma colônia isolada foi transferida para 50 mL de meio YEPD (extrato de levedura, 10 g L⁻¹; peptona bacteriológica, 20 g L⁻¹ e glicose, 20 g L⁻¹, pH 7,0) em frascos Erlenmeyer de 250 mL. A linhagem foi incubada em agitador rotacional, sob agitação orbital de 180 rpm, a uma temperatura de 30 °C (\pm 0,2 °C), por 12 h. Os inóculos

foram preparados através da padronização da concentração celular para densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) igual a 1. Os meios soro e permeado de soro foram previamente hidrolisados com β -galactosidase comercial a temperatura ambiente, pH 7,0 por 8 horas. O cultivo foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 144 mL de meio de fermentação esterilizado (121°C, 15 min), pH 7,0 e 16 mL de inóculo, totalizando um volume de fermentação de 160 mL. Para evitar a precipitação das proteínas durante o processo de esterilização, o soro de queijo foi hidrolisado com uma protease comercial a 55 °C, pH 8,5 por 3 h. Os Erlenmeyers contendo as culturas foram incubados em agitador orbital, a uma temperatura de 30 °C ($\pm 0,2$ °C), sob agitação de 150 rpm por 48 h.

2.4 Métodos analíticos

As concentrações de lactose, glicose e etanol foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu) utilizando detector de índice de refração (IR) e coluna Bio-Rad Aminex HPX 87H, a 45 °C, utilizando solução de ácido sulfúrico 5mM (H_2SO_4) como fase móvel na vazão de 0,6 mL min^{-1} , e 20 μ L de volume de amostra.

A conversão de substrato em etanol foi determinada pela seguinte equação:

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_o}{S_o - S}$$

Em que P é a concentração final de etanol ($g L^{-1}$), P_o é a concentração inicial de etanol ($g L^{-1}$), S é a concentração final de substrato ($g L^{-1}$) e S_o é a concentração inicial de substrato ($g L^{-1}$).

A produtividade volumétrica foi definida como:

$$Q_p = \frac{P - P_o}{\Delta t}$$

Onde:

Δt : intervalo de tempo de fermentação (h)

A eficiência de conversão foi dada pela equação:

$$\eta(\%) = \frac{Y_{P/S}}{0,51} 100$$

Onde:

O valor de 0,51 corresponde à conversão teórica de glicose e galactose em etanol.

3 Resultados e discussão

A capacidade de bioconversão de lactose a etanol é encontrada em poucas leveduras. O gênero *Saccharomyces cerevisiae* se caracteriza por não assimilar diretamente a lactose, contudo, se esta for hidrolisada em seus monossacarídeos, glicose e galactose, através da ação da enzima β -galactosidase, estes podem ser metabolizados e convertidos a etanol (Silva et al., 2010).

A cinética de consumo de glicose e galactose e da produção de etanol em meio soro e permeado de soro de queijo previamente hidrolisados com β -galactosidase, pode ser observada na Figura 1. A glicose foi totalmente consumida em 12 h de cultivo para ambos os meios, enquanto que a galactose foi consumida mais lentamente, esgotando-se em praticamente 24 h em meio soro de queijo e em 48 h em meio permeado de soro. Uma explicação para este acontecimento deve-se ao fato de que o meio soro de queijo é um meio mais rico em nutrientes, contendo maiores quantidades de proteínas e sais minerais, favorecendo o crescimento celular e formação do produto de interesse. Em relação à concentração de etanol, esta foi maior em meio soro de queijo, alcançando um máximo de $17,7 \text{ g L}^{-1}$ em 24 horas de cultivo, enquanto que para o mesmo tempo de cultivo em permeado de soro, a concentração foi de $14,4 \text{ g L}^{-1}$. Adicionalmente, maiores valores do fator de conversão e produtividade volumétrica foram obtidos em meio soro de queijo, $0,42 \text{ g g}^{-1}$ e $0,37 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, alcançando uma eficiência de conversão de 82,4 % (Tabela 1).

Tabela 1. Fator de conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}$), eficiência de conversão (η) e produtividade volumétrica de etanol (Q_P) nos meios soro de queijo e permeado de soro de queijo previamente hidrolisados com β -galactosidase.

Meio de fermentação	$Y_{P/S} (\text{g g}^{-1})$	Eficiência de conversão (%)	$Q_P (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1})$
Soro de queijo	0,42	82,4	0,37
Permeado de soro de queijo	0,41	79,9	0,34

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser comparados com alguns outros reportados em literatura. A produção de $19,6 \text{ g L}^{-1}$ de etanol foi obtida em estudo utilizando *S. cerevisiae* GRF167, geneticamente modificada, a uma temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e em condições anaeróbias, em meio sintético contendo 20 g L^{-1} de glicose e de galactose, atingindo um fator de conversão de $0,48 \text{ g g}^{-1}$ (Ramakrishnan e Hartley, 1993). Menores valores de concentração de etanol (12 g L^{-1}) foram obtidos em estudo de El-Nemr (2001) utilizando *S. cerevisiae*

ATCC 4126 recombinante em soro de queijo (contendo 46 g L⁻¹ de lactose) a uma temperatura de 25 °C durante 96 h de fermentação. Silva et al. (2010) encontraram uma concentração de etanol de 33 g L⁻¹ e uma produtividade volumétrica de 0,74 g L⁻¹ h⁻¹ partir de 150 g L⁻¹ de soro de queijo deproteinizado, utilizando *S. cerevisiae* recombinante, NCYC869-A3/T1-E, a uma temperatura de 30 °C e 150 rpm, alcançando uma conversão teórica de 76%.

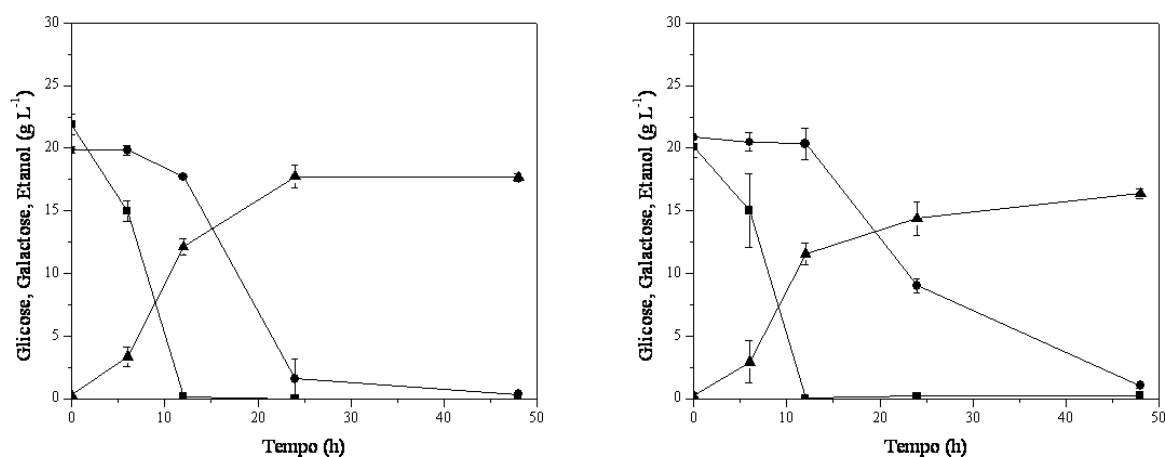


Figura 1. Cinética do consumo de glicose e galactose e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em meio soro de queijo (a) e em permeado de soro de queijo (b). Glicose (■), Galactose (●), Etanol (▲).

No presente trabalho, fica evidenciada a utilização do soro e permeado de soro de queijo, como fontes alternativas de carbono para a produção de etanol, consistindo em uma proposta bastante interessante em se tratando de questões técnicas, econômicas e ambientais. O aproveitamento destes substratos em processos fermentativos pode minimizar o seu potencial poluidor, além de tornar a produção de etanol um processo menos oneroso, deixando este processo potencialmente competitivo economicamente.

Referências

- AMANTE, E.R.; CASTILHOS, A.B.; KANZAWA, A.; ENSSLIN, L.; MURAKI, M. Um panorama da tecnologia limpa na indústria de alimentos. *Boletim SBCTA*, v. 33, n. 1, p. 16-21, 1999.
- EL-NEMR, T.M. Immobilization of recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* for the hydrolysis of lactose in salted domiati cheese whey. *Eur Food Res Technol*, v.212, p. 225-227, 2001.

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

MAPA/SPA – Secretaria de Política Agrícola. *Sumário Executivo: Complexo Leite*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 7 p. 2010.

RAMAKRISHNAN, S; HARTLEY, B.S. Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Appl Environmental Microbiol.*, v. 59, p.4230-4235, 1993.

SILVA, A., GUIMARES, P.M.R., TEIXEIRA, J.A., DOMINGUES, L. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *J Ind Microbiol & Biotechnol*, v. 37, p. 973-982, 2010.

APÊNDICE D

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE SORO E PERMEADO DE SORO DE QUEIJO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Aproveitamento biotecnológico de soro e permeado de soro de queijo para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*

S. GABARDO¹, G. F. PEREIRA¹, M. P. KLEIN², P.F. HERTZ², R. RECH², M.A.Z. AYUB^{1,2}

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de Biotecnologia e Engenharia Bioquímica

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências e Tecnologias de Alimentos

E-mail para contato: sabrinagabardo@gmail.com

RESUMO – O desenvolvimento de pesquisas para a produção de biocombustíveis alternativos tem sido significativo nos últimos anos, entre as quais pode-se citar a utilização de substratos alternativos e de baixo custo para a produção de etanol. O presente trabalho avaliou a utilização de soro e permeado de soro de queijo para a produção de etanol, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. O soro e o permeado de soro foram tratados enzimaticamente para a hidrólise da lactose e utilizados como meio de cultivo sem suplementação. Os cultivos foram realizados em incubadora rotatória a 30 °C, 150 rpm por 48 h. A glicose foi prontamente metabolizada em ambos os meios de cultivo, enquanto que a galactose foi metabolizada de forma mais lenta em permeado de soro. A eficiência de conversão variou entre 75,4 % e 81,1 % e a produtividade volumétrica variou entre 0,34 g L⁻¹ h⁻¹ e 0,40 g L⁻¹ h⁻¹, sendo a concentração máxima de etanol de 19,0 g L⁻¹.

1. Introdução

O aperfeiçoamento de processos fermentativos associados à crescente preocupação ambiental tem impulsionado pesquisas no sentido de desenvolver tecnologias alternativas de geração de energia (Canacki e Sanli, 2008). O aproveitamento de subprodutos industriais para a produção de etanol tem sido significativo nos últimos anos devido ao mercado crescente e a potencial redução dos custos de produção associada a sua utilização. O emprego de substratos alternativos e de baixo custo, tais como o permeado e o soro de queijo, além de auxiliar na

produção de etanol, pode, ainda, minimizar problemas ambientais através de seu aproveitamento neste bioprocessamento (Gabardo *et al.*, 2012).

O soro de queijo, subproduto da indústria de laticínios, se caracteriza por ser rico em nutrientes, contendo apreciáveis quantidades de lactose (45-50 g L⁻¹), proteínas (6-8 g L⁻¹), e sais minerais (8-10 % do extrato seco). Processos que valorizam o soro de queijo estão sendo constantemente realizados, entre os quais, a recuperação das proteínas através do processo de separação por ultrafiltração, o qual gera grandes volumes remanescentes de lactose, também denominado de permeado. Este produto, o permeado, assim como o soro de queijo, continua sendo um poluente importante visto que retêm mais de 70 % dos sólidos totais presentes no soro de queijo. Dessa forma, o permeado apresenta problemas de disposição, tanto em termos de volume produzidos quanto de carga orgânica, aproximadamente igual ao do soro de queijo (Siso, 1996; Domingues *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2010). Caracterizado por elevados valores de demanda bioquímica de oxigênio (30-50 g L⁻¹), o soro de queijo apresenta potencial poluidor aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico (Siso, 1996; Guimarães *et al.*, 2010). Sendo a quantidade de lactose disponível no mundo para a produção de etanol maior que 4 milhões de toneladas por ano, é sugestivo o grande potencial de aproveitamento desta fonte de carbono alternativa para a condução deste bioprocessamento (Guimarães *et al.*, 2010).

A produção mundial de etanol foi de aproximadamente 65 bilhões de litros no ano de 2008, sendo o continente Americano responsável por 70 % dessa produção. O maior produtor mundial são os Estados Unidos, produzindo no ano de 2008 cerca de 34,0 bilhões de litros. Em segundo lugar encontra-se o Brasil, chegando a uma produção de 25,7 bilhões de litros no ano de 2010, contribuindo de forma significativa no cenário internacional (Demirbas, 2007; Guimarães *et al.*, 2010; Mussato *et al.*, 2010). Com a perspectiva de crescimento da demanda de álcool combustível, tecnologias capazes de melhorar o desempenho do processo ganham importância fundamental no Brasil e no mundo. Leveduras tradicionalmente utilizadas em plantas industriais do Brasil, como as do gênero de *Saccharomyces cerevisiae*, reconhecidas pela tolerância a altas concentrações de etanol e de açúcar, não são capazes de utilizar a lactose como fonte de energia. Contudo, estas linhagens são capazes de metabolizar a glicose e a galactose, monômeros constituintes da lactose. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em meio soro e permeado de soro de queijo previamente hidrolisados com β -galactosidase e comparar a capacidade de bioconversão nos diferentes meios de cultivo.

2. Materiais e métodos

2.1 Permeado e soro de queijo

O permeado de soro de queijo em pó foi fornecido pela Sooro (PR, Brasil) e o soro de queijo em pó fornecido pela Elegê Laticínios S.A. (RS, Brasil). Para sua preservação, ambos permaneceram estocados em freezer a -16 °C.

2.2 Microrganismo e manutenção celular

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 foi cedida pelo Departamento de Genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. A linhagem foi mantida em placas de Petri contendo meio nutritivo YEPD, composto de extrato de levedura (10 g L⁻¹), peptona bacteriológica (20 g L⁻¹), glicose (20 g L⁻¹), e ágar (20 g L⁻¹), pH ajustado para 7,0 com solução de NaOH 0,1 M. Previamente a sua utilização, o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. A linhagem foi plaqueada em meio YEPD, e incubada em estufa a 30 °C por 48 h para o crescimento celular e, posteriormente armazenada a 4 °C. A cada 30 dias as culturas foram renovadas via repique.

2.3 Fermentação em frascos agitados

O pré-inóculo foi preparado através da transferência asséptica de uma colônia isolada para 50 mL de meio YEPD (extrato de levedura, 10 g L⁻¹; peptona bacteriológica, 20 g L⁻¹ e glicose, 20 g L⁻¹, pH 7,0) em frascos cônicos de 250 mL. A linhagem foi incubada em agitador rotacional, sob agitação orbital de 180 rpm, a uma temperatura de 30 °C (\pm 0,2 °C), por 12 h. Os inóculos foram preparados através da padronização da concentração celular para densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) igual a 1. Os meios soro e permeado de soro foram previamente hidrolisados com β -galactosidase comercial utilizando um volume de enzima de 0,5 mL L⁻¹, a temperatura ambiente, em pH 7,0, por 8 h e sob branda agitação. O cultivo foi conduzido em frascos cônicos de 250 mL contendo 144 mL de meio de fermentação esterilizado (121 °C, 15 min), pH 7,0 e 16 mL de inóculo, totalizando um volume de fermentação de 160 mL. Para evitar a precipitação das proteínas durante o processo de esterilização, o soro de queijo foi previamente hidrolisado com uma protease comercial a 55

°C, pH 8,5 por 3 h. Os frascos cônicos contendo as culturas foram incubados em agitador orbital, a uma temperatura de 30 ° C ($\pm 0,2$ °C), sob agitação de 150 rpm por 48 h.

2.4 Métodos analíticos

Amostras de 3 mL do meio fermentativo foram coletadas em 0 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h de cultivo para determinação da concentração de glicose, galactose e etanol. O preparo das amostras foi realizado através da centrifugação a $3000 \times g$ por 15 min, 4 °C (Brinkmann Instruments Inc., Eppendorf Bench Centrifuge, modelo 5410, Alemanha) para separar as células do meio de cultivo e o sobrenadante foi analisado. As concentrações dos açúcares e de etanol foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu) utilizando detector de índice de refração (IR) e coluna Bio-Rad Aminex HPX 87H, a 45 °C, utilizando solução de ácido sulfúrico 5mM (H₂SO₄) como fase móvel na vazão de 0,6 mL min⁻¹, e 20 µL de volume de amostra.

3. Resultados e discussão

A linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 é convencionalmente utilizada em plantas industriais de etanol do Brasil devido a suas características fisiológicas como, por exemplo, a tolerância a altas concentrações de etanol e altos rendimentos obtidos a partir da cana de açúcar e melaço (Basso *et al.*, 2008). Contudo, esta linhagem não tem sido explorada para a bioconversão em etanol a partir de soro e permeado de soro de queijo. O gênero de *Saccharomyces cerevisiae* se caracteriza por não assimilar diretamente a lactose devido a ausência dos genes *LAC12* e *LAC4*, os quais codificam as enzimas, lactose-permease e β -galactosidase, respectivamente. Contudo, se a lactose for hidrolisada em seus monossacarídeos, glicose e galactose, através da ação da enzima β -galactosidase, estes podem ser metabolizados e convertidos a etanol pelas vias glicolítica e de Leloir (Rubio-Teixeira, 2005; Timson, 2007; Bai *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010).

A cinética do consumo dos monossacarídeos glicose e galactose e da produção de etanol em meio soro e permeado de soro de queijo pode ser observada na Figura 1. Um comportamento diauxico é observado para ambos os meios de cultivo, em que a glicose é consumida primeiramente à galactose. Este fato é característico de linhagens de *S. cerevisiae* e acontece devido à repressão catabólica dos genes *GAL* pela glicose (Guimaraes *et al.*, 2010). Além do mais, a galactose foi metabolizada mais lentamente do que a glicose, levando mais

que o dobro do tempo para a sua exaustão. Isto pode ser explicado devido ao fato de que a bioconversão da galactose exige energia e etapas catabólicas adicionais, uma vez que a galactose deve primeiramente entrar na via Leloir, transformando-se em um intermediário glicolítico, para posteriormente entrar na via glicolítica e finalmente ser reduzida a etanol (Rubio-Teixeira, 2005; Timson, 2007). Além disso, a metabolização da galactose diferiu nos distintos meios. Uma explicação para isso é devido ao meio soro de queijo ser mais rico em nutrientes, contendo maiores quantidades de proteínas e sais minerais, favorecendo o crescimento celular e a produção de etanol. Neste mesmo sentido, a cinética de produção de etanol foi mais rápida em meio soro de queijo do que em permeado de soro de queijo nas primeiras 24 h, contudo para o período de 48 h, a produção de etanol foi maior em permeado de soro de queijo (19 g L^{-1}), o que refletiu em maiores produtividades volumétricas (Tabela 1). Isto se deve pela diferença inicial dos açúcares, em que no início do experimento a concentração de glicose e galactose ficou em 20 g L^{-1} ao passo que em permeado de soro a concentração inicial foi de 25 g L^{-1} . O fator de conversão de açúcares a etanol foi maior em meio soro de queijo, sugerindo uma maior adaptação em meio soro de queijo pela levedura.

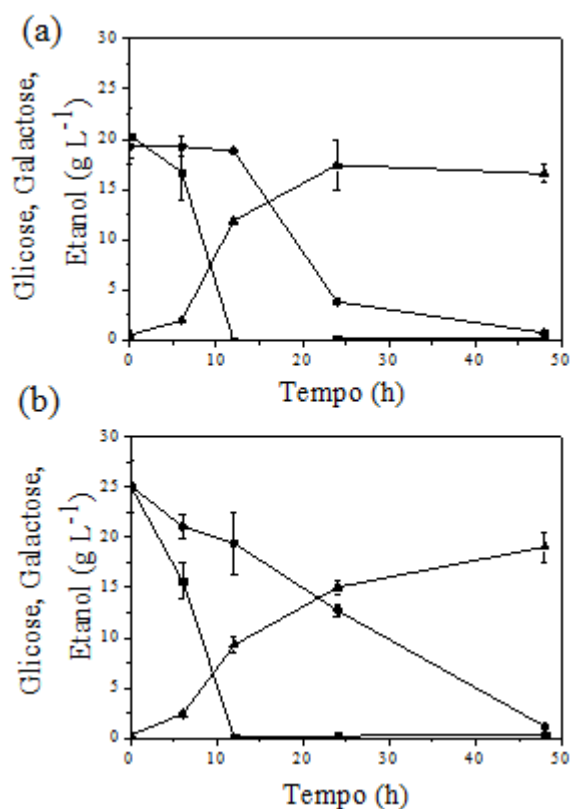


Figura 1. Cinética do consumo de glicose e galactose e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em meio soro de queijo (a) e em permeado de soro de queijo (b). Glicose (■), Galactose (●), Etanol (▲).

Tabela 1. Fator de conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}$), eficiência de conversão (η) e produtividade volumétrica de etanol (Q_P) nos meios soro de queijo e permeado de soro de queijo previamente hidrolisados com β -galactosidase.

Meio de fermentação	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	η (%)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Soro de queijo	0,41	81,1	0,34
Permeado de soro de queijo	0,38	75,4	0,40

Os parâmetros cinéticos obtidos neste trabalho foram ligeiramente inferiores aos reportados em literatura, contudo, é válido enfatizar que estes últimos utilizaram *S. cerevisiae* geneticamente modificada, o que pode influenciar nas características fisiológicas e no metabolismo do carbono. Por exemplo, Silva *et al.* (2010) obtiveram uma produtividade volumétrica de 0,74 g L⁻¹ h⁻¹ e uma conversão teórica de 76 % partir de soro de queijo deproteinizado, utilizando *S. cerevisiae* recombinante, NCYC869-A3/T1-E, a uma temperatura de 30 °C e 150 rpm; além disso, alto fator de conversão (0,48 g g⁻¹) foi alcançado por *S. cerevisiae* geneticamente modificada (GRF167) a partir de meio sintético contendo 20 g L⁻¹ de glicose e de galactose (Ramakrishnan e Hartley, 1993). Valores similares aos obtidos no presente trabalho foram observados por Domingues *et al.* (1999) ao utilizar *S. cerevisiae* geneticamente modificada (linhagem T1), chegando a uma produtividade volumétrica de 0,40 g L⁻¹ h⁻¹ e uma eficiência de 60 % a partir de meio sintético contendo lactose como fonte de carbono.

No presente trabalho, fica evidenciada a capacidade de bioconversão do soro e permeado de soro por *S. cerevisiae* PE-2, uma levedura convencionalmente empregada em plantas industriais, o que permite testar posteriormente condições mais aproximadas das condições industriais. A utilização do soro e permeado de soro de queijo como fonte alternativa de carbono em processos fermentativos, consiste em uma proposta bastante interessante, podendo minimizar o seu potencial poluidor, além de tornar a produção de etanol um processo menos oneroso e potencialmente competitivo economicamente.

Referências

BAI, F.W; ANDERSON, W.A; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.*, v. 14, p. 89-105, 2008

- BASSO, L. C.; de AMORIM, H. V.; de OLIVEIRA, A.J., et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 8, p.1155-1163, 2008.
- CANAKCI, M.; SANLI, H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J. Ind.Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, p. 431-441, 2008.
- DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biofuels. *Progress Energy Combustion Sci.*, v. 33, p. 1-18, 2007.
- DOMINGUES, L; TEIXEIRA, J.A; LIMA, N. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. *Appl. Microbiol.Biotechnol.*, v.51, p.621-626, 1999.
- DOMINGUES, L; LIMA, N; TEIXEIRA, J.A. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 72, p. 507-514, 2001.
- GABARDO, S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. *J. Chem. Technol.Biotechnol.*, v. 87, p.1194-1201, 2012.
- GUIMARÃES, P.M.R; TEIXEIRA, J.A; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Biotechnol. Adv.*, v.28, p. 375–384, 2010.
- MUSSATTO S. I.; DRAGONE G.; GUIMARAES P.M.R., et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol. Adv.*, v.28, p.817-830, 2010.
- RAMAKRISHNAN, S; HARTLEY, B.S. Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Appl. Environmental Microbiol.*, v. 59, p.4230-4235, 1993.
- RUBIO-TEXEIRA, M. A comparative analysis of the genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Yeast Research*, v. 5, p. 1115-1128, 2005.
- SILVA, A., GUIMARES, P.M.R., TEIXEIRA, J.A., DOMINGUES, L. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *J. Ind. Microbiol.Biotechnol.*, v. 37, p. 973-982, 2010.
- SISO M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technol.*, v. 57, p. 1-11, 1996.
- TIMSON, D. J. Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochem., Process Biotechnol. Molecular Biology. In: Global Sci. Books*, v.1, p.63-73, 2007.

APÊNDICE E

TESTES EM DIFERENTES SUPORTES E TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR

Estes testes prévios de imobilização celular foram realizados com a finalidade de avaliar a influência da utilização de diferentes suportes de imobilização sobre a cinética de produção de etanol utilizando como biocatalisador a levedura *K. marxianus* CCT 4086. Os experimentos ocorreram tanto em biorreator de coluna quanto em frascos Duran, dependendo da diferença de densidade do suporte em relação ao meio de cultivo. Meio permeado de soro de queijo foi utilizado como meio de cultivo.

Duas diferentes técnicas de imobilização foram testadas: a técnica de adsorção, em que esponjas comerciais de poliuretano (PUF) e poliéster (PE) foram utilizadas como material suporte, e a técnica de envolvimento em matrizes porosas, onde a tecnologia patenteada de imobilização celular em hidrogel de álcool polivinílico (Lentikats®) foi empregada. Nesta seção, será abordada de forma sucinta as principais observações verificadas para as diferentes técnicas testadas.

1.1 Introdução

O êxito de um bioprocessamento só pode ser alcançado com a sua otimização. Considerando a necessidade de tecnologias capazes de melhorar o desempenho e a eficiência de processos fermentativos, a técnica de imobilização celular tem surgido como uma tecnologia alternativa que pode contribuir positivamente para o desenvolvimento de processos mais eficazes e vantajosos (GABARDO et al., 2012, 2014).

Diferentes técnicas de imobilização celular têm sido relatadas, sendo a técnica de envolvimento em matrizes porosas a mais difundida e amplamente estudada. De forma geral, o envolvimento consiste em uma técnica simples, barata e de fácil manipulação, que confere alta retenção celular e proteção às células contra estresse ambiental decorrente de alterações de pH, de compostos que possam ser tóxicos às células ou inibitórios do crescimento (KOURKOUTAS et al., 2004; VERBELEN et al., 2006; CHRISTENSEN et al., 2011). Entre os materiais mais amplamente empregados encontram-se o alginato, carragena e a quitosana.

Porém, estes suportes apresentam pouca resistência mecânica. Como resposta a este problema, o material-suporte de álcool polivinílico (PVA) tem surgido como uma opção viável entre os sistemas de imobilização celular por envolvimento (da CUNHA et al., 2009). Nesse mesmo contexto, materiais como poliuretano (PUF) e poliéster (PE) apresentam grande resistência à tensão de cisalhamento, permitindo intensa agitação, sem a ruptura do material suporte. Além dessa característica, esses materiais também apresentam resistência térmica, grande área superficial com espaços intersticiais, além grande capacidade de adesão celular (KILONZO et al., 2011; WANG et al., 2012). Diante do exposto, esta etapa experimental teve como objetivo avaliar a produção de etanol por diferentes suportes de imobilização celular e técnicas.

1.2 Metodologia

1.2.1 Imobilização por adsorção

Poliuretano (PUF) e poliéster (PE) comerciais foram cortados em cubos de 5 mm³, lavados por duas vezes com água destilada, e, posteriormente adicionados em frascos cônicos de 1L contendo 400 mL de meio YEP-Lactose, e em seguida, esterilizados (121 °C, 15 min). Para o preparo do inóculo, ocorreu a transferência asséptica de uma colônia isolada da levedura *K. marxianus* CCT 4086 para frasco cônico de 250 mL contendo 50 mL de meio YEP-Lactose (30° C, 150 rpm, 12 h), e em seguida, a concentração celular foi ajustada para densidade óptica igual a 1 (DO, 600 nm). Após, foi realizada a adição do inóculo ao frasco contendo a mistura (esponja e meio de cultivo) em um volume correspondente a 10 % do volume total de meio. A mistura de célula, meio de cultivo e suporte de imobilização foi mantida em agitador rotacional a 30 °C, 150 rpm, por 48 h para possibilitar o crescimento celular e a imobilização das células nas esponjas por adsorção. Concentrações de 2,9 g biomassa seca/volume de cubo e de 2,4 g biomassa seca/volume de cubo foram alcançadas nos sistemas de imobilização em PUF e PE, respectivamente.

1.2.2 Imobilização por envolvimento: Lentikats®

Uma colônia isolada de *K. marxianus* CCT 4086 foi transferida assepticamente para frascos cônicos de 2 L contendo 800 mL de meio YEP-Lactose, incubada em agitador rotacional (180 rpm, 30 °C, 15 h), até fase de crescimento exponencial. Em seguida, o meio de

cultivo foi recolhido e centrifugado ($3000 \times g$, 15 min), e as células foram lavadas por duas vezes com água destilada estéril, novamente centrifugadas ($3000 \times g$, 15 min), e ressuspensas pela adição de 50 mL de água destilada estéril. A imobilização em álcool polivinílico foi realizada através do aquecimento de 200 mL do líquido Lentikats (Genialab, Braunschweig-Alemanha) a $95 \text{ }^\circ\text{C}$, e posterior resfriamento em temperatura ambiente, até atingir $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, foram adicionados 50 mL de suspensão celular previamente preparada, de modo a obter uma solução contendo $0,02 \text{ g mL}^{-1}$ (biomassa seca/volume de solução). A mistura (PVA/células) foi gotejada em placas de petri de poliestireno estéril com o auxílio de uma seringa estéril (agulha 0,70 x 25 22 G 1), de forma a se obter gotículas no formato de “lentilhas”, com 3-4 mm de diâmetro, conforme verificado na Figura 1a. As placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar para gelificação, terminando o processo quando a evaporação reduziu a massa inicial em 72 %. Em seguida, essas “lentilhas” foram estabilizadas e reentumecidas em solução estabilizadora (Genialab), sob constante agitação (Figura 1b). Após, estas foram lavadas por 3 vezes com água destilada estéril (Figura 1c) e adicionados em frascos Duran para o início da fermentação.



Figura 1. Processo de imobilização celular em Lentikats®: gotejamento em placa de petri (a), estabilização e reentumecimento em solução estabilizadora (b), “lentilhas” prontas (c).

1.2.3 Métodos analíticos

As amostras coletadas foram centrifugadas ($3000 \times g$, 15 min), e o sobrenadante foi filtrado em membranas de acetato de celulose ($0,22 \mu\text{m}$) para posterior análise em CLAE. A biomassa foi lavada e novamente centrifugada ($3000 \times g$, 15 min) para leitura em

espectrofotômetro a 600 nm, e correlacionada através de curva de calibração densidade óptica (600 nm) *versus* peso seco (g L^{-1}). Para os testes em adsorção, 5 esponjas (5 mm^3) contendo a biomassa imobilizada foram lavadas por duas vezes com água destilada, e em seguida, adicionadas em 1 mL de água destilada, para posterior sonicação em sonicador (frequência 50/60 hertz). O desprendimento celular foi analisado em espectrofotômetro a 600 nm, e a biomassa quantificada como anteriormente descrito. A lactose e o etanol foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito no item 2.8.2 deste documento.

1.2.4 Fermentação em biorreator e em frascos Duran

A fermentação foi realizada em biorreator de leito fixo para o sistema de imobilização por adsorção e em frascos Duran para o sistema de imobilização em Lentikats®, devido à flotação das “lentilhas” em teste prévio em biorreator. Após o processo de imobilização em PUF e PE, as esponjas contendo as células foram lavadas por duas vezes com água destilada estéril e adicionadas na coluna do biorreator em um volume de 85 mL. Em seguida 270 mL de permeado de soro de queijo 60 g L^{-1} reconstituído (contendo 56 g L^{-1} de lactose, 1 g L^{-1} de proteína e 3 g L^{-1} de minerais), pH 7,0, foi utilizado como meio de cultivo. O experimento foi conduzido em biorreator de leito fixo, e a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ foi controlada pela recirculação de água na camisa do biorreator através de banho-termostato (Figura 2).



Figura 2. Produção de etanol em biorreatores de leito fixo utilizando como material suporte esponjas de poliuretano (PUF), e poliéster (PE).

Para a fermentação a partir de células imobilizadas em Lentikats®, 40 mL do material suporte foram adicionados em Duran de 250 mL e um volume de 200 mL de permeado de soro de queijo em diferentes concentrações (60 g L^{-1} , 120 g L^{-1} , 150 g L^{-1} e 180 g L^{-1}), pH 7,0, também foi adicionado (Figura 3a). O experimento foi conduzido a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, com aquecimento em agitador rotacional, e a agitação realizada através de um agitador magnético (Figura 3b).

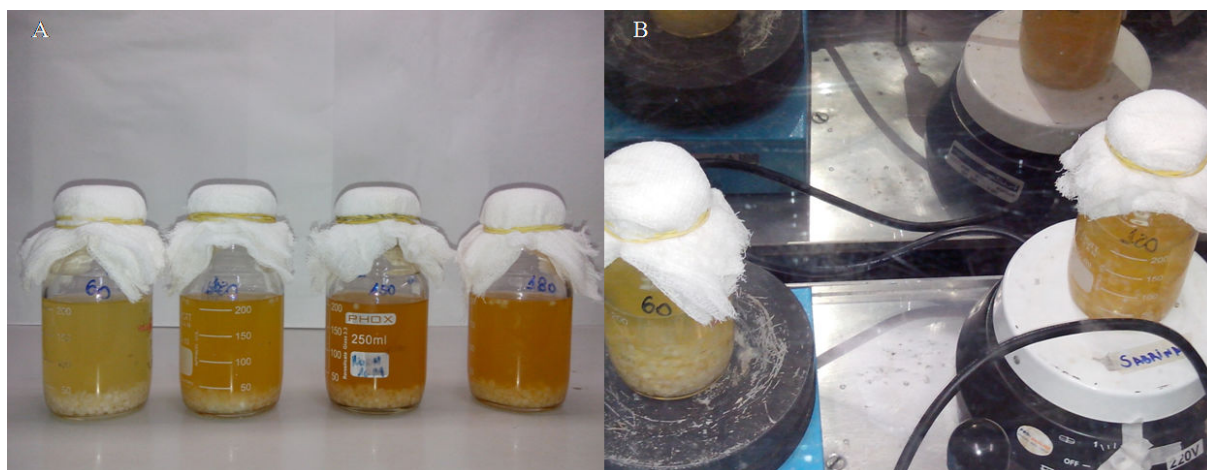


Figura 3. Sistema de fermentação por células imobilizadas em Lentikats®: lentilhas e meio de cultivo adicionados em Duran (a), fermentação em incubadora para manutenção da temperatura e homogeneização do meio por agitador magnético (b).

1.3 Resultados e discussão

O processo de imobilização por adsorção, para os dois suportes empregados, se mostrou ineficiente, uma vez que pouca quantidade de biomassa foi adsorvida ($2,9 \text{ g L}^{-1}$ para PUF e $2,4 \text{ g L}^{-1}$ para PE), contrapondo com a principal característica da imobilização celular, que é a grande densidade de células por volume de biorreator. A Figura 4 apresenta a cinética de consumo de lactose, produção de etanol e concentração de biomassa suspensa. A metabolização da lactose foi bastante similar para os dois suportes de imobilização testados, PUF e PE, esgotando-se em 24 h de cultivo. A produção de etanol atingiu as concentrações máximas de $23,7 \text{ g L}^{-1}$ e $27,5 \text{ g L}^{-1}$ para os sistemas de imobilização em PUF e PE, em 24 h e 30 h de cultivo, respectivamente (Figura 4). Além disso, se comparado à quantidade de biomassa inicial imobilizada, se verifica um considerável desprendimento da biomassa em relação ao material suporte, observado pela alta concentração de biomassa suspensa no biorreator. Enquanto a lactose foi metabolizada neste sistema em 24 h de cultivo, no sistema de imobilização em esferas de alginato de cálcio a lactose foi esgotada em praticamente 10 h (Capítulo III), isto é, levou praticamente a metade do tempo de cultivo do que em PUF e PE, para a mesma linhagem testada. A explicação para isso consiste na pouca quantidade de biomassa imobilizada nestes novos suportes. Além disso, a conversão de lactose a etanol foi ligeiramente inferior nestes dois sistemas de imobilização celular, chegando a $0,45 \text{ g g}^{-1}$ (PUF) e $0,46 \text{ g g}^{-1}$ (PE), enquanto que para a técnica de imobilização em alginato de cálcio a conversão chegou a $0,47 \text{ g g}^{-1}$. A principal diferença entre as diferentes técnicas de

imobilização utilizadas consiste na produtividade volumétrica, a qual foi de apenas $0,96 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (PUF) e $1,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (PE) frente a $2,53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ obtidos em alginato de cálcio.

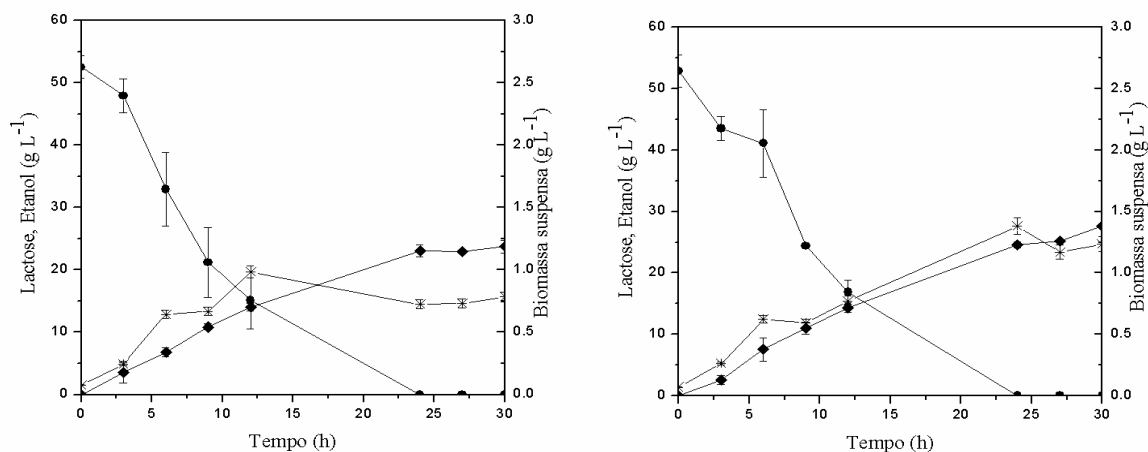


Figura 4. Perfil do consumo de lactose, produção de etanol e biomassa suspensa em biorreator de leito fixo contendo *K. marxianus* CCT 4086 imobilizada em PUF (a) e PE (b), a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

O perfil do consumo de lactose, produção de etanol e biomassa suspensa a partir da bioconversão do permeado de soro de queijo por *K. marxianus* CCT 4086 imobilizada em álcool polivinílico (Lentikats®), está representado na Figura 5. A baixa concentração de biomassa suspensa, para as quatro concentrações de permeado testadas, demonstra que a imobilização celular foi eficaz. Além disso, se verifica que a levedura foi capaz de metabolizar altas concentrações de lactose, incluindo permeado de soro de queijo na concentração de 180 g L^{-1} . A cinética de metabolização do açúcar foi ligeiramente mais lenta quando comparada à cinética obtida pela imobilização em alginato de cálcio, para a mesma concentração de permeado de soro de queijo (60 g L^{-1}), em que no tempo de 12 h de cultivo 89 % do açúcar foi consumido, enquanto que para o processo de imobilização celular em alginato de cálcio o açúcar foi esgotado em 12 h. Isso indica que melhorias na transferência de massa necessitam ser feitas, seja pelo aumento de agitação, ou mudança de geometria do reator. Testes em biorreator STR não estão descartados no futuro. Nestes sistemas, altas concentrações de etanol foram alcançadas, chegando a um máximo de $27,8 \text{ g L}^{-1}$, $49,1 \text{ g L}^{-1}$ e $57,3 \text{ g L}^{-1}$ para as concentrações de permeado de soro de queijo 60 g L^{-1} , 120 g L^{-1} , 150 g L^{-1} , respectivamente. Embora a cinética da produção de etanol a partir de permeado de soro de queijo 180 g L^{-1} necessita de maior tempo de cultivo, é possível observar a capacidade de bioconversão pela levedura, mesmo em altas concentrações de açúcar, em que para 36 h de cultivo 85 % deste foi metabolizado, produzindo concentração máxima de etanol de $62,0 \text{ g L}^{-1}$.

¹. Altos fatores de conversão e produtividades volumétricas foram obtidos, variando de 0,44 g g⁻¹ a 0,53 g g⁻¹, e de 1,03 g L⁻¹ h⁻¹ a 1,72 g L⁻¹ h⁻¹, sendo que a maior conversão foi obtida para a menor concentração de meio permeado de soro de queijo (60 g L⁻¹), enquanto a maior produtividade volumétrica foi obtida para a maior concentração de meio (180 g L⁻¹). Maiores concentrações de açúcar levam a maiores produtividades volumétricas devido à obtenção de maiores concentrações de produto no processo.

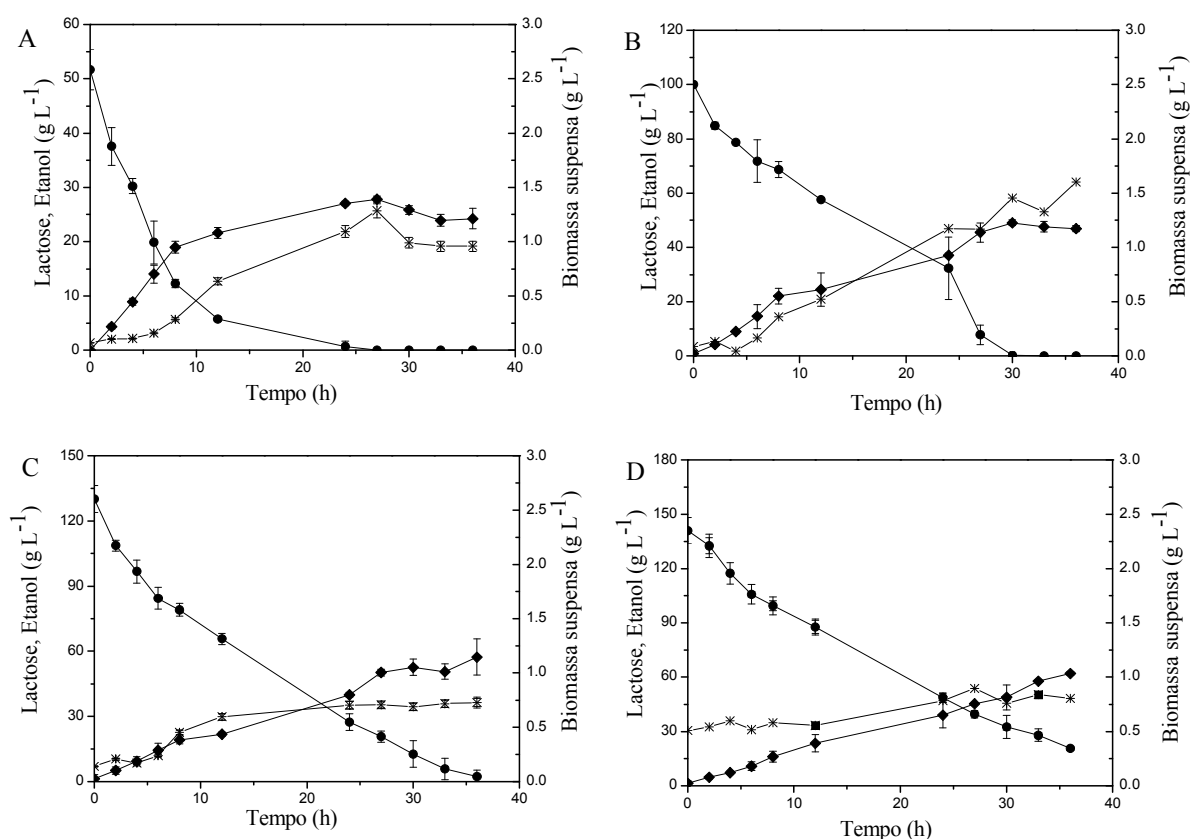


Figura 5. Perfil do consumo de lactose, produção de etanol e biomassa suspensa a partir de *K. marxianus* CCT 4086 imobilizada em Lentikats®, em cultivo em frasco agitado contendo permeado de soro de queijo como meio de cultivo, nas concentrações de 60 g L⁻¹ (a), 120 g L⁻¹ (b), 150 g L⁻¹ (c), e 180 g L⁻¹ (d), a 30 °C.

O processo de imobilização celular pela tecnologia Lentikats® mostra ser uma opção interessante, que pode contribuir significativamente para melhorias no processo de produção de etanol, visto ser um material bastante resistente a tensões de cisalhamento, contudo melhorias na transferência de massa e de configuração de biorreator ainda necessitam ser realizadas para tornar o processo mais eficaz e bastante vantajoso.

Referências

CHRISTENSEN, A. D.; KADAR, Z.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; THOMSEN, M. H. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p.283-289, 2011.

GABARDO, S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p.1194-1201, 2012.

GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v.69, 89-96, 2014.

KOURKOUTAS, Y; BEKATOROU, A; BANAT, I.M; MARCHANT, R; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p. 377-397, 2004.

VERBELEN, P.J; SCHUTTER, D.P; DELVAUX, F.P; VERTREPEN, K.J. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1515-1525, 2006.