

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

Produção de bioetanol, usando soro do queijo como fonte de carbono

Screening de uma estirpe de levedura competente

Ana Catarina Rosa Felizardo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sobre a orientação de:

Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

E Coorientação Professora Doutora Sara Isabel Cacheira Raposo

2014

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

Produção de bioetanol, usando soro do queijo como fonte de carbono

Screening de uma estirpe de levedura competente

Ana Catarina Rosa Felizardo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sobre a orientação de:

Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

E Coorientação Professora Doutora Sara Isabel Cacheira Raposo

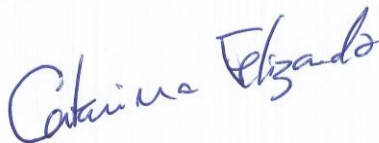
2014

Produção de bioetanol, usando soro do queijo como fonte de carbono

***Screening* de uma estirpe de levedura competente**

Declaração de autoria de trabalho

“Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.”

A handwritten signature in blue ink on a white background. The signature reads "Catarina Felizardo" in a cursive script.

(Ana Catarina Rosa Felizardo)

“A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

“A confiança em si mesmo é o primeiro segredo do sucesso”

Ralph Waldo Emerson

The logo for the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) consists of the letters 'FCT' in a bold, dark green, sans-serif font.

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Agradece-se o apoio financeiro à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do Projeto SORO&ALFAETANOL (PTDC/AGR-TEC/3346/2012) - “Uma estratégia emergente para a produção de bioetanol a partir de efluentes industriais de queijarias e de resíduos de alfarroba para implementação de uma biorrefinaria de 2ª geração

Agradecimentos

Agradeço a professora doutora Emília Costa pela oportunidade que me deu em realizar este trabalho de dissertação no LEBA, por toda a disponibilidade que sempre teve, partilha de conhecimento, apoio e ajuda que me deu ao longo deste trabalho de dissertação.

A professora Doutora Sara Raposo por toda a disponibilidade que sempre teve em ajudar e apoiar, todos os conhecimentos que partilhou ao longo do trabalho de dissertação.

A Engenheira Ana Pedro Constantino e a Engenheira Brígida Rodrigues por toda a ajuda que me prestaram ao longo deste trabalho de dissertação, por estarem sempre disponíveis a ajudar, por todas as partilhas de conhecimento e por todos os bons momentos passados. Foi um prazer fazer parte deste grupo de investigação.

Aos meus colegas do LEBA que estiveram sempre dispostos a ajudar-me, e que me apoiaram sempre. Ao Engenheiro Fábio Guerreiro meu colega e amigo, que na reta final se mostrou sempre disponível a ajudar.

A minha mãe por tudo o que fez por mim, aos meus avós maternos, a minha irmã, ao Luís, aos meus tios, e ao meu pai um grande obrigado por todo o apoio e paciência que sempre tiveram comigo.

A todos os meus amigos de longa data que sempre me incentivaram, ajudaram, e por toda a paciência que sempre tiveram comigo, mas em especial à Mariana, Ana Patrícia e a Irene.

A todas os meus colegas que me acompanharam ao longo desta etapa e em especial às amigas que fiz durante esta etapa Bernardete e Cátia.

Ao Miguel, por toda a paciência que teve ao longo destes anos comigo, por todos os incentivos, por todo o apoio, por me ter ajudado em todas as alturas, um muito obrigado.

Resumo

Para a produção de bioetanol podem ser utilizadas várias matérias-primas, entre os quais o soro do queijo, um efluente da indústria de laticínios rico em açúcares mas considerado um forte poluente e um grande problema ambiental. Para a fermentação do soro do queijo é necessário usar uma com capacidade de metabolizar a lactose em etanol. Realizou-se um *screening* de três leveduras *Kluyveromyces sp.* com capacidade fermentativa em meios contendo lactose. As três estirpes utilizadas: *Kluyveromyces lactis* CECT 10371, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 apresentaram um perfil de fermentação semelhante, e obtiveram valores de etanol máximos entre 35 e 41 g/l.

Foi identificada a estirpe de *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 com a melhor capacidade fermentativa, em meio de fermentação com o soro do queijo de cabra concentrado a 100 g/l, visto apresentar um valor de produtividade etanólica superior relativamente às restantes leveduras.

Utilizando a levedura selecionada, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e o soro de queijo de cabra completo, testaram-se várias fontes de azoto: peptona e extrato de levedura, ureia e sem adição de azoto adicional. A utilização de peptona e extrato de levedura como fonte de azoto promoveu o aumento do $Y_{E/S}$ e da produtividade de etanol, A ureia não influenciou a produção de etanol indicando que não é metabolizada pela levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360. A proteína presente no soro também não parece metabolizável como fonte de azoto na fermentação alcoólica.

Efectuou-se um ensaio em reator biológico STR em que se testou o efeito do arejamento inicialmente a 0,13 vvm e após 24h alterando para 0,042 vvm utilizando as mesmas condições anteriormente estudadas. Através de ensaio conclui-se que a oxigenação durante a produção de etanol é fundamental quando utilizada a *Kluyveromyces lactis* CBS 2360.

Palavras chave: Bioetanol, Soro do queijo, Efluente, *Kluyveromyces sp.*, Fermentação.

Abstract

Several feed-stocks can be used for bioethanol production, such as cheese whey, which is an effluent from dairy industry. Cheese whey has a high sugar content, but it's considered to be a dangerous pollutant and a major environmental problem.

It's required in cheese whey fermentation the use of *Kluyveromyces sp.* yeast, which has the ability to metabolize lactose into ethanol. It was performed a screening of three *Kluyveromyces sp.* yeasts, which achieved a maximum ethanol concentration between 35 and 41 g/l. The three tested yeasts: *Kluyveromyces lactis* CECT 10371, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 showed a similar fermentation profile.

After the first screening, an assay was performed to identify the *Kluyveromyces sp.* strain with the best fermentative performance, using goat cheese whey concentrated at 100 g/l of lactose, as the fermentation medium. It was possible to verify that the yeast with better ethanol productivity was *Kluyveromyces lactis* CBS 2360.

Then, using the chosen yeast strain and crude goat cheese whey, were tested different nitrogen sources: peptone and yeast extract, urea and a cheese whey without any additional nitrogen source. The results demonstrated that peptone and yeast extract promoted an increase in $Y_{E/S}$ (0,44 g/g) and ethanol productivity (1,09 g/l.h).

At the end of the present work, it was executed an assay on a STR bioreactor, to test the effect of aeration. Initially, an aeration rate of 0,13 vvm was used and, after 24h of fermentation, it was decreased to 0,042 vvm, using the same conditions referred above. With this assay it was possible to conclude that the oxygenation during ethanol production is fundamental when using the yeast *Kluyveromyces lactis* CBS 2360

Keywords: Bioethanol, Cheese Whey, Effluent, Fermentation, *Kluyveromyces sp.*, Fermentation,

Índice

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract.....	VI
Índice de abreviaturas	IX
Índice de figuras	XI
Índice de tabelas	XIII
1.Introdução	1
1.1. Enquadramento.....	1
1.2. Biocombustíveis	2
1.3. Produção de Bioetanol.....	3
1.4. Resíduos agro-industriais	5
1.4.1. Soro do queijo.....	5
1.5. Microrganismos fermentativos	8
2.4.1. <i>Kluyveromyces sp.</i>	12
2.Objetivos.....	16
3.Materiais e Métodos	17
3.1.Matéria-prima	17
3.1.1.Concentração do soro do queijo	17
3.2.Microrganismos	17
3.2.1Condições de armazenamento e crescimento	17
3.3.Ensaio experimentais	19
3.3.1. <i>Screening</i> das estirpes <i>Kluyveromyces sp.</i> utilizando como fonte de carbono a lactose	19
3.3.2. Fermentação do soro do queijo de cabra como fonte de carbono utilizando as leveduras <i>Kluyveromyces sp.</i>	20

3.3.3. Fermentação do soro do queijo de cabra com a estirpe <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 utilizando várias fontes de azoto.....	21
3.3.4. Fermentação do soro do queijo com a estirpe <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 em STR.....	21
3.4.Métodos analíticos.....	22
3.4.1.Determinação da densidade ótica por espectrofotometria do visível.....	22
3.4.2.Determinação das unidades formadoras de colónias (UFC's).....	22
3.4.3.Determinação da biomassa.....	23
3.4.4.Quantificação da lactose e do etanol.....	23
3.5.Caracterização da cinética de crescimento.....	24
3.5.1.Taxa específica de crescimento.....	24
3.5.2.Tempo de duplicação.....	24
3.5.3.Rendimento da biomassa produzida em relação ao substrato consumido.....	24
3.5.4.Rendimento do etanol produzido em relação ao substrato consumido.....	24
3.5.6.Produtividade máxima.....	25
3.6.Tratamento estatístico.....	25
4. Resultados e discussão.....	26
4.1. <i>Screening</i> de estirpes de <i>Kluyveromyces sp.</i> utilizando como fonte de carbono a lactose.....	26
4.2. Fermentação do soro de queijo de cabra como fonte de carbono com <i>Kluyveromyces sp.</i>	30
4.3-Fermentação do soro do queijo com a estirpe de levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 utilizando várias fontes de azoto.....	34
4.4-Fermentação do soro do queijo com estirpe de levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 em STR em condições de microarejamento.....	40
5.Conclusões.....	45
6.Perspectivas futuras.....	47
7.Bibliografia.....	48

Índice de abreviaturas

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CBO	Carência biológica de oxigênio
CBS	KNAW Fungal Biodiversity Centre
CE	Comunidade Europeia
CECT	Colecção espanhola de culturas tipo
CIMA	Centro de Investigação Marinha e Ambiental
CO ₂	Dióxido de Carbono
CQO	Carência química de oxigênio
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
EUA	Estados Unidos Da america
GEE	Gases de efeito de estufa
GRAS	Geralmente como segura
HNO ₃	Ácido nítrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LEBA	Laboratório de engenharia e biotecnologia ambiental
NADH	Dinucleótido de adenina nicotinamida fosfato reduzida
NO _x	Óxido de azoto
P _i	Piruvato
SO ₂	Dióxido de enxofre
sp.	Species

STR	<i>Stirred tank</i> reactor
td	Tempo de duplicação
$t_{\text{estacionário}}$	Tempo fase estacionária
UALG	Universidade do Algarve
UDP	Difosfato de uridina
UE	União Europeia
UFC	Unidades formadoras de colónias
V_{vm}	Volume de gás por volume útil no reator biológico por minuto
$Y_{E/S}$	Rendimento de etanol em relação ao substrato
$Y_{X/S}$	Rendimento da biomassa em relação ao substrato
YEPD	<i>Yeast extract peptona</i> dextrose
YPL	<i>Yeast extract peptone</i> Lactose
μ	Taxa específica de crescimento

Índice de figuras

Figura 1- Soro do queijo proveniente coagulação da caseína do leite.	6
Figura 2- Estrutura química da lactose, adaptado de (Berg et al., 2002).	7
Figura 3- Mecanismo da glicólise, adaptado de (Tortora et al., 2012).....	9
Figura 4- Ciclo de Krebs, adaptado de (Quintas et al., 2008).	10
Figura 5- Tipos de fermentação. a) Fermentação láctica b) Fermentação alcoólica, adaptado de (Tortora et al., 2012).....	11
Figura 6- Reação da fermentação alcoólica, adaptado de (Voet and Voet, 2006).	11
Figura 7- Catabolismo da galactose pela via de Leloir , adaptado de (Holden et al., 2003).....	14
Figura 8- Perfil de produção de etanol das leveduras <i>Kluyveromyces sp.</i> utilizando lactose comercial como substrato (A) <i>Kluyveromyces lactis</i> CECT 10361 (B) <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 (C) <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10370 (D) <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 em crescimento em erlenmeyer com uma concentração de lactose de cerca de 100 g/l. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30±1 °C. Todos os dados acima representados referem-se a valores médios (n=3) e os erros padrão,correspondente.	27
Figura 9- Perfil de produção de etanol das leveduras <i>Kluyveromyces sp</i> utilizando soro do queijo como substrato concentrado a 100 g/l de lactose (A) <i>Kluyveromyces lactis</i> CECT 10361 (B) <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 (C) <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10370 em crescimento em erlenmeyer com uma concentração de lactose de cerca de 100 g/l o. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30±1 °C. Todos os dados acima representados referem-se a valores médios (n=3) e os erros padrão correspondente.	31

Figura 10- *Erlenmeyers* contendo os meios fermentativos com as diferentes fontes de azoto. (A) peptona (5 g/l) +extrato de levedura (3 g/l) (B) ureia (3 g/l) (C) soro de queijo de cabra (80 g/l)..... 36

Figura 11- Perfil de produção de etanol da estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360. utilizando soro do queijo como substrato (A) 3 g/l de extrato de levedura e 5 g/l de peptona (B) 3 g/l de ureia (C) sem fonte de azoto adicionada em crescimento em *erlenmeyer* com uma concentração de lactose de cerca de 80 g/l utilizando o soro do queijo como substrato. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30 ± 1 °C. Todos os dados acima representados referem-se a valores médios (n=3) e os erros padrão correspondente. 37

Figura 12- Reator biológico STR contendo meio fermentativo composto por soro do queijo concentrado a 100 g/l de lactose, peptona e extrato de levedura utilizando a *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 41

Figura 13- Perfil de produção de etanol da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em reator biológico STR de 3 l utilizando soro do queijo como substrato. Utilizou-se inicialmente um arejamento de 0,13 vvm alterando às 24h para 0,042 vvm .O crescimento foi acompanhando com o logaritmo do peso seco, modelação pelo *software* DMFIT, produção de etanol e consumo de lactose. A fermentação decorreu durante 96h a 250 rpm e a uma temperatura de 30 ± 1 °C. Todos os dados acima representados referem-se a valores médios (n=3) e os erros padrão. 41

Índice de tabelas

Tabela 1- Produção anual de bioetanol, adaptado de (Renewable Fuels Association, 2014).....	5
Tabela 2- Parâmetros de crescimento e de produção de etanol determinados para as fermentações em <i>erlenmeyers</i> com 100 g/l de lactose utilizando as estirpes: <i>Kluyveromyces lactis</i> CECT 10361, <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360, <i>Kluyveromyces</i> CECT 10370. As fermentações decorreram durante 96h, numa agitadora orbital com uma agitação de 150 rpm e a temperatura de 30±1 °C	28
Tabela 3- Parâmetros de crescimento e de produção de etanol determinados para as fermentações em <i>erlenmeyers</i> com soro do queijo concentrado a 100 g/l de lactose, utilizando as leveduras <i>Kluyveromyces lactis</i> CECT 10361, <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360, <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10370. As fermentações decorreram durante 96h, numa agitadora orbital com uma agitação de 150 rpm e a temperatura de 30±1 °C	31
Tabela 4- Parâmetros de crescimento e de produção de etanol determinados para as fermentações com a estirpe de levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360, em <i>erlenmeyer</i> com uma concentração de 80 g/l de lactose e com diferentes fontes de azoto 5g/l de extrato de levedura e 3 g/l peptona, 3 g/l ureia e sem adição de fonte de azoto. As fermentações decorreram durante 96h, numa agitadora orbital com uma agitação de 150 rpm e a temperatura de 30±1 °C	38
Tabela 5- Parâmetros determinados para a fermentação em reator biológico STR de 3l com levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 utilizando como substrato o soro do queijo de cabra com uma concentração de 100 g/l de lactose. Utilizou-se um arejamento inicial de 0,13 vvm alterando para 0,042 vvm às 24h. As fermentações decorreram durante 96h, com uma agitação de 250 rpm e à temperatura de 30±1 °C.	42
Tabela 6- Parâmetros de crescimento determinados para a fermentação em reator biológico STR 3l e erlenmeyer com o soro do queijo de cabra concentrado a 100 g/l de lactose descrito anteriormente utilizando a levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS	43

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Nas últimas décadas, tem vindo a notar-se uma crescente preocupação em relação à questão do aquecimento global. O aumento constante do preço dos combustíveis também tem sido alvo de preocupação. Consequentemente, estes fatores têm influenciado a procura de biocombustíveis, tais como o bioetanol e o biodiesel (Lima-Costa et al., 2012), uma vez que estes prometem ser economicamente mais rentáveis e muito menos poluentes que os combustíveis fósseis (Jegannathan et al., 2009).

Os combustíveis fósseis são responsáveis pelo elevado consumo da energia a nível mundial, cerca de 80,3%, sendo que cerca de 57,7% é usado no sector dos transportes (Escobar et al., 2009). Logo, facilmente se conclui que a utilização de combustíveis fósseis contribui em grande parte para a emissão de gases de efeito de estufa (GEE), CO₂, SO₂ e NO_x, entre outros.(Jegannathan et al., 2009).

A União Europeia (UE) tem vindo cada vez mais a incentivar a produção de biocombustíveis e a utilização de energias renováveis, tendo sido criada no Parlamento e Conselho Europeu a Diretiva 2003/30/CE de 8 de Maio de 2003. Esta Diretiva vem dar ênfase ao Protocolo de Quioto e ao Plano de Ação de Bali, visto que estes promovem a procura de novas fontes de energia renováveis (Europeu, 2003).

Em 2009, a Diretiva 2003/30/CE de 8 de Maio de 2003 foi transposta para a Diretiva 2009/20/CE de 23 de Abril de 2009, sendo que esta realça a utilização de biocombustíveis e a investigação de tecnologias renováveis. Esta diretiva define que até 2017 a redução de emissões de GEE deve rondar os 35 %, a partir de 2017 os 50% e após 2018 a redução de emissões deve ser de 60%. (Europeu, 2009)

O plano de Ação de Bali e o Protocolo de Quioto incentivam o uso de fontes renováveis e a redução da emissão de GEE (principal causa do aquecimento global), e obrigando assim os países desenvolvidos a limitar ou a reduzir as emissões dos GEE (Europeu, 2003).

Sendo Portugal um membro da UE, foi publicado em 2013 um decreto de lei (nº 39/2013 de 18 de Março de 2013), definindo que até 2020 o sector de transportes teria de utilizar 10% de energia proveniente de fontes renováveis e cumprindo os critérios de sustentabilidade (Republica, 2013).

Atualmente, os veículos em circulação na União Europeia, são capazes de utilizar sem problemas uma mistura combustível fóssil com baixo teor de biocombustíveis. Com os avanços tecnológicos pretende-se utilizar até 10% de biocombustíveis na mistura (Europeu, 2003). Em 2013 a taxa de incorporação de biocombustíveis nos transportes europeus rondou os 4,7 % (Observ'er, 2014)

1.2. Biocombustíveis

De acordo com o Decreto-Lei nº 39/2013 de 18 de Março de 2013, biocombustíveis são combustíveis líquidos ou gasosos usados em transportes, produzidos a partir de biomassa. Segundo o mesmo decreto-lei, a biomassa é definida como a fração biodegradável de produtos residuais e detritos de origem biológica provenientes da agricultura ou de resíduos industriais e urbanos. Os biocombustíveis podem ser classificados como de primeira, segunda e terceira geração.

Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de matérias-primas de origem agrícola como o caso do milho, a cana-de-açúcar, sorgo, entre outros. A produção destes biocombustíveis tem aumentado nos últimos anos devido ao aumento do preço do petróleo. A produção de biocombustíveis de primeira geração origina uma grande procura de matérias-primas agrícolas (Singh and Singh, 2011). Uma das grandes consequências da utilização de matérias-primas de origem agrícola para a produção de biocombustíveis, é a transferência da utilização das terras aráveis para culturas da alimentação humana para a produção de biocombustíveis e o aumento do preço destes produtos agrícolas, dando origem ao grande debate mundial, *food vs fuel*, (A. Singh et al., 2011).

Nos últimos anos têm surgido grandes críticas à produção de biocombustíveis de primeira geração sendo as principais razões o facto de estes serem considerados não sustentáveis e competirem diretamente com a alimentação humana. Os biocombustíveis de segunda e terceira geração surgem como uma alternativa sustentável à primeira geração.

Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir de biomassa, ou seja, a partir de resíduos agro-industriais, resíduos de indústrias ou de biomassa lignocelulósica (Lima-Costa et al., 2012). Estes biocombustíveis têm como vantagens o facto de não se utilizarem como matéria-prima produtos que competem com a alimentação e serem de baixo custo, matérias-primas que sem valor comercial, poderão ser valorizadas, e ainda utilizar resíduos que apresentem uma elevada carga poluentes, em que muitas vezes o seu tratamento é demasiado dispendioso (Nigam and Singh, 2011).

Os biocombustíveis de terceira geração surgiram como uma alternativa aos inconvenientes associados aos biocombustíveis de primeira e segunda geração. Estes biocombustíveis são produzidos a partir de algas ou cianobactérias (Nigam and Singh, 2011). As algas cada vez mais estão a ser utilizadas para a produção de biocombustíveis, visto que tem um ciclo de crescimento menor em comparação com outros microrganismos tem a capacidade de acumular lípidos e algumas algas são ricas em hidratos de carbono o que permite assim serem utilizadas na produção de biodiesel e bioetanol (Chaudhary et al., 2014).

Existem diferentes tipos de biocombustíveis, gasosos e líquidos, tais como biometanol, bioéter dimetilico, biocombustíveis sintéticos e biohidrogénio, sendo os mais utilizados na União Europeia o bioetanol, biogás e biodiesel (Observ'er, 2014)

1.3. Produção de Bioetanol

O etanol também conhecido como álcool etílico é o álcool mais comum, sendo a sua fórmula molecular é $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (Balat et al., 2008).

A diretiva 2003/30/CE de 8 de Maio de 2003 define bioetanol como sendo o etanol produzido a partir de biomassa e/ou a fração biodegradável de resíduos, para a utilização de biocombustíveis.

O bioetanol é obtido através de processos fermentativos em que são utilizadas matérias-primas ricas em açúcares ou que podem ser convertidas em açúcar como o amido ou a celulose, sendo neste caso necessário um processo complexo de hidrólise antes de ocorrer a fermentação.

Quando utilizadas matérias primas como o milho, trigo e batata é encontrado o amido na sua constituição. O amido é formado por dois polímeros: amilose e

amilopectina em que é necessário um pré-tratamento ácido ou enzimático para que os microrganismos utilizados na produção de bioetanol consigam fermentar. (Hashem and Darwish, 2010).

A biomassa lenhocelulósica, constituída por celulose, hemicelulose e lenhina pode ser encontrada em três grupos de resíduos: agrícolas (palhas de trigo, palhas de milho), resíduos de madeira e resíduos de indústrias de papel. Este tipo de resíduos necessitam de um pré-tratamento, como sendo hidrólises ácidas ou enzimáticas, para que os açúcares fermentáveis sejam disponibilizados para o processo fermentativo (Foyle et al., 2007).

A produção de bioetanol pode ser realizada através de quatro modos de operação: modo *batch* (cultura descontínua) em que o substrato e o microrganismo são colocados juntamente no reator biológico com os nutrientes; modo Contínuo, em que o meio de cultura e os outros nutrientes são introduzidos continuamente no reator biológico sendo necessário manter o volume do meio constante; modo *fed-batch*, considerado uma combinação entre o modo *batch* e a cultura contínua onde o substrato e/ou os microrganismos são adicionados em intervalos constantes; modo semi-contínuo em que uma parte do meio é removida esporadicamente (Çaylak and Sukan, 1998).

O produto obtido através da fermentação alcoólica tem de ser destilado para se obter o bioetanol puro e anidro (Demirbas, 2011; Jegannathan et al., 2009).

O bioetanol é um combustível alternativo bastante atraente por permitir a redução das emissões de gases, como o CO₂ e o NO_x, na combustão dos veículos, devido a ser um combustível bastante oxigenado, uma vez que contém 35% de oxigénio (Balat et al., 2008).

Ao longo dos anos a produção mundial de bioetanol tem vindo a aumentar, tal como podemos verificar na tabela 1, salientando que de 2006 a 2010 a produção de bioetanol duplicou (Renewable Fuels Association, 2014)

Tabela 1- Produção anual de bioetanol, adaptado de (Renewable Fuels Association, 2014).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Milhões de litros	39,25	49,63	66,08	73,09	85,05	84,05	85,09

O Brasil e os Estados Unidos da América (EUA) são os principais produtores de bioetanol, representando cerca de 62% da produção mundial (Jegannathan et al., 2009). Ambos produzem maioritariamente biocombustíveis de primeira geração, uma vez que o Brasil os EUA utilizam como principal matéria-prima a cana-de-açúcar e o milho, respetivamente (Jegannathan et al., 2009).

1.4. Resíduos agro-industriais

Nos últimos anos a tendência para reutilizar resíduos agro-industriais tem vindo a aumentar (Pandey et al., 2000). Esses resíduos podem ser provenientes da agricultura ou da indústria, e o facto de serem substratos de baixo custo abundantes, torna-os uma boa alternativa às matérias-primas de origem vegetal alimentar para a produção de bioetanol. Alguns desses resíduos têm de ser tratados antes de enviados para estação de tratamento de águas residuais (ETAR's), e por isso, a sua reutilização evita assim esse esforço e custo adicional do tratamento (Sarkar et al., 2012).

Para a produção de bioetanol podem se utilizar vários resíduos agro-industriais, entre os quais os resíduos de alfarroba (Lima-Costa et al., 2012), palha de arroz (Belal, 2013); palha de cevada (Duque et al., 2014), palha de trigo (Karagöz and Özkan, 2014), resíduos florestais (McIntosh et al., 2012), bagaço de cana-de-açúcar (Khuong et al., 2014), melação de beterraba (Akbas et al., 2014) ou até mesmo resíduos oriundos de queijarias e indústrias de azeite (Dareioti and Kornaros, 2014). A utilização e disponibilidade dos resíduos agro-industriais para produzir bioetanol varia consoante a área geográfica e a sua disponibilidade.

1.4.1. Soro do queijo

O soro do queijo é um efluente das indústrias de queijo. É a parte aquosa de cor amarela esverdeada (figura 1), produzida durante a coagulação da caseína do leite (Prazeres et al., 2012). Estima-se que seja produzido por ano em todo o mundo, 10^8

toneladas de soro do queijo, tendo em conta que ao produzir 1kg de coalhada de queijo produz aproximadamente 9 litros de soro do queijo (Toyoda and Ohtaguchi, 2008).

Em Portugal produz-se cerca de 500000 a 560000 toneladas por ano de soro líquido, sendo que 60% pertence à produção de queijo, sendo que o restante pertence à produção dos restantes laticínios (Tecninvest and Frazão, 2001).



Figura 1- Soro do queijo proveniente coagulação da caseína do leite.

O soro do queijo retém aproximadamente 55% dos nutrientes do leite e é maioritariamente composto por água, cerca de 92 %. Fazem também parte da sua composição lactose (4,5-5% p/v), proteínas solúveis (0,6-0,8% p/v), lípidos (0,4-0,5 % p/v), sais minerais (8-10% de extrato seco), ácido láctico e cítrico (0.05% w/v) e ainda quantidades muito pequenas de ureia, ácido úrico, e grupos de vitaminas B. A composição do soro do queijo varia consoante o tipo de leite utilizado na confeção do queijo (Guimarães et al., 2010).

Nos últimos anos a produção de queijo aumentou e como consequência o volume de soro do queijo produzido atingiu valores elevados. A maior parte desse soro antigamente era desviado para cursos de água (ribeiras e rios), sendo agora desviado para as ETAR's da rede de esgotos público devido á legislação. O soro é um problema ambiental (Guimarães et al., 2010) e é fundamental que este efluente seja tratado antes de ir para o esgoto de rede publica, uma vez que o valor de carência química de oxigénio (CQO) é aproximadamente 60-80 g/l, e a carência biológica de oxigénio (CBO) é de 30-80 g/l (Zoppellari and Bardi, 2013). A reutilização do soro do queijo diminui o

seu impacto ambiental e reduz os elevados custos associados ao seu tratamento como efluente industrial (Yadav et al., 2014).

As excelentes propriedades nutricionais, biológicas e funcionais das proteínas presentes no soro do queijo possibilitam a valorização deste excedente. A realização da extração das proteínas presentes no soro do queijo permite que estas sejam utilizadas como suplemento nutricional (Siso, 1996).

O açúcar presente no soro do queijo é a lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), cuja denominação química é 4-*O*- β -D-galactopyranosyl-D-glucose (Figura 2). A lactose é um dissacarídeo constituído por uma unidade de galactose e outra de glucose, e quando comparada com outros açúcares, apresenta um sabor menos doce. Este açúcar é também o grande responsável pelo alto valor de CBO que o soro do queijo apresenta (Guimarães et al., 2010).

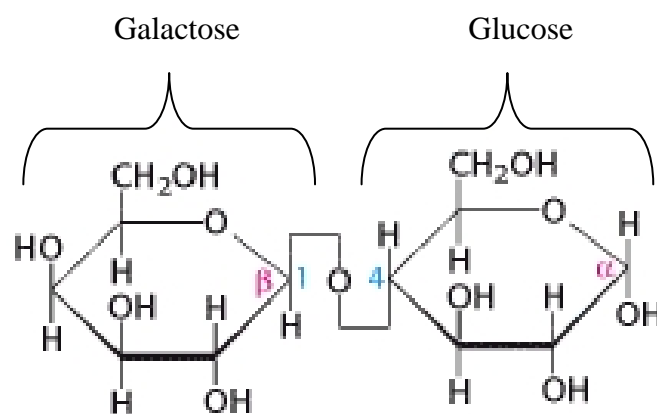


Figura 2-Estrutura química da lactose, adaptado de (Berg et al., 2002).

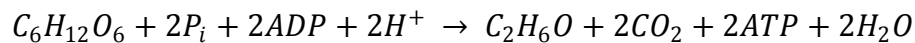
A presença da lactose e de proteínas do leite no soro do queijo torna-o um substrato ótimo para a produção de bioetanol, visto ter na sua composição uma fonte de carbono e de azoto para o processo fermentativo (Serpil Ozmihci and Kargi, 2007).

Para além da produção de bioetanol, o excedente de soro de queijo pode ser transformado em vários produtos, entre os quais: ácido láctico, enzimas, biogás, kefir, produtos probióticos e proteína unicelular (Yadav et al., 2014).

1.5. Microrganismos fermentativos

A fermentação é definida pelo processo bioquímico em que ocorre a redução de óxido da geração de ATP na ausência de oxigênio e em compostos orgânicos que agem como doadores ou aceitadores de elétrons (Guimarães, 2008).

A produção de bioetanol ocorre através de uma reação bioquímica, fermentação alcoólica que consiste na transformação de açúcares em etanol e CO₂ (reação 1), devido à atividade enzimática de enzimas existentes nos microrganismos, sendo os mais comuns, as leveduras (Tortora et al., 2012).



Reação 1

Antes de ocorrer a fermentação é necessário que haja a glicólise. A glicólise é uma sequência de dez reações enzimáticas que ocorrem no citoplasma, na qual a molécula de glucose (seis carbonos) é oxidada produzindo duas moléculas de piruvato (três carbonos), e uma quantidade reduzida de ATP. A glicólise é dividida em duas fases (figura 3): a fase onde é consumido ATP, ocorre a fosforilação da glucose com a produção de 2 moléculas de 3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase; a segunda fase, designada de fase de produção, inicia-se com a oxidação do 3-fosfato de gliceraldeído e terminando com a produção de piruvato (Quintas et al., 2008).

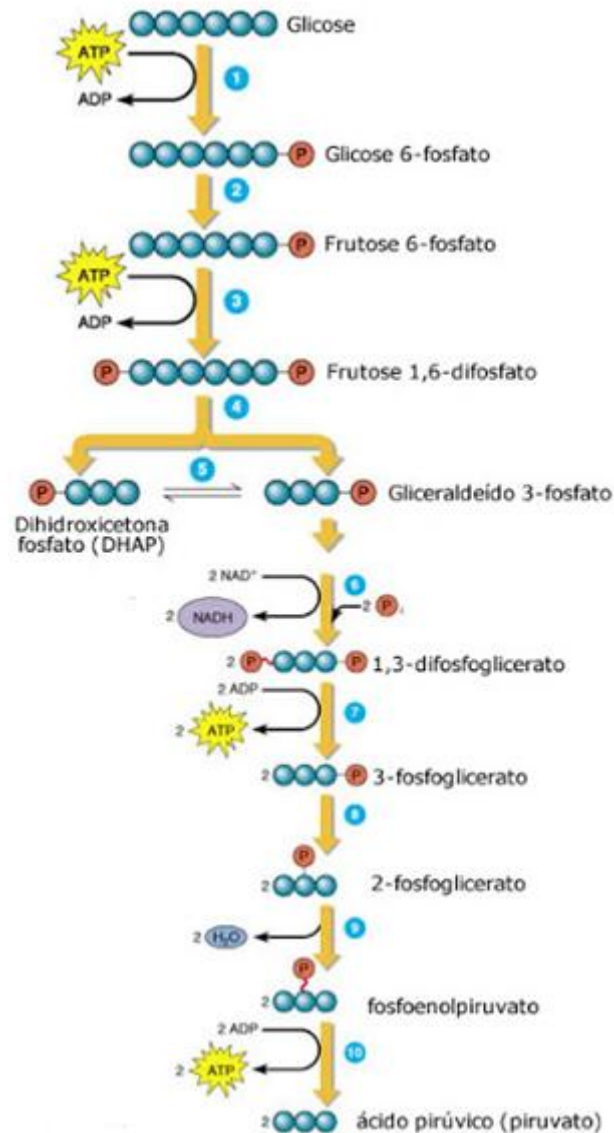


Figura 3- Mecanismo da glicólise, adaptado de (Tortora et al., 2012).

O piruvato obtido através da glicólise pode seguir duas vias: a respiratória, através do ciclo de Krebs e a via fermentativa.

No metabolismo aeróbio as moléculas de piruvato produzidas durante a glicólise são descarboxiladas a acetil-coA, esta molécula vai posteriormente entrar no ciclo de Krebs na mitocôndria. O ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico é um conjunto de nove reacções divididas em duas fases: a primeira fase é chamada de descarboxilação que é iniciada com a formação de citrato (com 6 carbonos), onde são removidos dois carbonos na forma de CO_2 e originando succinil-CoA; a segunda fase é denominada de fase

oxidativa que termina com a formação de oxaloacetato que está pronto a reagir com o acetil-CoA (Figura 4) (Quintas et al., 2008)

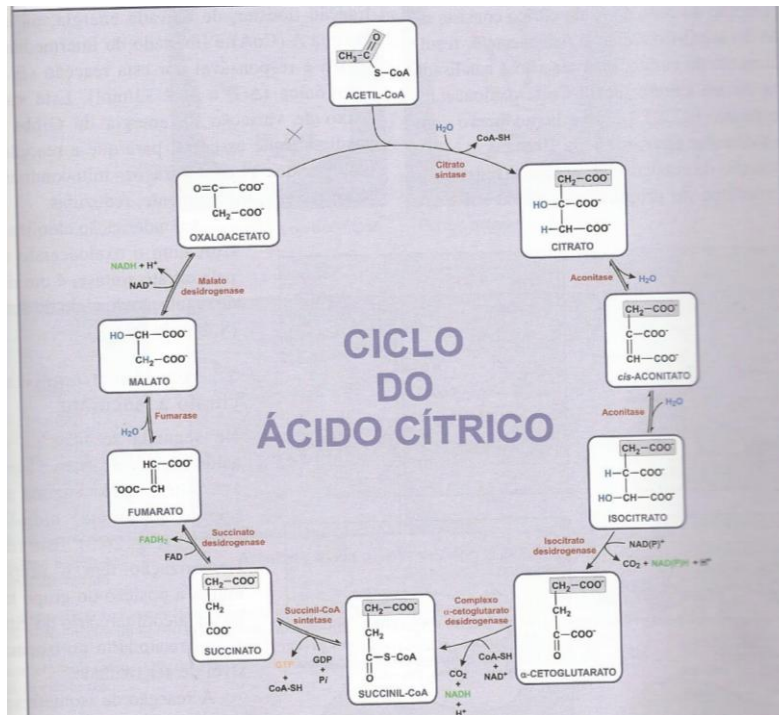


Figura 4- Ciclo de Krebs, adaptado de (Quintas et al., 2008).

O piruvato ao seguir a via fermentativa pode seguir dois destinos: a fermentação láctica e a fermentação alcoólica (figura 5). Na fermentação láctica o piruvato sofre uma redução pelo NADH formando-se lactato, catalisada por uma desidrogenase (Tortora et al., 2012).

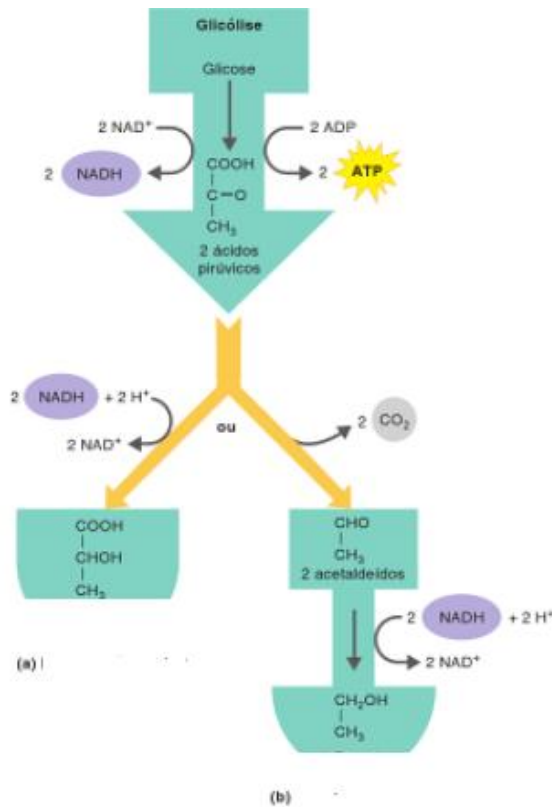


Figura 5- Tipos de fermentação. a) Fermentação láctica b) Fermentação alcoólica, adaptado de (Tortora et al., 2012).

A fermentação alcoólica ocorre em duas fases: na primeira fase ocorre a descarboxilação do piruvato e na segunda etapa ocorre a redução do acetaldéido a etanol pelo NADH como podemos observar na figura 6 (Tortora et al., 2012).

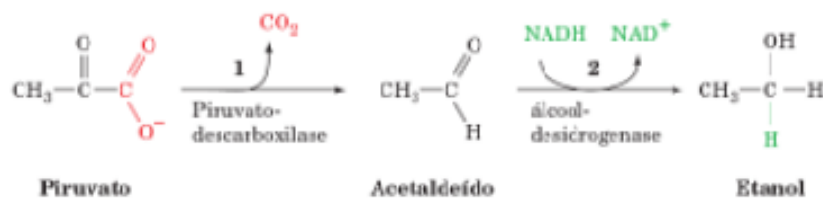


Figura 6- Reação da fermentação alcoólica, adaptado de (Voet and Voet, 2006).

Na produção de etanol podem ser utilizados vários microrganismos, mas é preciso ter em conta diversos aspetos para fazer a melhor escolha: é necessário que o microrganismo tenha capacidade fermentativa, elevada tolerância ao etanol e tolerância

a alta temperatura. As leveduras com capacidade fermentativa mais utilizadas mais de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichiastipitis*, *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), *Schizosaccharomyces pombe* e algumas espécies de *Kluyveromyces sp.* (Bayrakci and Koçar, 2014).

Saccharomyces cerevisiae é a levedura convencional para a produção de etanol na indústria. É uma levedura aeróbia facultativa (ajusta-se a condições de aerobiose ou anaerobiose) capaz de fermentar a maior parte dos açúcares. No entanto, não é capaz de fermentar a lactose devido à ausência da enzima β -galactosidase e da permease de lactose, que permite o transporte da lactose para o interior das células (Domingues et al., 2010).

Para utilizar a lactose como fonte de carbono na produção de bioetanol não se pode utilizar estirpes selvagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismo fermentativo. Contudo, existem estirpes recombinadas de *Saccharomyces cerevisiae* que adquiriram por transformação genética capacidade de fermentar lactose (Guimarães et al., 2010).

Pode-se utilizar igualmente fungos tais como *Arpegillus nidulans*, *Neurospora crassa* e *Fusarium graminearum*, ou leveduras como *Candida pseudotropicalis* ou *Kluyveromyces sp.*, que apresentam capacidade de fermentar a lactose (Domingues et al., 2010).

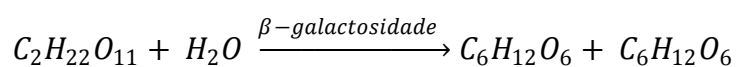
2.4.1. *Kluyveromyces sp.*

As leveduras *Kluyveromyces sp.* são seres unicelulares, esféricos, homotáticos, que pertencem à família *fungi* estando filogeneticamente relacionada com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Normalmente estas leveduras são isoladas a partir de fontes lácticas (Lane and Morrissey, 2010).

As leveduras *Kluyveromyces sp.* são consideradas respiro-fermentativas e termotolerantes. As leveduras, como por exemplo *Saccharomyces cerevisiae*, apresentam o efeito *Crabtree* positivo. Este efeito ocorre, em geral, quando a concentração de glucose no meio fermentativo é elevada, em geral acima de 2% (p/v). Os genes que codificam os citocromos da cadeia respiratória são reprimidos, na presença da glucose, pelo que apenas a via de fermentação fica ativa (Lane and Morrissey, 2010; Lane et al., 2011).

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* a respiração apenas representa 10% do rendimento energético do metabolismo aeróbico enquanto nas leveduras *Kluyveromyces sp.* a via respiratória prevalece sobre a fermentação (Siso et al., 1996).

Para a fermentação de dissacarídeos, como o caso da lactose, é necessário que se dê a clivagem da molécula em monossacarídeos. Para tal, é necessário utilizar microrganismos que tenham enzimas capazes de tal efeito. As levedura *Kluyveromyces sp.* têm essa capacidade por possuírem a enzima de seu nome, β -galactosidase, originando a clivagem da lactose em galactose e glucose (reação 2) (Zoppellari and Bardi, 2013).



Reação 2

Nas diferentes espécies de *Kluyveromyces sp.* a lactose é transportada por uma permease lactose, codificada pelo gene lac 12 para o interior da célula, posteriormente a enzima β -galactosidase codificada pelo gene lac 4 cliva a molécula de lactose, originando 1 molécula de glucose e outra de galactose. A glucose é metabolizada pela via glicolítica, e a galactose é metabolizada pela via de Leloir para originar a glucose, metabolismo demonstrado na figura 7 (Diniz et al., 2012; Silva et al., 2010).

A via de Leloir é composta por 4 etapas como demonstrado na Figura 7. Na primeira etapa a β -D-galactose é convertida em α -D-galactose utilizando a galactose mutarotase, na segunda etapa α -D-galactose é fosforilada pela galactoquinase originando galactose-1-fosfato e por fim na terceira etapa é convertida a UDP-galactose. A última e quarta etapa a UDP-glucose é convertida em glucose-1-fosfato utilizando a UDP-galactose uridiltransferase (Holden et al., 2003).

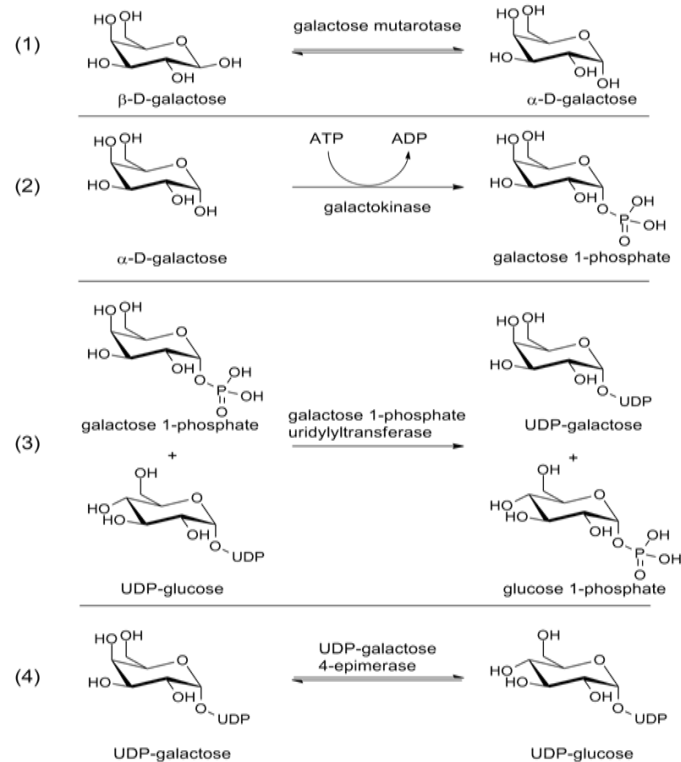


Figura 7- Catabolismo da galactose pela via de Leloir , adaptado de (Holden et al., 2003).

Ao utilizar o soro do queijo como substrato e as espécies de levedura *Kluyveromyces sp.* para a produção de bioetanol é possível ter um rendimento máximo teórico de 0,54 g etanol/g lactose (Serpil Ozmihci and Kargi, 2007).

Existem vários países como Nova Zelândia, EUA e Dinamarca já existem processos industriais estabelecidos para a produção de bioetanol a partir de soro do queijo e utilizando as leveduras *Kluyveromyces sp.* (Guimarães et al., 2010). Na nova Zelândia onde já existe uma produção industrial bastante avançada de bioetanol a partir de soro do queijo o custo desse bioetanol ronda os 0,42-0,49 US\$/L (Gupta and Verma, 2015).

Existem várias estirpes da levedura *Kluyveromyces sp.* utilizadas para a produção de bioetanol a partir do soro do queijo, tais como *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*. As leveduras *Kluyveromyces sp.* são consideradas geralmente como seguras (GRAS) (Lane and Morrissey, 2010).

Neste trabalho de dissertação de mestrado pretende-se utilizar o soro do queijo para produzir bioetanol utilizando várias estirpes de levedura *Kluyveromyces* de maneira

a identificar a que apresenta maior eficiência fermentativa e verificar em que condições são obtidos os melhores resultados. Para tal foram realizadas fermentações em modo descontínuo (*batch*), ou seja, em sistema fechado, o substrato e a cultura de microrganismos são colocados no início da fermentação e o reator apenas permite trocas gasosas (Çaylak and Sukan, 1998).

2.Objetivos

O trabalho desta dissertação de mestrado foi realizado no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA) que pertencente ao Centro de Investigação Marinha e Ambiental (CIMA) da Universidade do Algarve.

O objetivo principal deste trabalho de foi realizar um *screening* e identificar uma estirpe de levedura *Kluyveromyces sp* capaz de fermentar soro do queijo em condições otimizadas para a produção de bioetanol. Com base neste objectivo principal pretenderam-se atingir os seguintes objetivos específicos:

- *Screening* de leveduras *Kluyveromyces sp*.com capacidade para fermentar o soro de queijo.
- Seleção de uma estirpe da levedura *Kluyveromyces sp*. robusta e tolerante a elevadas concentrações de etanol, que apresente elevada produtividade e rendimento etanólico.
- Avaliação de diferentes fontes de azoto no meio fermentativo para a produção de etanol pela estirpe de levedura *Kluyveromyces sp*. seleccionada.
- Estudo do efeito do arejamento na produção de etanol em reator biológico STR de 3L.

3.Materiais e Métodos

3.1.Matéria-prima

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi o soro do queijo de cabra, um efluente da indústria de laticínios que foi gentilmente fornecido pela fábrica artesanal “Portal dos Queijos em São Brás de Alportel”.

3.1.1.Concentração do soro do queijo

O soro de queijo tal como nos é cedido, apresenta uma concentração de lactose de aproximadamente 50 g/l. Neste trabalho, foi necessário concentrar o soro de queijo para obter uma concentração de aproximadamente 100 g/L. O processo de concentração foi efetuado através de evaporação utilizando um evaporador rotativo (Heidolph 94200, Alemanha) à temperatura de à 70 °C.

3.2.Microrganismos

Foram utilizadas cinco estirpes de levedura *Kluyveromyces sp.* : *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 doada pela professora Lídia Dionísio, professora da Universidade do Algarve; *Kluyveromyces lactis* CECT 10361 isolada a partir do queijo, *Kluyveromyces lactis* CECT 1132 isolada a partir de salmoura, *Kluyveromyces marxianus* CECT 10371 e *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 isoladas a partir de iogurte e foram doadas pelo professor José Peinado da Universidade Complutense de Madrid.

3.2.1Condições de armazenamento e crescimento

As leveduras *Kluyveromyces sp.* foram mantidas em placas com meio YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) sólido, com a composição de 10 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de peptona, 20 g/l de glucose e 20 g/l de agar.

Para a cultura das células efetuou-se um pré-inóculo com meio YEPD líquido, com constituição semelhante ao YEPD sólido descrito acima mas retirando o agar.

O meio do inóculo é constituído por 3 g/l de extrato de levedura e 5 g/l de peptona, a fonte de carbono utilizada foi substituída pela mesma que é utilizada na fermentação (lactose comercial ou soro do queijo), com uma concentração total de açúcares de 33 g/l.

O meio de fermentação tem na sua composição 3 g/l de extrato de levedura, 5 g/l de peptona e utiliza como fonte de carbono lactose comercial ou soro do queijo com a concentração de 100 g/l. Nos ensaios onde a ureia foi utilizada como fonte de azoto o extrato de levedura e a peptona presentes nos meios de inoculo e de fermentação foram substituídos por 3 g/l de ureia.

Todos os meios de cultura referidos foram esterilizados por autoclavagem (Uniclave87, Portugal), através de calor húmido a 121 ± 1 °C durante 45 minutos.

Para armazenamento a longo prazo a cultura foi mantida a -80 °C em microtubos de centrífuga com meio YEPD líquido com 30 % (v/v) de glicerol.

As leveduras *Kluyveromyces sp.* Foram repicadas para placas de Petri contendo meio YEPD sólido com a constituição já descrita neste ponto, e incubadas numa estufa (Selecta, Espanha) a 30 ± 1 °C durante 24 a 48 h e seguidamente foram colocadas a 4 °C.

3.2.1.1 Preparação de pré-inóculos , inóculos e fermentações

Após a preparação de 50 ml do meio de cultura do pré-inóculo este é inoculado com a levedura *Kluyveromyces sp.* proveniente do crescimento em placa em meio YEPD sólido e fica a incubar numa agitadora orbital (IKA 4s 4000, Alemanha) com uma agitação de 150 rpm a 30 ± 1 °C durante 48h. Preparou-se posteriormente o inóculo transferindo 10 % (v/v) da suspensão celular proveniente do pré-inóculo, para 45ml ou 90 ml de meio líquido YEPL (*Yeast Extract Peptone Lactose*). Os balões de *erlenmeyer* foram colocados numa agitadora orbital (IKA 4s 4000, Alemanha) durante 48h, a 30 ± 1 °C a 150 rpm.

Uma vez que se pretende que a fermentação seja inoculada com uma concentração celular de 1×10^7 células/ml, foi feita uma contagem das células do inóculo numa câmara de *Neubauer* (Blau Brand, Alemanha), de modo a determinar o volume de inóculo necessário.

As fermentações em balão *erlenmeyer* de 250 ml com 150ml de meio fermentativo, foi realizada em triplicado. Após a inoculação, os balões *erlenmeyer* foram colocados na agitadora (IKA 4s 4000, Alemanha) a 30 ± 1 °C a 150 rpm durante 96 h. A recolha de amostras ao longo das fermentações foi feita em câmara de fluxo laminar (Telstar Bio II A, Espanha) com material estéril, de modo a garantir assepsia durante o tempo de fermentação.

As fermentações sujeitas a *scale up* foram feitas num reator biológico STR de 3l com um volume útil de 2,4l mecanicamente agitado através de um rotor de agitação. Este reator biológico está equipado com uma turbina de *Rushton*, dispersor de ar em L, camisa para controlo da temperatura ligada a um termociclador, condensador e um fluxímetro para controlar o arejamento. O ar introduzido no reator, para o arejamento, foi esterilizado utilizando um filtro de membrana hidrofóbica, com a porosidade de 0,2 µm (Milipore). Os gases que saíram do reator passaram por dois condensadores, com a finalidade de diminuir as perdas etanol. Após este passo, são libertados para o exterior através de um filtro de membrana 0,2 µm (Milipore). Contém ainda sondas para a determinação da percentagem de oxigénio dissolvido, pH e temperatura. O reator encontra-se ligado a uma unidade de controlo digital (Bio Controller ADI 1030 Applikon, Holanda), onde estas variáveis são controladas e monitorizadas, utilizando o software BioXpert, versão 2.1.

Foram recolhidas amostras durante a fermentação em condições de assepsia de duas em duas horas até às 14 h daí para a frente foram recolhidas amostras de três em três horas até as 84 h e até as 96h de seis em seis horas.

Em todas as fermentações as amostras recolhidas foram sujeitas a monitorização da densidade ótica por espectrofotometria, contagem de células viáveis utilizado o método das unidades formadoras de colónias, concentração da biomassa seca por gravimetria, concentração de açúcares e etanol por HPLC. Os procedimentos realizados encontram-se descritos no ponto 3.4.

3.3. Ensaios experimentais

3.3.1. *Screening* das estirpes *Kluyveromyces sp.* utilizando como fonte de carbono a lactose

Com o objetivo de identificar qual das leveduras *Kluyveromyces sp.* apresenta melhor capacidade fermentativa com elevados rendimentos e produtividades etanólicas. Realizou-se quatro fermentações em triplicado utilizando como fonte de carbono lactose comercial com a concentração de 100 g/L e utilizando como fonte de azoto 5 g/l de peptona e 3 g/l de extrato de levedura.

Neste ensaio foram utilizadas cinco estirpes de *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis* CECT 10361, *Kluyveromyces lactis* CECT 1132, *Kluyveromyces*

lactis CBS 2360, *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 *Kluyveromyces marxianus* CECT 10371.

Os ensaios experimentais foram realizados em balões *erlenmeyers* de 250 ml contendo 150 ml de meio fermentativo, descrito no ponto 3.2.1.1. Os meios foram esterilizados na autoclave (Uniclave87, Portugal) e posteriormente inoculados com uma concentração inicial de células de 1×10^7 células/ml. Após a inoculação, foram colocados numa agitadora orbital (IKA-KSA4000i, Alemanha) a incubar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ a 150 rpm durante 96 h, a duração da fermentação. Foram recolhidas amostras nos tempos já referidos anteriormente (ponto 3.2.1.1), sendo analisado posteriormente:

- Crescimento de células viáveis pelo método das unidades formadoras de colónias (UFC'S);
- Determinação da concentração de biomassa seca por gravimetria;
- Análise do crescimento celular por espectrofotometria.
- Quantificação de lactose e de etanol através de HPLC,

3.3.2. Fermentação do soro do queijo de cabra como fonte de carbono utilizando as leveduras *Kluyveromyces sp.*

Neste ensaio experimental foram utilizadas três estirpes de *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis* CECT 10361, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 com o objetivo identificar qual das *Kluyveromyces sp* apresenta melhor capacidade fermentativa e elevados rendimentos e produtividades em etanol, ao utilizar o soro do queijo de cabra como substrato. Realizaram-se 3 fermentações em triplicado utilizando como fonte de carbono soro de queijo de cabra com a concentração de 100 g/l de lactose e utilizando como fonte de azoto 5 g/l de peptona e 3 g/l de extrato de levedura

Foram realizadas nove fermentações em balões *erlenmeyer* de 250 ml contendo 150 ml de meio fermentativo já descritos na ponto 3.2.1.1. Os meios foram esterilizados na (autoclave Uniclave87, Portugal) e posteriormente foram inoculados com uma concentração inicial de células de 1×10^7 células/ml foram colocados numa agitadora orbital (IKA-KSA4000i, Alemanha) a incubar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ a 150 rpm durante 96 h, a duração da fermentação.

3.3.3. Fermentação do soro do queijo de cabra com a estirpe *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 utilizando várias fontes de azoto

Trabalhos realizados anteriormente no LEBA/UALG demonstraram que a mudança de fonte de azoto poderia aumentar os rendimentos etanólicos e proteger a membrana da célula da elevada concentração de etanol.

Utilizando a estirpe *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e com o objetivo de testar o efeito das diferentes fontes de azoto nos rendimentos etanólicos realizou-se três fermentações em triplicado utilizando soro do queijo de cabra como substrato sem fonte adicional e adicionando 5g/l de peptona e 3 g/l extrato de levedura 5 g/l num ensaio e 3g/l de ureia outro ensaio.

As fermentações foram realizadas em balões *erlenmeyer* de 250 ml contendo 150 ml de meio fermentativo já descritos na ponto 3.2.1.1. Os meios foram esterilizados na (autoclave Uniclave87, Portugal) e posteriormente foram inoculados com uma concentração inicial de células de 1×10^7 células/ml foram colocados numa agitadora orbital (IKA-KSA4000i, Alemanha) a incubar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ a 150 rpm durante 96 h, duração da fermentação.

3.3.4. Fermentação do soro do queijo com a estirpe *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em STR

Foi realizado um ensaio experimental em reator biológico STR utilizando a estirpe *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e nas condições anteriormente estudadas com o objetivo de avaliar o efeito do arejamento nos rendimentos etanólicos.

Para avaliar a influência do arejamento realizou-se uma primeira fermentação onde se estabelece um arejamento inicial de 0,13 vvm, em que se pretendeu que a estirpe *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 respire e produza biomassa e após as 24 h diminuiu-se o arejamento para 0,042 vvm para fermentar e produzir etanol. A fermentação foi iniciada com uma concentração celular de 1×10^7 células/ml fermentações, num reator biológico agitado mecanicamente a 250 rpm a uma temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ em modo contínuo.

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Determinação da densidade ótica por espectrofotometria do visível

O crescimento celular é acompanhado utilizando o método de espectrofotometria é feita leitura da densidade ótica no comprimento de onda de 590 nm, contra um branco, sendo este, uma diluição do meio fermentativo antes de ser inoculado numa proporção de 1:20. As amostras analisadas foram também diluídas na mesma proporção que as branco. As amostras foram analisadas num espectrofotômetro e as leituras foram realizadas em triplicado.

3.4.2. Determinação das unidades formadoras de colónias (UFC's)

A contagem de unidades formadora de colónias (UFC's) é um método para acompanhar o crescimento celular e a viabilidade das células. Neste método fazem-se sucessivas diluições das amostras em tubos de ensaio que contenham tampão fosfato. As diluições realizadas vão desde 10^{-1} a 10^{-2} , após feita a primeira diluição com 9,9 ml de tampão PBS e 1 ml de amostra prossegue-se as diluições seguintes. Todas as diluições têm de estar perfeitamente homogeneizadas antes de iniciar uma nova diluição e para tal recorre-se a um agitador (Velpscientific zx3, Italia). No final de todas as diluições estarem prontas, diluindo até a 10^{-6} , as placas de Petri com meio YEPD sólido (descrito na secção 3.2.1) são inoculadas com 3 gotas de 20µl da suspensão celular e colocadas a crescer a 30°C numa estufa de incubação (Incuberm-Raypa, Espanha) durante 48 h, Após o crescimento celular das placas procedeu-se á contagem das colónias formadas, determinando-se assim a concentração de células recorrendo à equação 2:

$$C_{células} = N^{\circ}_{células \text{ na placa}} \times FD \times \frac{1}{V_{inoculado}}$$

Equação 1

$$C_{células} \equiv \text{concentração de células} \left(\frac{UFC's}{mL} \right) N^{\circ}_{células \text{ na placa}} \equiv \text{número de células contadas na placa}$$

$FD \equiv \text{factor de diluição}$

$V_{inoculado} \equiv \text{volume inoculado (mL)}$

3.4.3. Determinação da biomassa

Para seguir o crescimento celular nos ensaios realizados em balões *erlenmeyers* foram recolhidas amostras em triplicado com um volume de 1,2 ml para microtubos de centrífuga de 1,5 ml previamente pesados e secos. Posteriormente foram centrifugados a 13000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5415D, Alemanha). A biomassa fresca é seca numa estufa (Binder FD53, EUA) durante 60 h à temperatura de 70 °C e o sobrenadante é utilizado para a quantificação de lactose e de etanol (descrito no ponto 3.4.4). Após a secagem, os microtubos de centrífuga com a biomassa seca foram arrefecidos à temperatura ambiente e pesados numa balança analítica de precisão (Precisa XB 120 A, Suíça).

Nos ensaios realizados em reator biológico STR foram recolhidas amostras em triplicado de 7 ml para tubos de centrífuga de 15 ml previamente pesados e secos. Após centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos, as amostras recolhidas neste ensaio sofreram o mesmo processo de separação no ponto 3.4.3.

Utilizando os dados da biomassa seca foi possível efetuar uma correlação (equação 2) entre a densidade ótica e o peso seco celular.

$$y = 0,371 x + 0,113$$

Equação 2

A correlação foi utilizada para calcular a biomassa em todos os ensaios experimentais efetuados.

3.4.4. Quantificação da lactose e do etanol

A lactose e o etanol foram quantificados através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o sobrenadante acima referido obtido da centrifugação descrita em 3.4.3 filtrando-o com um filtro com poro de 0,22µm (Milipore) para um vial.

O equipamento de HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom) é constituído por bomba (L-2130), um forno (L-2300), um auto-injector (L-2200) e uma coluna cromatografia (Aminex HPX-87H Biorad) equipada com uma pré-coluna (Carbo-P Biorad). A quantificação foi realizada a 45°C com o eluente 10mM HNO₃, previamente

sujeito a um banho de ultrasons (Ultrason - Selecta) durante 30 min, a um fluxo de 0.5 ml/min.

3.5. Caracterização da cinética de crescimento

3.5.1. Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento (μ), expressa em h^{-1} , é determinada utilizando o programa de modelação *online* DMFIT (<http://modelling.combase.cc>) (Baranyi and Roberts, 1994) que possibilita a determinação da taxa específica de crescimento com base em modelos de aproximação e utiliza o logaritmo natural da concentração celular obtida através do peso seco em função do tempo de fermentação.

3.5.2. Tempo de duplicação

O tempo de duplicação (t_d) foi calculado através da equação 3.

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Equação 3

$t_d \equiv$ tempo de duplicação (h)

$\mu \equiv$ taxa específica de crescimento (h^{-1})

3.5.3. Rendimento da biomassa produzida em relação ao substrato consumido

Para determinar o rendimento da biomassa produzida em relação ao substrato, consumido, expresso em $g_{\text{biomassa produzida}}/g_{\text{substrato consumido}}$, foi efetuada uma regressão linear dos valores de biomassa em relação aos valores de lactose consumidos em função do tempo.

3.5.4. Rendimento do etanol produzido em relação ao substrato consumido

Para determinar o rendimento de etanol produzido em relação ao substrato consumido, foi efetuada uma regressão linear dos valores de etanol em relação aos valores de lactose consumidos em função do tempo.

O rendimento do etanol produzido em relação ao substrato consumido é expresso em $g_{\text{biomassa produzida}}/g_{\text{etanol produzido}}$.

3.5.6. Produtividade máxima

A produtividade máxima foi calculada através de uma regressão linear dos valores de etanol produzido máximo em função do tempo de fermentação.

A produtividade máxima é expressa em g/lh.

3.6. Tratamento estatístico

Em todos os ensaios os dados foram submetidos a análise estatística as regressões lineares foram efetuadas no Microsoft Office Excel 2010 e as análises de variância foram efetuadas pelo teste Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$) no software SigmaPlot versão 12.

4. Resultados e discussão

Neste trabalho de dissertação de mestrado utilizou-se o soro do queijo de cabra como substrato para a produção de bioetanol. Este substrato é bastante rico em lactose, um açúcar fermentável, e em que proteína que presente pode ser utilizada como fonte de azoto necessária ao processo fermentativo.

Em estudos realizados anteriormente no LEBA/UAlg, verificaram que na fermentação do soro do queijo de cabra concentrado a mais de 150 g/l de lactose, por uma estirpe de *Kluyveromyces sp.*, ocorriam inibições, ou seja, a levedura não crescia, nem fermentava adequadamente, obtendo-se concentrações de bioetanol muito baixas e uma elevada concentração de açúcares por consumir. No entanto, ao utilizar o soro do queijo de cabra tal como é colectado na queijaria, o qual tem aproximadamente 50 g/l de lactose, a produção de bioetanol iria ser demasiado reduzida. (Dados não publicados) Por estas razões, optou-se por utilizar neste trabalho de dissertação de mestrado, soro do queijo de cabra concentrado a uma concentração inicial de cerca de 100 g/l de lactose para realizar as fermentações.

4.1. Screening de estirpes de *Kluyveromyces sp.* utilizando como fonte de carbono a lactose

As leveduras *Kluyveromyces sp.* são normalmente utilizadas quando se pretende produzir bioetanol a partir do soro do queijo devido ao facto de serem capazes de metabolizar a lactose.

Para fazer um primeiro *screening* e verificar a capacidade fermentativa das estirpes *Kluyveromyces sp.* utilizou-se lactose comercial como fonte de carbono, Testaram-se as seguintes cinco estirpes de leveduras *Kluyveromyces sp.*: *Kluyveromyces lactis* CECT 10361, *Kluyveromyces lactis* CECT 1132; *Kluyveromyces lactis* CBS 2360; *Kluyveromyces marxianus* CECT 10371; *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370.

Inicialmente procedeu-se ao crescimento das leveduras *Kluyveromyces sp.* em meio sólido YEPD como descrito no ponto 3.2.1 para, posterior utilização na inoculação das culturas líquidas. A levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10371 não cresceu

em meio sólido YEPD, portanto não foi utilizada para em estudos posteriores em meio líquido.

Na figura 8 e na tabela 2 estão representados os perfis de fermentação e os parâmetros cinéticos das estirpes testadas.

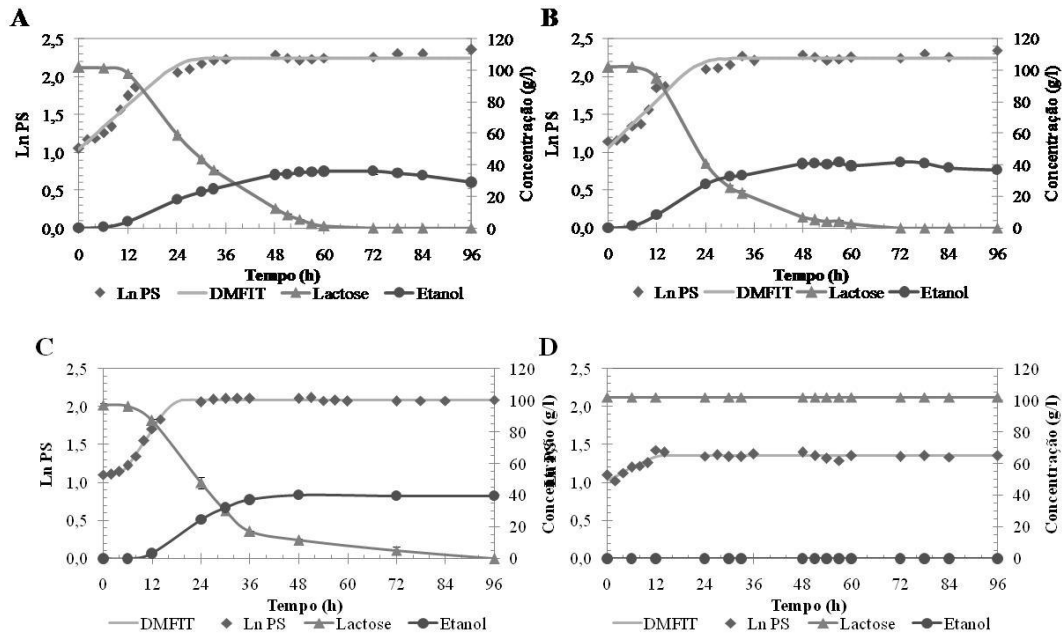


Figura 8- Perfil de produção de etanol das leveduras *Kluyveromyces sp.* utilizando lactose comercial como substrato (A) *Kluyveromyces lactis* CECT 10361 (B) *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 (C) *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 (D) *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em crescimento em erlenmeyer com uma concentração de lactose de cerca de 100 g/l.. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30 ± 1 °C. Todos os dados acima representados referem-se a valores médios (n=3) e os erros padrão, correspondente.

Na figura 8.D, podemos observar o perfil de crescimento cinético da estirpe *Kluyveromyces lactis* CECT 1132 onde é possível verificar que a estirpe não foi capaz de consumir a lactose, deste modo não ocorreu produção de etanol nem de biomassa. A estirpe *Kluyveromyces lactis* CECT 1132 não apresentou capacidade fermentativa da lactose, pelo que não foi utilizada nos trabalhos posteriores.

Tabela 2- Parâmetros de crescimento e de produção de etanol determinados para as fermentações em *erlenmeyers* com 100 g/l de lactose utilizando as estirpes: *Kluyveromyces lactis* CECT 10361, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, *Kluyveromyces* CECT 10370. As fermentações decorreram durante 96h, numa agitadora orbital com uma agitação de 150 rpm e a temperatura de 30±1 °C

	<i>Kluyveromyces lactis</i> CECT 10361	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10370
μ (h ⁻¹)	0,049±0,0044 ^b	0,052±0,0054 ^b	0,085±0,0034 ^a
td (h)	14,15	13,32	8,16
t _{est} (h)	32	30	24
Etanol máximo (g/l)	35,31±0,26 ^b	41,48±0,35 ^a	40,20±0,60 ^a
t Etanol máximo (h)	54	57	48
Conversão da lactose (%)	100	100	100
Y _{E/S} (g/g)	0,36±0,01 ^c	0,40±0,02 ^b	0,48±0,01 ^a
Y _{X/S} (g/g)	0,05±0,00 ^a	0,06±0,01 ^a	0,08±0,01 ^a
Produtividade (g/l.h)	0,71±0,04 ^a	0,89±0,096 ^a	1,07±0,15 ^a

Taxa específica de crescimento (μ), tempo de duplicação (td), tempo de início da fase estacionária (t_{est}) concentração de etanol máximo atingido (Etanol_{máximo}), tempo etanol máximo (t etanol_{máximo}), conversão da lactose, rendimento etanol em relação com o substrato (Y_{E/S}), rendimento biomassa em relação ao substrato (Y_{X/S}) e produtividade de etanol para as diferentes estirpes *Kluyveromyces sp.* Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05)

Ao analisar os perfis de crescimento representado na figura 8 podemos verificar que as estirpes *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 (figura 8.B), *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 (Figura 8.C) têm uma pequena fase de latência de 5 h aproximadamente, enquanto que na estirpe *Kluyveromyces lactis* CECT 10361 (figura 8.A) não se observa essa fase. A fase exponencial nas estirpes *Kluyveromyces lactis* CECT 10361 e na *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 são semelhantes com uma duração aproximada de 30h. A fase exponencial da estirpe *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 é mais curta do que nas outras duas leveduras, mas o crescimento é mais rápido justificando-se a taxa específica de crescimento mais elevada 0,085±0,0034 h⁻¹. Esta observação fica comprovada pelo tempo de duplicação das estirpes *Kluyveromyces sp.* (tabela 2)

podendo concluir que este é nas estirpes *Kluyveromyces lactis* enquanto que na estirpe *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 é menor,

A estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 entra em fase estacionária por volta das 24 h enquanto que as leveduras *Kluyveromyces lactis* CECT 10370 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 entram mais tardiamente, às 32h e 30h, respectivamente. Esta fase não corresponde ao esgotamento da lactose como seria expetável, visto que este açúcar se esgota apenas por volta das 72h de fermentação nas duas estirpes da levedura *Kluyveromyces lactis*, enquanto que na *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 é esgotada apenas às 96 h. A entrada na fase estacionária em cada uma das estirpes pode ser justificada pela presença de etanol endógeno que apresenta a toxicidade celular, como já foi estudado por (N. L. Singh et al., 2011). Nas estirpes *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 às 30h quando a cultura entra em fase estacionária (30h) existe cerca de 32 g/l de etanol que foram suficientes para alterar o metabolismo celular evidenciando sensibilidade á presença de etanol em baixas concentrações. As leveduras *Kluyveromyces* sp têm contudo uma menor tolerância ao etanol do que *Saccharomyces cerevisiae*, pelo que a sua utilização nos processos fermentativos é mais restrita (Shi et al., 2009)

Na estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 a fase estacionária ocorre quando o etanol atinge um valor ligeiramente inferior a 20 g/l sugerindo que esta estirpe apresente uma menor tolerância à presença etanol do que as estirpes de levedura *Kluyveromyces lactis*.

Em ambas as estirpes de levedura *Kluyveromyces lactis* testadas observa-se um ligeiro crescimento diauxico às 84h, visto que nesse tempo a lactose encontra-se esgotada e a levedura utiliza o etanol para produzir biomassa.

A estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 apresenta um $Y_{E/S}$ mais elevado, $0,48 \pm 0,01$ g de etanol/g de lactose (tabela 2) do que as restantes estirpes de levedura *Kluyveromyces lactis* atingindo o máximo às 48h o que pode ser vantajoso numa produção em larga escala

Na estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 observamos que o etanol máximo produzido foi estatisticamente igual ao acumulado pela estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, $40,20 \pm 0,60$ g/l, $41,48 \pm 0,35$ g/l

respetivamente, enquanto que com a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CECT 10361 observa-se um valor inferior $35,31 \pm 0,26$ (tabela 2). Contudo, na estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 1037 a produção máxima ocorre às 48h, enquanto que nas estirpes de levedura *Kluyveromyces lactis* a produtividade máxima ocorre mais tarde.

Nas condições deste trabalho experimental obtiveram-se valores de $Y_{E/S}$ mais elevados do que em trabalhos realizados por outros autores utilizando o mesmo substrato (S Ozmihci and Kargi, 2007). Quanto à produtividade e ao rendimento $Y_{X/S}$ as três estirpes de levedura *Kluyveromyces sp.* apresentam valores estatisticamente iguais, embora a estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 apresente um valor de produtividade de etanol mais elevado.

As estirpes de levedura *Kluyveromyces lactis* CECT 10361, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 apresentam perfis de fermentação e de consumo de lactose similares.

Todas as estirpes testadas obtiveram resultados promissores ao crescer e fermentar em meio contendo 100 g/l de lactose, tendo a estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 apresentado um valor mais elevado de rendimento etanólico (0,48 g/g), próximo do valor de rendimento teórico (0,54 g/g). As três leveduras *Kluyveromyces sp.* vão ser testadas em soro do queijo de cabra como substrato.

4.2. Fermentação do soro de queijo de cabra como fonte de carbono com *Kluyveromyces sp.*

No ponto 4.1 foi feito um *screening* para verificar se as leveduras escolhidas seriam capazes de produzir bioetanol num meio contendo lactose, acabando por identificar três estirpes de *Kluyveromyces sp.* para esse efeito. Com o objetivo de se avaliar se as estirpes de levedura *Kluyveromyces lactis* CECT 10361, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 seriam capazes de fermentar em soro de queijo de cabra e verificar qual delas obtinha melhor capacidade fermentativa e rendimentos etanólicos mais elevados, efetuou-se o presente ensaio experimental. Foram realizados três ensaios em erlenmeyers em triplicado, com as três

estirpes crescidas em meio YEP suplementado com o soro de queijo de cabra concentrado a 100 g/l de lactose, à temperatura de 30 ± 1 °C, durante 96 h.

Na figura 9 estão representados os perfis de fermentação e crescimento e das estirpes de levedura *Kluyveromyces lactis* CECT 10361 (A), *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 (B), *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 (C) e na tabela 3 os respectivos parâmetros de crescimento e produção de etanol.

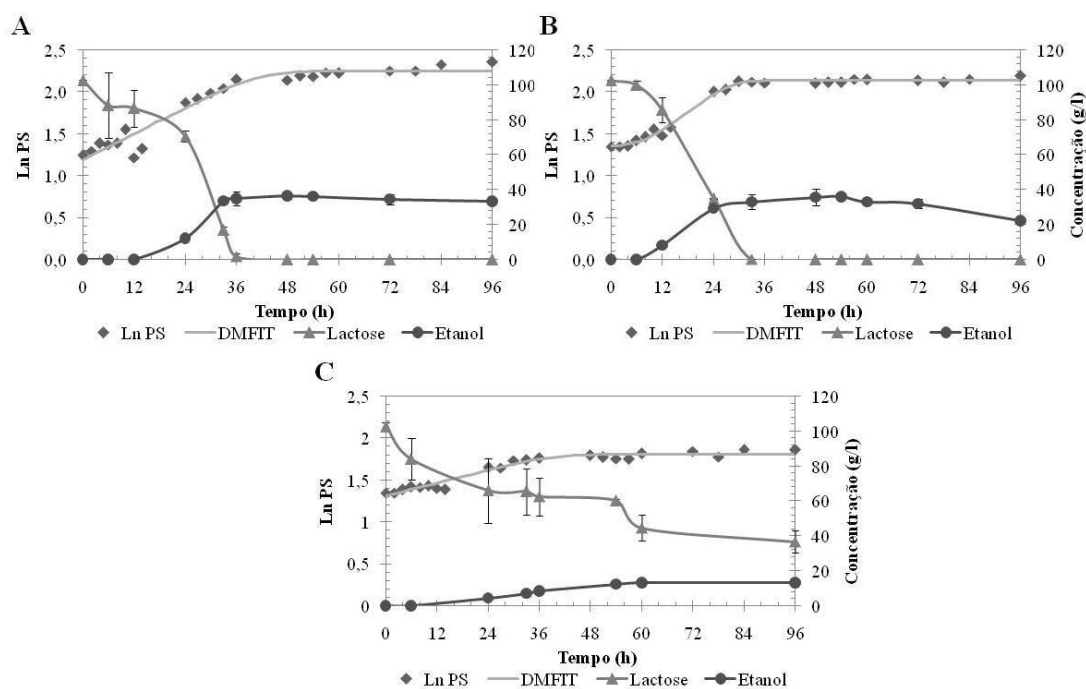


Figura 9- Perfil de produção de etanol das leveduras *Kluyveromyces sp* utilizando soro do queijo como substrato concentrado a 100 g/l de lactose (A) *Kluyveromyces lactis* CECT 10361 (B) *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 (C) *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 em crescimento em erlenmeyer com uma concentração de lactose de cerca de 100 g/l o. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30 ± 1 °C. Todos os dados acima representados referem-se a valores médios ($n=3$) e os erros padrão correspondente.

Tabela 3- Parâmetros de crescimento e de produção de etanol determinados para as fermentações em erlenmeyers com soro do queijo concentrado a 100 g/l de lactose, utilizando as leveduras *Kluyveromyces*

lactis CECT 10361, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370. As fermentações decorreram durante 96h, numa agitadora orbital com uma agitação de 150 rpm e a temperatura de 30 ± 1 °C

	<i>Kluyveromyces lactis</i> CECT 10361	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10370
μ (h ⁻¹)	0,026±0,026 ^b	0,037±0,003 ^a	0,013±0,001 ^c
td (h)	26,97	18,84	54,15
t _{est} (h)	50	36	44
Etanol máximo (g/l)	36,60±1,90 ^a	36,17±0,36 ^a	13,40±0,03 ^b
T Etanol máximo (h)	48	54	96
Conversão de lactose (%)	100	100	64,01
Y E/S (g/g)	0,40±0,02 ^a	0,35±0,02 ^a	0,25±0,03 ^b
Y X/S(g/g)	0,05±0,01 ^a	0,05±0,00 ^a	0,04±0,00 ^a
Produtividade (g/l.h)	0,82±0,11 ^b	0,90±0,17 ^a	0,17±0,03 ^a

Taxa específica de crescimento (μ), tempo de duplicação (td), tempo de início da fase estacionária (t_{est}) concentração de etanol máximo atingido (Etanol_{máximo}), tempo etanol máximo (t_{etanol máximo}), conversão da lactose, rendimento etanol em relação com o substrato (Y_{E/S}), rendimento biomassa em relação ao substrato (Y_{X/S}) e produtividade do etanol para as diferentes estirpes *Kluyveromyces sp.* Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05)

Nos perfis de crescimento das três estirpes de leveduras *Kluyveromyces sp.* representados na figura 9 é possível verifica que apenas a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 (figura9.B) apresenta uma pequena fase de adaptação ao meio fermentativo que dura aproximadamente 7h, o que não se observa na estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CECT 10361 (figura 9.A) e na estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10360 (figura 9.C).

Ao analisar a figura 9.B verifica-se que a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 apresenta uma fase exponencial mais curta (aproximadamente 30h) que as restantes estirpes de leveduras *Kluyveromyces sp.*, evidenciando que esta apresenta

um crescimento mais rápido com uma taxa de crescimento maior ($0,037 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$) e tempo de duplicação (18,84 h) menor como podemos ver na tabela 3.

Da análise da Figura 7 é possível observar que a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CECT 10371 produz o etanol máximo por volta das 48h quando a lactose é esgotada, dando origem á fase estacionária. A estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 esgota, a lactose pelas 30 h e inicia-se a fase estacionária sendo o máximo de etanol (36.17 g/l) atingido na fase estacionária. É de salientar que ambas as estirpes *Kluyveromyces lactis* entram na fase estacionária quando a lactose é esgotada como era de esperar. Ao utilizar soro do queijo como substrato verifica-se que as estirpes de levedura *Kluyveromyces lactis* apresentam uma melhor tolerância ao etanol do que quando utilizado apenas lactose comercial (ponto 4.1).

As duas estirpes de levedura *Kluyveromyces lactis* apresentam concentrações de etanol máximo, $Y_{E/S}$ e $Y_{X/S}$ estatisticamente iguais como podemos observar na tabela 3. Ao analisar os valores de produtividades de ambas as estirpes de levedura *Kluyveromyces lactis* verifica-se que o valor produtividade da estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 é superior ($0,90 \pm 0,17 \text{ g/lh}$) do que da estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CECT 10361. É de salientar que a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 começa a acumular o etanol mais cedo do que a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CECT 10361.

O ensaio com a estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 onde foi utilizado a lactose como substrato, obteve resultados bastante promissores, contudo ao utilizar o soro do queijo de cabra como substrato os resultados precisam ser mais desenvolvidos. A estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 não esgotou a lactose e o seu etanol máximo foi atingido ás 96h com um valor de $13,42 \pm 0,03 \text{ g/l}$ e apresentando valores de $Y_{E/S}$, $Y_{X/S}$ baixos, relativamente às restantes leveduras testadas, como podemos observar na tabela 3. Alguns autores (Dragone et al., 2011) utilizam soro de queijo desproteínizado e obtêm valores de etanol elevados (89,98 g/l) o que pode indicar que talvez as proteínas presentes no soro de queijo de cabra possam ter algum efeito protetor da célula.

Siso e os seus colaboradores (Siso et al., 1996) realizaram um estudo em que testaram várias estirpes de leveduras *Kluyveromyces sp.* utilizando o soro do queijo como substrato, em que este era composto por 5% de lactose. Neste trabalho

experimental obtemos um $Y_{E/S}$ máximo de 0,40 g de etanol/g de lactose, sendo este rendimento mais elevado do que os $Y_{E/S}$ obtidos no trabalho de Siso e colaboradores (Siso et al., 1996) que rondaram os 0,37 g de etanol/g de lactose.

As estirpes *Kluyveromyces lactis* neste trabalho experimental apresentam maior tolerância ao etanol na presença de compostos proteicos do leite do que a estirpe de levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370, pois esta última apresenta uma menor capacidade fermentativa como podemos observar na figura 9e tabela 3.

Nos ensaios experimentais onde se utilizou a lactose comercial como fonte de carbono, as estirpes de leveduras *Kluyveromyces lactis* CECT 10361 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 apresentam valores de taxa específica de crescimento, $Y_{E/S}$, $Y_{X/S}$ mais elevados do que quando se utiliza o soro do queijo, no entanto, o valor de produtividade etanólica é mais elevado quando se utiliza o soro do queijo de cabra.

Depois de ter sido realizado um primeiro *screening* utilizando a lactose comercial com a concentração de 100 g/l para verificar qual das estirpes de leveduras *Kluyveromyces sp.* apresentava melhor capacidade fermentativa é, tendo depois sido repetido este *screening* utilizando o soro do queijo de cabra concentrado a 100g/l de lactose, a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 foi a escolhida para ser utilizada no restante trabalho de dissertação, por apresentar melhor capacidade fermentativa.

4.3-Fermentação do soro do queijo com a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 utilizando várias fontes de azoto

Neste ensaio foi utilizada a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 que apresentou melhor capacidade fermentativa e selecionada no ponto 4.2

A fonte de azoto presente num meio de fermentação para a produção de bioetanol é bastante importante, e a sua adição pode influenciar os rendimentos etanólicos. O soro do queijo tem na sua composição várias fontes de compostos azotados como proteínas, no entanto nem todas as fontes de azoto são as mais indicadas para determinados microrganismos, pois estes podem não ser capazes de metabolizar esse composto azotado.

Podem ser utilizadas várias fontes de azoto em processos de fermentação de produção de etanol, como sulfato de amónio, nitratos e nitritos, ureia, peptona e extrato de levedura entre outros. No entanto, como neste trabalho experimental a levedura utilizada é a *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e esta não é capaz de metabolizar nitratos e nitritos, escolheu-se por isso o extrato de levedura com peptona e a ureia o como fontes de azoto (“Yeast of the world version 2.0,” 2013)

Trabalhos anteriormente realizados no LEBA/UALG obtiveram rendimentos elevados de bioetanol próximo do valor máximo teórico (0,54 g/g) utilizando a ureia como fonte de azoto (dados não publicados). Gupte e Nair (Gupte and Nair, 2010) realizaram um estudo onde foi utilizado soro do queijo, em que se concluiu que a utilização da ureia como fonte de azoto permitia obter valores mais elevados de etanol quando comparados com a peptona e extrato de levedura. Em fermentações com uma concentração de açúcar bastante alta a fonte de azoto permite obter rendimentos etanólicos e produtividades mais elevados, uma vez que as membranas das células da levedura ficarão mais protegidas contra o *stress* osmótico e o etanol endógeno (Yue et al., 2012). Adicionalmente, a ureia é uma fonte de azoto orgânica mais económica que a peptona e o extrato de levedura.

Neste ensaio utilizou-se o soro de queijo de cabra sem estar concentrado, ou seja tendo aproximadamente 80 g/L de lactose permitindo assim comparar estes resultados com outros trabalhos realizados em paralelo no LEBA/UALG, que juntamente com este trabalho de dissertação de mestrado estão englobados no mesmo projeto Soroalfaetanol.

Para verificar se a fonte de azoto influencia os rendimentos etanólicos testaram-se diferentes fontes de azoto: extrato de levedura e peptona com a concentração de 3g/l e 5g/l, respetivamente (meio YEP), ureia com a concentração de 3 g/l e apenas soro do queijo de cabra sem adição de fonte de azoto. A peptona e o extrato de levedura foram as fontes de azoto utilizadas nos ensaios realizados e descritos no ponto 4.2.

Na figura 10 são apresentados os perfis referentes ao ensaio *erlenmeyers* contendo os meios fermentativos dos ensaios com a peptona e extrato levedura, ureia e sem fonte de azoto, respetivamente, podendo assim observar-se as diferenças entre esses meios. Podemos verificar que o meio em que a fonte de azoto utilizada é a peptona e o extrato de levedura (figura 10.A) tem uma tonalidade amarelada enquanto os outros

meios em que se utiliza ureia (figura 10.B) e sem fonte de azoto, apenas o soro do queijo, (figura 10.C) têm um tom esbranquiçado.

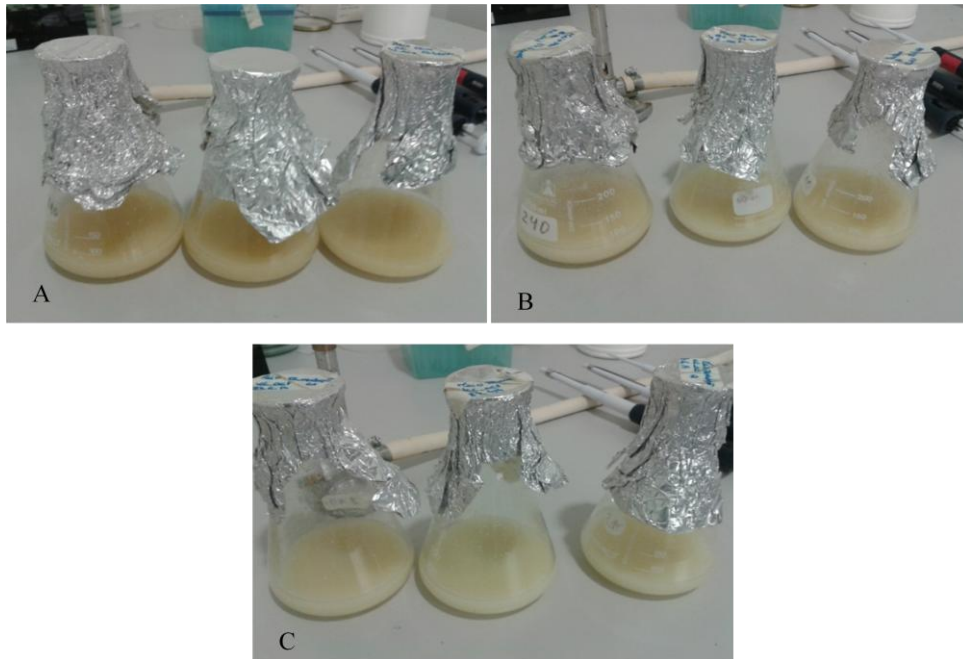


Figura 10- *Erlenmeyers* contendo os meios fermentativos com as diferentes fontes de azoto. (A) peptona (5 g/l) +extrato de levedura (3 g/l) (B) ureia (3g/l) (C) soro de queijo de cabra (80 g/l).

Na figura 11 podemos observar os perfis cinéticos e de fermentação da estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 quando é utilizado o soro do queijo como substrato, e testando as várias fontes de azoto: peptona (5g/l) e extrato de levedura (3 g/l) (figura 11.A), ureia (3g/l) (figura 11.B) e sem adição de fonte de azoto (figura 11.C). Na tabela 8 podem ser observados os respectivos parâmetros de crescimento e de produção de etanol.

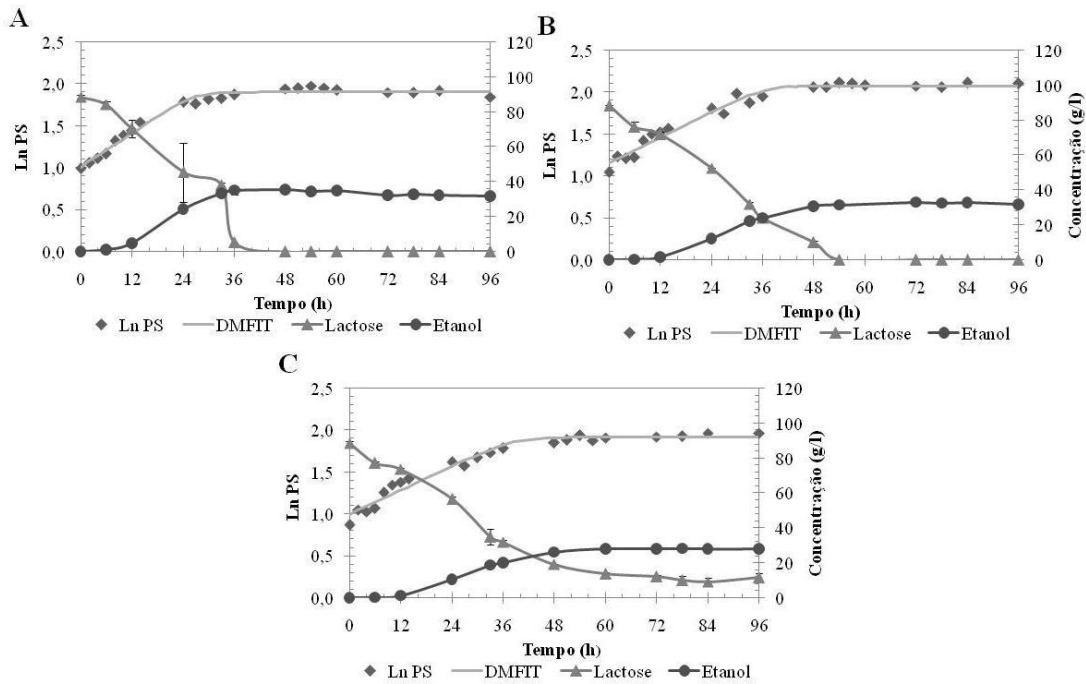


Figura 11- Perfil de produção de etanol da estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, utilizando soro do queijo como substrato (A) 3 g/l de extrato de levedura e 5 g/l de peptona (B) 3 g/l de ureia (C) sem fonte de azoto adicionada em crescimento em *erlenmeyer* com uma concentração de lactose de cerca de 80 g/l utilizando o soro do queijo como substrato. A fermentação decorreu durante 96 h, em agitadora orbital a 150 rpm e 30 ± 1 °C. Todos os dados acima representados referem-se a valores médios ($n=3$) e os erros padrão correspondente.

Tabela 4- Parâmetros de crescimento e de produção de etanol determinados para as fermentações com a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, em *erlenmeyer* com uma concentração de 80 g/l de lactose e com diferentes fontes de azoto 5g/l de extrato de levedura e 3 g/l peptona, 3 g/l ureia e sem adição de fonte de azoto. As fermentações decorreram durante 96h, numa agitadora orbital com uma agitação de 150 rpm e a temperatura de 30±1 °C

	Extrato levedura (3 g/l) peptona (5 g/l)	Ureia (3 g/l)	Sem fonte de azoto adicionada
μ (h⁻¹)	0,034±0,003 ^a	0,026±0,002 _b	0,024±0,002 ^b
td (h)	20,6	27,29	28,88
t_{est} (h)	42	46	52
Etanol_{máximo} (g/l)	35,47±0,64 ^a	33,30±0,12 ^a	28,67±1,09 ^b
tEtanol_{máximo} (h)	48	48	96
Conversão de açúcares (%)	100	100	86,73
Y_{E/S} (g/g)	0,44±0,07 ^a	0,42±0,02 ^a	0,41±0,02 ^a
Y_{X/S} (g/g)	0,05±0,01 ^a	0,06±0,01 ^a	0,06±0,00 ^a
Produtividade (g/l.h)	1,09 ±0,09 ^a	0,64±0,04 ^b	0,59±0,04 ^b

Taxa específica de crescimento (μ), tempo de duplicação (td), tempo de início da fase estacionária (t_{est}), concentração de etanol máximo atingido (Etanol_{máximo}), tempo etanol máximo (t etanol_{máximo}), conversão da lactose, rendimento etanol em relação com o substrato (Y_{E/S}), rendimento biomassa em relação ao substrato (Y_{X/S}) e produtividade do etanol para as diferentes estirpes *Kluyveromyces sp.* Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05)

Ao analisar a figura 11.A (soro de queijo com e extrato de levedura como fonte de azoto orgânica) observa-se que a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 na fase exponencial respira e fermenta, demonstrando assim o porquê de ser considerada uma levedura respiro-fermentativa. É de realçar que a levedura entra em fase estacionária com o esgotamento da lactose, como era de esperar numa fermentação

Quando é utilizada a ureia como fonte de azoto, é possível observar que a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 (Figura 11.B) tem um comportamento similar a, quando utilizado soro do queijo como substrato sem suplementação de fonte de azoto (figura 11.C), ou seja durante a fase exponencial ela respira e fermenta,

apresentando o metabolismo respiro-fermentativo. É de salientar que quando é utilizada a ureia como fonte de azoto a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 entra em fase estacionária mais tardiamente, por volta das 46 h, o que pode indicar que a ureia será muito pouco hidrolisada ou até mesmo não hidrolisada.

Quando não é adicionada fonte de azoto (figura 11.C) no meio contendo apenas soro do queijo de cabra, a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 apresenta um metabolismo mais lento do que quando utilizado as restantes fontes de azoto. Verifica-se também que a levedura respira e fermenta durante a fase exponencial. O metabolismo da estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 quando o meio fermentativo não é suplementado com fonte de azoto orgânica é mais lento, o que pode indicar que a presença de uma fonte de azoto adicional é bastante importante. É de salientar que neste ensaio experimental verifica-se que a quantidade de azoto disponível no soro do queijo de cabra, poderá não ser suficiente para satisfazer as necessidades nutricionais da levedura.

Na tabela 8 podemos observar os parâmetros de crescimento evidenciam que o $Y_{X/S}$ são estatisticamente iguais quando se utiliza mas várias fontes de azoto. No entanto, os parâmetros de produção de etanol $Y_{E/S}$, produtividade e etanol máximo utilizando peptona e extrato de levedura apresentam valores superiores ao ensaio utilizando a ureia e sem adição de fonte de azoto suplementar.

Na ausência de fonte de azoto suplementar e utilizando ureia, os parâmetros de crescimento e de produção de etanol são similares como podemos verificar na tabela 8, com exceção do etanol máximo que é ligeiramente superior quando a ureia foi utilizada, o que evidencia que quando o meio não é suplementado com fonte de azoto a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 apresenta um metabolismo lento. É possível concluir que a ureia praticamente não é metabolizável pela estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360.

O consumo da lactose é rápido no meio quando este contém peptona e extrato de levedura, começando o etanol a ser produzido ainda está na fase exponencial, enquanto utilizando a ureia ou meio sem fonte de azoto, o etanol começa a ser produzido durante a fase estacionária.

Nestes ensaios experimentais foi possível observar que a adição de fonte de azoto é essencial na fermentação do soro do queijo para a produção de etanol. Embora o soro de queijo de cabra tenha na sua composição proteínas é possível concluir que a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 não é capaz de metabolizá-las sendo por isso necessário suplementar o meio fermentativo com outras fontes de azoto.

4.4-Fermentação do soro do queijo com estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em STR em condições de microarejamento

Nos ensaios experimentais anteriormente discutidos foi escolhida a estirpe levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, visto que esta apresenta a melhor capacidade fermentativa quando utilizado o soro do queijo como substrato na produção de etanol e utilizando como fonte de azoto peptona e extrato de levedura como já descrito no ponto 3.2.1.1.

Com o objetivo de avaliar o efeito do arejamento nas condições anteriormente estudadas foi realizado um ensaio experimental em reactor STR de 3l (figura 12) utilizando o arejamento de 0,13 vvm até as 24 h e posteriormente um microarejamento de 0,042 vvm.



Figura 12- Reator biológico STR contendo meio fermentativo composto por soro do queijo concentrado a 100 g/l de lactose, peptona e extrato de levedura utilizando a *Kluyveromyces lactis* CBS 2360

Na figura 12 e tabela 5 estão representados o perfil de crescimento e os parâmetros cinéticos, respetivamente, da *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 selecionada anteriormente, com um teor em lactose de 100 g/l e suplementado com a fonte de azoto escolhida.

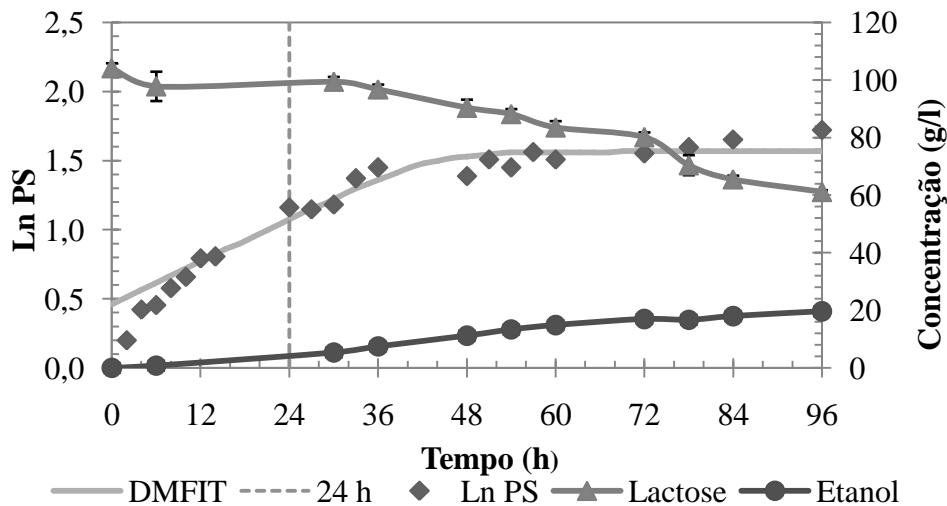


Figura 13- Perfil de produção de etanol da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em reator biológico STR de 3 l utilizando soro do queijo como substrato. Utilizou-se inicialmente um arejamento de 0,13 vvm alterando às 24h para 0,042 vvm. O crescimento foi acompanhado com o logaritmo do peso seco, modelação pelo *software* DMFIT, produção de etanol e consumo de lactose. A fermentação decorreu durante 96h a 250 rpm e a uma temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos os dados acima representados referem-se a valores médios ($n=3$) e os erros padrão.

Tabela 5- Parâmetros determinados para a fermentação em reator biológico STR de 3l com levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 utilizando como substrato o soro do queijo de cabra com uma concentração de 100 g/l de lactose. Utilizou-se um arejamento inicial de 0,13 vvm alterando para 0,042 vvm às 24h. As fermentações decorreram durante 96h, com uma agitação de 250 rpm e à temperatura de 30±1 °C.

	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360
μ (h ⁻¹)	0,037±0,0026
td (h)	20.33
t _{est} (h)	36
Etanol máximo(g/l)	19,64±0,1428
t Etanol máximo (h)	96
Conversão lactose (%)	41,30
Y _{E/S} (g/g)	0,44±0,0058
Y _{X/S} (g/g)	0,053±0,0042
Produtividade(g/l.h)	0,23 ±0,11

Taxa específica de crescimento (μ), tempo de duplicação (td), tempo de início da fase estacionária (t_{est}) concentração de etanol máximo atingido (Etanol_{máximo}), tempo etanol máximo (t etanol_{máximo}), conversão da lactose, rendimento etanol em relação com o substrato (Y_{E/S}), rendimento biomassa em relação ao substrato (Y_{X/S}) e produtividade de etanol para as diferentes estirpes *Kluyveromyces sp.* Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05)

. Da análise da figura 13, verifica-se que durante as primeiras 24 h em que o arejamento foi de 0,13 vvm, a cultura se manteve em fase exponencial de crescimento, apesar do consumo de açúcares ter sido muito reduzido. A produção de etanol foi praticamente nula. Contudo, assim que se alteraram as condições de arejamento, reduzindo para 0,042 vvm (micro-arejamento) a fermentação intensificou-se atingindo cerca de 19,64 g/l às 96 h e o consumo dos açúcares aumentou. Não se verificaram alterações na fase exponencial de crescimento até cerca das 40 h, mas a partir deste momento ocorreu uma inflexão na fase exponencial com uma redução significativa na taxa específica de crescimento (0,005 h⁻¹). Contudo, a produção de etanol aumentou até ao final da fermentação (96h) atingindo uma concentração máxima de 19,64±0,143 g/l.

Este facto poderá indicar que a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 terá melhor capacidade fermentativa quando está em condições de oxigénio limitante como já foi referida em alguns estudos já realizados (Diniz et al., 2012) . A

estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 demonstra o seu metabolismo respiro-fermentativo como já referido por Siso e os seus colaboradores (Siso et al., 1996), dependendo das condições de oxigenação a que está sujeito no reator.

É de realçar que ao observar o perfil de crescimento cinético da estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 até às 96h de fermentação, a levedura ainda está a produzir etanol, o que poderá indicar que se a fermentação tivesse sido prolongada a levedura poderia eventualmente consumir toda a lactose e atingir um rendimento mais próximos dos valores obtidos em erlenmeyer (tabela 6) e do máximo teórico 0,54 g/l .

Tabela 6- Parâmetros de crescimento determinados para a fermentação em reator biológico STR 31 e erlenmeyer com o soro do queijo de cabra concentrado a 100 g/l de lactose descrito anteriormente utilizando a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS .

	Reator biológico STR	Erlenmeyer
μ (h ⁻¹)	0,034±0,0026 ^a	0,037±0,0026 ^a
td (h)	20,33	18,8355
t _{est} (h)	36	30
Etanol máximo (g/l)	19,64±0,14 ^b	35,82±0,70 ^a
t Etanol máximo (h)	96	48
Conversão de lactose (%)	41,3	100
Y_{E/S}(g/g)	0,44±0,0058 ^a	0,35±0,030 ^b
Y_{X/S}(g/g)	0,053±0,0042 ^a	0,046 ±0,0053 ^a
Produtividade (g/l.h)	0,23 ±0,11 ^b	0,92±0,23 ^a

Taxa específica de crescimento (μ), tempo de duplicação (td), tempo de início da fase estacionária (t_{est}) concentração de etanol máximo atingido (Etanol_{máximo}), rendimento etanol em relação com o substrato (Y_{E/S}), rendimento biomassa em relação ao substrato (Y_{X/S}) e produtividade do etanol para as diferentes leveduras *Kluyveromyces sp.* Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05)

* resultados tabela 3 e tabela 5

Com o intuito de realçar o comportamento cinético da fermentação do soro do queijo pela estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em diferentes condições de crescimento (erlenmeyers e reator STR) analisou-se a tabela 6, na qual se verifica que em *erlenmeyers* os resultados obtidos de $Y_{X/S}$, taxa específica de crescimento e tempo de duplicação são semelhantes em ambos os ensaios. No entanto no ensaio em *erlenmeyer* obtiveram-se valores de produtividade de etanol mais elevados $0,92 \pm 0,23$ e $0,23 \pm 0,1$ g/l.h¹, respectivamente. E o mais relevante é que em *erlenmeyer* a produção de etanol atinge o seu máximo cerca às 48h ($35,82 \pm 0,70$ g/l) e com um valor mais elevado do que o atingido pelas 96 h em reator ($19,64 \pm 0,14$ g/l) com um arejamento de 0,13 vvm, Este fato pode indicar que em *erlenmeyer* as condições de oxigenação são mais favoráveis à produção de etanol, nas condições testadas com a estirpe de levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, visto esta ser considerada uma levedura respiratório-fermentativo. O estudo do metabolismo desta estirpe em condições de aerobiose e de micro-arejamento deverá ser aprofundado na perspectiva de favorecer o processo fermentativo

5.Conclusões

O soro do queijo de cabra utilizado como substrato mostra ter um grande potencial para a produção de bioetanol de segunda geração, visto que é rico em açúcar fermentável (lactose).

A utilização do soro do queijo como substrato requer a utilização de leveduras específicas capazes de degradar a lactose, como as leveduras *Kluyveromyces sp.* Deste modo este trabalho de dissertação pretendeu identificar uma robusta e competente estirpe de levedura *Kluyveromyces sp* capaz de fermentar o soro do queijo e identificar as condições ideais para obter elevados de rendimentos etanólicos.

Ao realizar o primeiro *screening* onde se testaram diferentes estirpes de *Kluyveromyces sp.* utilizou-se lactose comercial e verificou-se que a estirpe *Kluyveromyces lactis* CECT 1132 não apresentou capacidade fermentativa da lactose. As outras estirpes de levedura *Kluyveromyces sp*: *Kluyveromyces lactis* CECT 10361, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e *Kluyveromyces marxianus* CECT 10370 apresentam capacidades fermentativas similares da lactose. No entanto a *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 foi escolhida por parecer apresentar melhor capacidade fermentativa do soro do queijo com 100 g/l de lactose, nas condições testadas.

Após a seleção das leveduras *Kluyveromyces sp.* no primeiro *screening* com lactose realizou-se um ensaio experimental utilizando o soro do queijo concentrado a 100 g/l de lactose. Este ensaio permitiu concluir que a *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e a *Kluyveromyces lactis* CECT 10361 apresentam capacidades fermentativas similares, mas que a *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 começa a acumular etanol mais cedo e apresenta um valor de produtividade mais elevado ($0,90 \pm 0,17$ g/lh)

Na fermentação do soro do queijo as leveduras *Kluyveromyces sp.* parecem apresentar uma maior tolerância ao etanol endógeno do queijo do que quando fermentam a lactose comercial, sugerindo que poderão existir componentes no soro com função protectora das membranas celulares.

A produção de bioetanol foi testada em meio fermentativo com o soro do queijo e suplementado com fontes de azoto: peptona (5 g/l) e extrato de levedura (3 g/l) , ureia (3 g/l). A adição de uma fonte de azoto orgânico (peptona e extrato de levedura)

demonstrou ser essencial na fermentação do soro do queijo para permitir obter valores de rendimentos etanólicos mais favoráveis. Embora no soro do queijo, seja rico numa fonte de azoto proteico, esta não foi metabolizável durante a fermentação, não se observando alterações nos parâmetros cinéticos. Nas condições testadas a ureia, uma fonte de azoto orgânico e não dispensiosa, foi igualmente testada, mas não se verificou uma melhoria na produção de etanol pela estirpe *kluveromyces lactis* CBS 2360.

O efeito do arejamento na fermentação do soro do queijo pela estirpe da levedura *Kluveromyces lactis* CBS 2360 foi verificado em reator biológico STR 31, com um arejamento de 0,13 vvm e após 24h submetido a um micro-arejamento de 0,042 vvm. Esta redução no arejamento foi benéfica no processo fermentativo versus respiratório, uma vez que nas primeiras 24h da fermentação o arejamento maior de 0,13 vvm favoreceu o processo respiratório, evidenciando as características respiro-fermentativas desta estirpe em condições aeróbicas.

Não obstante outros estudos em STR terem de ser realizados para que o efeito do arejamento seja totalmente esclarecido, a estirpe de levedura *Kluveromyces lactis* CBS 2360 parece apresentar boas condições de produção de etanol a partir do soro do queijo, visto em *erlenmeyer* ter sido possível obter uma total conversão de açúcares em etanol e um rendimento etanólico de cerca de 35% (p/v), assim como uma produtividade de etanol de 0,92 g/l.h

6.Perspectivas futuras

Os resultados obtidos neste trabalho de dissertação mostraram ser bastante promissores, no entanto como forma de complementar este estudo poderiam ser realizados novos trabalhos experimentais.

Como propostas de novos trabalhos temos:

- Utilizar o soro do queijo em pó ou soro desproteínizado em vez do soro do queijo líquido, visto que muitos estudos indicam que obtém melhores rendimentos etanólicos;
- Substituir a fonte de azoto peptona e extrato de levedura por outra mais económica;
- Testar vários arejamentos em reator biológico utilizando a levedura *Kluyveromyces sp.*;
- Testar a levedura *Kluyveromyces lacti* sCECT 10361 em reator biológico visto que esta demonstrou durante os estudos realizados apresentar também uma boa capacidade de fermentar o soro do queijo.

7.Bibliografia

- Akbas, M.Y., Sar, T., Ozcelik, B., 2014. Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by “*Vitreoscilla hemoglobin* expressing” *Escherichia coli*. *J. Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 687–694.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 551–573.
- Baranyi, J., Roberts, T., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 277–294.
- Bayrakci, A.G., Koçar, G., 2014. Second-generation bioethanol production from water hyacinth and duckweed in Izmir: A case study. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 30, 306–316
- Belal, E.B., 2013. Bioethanol production from rice straw residues. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 225–234.
- Berg, J.M., John, T., Stryer, L., 2002. *Biochemistry*, 5 th. ed, *Biochemistry*. W H Freeman, New York.
- Çaylak, B., Sukan, F., 1998. Comparison of Different Production Processes for Bioethanol. *Turkish J. Chem.* 22, 351–359.
- Chaudhary, L., Pradhan, P., Soni, N., 2014. Algae as a Feedstock for Bioethanol Production : New Entrance in Biofuel World. *Int. J. ChemTech Res.* 6, 1381–1389.
- Dareioti, M.A., Kornaros, M., 2014. Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. *J. Bioresour. Technol.* 167C, 407–415.
- Demirbas, A., 2011. Competitive liquid biofuels from biomass. *Appl. Energy* 88, 17–28.
- Diniz, R.H.S., Silveira, W.B., Fietto, L.G., Passos, F.M.L., 2012. The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 101, 541–550.
- Domingues, L., Guimarães, P.M.R., Oliveira, C., 2010. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. *J. Bioeng. bugs* 1, 164–71.
- Dragone, G., Mussatto, S.I., Almeida e Silva, J.B., Teixeira, J. a., 2011. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass and Bioenergy* 35, 1977–1982.

- Duque, a., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M., 2014. Study of process configuration and catalyst concentration in integrated alkaline extrusion of barley straw for bioethanol production. *Fuel* 134, 448–454.
- Escobar, J.C., Lora, E.S., Venturini, O.J., Yáñez, E.E., Castillo, E.F., Almazan, O., 2009. Biofuels: Environment, technology and food security. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 1275–1287. Europeu, P., 2003. DIRECTIVA 2003/30/CE de 8 de Maio de 2003.
- Directiva 2009/20/CE de 23 de Abril de 2009.
- Foyle, T., Jennings, L., Mulcahy, P., 2007. Compositional analysis of lignocellulosic materials: evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresour. Technol.* 98, 3026–36.
- Guimarães, P.M.R., 2008. Pedro Miguel Reis Guimarães Physiology of Yeasts in Alcoholic Fermentation Processes Universidade do Minho Pedro Miguel Reis Guimarães Physiology of Yeasts in Alcoholic Fermentation Processes. Universidade de Braga.
- Guimarães, P.M.R., Teixeira, J. a, Domingues, L., 2010. Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol. Adv.* 28, 375–84.
- Gupta, A., Verma, J.P., 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41, 550–567. doi:10.1016/j.rser.2014.08.032
- Gupte, A.M., Nair, J.S., 2010. β -Galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *J. Sci. Ind. Res.* 69, 855–859.
- Hashem, M., Darwish, S.M.I., 2010. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biomass Bioenergy* 34, 953–959.
- Holden, H.M., Rayment, I., James, B., Thoden, J.B., 2003. Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 43885–43888.
- Jegannathan, K.R., Chan, E., Ravindra, P., 2009. Harnessing biofuels: A global Renaissance in energy production? *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 2163–2168. doi:10.1016/j.rser.2009.01.012
- Karagöz, P., Özkan, M., 2014. Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. *J. Bioresour. Technol.* 158, 286–293.
- Khuong, L.D., Kondo, R., De Leon, R., Anh, T.K., Meguro, S., Shimizu, K., Kamei, I., 2014. Effect of chemical factors on integrated fungal fermentation of sugarcane

- bagasse for ethanol production by a white-rot fungus, *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresour. Technol.* 167, 33–40. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.064
- Lane, M.M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K.H., O’Byrne, C.P., Morrissey, J.P., 2011. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *J. Antonie van Leeuwenhoek* 100, 507–519.
- Lane, M.M., Morrissey, J.P., 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister’s shadow. *J. Fungal Biol. Rev.* 24, 17–26.
- Lima-Costa, M.E., Tavares, C., Raposo, S., Rodrigues, B., Peinado, J.M., 2012. Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 789–97.
- McIntosh, S., Vancov, T., Palmer, J., Spain, M., 2012. Ethanol production from Eucalyptus plantation thinnings. *J. Bioresour. Technol.* 110, 264–272. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.114
- Nigam, P.S., Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.* 37, 52–68.
- Observ’er, 2014. http://www.energiesrenouvelables.org/observer/stat_baro/observ/baro22_en.pdf, acedido a 14 de Setembro de 2014 .
- Ozmihci, S., Kargi, F., 2007. Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. *J. Enzym. Microb. Technol.* 41, 169–174.
- Ozmihci, S., Kargi, F., 2007. Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 602–6.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues . I : sugarcane bagasse. *J. Bioresour. technol* 74, 69–80.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: a review. *J. Environ. Manage.* 110, 48–68.
- Quintas, A., Freire, A., Halpern, M., 2008. *Bioquímica Organização molecular da vida*, 1ª Edição. ed. Lidel, Lisboa.
- Renewable Fuels Association, 2014. <http://www.ethanolrfa.org/news/entry/global-ethanol-production-to-reach-85.2-billion-litres- in-2012/> acedido a 14 de Setembro de 2014.
- Decreto de lei nº n°39/2013 de 18 de Março de 2013.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes : An overview. *J. Renew. Energy* 37, 19–27.

- Shi, D., Wang, C., Wang, K., 2009. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 139–47.
- Silva, A.C., Guimarães, P.M.R., Teixeira, J. a, Domingues, L., 2010. 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.* 37, 973–82.
- Singh, A., Nigam, P.S., Murphy, J.D., 2011. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. *Bioresour. Technol.* 102, 10–16.
- Singh, N.L., Prasad, R., Mishra, P.K., Srivastava, P., 2011. Kinetics studies of product inhibition in alcoholic fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* 70, 373–378.
- Singh, P., Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources 37, *Progress in Energy and Combustion Science*, 37:52–68.
- Siso, M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *J. Bioresour. Technol.* 57, 1–11.
- Siso, M.I.G., Ramil, E., Cerdhn, M.E., 1996. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis* : Ethanol production and the Crabtree effect. *J. Enzym. Microb. Technol.* 18, 585–591.
- Tecninvest, Frazão, N., 2001. ESTUDO DE MERCADO DO SORO LÁCTEO, relatório da tecninvest.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C., 2012. *Microbiologia*, 10ª edição ed. ARTEMED, Porto Alegre , Brasil.
- Toyoda, T., Ohtaguchi, K., 2008. Production of Ethanol from Lactose by *Kluyveromyces lactis* NBRC 1903. *Thammasat Int. J. Sci. Technol.* 13, 30–35.
- Voet, D., Voet, J., 2006. *Bioquímica*. ARTMED, Porto alegre , Brasil.
- Yadav, J.S.S., Bezawada, J., Ajila, C.M., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2014. Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *J. Bioresour. Technol.* 164, 119–127.
- Yeast of the world version 2.0, 2013, software
- Yue, G., Yu, J., Zhang, X., Tan, T., 2012. The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. *Biomass and Bioenergy* 39, 48–52.
- Zoppellari, F., Bardi, L., 2013. Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. *New biotechnology.* 30, 607–613.

