

Produção de bioetanol por uma cultura mista de leveduras
a partir de um substrato misto de alfarroba e soro de queijo

José Diogo Monteiro Gonçalves

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sobre a orientação e co-orientação de:

Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

Mestre Brígida Gonçalves Rodrigues

2014

Produção de bioetanol por uma cultura mista de leveduras
a partir de um substrato de alfarroba e soro de queijo

José Diogo Monteiro Gonçalves

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sobre a orientação e co-orientação de:

Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

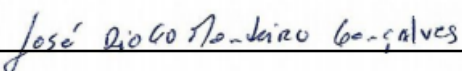
Mestre Brígida Gonçalves Rodrigues

2014

Produção de bioetanol por uma cultura mista de leveduras a partir de um substrato de alfarroba e soro de queijo

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o(a) autor(a) deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.



José Diogo Monteiro Gonçalves

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar 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.



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

A realização desta dissertação de mestrado, contou com diversos apoios e incentivos de caráter pessoal e profissional. Por essa razão, pretendo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar, à minha orientadora, Professora Doutora Maria Emília Lima Costa pela sua ajuda incansável, conhecimentos partilhados e pela sua visão crítica ao longo da realização desta dissertação. Gostaria de lhe agradecer também a oportunidade que me deu de poder integrar o seu grupo de investigação no projeto SORO&ALFAETANOL (PTDC/AGR-TEC/3346/2012).

À minha co-orientadora, Mestre Brígida Rodrigues, pela sua paciência, partilha de conhecimentos e pelas suas *skills* laboratoriais que tanto me ajudaram na realização desta dissertação. Agradeço-lhe também a sua amizade e todos os momentos de boa disposição passados ao longo destes meses.

À Professora Doutora Sara Raposo, pela sua ajuda, conhecimentos partilhados e por toda a disponibilidade e apoio demonstrado ao longo da realização desta dissertação.

À Professora Doutora Lídia Dionísio, pela sua ajuda, disponibilidade e interesse demonstrado em diversas fases da realização desta dissertação.

À Mestre Ana Constantino, pela sua ajuda, conhecimentos e *skills* laboratoriais. Agradeço-lhe igualmente toda a sua amizade e todas as deslocações ao laboratório em alguns fins-de-semana.

Ao Mestre Fábio Guerreiro, pela sua paciência e ajuda na fase final deste trabalho. Quero agradecer-lhe também pela sua amizade ao longo destes últimos cinco anos.

Aos meus colegas de laboratório, cujos seus trabalhos desenvolvidos em paralelo ajudaram à realização desta dissertação.

Aos meus pais e aos meus avós por toda a educação que me deram e todos os valores que me inculcaram durante estes vinte e quatro anos e que sem o seu apoio esta dissertação não teria sido realizada.

À Laura, pela sua paciência interminável e ajuda ao longo de todo este percurso académico

Resumo

Esta dissertação é focada na produção de bioetanol a partir de resíduos e de efluentes industriais numa perspectiva de reutilização e de obtenção de um biocombustível de 2ª geração.

Um dos maiores desafios na produção de etanol tem sido a diminuição dos custos de produção, para que o preço final para o consumidor seja economicamente competitivo. Uma das soluções está associada à utilização de matérias-primas de baixo custo, como a polpa da alfarroba proveniente da indústria transformadora e o efluente, soro do queijo proveniente da indústria de laticínios.

A estratégia utilizada visa a preparação de um substrato misto enriquecido em açúcares fermentáveis, selecionando a melhor proporção de alfarroba em soro do queijo.

Para obtenção do substrato misto foram testadas três proporções alfarroba (peso): soro do queijo (volume), correspondentes a 20, 30 e 40 % (p/v) e dois tempos de extração diferentes, 1 e 2 h, com o solvente, soro do queijo, com e sem proteína. O resultado mais favorável foi obtido com a proporção 40 % (p/v), contendo uma concentração total de açúcares de $189,66 \pm 6,96$ g/L.

A cultura mista composta pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, foi estudada em diferentes proporções e condições de açúcar, bem como através de ensaios que visam investigar a produção de toxinas *killer* por parte das estirpes celulares. Os resultados indicam que não existe atividade *killer* nas condições operacionais de fermentação e a proporção de leveduras na população mista utilizada é composta por 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*.

Estudos de arejamento, micro-arejamento e anoxia foram realizados em reator biológico de 3-L (STR) em diferentes modos de operação. Nas fermentações *batch*, foram consumidos de 74 a 81 % de açúcares totais, com rendimentos entre 38–48 % e uma concentração de etanol máxima de cerca de 71 g/L. Na fermentação realizada em *fed-batch*, a concentração máxima de etanol aumentou para cerca de 84 g/L.

Palavras-chave: bioetanol, alfarroba, soro do queijo, cultura mista, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*.

Abstract

This dissertation is focused on bioethanol production from industrial residues and effluents, in a perspective of reutilization and achievement of a 2nd generation biofuel.

The reduction of ethanol production costs has been one of the biggest challenges, so that its final price can be economically competitive for the consumer. One of the solutions might be the use of low cost raw materials, such as carob pulp from the agro-industry and cheese whey effluents from the dairy industry.

The strategy used involves the preparation of a mixed substrate enriched with fermentable sugars, selecting the best ratio of carob in cheese whey.

In order to obtain the mixed substrate, three carob (weight): cheese whey (volume) ratios were tested, corresponding to 20, 30 and 40% (w/v), two different extraction times of 1 and 2 h and the solvent, cheese whey, with and without protein. The best results were obtained using the 40% (w/v) ratio, with total sugar concentration of $189,66 \pm 6,96$ g/L.

A mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 and *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 was studied using different yeast ratios and sugar concentrations, as well as several assays aimed to investigate killer toxins production by the yeasts strains. The results showed that in the used fermentation conditions there is no killer activity. Also, the chosen ratio of yeasts in the mixed culture consists in 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*.

Were conducted studies of aeration, micro-aeration, and anoxic conditions on a 3-L STR bioreactor, in different operation modes. In batch fermentations, 74 to 81 % of the total sugars were consumed, with yields between 38–48 % and an ethanol maximum concentrations of 71 g/L. In the fed-batch fermentation, the ethanol maximum concentration increased up to 84 g/L.

Keywords: bioethanol, carob, cheese whey, mixed culture, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*.

ÍNDICE

Agradecimentos	III
Resumo.....	IV
Abstract	V
Lista de abreviaturas	IX
Índice de figuras	XI
Índice de tabelas	XV
1 Introdução.....	1
1.1 Breve referência histórica do conceito fermentação	1
1.2 Enquadramento dos biocombustíveis.....	3
1.2.1 Contributos para uma análise económica da produção de etanol.....	4
1.3 Produção de bioetanol	5
1.3.1 Processo geral de produção de bioetanol.....	5
1.3.2 Matérias-primas	7
1.3.2.1 Alfarroba.....	7
1.3.2.2 Soro do queijo.....	8
1.3.3 Microrganismos fermentativos	10
1.3.3.1 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.3.3.2 Levedura <i>Kluyveromyces lactis</i>	15
1.4 Aperfeiçoamento da produção de bioetanol.....	17
1.4.1 Mistura de substratos	17
1.4.2 Mistura de populações celulares.....	18
1.5 Objetivos	19
2 Material e métodos	20

2.1	Matéria-prima.....	20
2.1.1	Processo de obtenção do substrato misto	20
2.1.2	Processo de obtenção do extrato concentrado de alfarroba.....	20
2.2	Microrganismos.....	21
2.3	Meios de cultura, armazenamento e condições de crescimento.....	21
2.3.1	Armazenamento.....	21
2.3.2	Pré-inóculo.....	22
2.3.3	Inóculo	22
2.3.4	Processo de obtenção da cultura mista	22
2.3.5	Crescimento em balão <i>erlenmeyer</i>	23
2.3.6	Crescimento em reator biológico STR	23
2.4	Ensaio experimentais	24
2.4.1	Preparação do substrato misto, alfarroba: soro.....	24
2.4.2	Ensaio com diferentes concentrações de açúcar total e diferentes proporções das culturas de leveduras <i>S. cerevisiae</i> : <i>K. lactis</i>	25
2.4.3	Avaliação da produção de toxinas “ <i>killer</i> ” das estirpes celulares.....	25
2.4.4	Influência do micro-arejamento na fermentação do substrato misto em STR	26
2.4.5	Influência de condições de anoxia na fermentação do substrato misto em STR	27
2.4.6	Fermentação do substrato misto com arejamento e em sistema <i>Fed-batch</i>	27
2.5	Parâmetros fermentativos.....	28
2.5.1	Determinação do crescimento celular.....	28
2.5.1.1	Densidade ótica.....	28
2.5.1.2	Peso seco.....	28
2.5.1.3	Número de células viáveis	29
2.5.2	Métodos analíticos.....	30

2.5.2.1	Quantificação de açúcares e etanol.....	30
2.5.2.2	Monitorização do pH	30
2.5.2.3	Monitorização do oxigénio	31
2.6	Caracterização da cinética de crescimento.....	31
2.6.1	Taxa específica de crescimento (μ)	31
2.6.2	Rendimento da biomassa produzida por unidade de massa de substrato consumido ($Y_{X/S}$)	31
2.6.3	Rendimento de etanol produzido por unidade de massa de substrato consumido ($Y_{P/S}$)	31
2.6.4	Produtividade máxima de etanol	32
2.7	Tratamento estatístico	32
3	Resultados e discussão.....	33
3.1	Preparação do substrato misto, alfarroba: soro	33
3.2	Estabelecimento de uma população mista de leveduras.....	40
3.2.1	Influência da concentração de açúcares para diferentes rácios de leveduras ..	41
3.2.2	Avaliação da produção de toxinas “killer” das estirpes celulares	52
3.3	Influência do micro-arejamento na fermentação do substrato misto em STR	54
3.4	Influência de condições de anoxia na fermentação do substrato misto em STR	57
3.5	Fermentação do substrato misto com arejamento e em sistema <i>Fed-batch</i>	62
4	Conclusões.....	67
5	Trabalhos futuros	69
6	Bibliografia.....	70

Lista de abreviaturas

30S:70K	30 % <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : 70% <i>Kluyveromyces lactis</i>
50S:50K	50 % <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : 50% <i>Kluyveromyces lactis</i>
70S:30K	70 % <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : 30 % <i>Kluyveromyces lactis</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CBO	Carência Bioquímica de Oxigênio
CBS	Centro de Biodiversidade de Fungos
CIMA	Centro de Investigação Marinha e Ambiental
CQO	Carência Química de Oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
E85	Combustível composto por 85 % gasolina e 15 % etanol
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LEBA	Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental
MB	<i>Methylene Blue</i>
NADH	Dinucleótido de adenina nicotinamida reduzido
PBS	Tampão fosfato salino
P _{Et}	Produtividade de etanol
STR	Reator mecanicamente agitado
t _{Et máx}	Tempo de obtenção da concentração máxima de etanol
UFC's	Unidades formadoras de colônia
vvm	Volume de gás por volume útil no reator biológico por minuto
X _{máx}	Concentração máxima de biomassa obtida

YM	<i>Yeast Malt</i>
YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
$Y_{P/S}$	Rendimento de etanol obtido por unidade de massa de substrato consumido
$Y_{X/S}$	Rendimento de biomassa obtida por unidade de massa de substrato consumido
% dO ₂	Percentagem de oxigénio dissolvido no meio
[Et] _{ac}	Concentração de etanol acumulado
[Et] _{máx}	Concentração máxima de etanol obtida
μ	Taxa específica de crescimento

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo da glicólise. Cada um dos 10 passos deste ciclo é catalisada por um enzima diferente. No passo 4 existe a clivagem de um açúcar de 6 carbonos em 2 açúcares de 3 carbonos, de modo que o número de moléculas após esta fase duplica. Note-se que 1 dos produtos do passo 4 necessita de ser isomerizado no passo 5 previamente ao início do passo 6. Como indicado, no passo 6 começa a fase de geração de energia da glicólise, que resulta na síntese líquida de ATP e NADH..... 11

Figura 2. Degradação do piruvato na ausência de oxigénio por fermentação alcoólica. Nos microrganismos com capacidade de crescimento em condições anaeróbicas, o piruvato é convertido a etanol e CO₂. Esta via regenera o NAD⁺ a partir do NADH para permitir a continuação do ciclo da glicólise. Note-se que por cada molécula de glucose que entra na glicólise são produzidas duas moléculas de piruvato (apenas um piruvato está representado neste esquema). A consequente fermentação dos dois piruvatos produz duas moléculas de CO₂ e etanol..... 12

Figura 3. Esquema completo do ciclo do ácido cítrico. Os dois carbonos do acetil-CoA que entram neste ciclo (realçados a vermelho) apenas serão convertidos a CO₂ no ciclo seguinte. Os dois carbonos realçados a azul é que serão convertidos a CO₂ neste ciclo..... 12

Figura 4. Representação esquemática da hidrólise da sacarose em glucose e frutose. 13

Figura 5. Representação esquemática da via de Leloir. Os enzimas responsáveis pela catálise de cada reação estão representadas pelos números. (1) *galactose mutase*, (2) *galactocinase*, (3) *Galactose-1-fosfato uridililtransferase* e (4) *UDP-glucose 4-epimerase*..... 13

Figura 6. Esquema representativo da Via das Pentoses Fosfatadas. Esta via é composta por um ramo oxidativo que dá origem ao NADPH e um ramo não oxidativo que faz a conversão dos açúcares fosforilados em pentoses fosfatadas..... 14

Figura 7. Representação esquemática da hidrólise da lactose em galactose e glucose, através da catálise pelo enzima *β-galactosidase*..... 15

Figura 8. Concentração de açúcares dissolvidos no soro. (A) Soro com proteína, utilizando o substrato misto a 40 % (p/v) com 1 e 2 h de extração. (B) Soro com e sem proteína, utilizando o substrato misto a 30 e 40 % (p/v) com 1 e 2 h de tempo de extração. (C) Açúcares totais da alfarroba dissolvidos no soro com proteína, para os rácios 20, 30 e 40 % (p/v) com o tempo de extração de 1 e 2 h. (D) Açúcares dissolvidos no soro com proteína, utilizando o substrato misto a 30 e 40 % com 1 e 2 h de tempo de extração. 36

Figura 9. Perfil de, produção de etanol, consumo de açúcares, e crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista, nas proporções (A) 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis* (B) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e (C) 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h utilizando o substrato misto a 40 % (p/v) e a concentração total de açúcares iniciais de 121 g/L. 41

Figura 10. Perfil de consumo de açúcares individuais presentes no substrato misto a 40 %, pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista com as proporções, (A) 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, (B) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e (C) 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* com a duração de 96 h, utilizando a fermentação do substrato misto a 40 % (p/v) que contém uma concentração total de açúcares iniciais de 121 g/L. 43

Figura 11. Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular, da levedura *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura (A) e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 nas proporções (B) 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, (C) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*, e (D) 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis* (D). As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h e em agitadora orbital a 30 °C e 150 rpm utilizando a fermentação do substrato misto a 40 % (p/v) de concentração total de açúcares iniciais de 236 g/L. 45

Figura 12. Perfil de consumo de açúcares individuais do substrato misto, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura (A) e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, com as proporções (B) 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, (C) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e (D) 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis* . As fermentações foram

realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h numa agitadora orbital a 30 °C e 150 rpm, utilizando a fermentação do substrato misto a 40 % (p/v) que contém uma concentração total de açúcares de 236 g/L..... 48

Figura 13. Resultados dos diferentes parâmetros estudados para a cultura mista, composta por *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 nas proporções 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis* nas duas condições de açúcar testadas. (A) concentração celular máxima obtida, (B) concentração de lactose e açúcares residuais, (C) Rendimento de produto obtido em função do substrato consumido, (D) concentração máxima de etanol obtido, (E) Produtividade de etanol..... 50

Figura 14. Resultado dos ensaios de deteção da presença de toxinas *killer* produzidas pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 à temperatura de 20 e 30 °C. (A) sensibilidade positiva da levedura *S. cerevisiae* às toxinas *killer* produzidas pela levedura *K. lactis* a 20 °C, (B) sensibilidade negativa da levedura *K. lactis* às toxinas produzidas pela levedura *S. cerevisiae* a 20 °C, (C) sensibilidade negativa da levedura *S. cerevisiae* às toxinas *killer* produzidas pela levedura *K. lactis* a 30 °C e (D) sensibilidade negativa da levedura *K. lactis* às toxinas *killer* produzidas pela levedura *S. cerevisiae* a 30 °C. 53

Figura 15. Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular da cultura pura da levedura, *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 (A) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* em reator biológico STR de 3-L a 30°C, 250 rpm e 0,042 vvm (B) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* em *erlenmeyer* a 30 °C e 150 rpm e (C) 100 % *S. cerevisiae* em *erlenmeyer* a 30 °C e 150 rpm. Todas as fermentações foram realizadas com a fermentação do substrato misto a 40 % (p/v). 55

Figura 16. Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. (A) em reator biológico STR de 3-L a 30 °C, 60 rpm e 0,042 vvm até às 48 h e 250 rpm e 0,13 vvm das 48 às 96 h (B) em reator biológico STR de 3-L a 30 °C, 250 rpm e 0,042 vvm (C) em *erlenmeyer* numa agitadora orbital a 30 °C e 150 rpm (D) em *erlenmeyer* com a cultura pura da levedura *S. cerevisiae* numa agitadora orbital a 30 °C 150 rpm. 58

Figura 17. Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento da cultura mista, composta pelas leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. A fermentação foi realizada com o substrato misto a 40 % (p/v), em reator biológico STR de 3-L em modo de operação *fed-batch* durante 120 h. O substrato apresentava uma concentração total de açúcares de 242 g/L e o reator foi alimentado às 48 e 78 h com extrato de alfarroba com concentração de açúcares de 52 g/L e 59 g/L, respectivamente. 62

Índice de tabelas

Tabela 1. Concentração média de açúcares dissolvidos no soro com proteína, concentração total de açúcares presentes no substrato misto para os rácios 20, 30 e 40 % (p/v), com o tempo de extração de 1 hora e temperatura de 25 °C..... 34

Tabela 2. Valores médios de pH e condutividade para as amostras de soro com proteína a as amostras de substrato misto com os rácios 20, 30 e 40 % (p/v), com o tempo de extração de 2h e temperatura de 25 °C..... 34

Tabela 3. Concentração média de açúcares dissolvidos no soro com proteína, concentração total de açúcares presentes no substrato misto e percentagem de volume recuperado para os rácios 20, 30 e 40 % (p/v), com o tempo de extração de 2 horas e temperatura de 25 °C. 35

Tabela 4. Concentração média de açúcares dissolvidos no soro sem proteína e concentração total de açúcares presentes no substrato misto para os rácios 20, 30 e 40 % (p/v), com o tempo de extração de 1 hora e temperatura de 25 °C..... 38

Tabela 5. Valores médios obtidos de pH e condutividade para as amostras de soro sem proteína e rácios 20, 30 e 40 % (p/v).Com o tempo de extração de 2 h e temperatura de 25 °C.. 39

Tabela 6. Concentração média de açúcares dissolvidos no soro sem proteína, concentração total de açúcares presentes no substrato misto e percentagem de volume recuperado para os rácios 20, 30 e 40 % (p/v), com o tempo de extração de 2 hora e temperatura de 25 °C..... 39

Tabela 7. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), com utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista nas proporções 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h e o substrato utilizado apresentava uma concentração total de açúcares de 121 g/L. 42

Tabela 8. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), com utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista, nas proporções 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e 30 % *S.*

cerevisiae: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h e o substrato misto apresentava uma concentração total de açúcares de 236 g/L. 46

Tabela 9. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), com utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura e com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista, nas proporções 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h e o substrato misto apresentava uma concentração total de açúcares de 236 g/L. 51

Tabela 10. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), com a utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. As fermentações decorreram durante 96 h em reator biológico de 3-L a 30 °C, 0,042 vvm e 250 rpm ou em *erlenmeyer* a 30 °C e 150 rpm..... 56

Tabela 11. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), com a utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. As fermentações decorreram em reator biológico STR de 3-L e em *erlenmeyer* durante 96 h. 59

Tabela 12. Parâmetros fermentativos determinados para os dois períodos em que decorreu a fermentação com a utilização da cultura mista composta pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. A fermentação decorreu durante 96 h em reator biológico de 3-L. Durante as primeiras 48 h não houve arejamento e a agitação foi colocada a 60 rpm, das 48 às 96 h estes parâmetros foram alterados para 0,13 vvm e 250 rpm, respetivamente. O substrato misto utilizado, 40 % (p/v) apresentava uma concentração total de açúcares de 251 g/L..... 61

Tabela 13. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), utilizando a cultura mista composta pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. A fermentação foi realizada em reator biológico em modo *fed-batch*. O arejamento e agitação foram mantidos constantes, com valores

de 0,13 vvm e 250 rpm, respetivamente. O substrato misto apresentava uma concentração total de açúcares de 242 g/L e as adições de 52 g/L e 59 g/L de extrato concentrado de alfarroba foram feitas às 48 e 78 h, respetivamente..... 63

Tabela 14. Parâmetros fermentativos determinados para os três períodos em que decorreu a fermentação, utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista, na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. A fermentação foi realizada em reator biológico em modo *fed-batch*. O arejamento e agitação foram mantidos constantes com valores de 0,13 vvm e 250 rpm, respetivamente. O substrato misto apresentava uma concentração total de açúcares de 242 g/L e as adições de 52 g/L e 59 g/L de extrato concentrado de alfarroba foram feitas às 48 e 78 h, respetivamente. 65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve referência histórica do conceito fermentação

Com origem na antiguidade, a arte da fermentação talvez tenha sido descoberta por mero acaso, enquanto as populações experimentavam o sabor e textura de alimentos fermentados ¹.

Sendo uma das técnicas mais antigas de preservação de alimentos, a fermentação tornou-se num processo popular no ceio das civilizações, não só pela sua vantagem de conservar, mas também porque as pessoas, gradualmente, se aperceberiam do valor terapêutico e nutricional, que estes alimentos e bebidas lhes ofereciam.

Como processo, a fermentação consiste na simples transformação de matérias-primas, contendo açúcar disponível na sua composição em diferentes produtos biológicos, altamente aceitáveis para os consumidores. Utilizando como princípio básico, o crescimento de microrganismos e a sua capacidade de interação com diversos substratos ¹. A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual açúcares como a glucose, frutose e sacarose são convertidos em energia celular, com produção de etanol e dióxido de carbono como metabolitos.

A existência destes microrganismos foi primeiramente verificada em 1680 por Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723), que descreveu como ‘*animalcules*’ os pequenos microrganismos que observara no microscópio à época, mas que não associou diretamente à fermentação. Mais tarde, no final do séc. XVII e início do séc. XVIII, Antoine Lavoisier (1743-1794), considerado o fundador da química moderna, e Joseph Gay-Lussac (1778-1850), elaboraram separadamente, uma série de correlações quantitativas para a fermentação alcoólica, mas que não esclareciam o processo que lhe estaria subjacente ². Lavoisier chegou mesmo a descrever a fermentação alcoólica como um dos fenómenos mais extraordinários da química ³.

Em 1837 e 1838, o físico e engenheiro francês, Charles Cagniard-Latour (1777-1859) e o fisiologista alemão Theodor Schwann (1810-1882) ao observarem as leveduras da cerveja e do vinho, conseguiram provar que estas tinham a capacidade de se reproduzirem e que o processo fermentativo estaria dependente da sua existência, derrubando assim o conceito de geração espontânea ².

Louis Pasteur (1822-1895) entre o período de 1855-1875 também fez contribuições significativas para a compreensão do papel das leveduras na fermentação ao afirmar que “as leveduras utilizam algo dos açúcares” e que 95 % dos produtos de fermentação seriam etanol e CO₂⁴. Provou que existem diversos tipos de fermentação, bem como a existência de diferenças no consumo de açúcares pelas leveduras em condições aeróbicas e anaeróbicas⁵.

Foi com a sua resposta à origem e à natureza da fermentação, bem como as suas descobertas no período entre 1850 a 1890, que Pasteur ajudou a criar uma nova área científica, a microbiologia².

Neste período de final do séc. XIX, entre as insistentes tentativas de Robert Koch (1843-1910) na obtenção de culturas puras, ou na tentativa de fazer crescer colónias individuais em placas com agar por Fannie Hesse, mulher de um dos colegas de Koch⁶, que Eduard Buchner (1860-1917) colocou a hipótese de que o processo fermentativo não estaria dependente dos organismos vivos, mas sim de uma substância solúvel, não escondendo qualquer dúvida que seria uma proteína, a qual lhe deu o nome de *zymase*².

Esta descoberta de Buchner, levou a um grande progresso no estudo do metabolismo celular, nomeadamente no ciclo da glicólise e de todos e os seus intermediários. Até que, em 1940 este esquema estaria completamente elucidado, graças à dedicação de vários bioquímicos, cujas descobertas lhes garantiram a atribuição de alguns prémios Nobel na área, com destaque para Arthur Harden (1865-1940), Carl Neuberg (1877-1956), Otto Fritz Meyerhof (1884-1951), Gustav Embden (1874-1933), Jacob Karol Parnas (1884-1949), Karl Lohmann (1898-1978 pelo seu trabalho desenvolvido na caracterização de todos os enzimas envolvidas na fermentação alcoólica⁷.

Foi com o contributo de todos estes investigadores e de muitos outros que não foram referenciados, que esta área científica evoluiu durante todo o séc. XX.

O conhecimento sobre os microrganismos e o seu metabolismo fez com que atualmente os processos fermentativos não sejam apenas empregados para a produção de vinho ou cerveja, como faziam à época, os romanos ou os egípcios, respetivamente. Atualmente, com a evolução da microbiologia, engenharia bioquímica ou biologia molecular, sabemos que a maioria das espécies de leveduras são capazes de fermentar açúcar, convertendo-o em etanol. Estes microrganismos

tornaram-se famosos devido a esta capacidade, especialmente à escala industrial, sendo este o motivo pela qual o estudo científico nesta área tem um vasto apoio financeiro ⁷.

1.2 Enquadramento dos biocombustíveis

Um dos grandes desafios da sociedade no séc. XXI foca-se em dar resposta ao crescente consumo de energia para os setores dos transportes, aquecimento e processos industriais, bem como o fornecimento de matéria-prima para a indústria de forma sustentável ⁸.

O mundo atravessa uma progressiva escassez dos seus recursos energéticos maioritariamente dominados por combustíveis de origem fóssil. O panorama global deste mercado tem-se tornado cada vez mais negro. Crises permanentes no Médio Oriente e a progressiva especulação da bolsa de valores, entre outros fatores, causaram a subida do preço do barril de petróleo para valores acima dos 74 € ⁹.

Por outro lado, a combustão dos derivados fósseis é responsável por 73 % do total de CO₂ produzido ¹⁰, resultando em diferentes problemas ambientais, incluindo aquecimento global, deterioração da qualidade do ar, derrames de petróleo, chuvas ácidas, entre outros ¹¹.

Assim, de acordo com o segundo período de compromisso estabelecido pelo protocolo de Quioto entre 2013-2020, a Comissão Europeia estabeleceu uma meta de redução da emissão de gases que provocam efeito de estufa em 20 % até 2020. Esta redução é baseada nos valores registados em 1990 e significa também uma redução equivalente a -14 % face aos valores registados em 2005 ¹².

Consequentemente, o governo português publicou em Diário da República, o Decreto-lei nº 117/2010 de 25 de Outubro, onde uma das linhas fundamentais para a modernização estrutural do País seria a liderança na revolução energética, salientando a importância de atingir a meta de incorporação de 31 % de consumo final de energia com origem renovável, dos quais 10 % no setor dos transportes até 2020 ¹³.

Até ao momento, o bioetanol tem-se apresentado como uma das maiores alternativas à dependência destes combustíveis de origem petrolífera, o que o tem conduzido a um aumento dramático da sua produção mundial ¹⁴.

Os álcoois têm sido utilizados como combustíveis desde a criação do automóvel. A mistura de etanol com outros combustíveis tem sido utilizado com sucesso em todo o tipo de veículos com motores a gasolina. O bioetanol possui um índice de octanas mais elevado, limites de inflamabilidade mais amplas e um calor de vaporização superior ao da gasolina. Estas propriedades permitem-lhe uma taxa maior de compressão e um menor tempo de combustão, o que contribui para ter vantagens sobre o uso da gasolina em motores de combustão interna ¹⁵.

Atualmente, a maioria do etanol produzido mundialmente provém de biomassa orgânica ¹¹. Dependendo do tipo de matéria-prima que é utilizado, poderá ser classificado de primeira ou segunda geração.

O bioetanol de primeira geração é produzido a partir de culturas agrícolas por tecnologias tradicionais ¹⁶, o que levanta questões éticas acerca da origem das matérias-primas, incluindo o impacto que podem ter na biodiversidade e no uso de terrenos para concorrência direta com as culturas alimentares.

Por outro lado, o bioetanol de segunda geração surge no sentido de arranjar alternativas mais sustentáveis, utilizando resíduos agroindustriais, ou resíduos de biomassa vegetal o que para além do seu baixo custo têm a vantagem adicional da ausência de preocupações éticas sobre o uso de potenciais recursos alimentares. Desta forma, poderão vir a complementar os recursos fósseis, como única fonte de combustíveis e apresentarem vantagens em termos de sustentabilidade económica e energética, disponibilidade de recursos e confiabilidade do seu fornecimento ¹⁷.

1.2.1 Contributos para uma análise económica da produção de etanol

A produção de bioetanol pode criar um impacto positivo no desenvolvimento económico, através da criação de oportunidades de trabalho, redução dos custos provenientes da importação de petróleo e no aumento do acesso a serviços energéticos modernos ¹⁸.

Os dois maiores produtores de bioetanol a nível mundial são os EUA e o Brasil, representando 62 % da produção total mundial ¹⁹ e utilizam como principais matérias-primas, milho e cana do açúcar, respetivamente.

Mundialmente, a produção de bioetanol aumentou de 17,25 mil milhões de litros em 2000 para 46 mil milhões em 2007. Com todos os programas políticos de compromisso acerca da utilização de biocombustíveis na América, Ásia e Europa, estima-se que esta produção ultrapasse os 125 mil milhões em 2020²⁰. Em 2007 essa produção representava aproximadamente 4 % dos 1300 mil milhões de litros de gasolina consumidos a nível mundial.

Tomando o exemplo do combustível E85, uma mistura de 85 % etanol e 15 % gasolina em volume. Em 100 Km percorridos por um veículo ligeiro de passageiros cujo combustível é gasolina, o seu consumo seria de 11 L. O mesmo veículo, utilizando o combustível E85 consome 2,2 L de gasolina e 12 L de bioetanol²⁰.

Os custos de produção de bioetanol estão muito dependentes da matéria-prima utilizada e constituem 60-75 % do custo total de produção²⁰.

O bioetanol produzido a partir da cana do açúcar, tem um custo de produção de 0,3 €/L, ao passo que, a partir de material lenho-celulósico do milho têm um custo de 0,75 €/L e 0,65 €/L, respetivamente²¹.

No caso da utilização da alfarroba, estima-se que a construção de uma unidade fabril com capacidade para tratar 68 mil tons/ano de alfarroba requer um custo mínimo de produção de 0,51 €/L^{21 22}.

1.3 Produção de bioetanol

1.3.1 Processo geral de produção de bioetanol

O processo de produção de bioetanol difere consoante o tipo de matéria-prima utilizada.

O processo mais complexo é o que diz respeito à utilização de biomassa lenho-celulósica, porque ao contrário do que acontece com a cana-de-açúcar em que os seus açúcares já estão disponíveis para serem diretamente fermentados pelos microrganismos, os açúcares na biomassa lenho-celulósica encontram-se na celulose e na hemicelulose na forma de polímeros, apresentando-se intercalados entre si e cobertos pela lenhina, uma macromolécula de estrutura molecular aromática complexa e que constitui a parede celular vegetal, possuindo uma estrutura de difícil desestabilização²².

O processo geral utilizando material lenho-celulósico inclui cinco passos principais: Pré tratamento da biomassa, hidrólise da celulose e hemicelulose, fermentação das hexoses, separação do produto e tratamento de efluentes ²³. No caso da utilização de biomassa em que os açúcares estão diretamente disponíveis, não existem as duas primeiras fases. A utilização de matérias-primas como o milho e o trigo onde o seu principal hidrato de carbono é o amido apenas precisa de uma fase de hidrólise, de modo a converter este polímero de moléculas de glucose em açúcares fermentáveis ¹⁵.

Devido à estrutura complexa do material lenho celulósico, o principal desafio no processo é a sua fase de pré-tratamento, em que o objetivo principal é a alteração da estrutura da biomassa celulósica, de forma a tornar mais acessível o acesso dos enzimas que convertem estes polímeros a açúcares fermentáveis. Uma fase de pré-tratamento eficiente deve ser capaz de, aumentar a formação de açúcares, evitar a perda ou degradação de hidratos de carbono, evitar a formação de subprodutos inibitórios a processos de hidrólise e fermentações posteriores e rentável economicamente ¹⁵.

Após a fase de pré-tratamento, a celulose é preparada para a fase de hidrólise, de forma a ser transformada em açúcares fermentáveis. Nesta etapa, quando não existe a fase de pré-tratamento o seu rendimento é cerca de 20 %, ao passo que quando existe essa fase, o rendimento sobe para 90 % ²⁰. A maioria dos processos nesta etapa utiliza celulasas ou ácido sulfúrico a várias concentrações e temperaturas elevadas. A utilização de enzimas torna esta etapa mais dispendiosa, por outro lado o uso de ácido sulfúrico faz com que seja mais económica, mas os custos associados à sua eliminação são também dispendiosos, além de que têm a desvantagem de degradação da glucose a temperaturas elevadas ¹⁵.

Após a hidrólise enzimática, é seguida uma fermentação que envolve a utilização de microrganismos com capacidade de converter açúcares fermentáveis em etanol e outros subprodutos. Estes microrganismos metabolizam tipicamente açúcares compostos por seis átomos de carbono e são selecionados de acordo com a sua compatibilidade nos substratos utilizados, processos e equipamentos existentes. Os principais parâmetros de uma fermentação são a temperatura, pH, tolerância ao etanol, taxa de crescimento, rendimento, produtividade, tolerância osmótica e estabilidade genética. Além disso, dependendo do seu regime de alimentação, a fermentação pode ser realizada em modo de operação *batch* que é um sistema fechado sem adição

de nutrientes ao longo da fermentação e caracterizado pela variação da concentração celular, dos produtos metabólicos e nutrientes ao longo do tempo. Sistema de operação em *fed-batch*, que é caracterizado por um crescimento em descontínuo na fase inicial da fermentação e uma alimentação periódica de nutrientes quando existe a sua depleção e por último o sistema contínuo, em que todos os nutrientes são adicionados continuamente ao reator após um crescimento em descontínuo e existe um efluente retirado do reator ao mesmo caudal de adição dos nutrientes. A escolha do processo mais adequado depende, por exemplo, das propriedades cinéticas dos microrganismos e aspetos económicos. Os sistemas de operação *fed-batch* são amplamente utilizados em aplicações industriais pelas suas vantagens de aumentar a concentração de células viáveis durante um espaço de tempo maior e permitir a acumulação de concentrações mais elevadas de produto¹⁵. Após o processo fermentativo, a última etapa é a separação do etanol do meio fermentativo por destilação²³.

1.3.2 Matérias-primas

Os principais tipos de matérias-primas utilizadas para a produção de bioetanol são: (i) matérias-primas que contêm açúcares diretamente fermentáveis pelos microrganismos, como a cana-de-açúcar²⁴, beterraba²⁵, alfarroba^{17 26} e sorgo²⁷, (ii) polissacarídeos como o amido⁹ que necessitam de sofrer hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentáveis e (iii) de biomassa lenho-celulósica^{28 26}.

1.3.2.1 Alfarroba

A alfarrobeira (*Ceratonia Siliqua L.*) é uma árvore amplamente cultivada em regiões do Mediterrâneo e sudoeste asiático²⁹. Pertence à subfamília *Caesalpinaceae* da família *Leguminosae*. Tem a particularidade de se conseguir desenvolver em terrenos secos, com solos pobres e calcários^{30 17}.

Atualmente, a produção mundial de alfarroba ronda 400 mil toneladas por ano, sendo os principais exportadores a Espanha (42%), Itália (16%), Portugal (10%), Marrocos (8%), Grécia (7%), Chipre (6%) e Turquia (5%)¹⁷.

Em Portugal, todos os anos são produzidas entre 40 a 55 mil toneladas de alfarroba por ano, com o preço atual a rondar 5 €/arroba ³¹.

A alfarroba é maioritariamente utilizada para a produção da goma de alfarroba, um aditivo natural com empregabilidade na indústria alimentar, têxtil e farmacêutica. Este processo apenas requer a utilização das suas sementes (10 % do peso total). Os restantes 90 % referem-se à polpa, que é considerado um desperdício ³², sendo maioritariamente empregado em ração para animais e nutrição humana, incluindo xaropes e como substituto do cacau devido à ausência de cafeína e teobromina ³³.

A polpa de alfarroba contém um elevado teor em mono e dissacarídeos (40-60 %). Predominantemente sacarose (34-42 %), frutose (10-12 %) e glucose (7-10 %). Contém também um baixo teor em proteínas (3-4 %) e lípidos (0,4-0,8 %) ³⁰.

Devido a este elevado conteúdo em açúcares, diversos esforços têm sido desenvolvidos no sentido de dar utilidades atrativas à polpa de alfarroba, utilizando-a como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos biológicos de valor acrescentado. Algumas alternativas são a utilização como substrato para produção de dextrano e frutose ³⁴, ácido cítrico ³⁵ ou etanol ¹⁷ como é o caso deste trabalho.

1.3.2.2 Soro do queijo

A indústria de lacticínios é dividida em vários setores, que estão associados a produção de diversos efluentes contaminantes. Estes efluentes têm diferentes características de acordo com o tipo de produto comercializado (iogurte, queijo, leite) ³⁶.

O soro do queijo é um efluente da indústria de lacticínios e o mais importante, devido ao seu volume de produção e elevado conteúdo em matéria orgânica ^{37 38}. Apresenta uma Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO) e uma Carência Química de Oxigénio (CQO) de 50 e 80 g/L, respetivamente ^{39 40}. Na verdade, a descarga contínua deste efluente para a terra pode alterar a estrutura química e física dos solos, colocando em perigo a produtividade das culturas e levar a sérios problemas de poluição em águas subterrâneas ⁴⁰.

Por regra geral, são produzidos cerca de 9 L de soro para produzir um 1 kg de coalhada de queijo. Atualmente, estima-se que a produção mundial de soro do queijo seja superior a 160 milhões de toneladas por ano. Em Portugal, são produzidos a cada ano cerca de 500-560 mil toneladas de soro⁵.

Este subproduto líquido, tem por característica uma cor amarelada que é causada pela presença de riboflavina (vitamina B2)³⁶ e é constituído predominantemente por lactose (45-50 g/L), proteínas solúveis (6-8 g/L), lípidos (4-5 g/L) e sais minerais (8-10 % do produto seco). Estes sais minerais são constituídos por NaCl e KCl (mais de 50%), sais de cálcio (maioritariamente fosfato), entre outros. Contém também quantidades consideráveis de ácido láctico (0,5 g/L), ácido cítrico, ureia e vitaminas do grupo B⁴¹.

Tradicionalmente, a maioria das fábricas de queijo eliminavam o soro por descarga direta em solos ou águas (lagos, rios, oceanos), sem qualquer pré-tratamento. Outras soluções passavam pela construção de tanques de armazenamento ou descargas no sistema de esgoto. Contudo, mesmo com a diluição em outras águas residuais menos poluentes, podem prejudicar a eficiência e estabilidade dos microrganismos em processos biológicos nas estações de tratamento de água. Atualmente é considerado um efluente causador de graves danos ambientais⁴². Deste modo, o tratamento deste efluente tornou-se um desafio para a indústria no sentido de processar o seu tratamento e em simultâneo valorizar este subproduto em que a produção de bioetanol tem sido largamente referenciada^{37 43 39 44 45} como um dos produtos industriais a partir desta matéria-prima.

Atualmente, estima-se que cerca de 50 % da produção mundial de soro do queijo seja tratada e transformada em produtos alimentares³⁷. Outras alternativas passam pela sua valorização através de processos fermentativos controlados para produção de ácido-láctico, butanol, glicerol, acetona, proteínas ou etanol³⁶. Contudo, esta última opção apesar de alguns autores referirem que pode não ser viável industrialmente devido ao baixo teor em lactose que apenas permite atingir valores de etanol entre 2-3 % (v/v)⁴⁶, existem unidades industriais de produção na Nova Zelândia com um custo de produção entre 0,33-0,39 €/L⁴⁷.

1.3.3 Microrganismos fermentativos

1.3.3.1 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) é utilizada há milhares de anos pelos seres humanos. Este organismo eucariota é não só utilizado em diversos processos biotecnológicos tradicionais, incluindo o processo de fabrico do pão ou bebidas alcoólicas, mas também em processos industriais de larga escala como a produção de extrato de levedura, aditivos alimentares (enzimas, vitaminas, e agentes aromatizantes) ou proteínas heterólogas (vacinas e outros compostos terapêuticos) ⁴⁸.

Esta levedura, que tem o seu genoma completamente sequenciado, é usualmente a primeira escolha no que respeita a processos de fermentação alcoólica. A sua preferência resulta da capacidade versátil em se conseguir desenvolver em diversos substratos, fermentáveis e não fermentáveis e também pela sua capacidade de tolerância ao etanol, permitindo uma produção até 20 % (v/v) ^{48 37}.

A regulação e o metabolismo do consumo de açúcares na levedura *S. cerevisiae* estão descritos ao nível metabólico e molecular ^{17 49 50}.

A principal via metabólica envolvida na produção de etanol reside no ciclo da glicólise, através do qual, resulta a produção de duas moléculas de piruvato a partir de uma molécula de glucose (Figura 1) ^{14 51}.

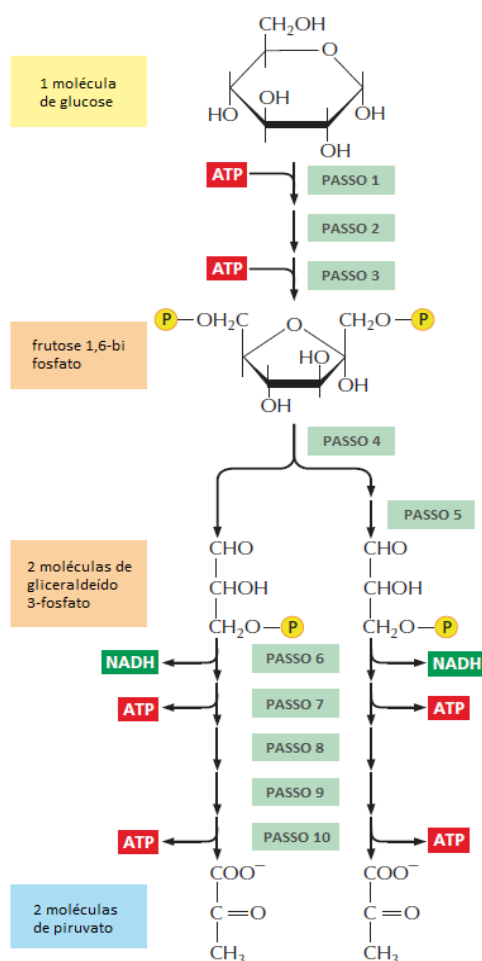


Figura 1. Ciclo da glicólise. Cada um dos 10 passos deste ciclo é catalisada por um enzima diferente. No passo 4 existe a clivagem de um açúcar de 6 carbonos em 2 açúcares de 3 carbonos, de modo que o número de moléculas após esta fase duplica. Note-se que 1 dos produtos do passo 4 necessita de ser isomerizado no passo 5 previamente ao início do passo 6. Como indicado, no passo 6 começa a fase de geração de energia da glicólise, que resulta na síntese líquida de ATP e NADH. Adaptado de Alberts *et al.*, 2014⁵¹.

Sob condições anaeróbicas, o piruvato é descarboxilado em acetaldeído, libertando CO_2 . Posteriormente, o acetaldeído é reduzido a etanol pelo NADH. Este processo tem um rendimento teórico de 0,51 gramas de etanol produzido por gramas de glicose consumida (Figura 2)¹⁴.

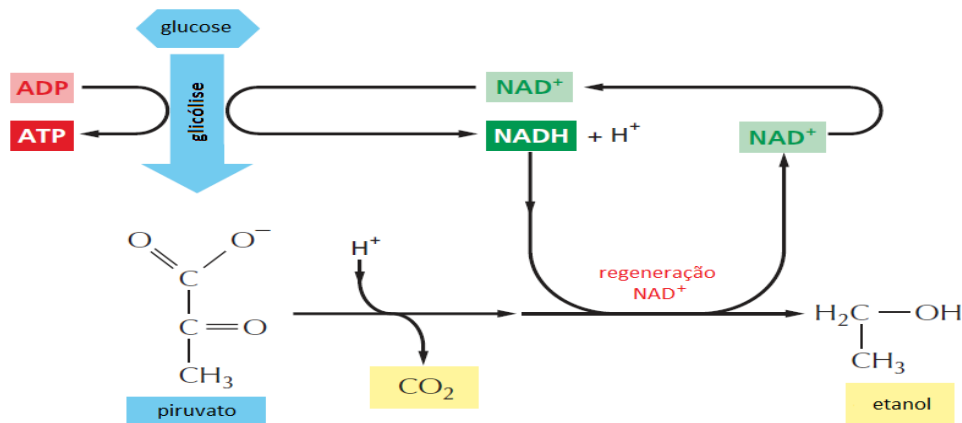


Figura 2. Degradação do piruvato na ausência de oxigénio por fermentação alcoólica. Nos microrganismos com capacidade de crescimento em condições anaeróbicas, o piruvato é convertido a etanol e CO₂. Esta via regenera o NAD⁺ a partir do NADH para permitir a continuação do ciclo da glicólise. Note-se que por cada molécula de glucose que entra na glicólise são produzidas duas moléculas de piruvato (apenas um piruvato está representado neste esquema). A consequente fermentação dos dois piruvatos produz duas moléculas de CO₂ e etanol. Adaptado de Alberts *et al.*, 2014 ⁵¹.

Em condições aeróbicas, a produção de etanol ocorre a partir do momento em que o fluxo de carbonos no ciclo da glicólise excede a capacidade que o ciclo do ácido cítrico tem em oxidar o piruvato produzido. Desta forma, o metabolismo completamente aeróbico apenas ocorre durante a utilização de baixas concentrações de açúcares (Figura 3) ⁴⁸.

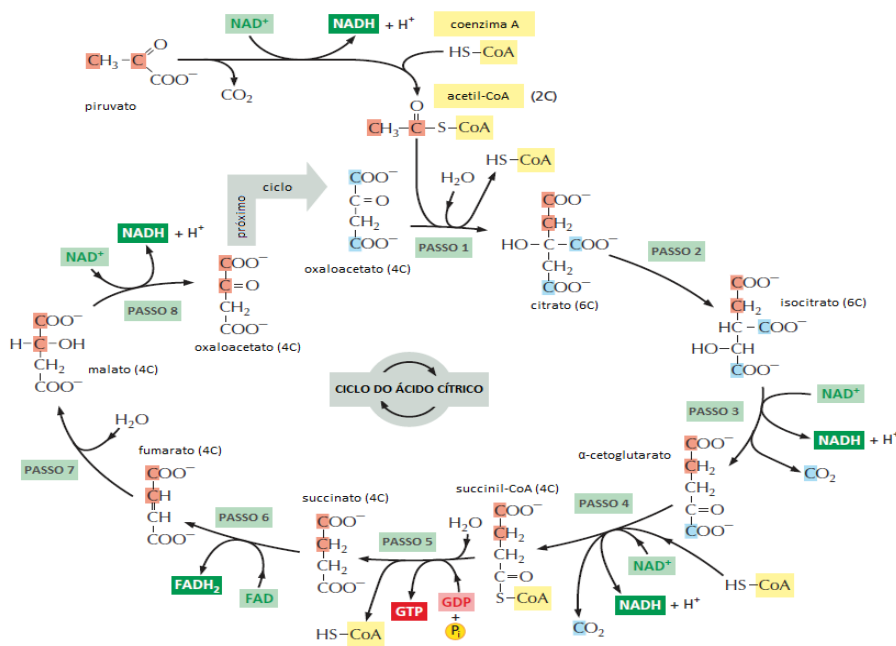


Figura 3. Esquema completo do ciclo do ácido cítrico. Os dois carbonos do acetil-CoA que entram neste ciclo (realçados a vermelho) apenas serão convertidos a CO₂ no ciclo seguinte. Os dois carbonos realçados a azul que serão convertidos a CO₂ neste ciclo. Adaptado de Alberts *et al.*, 2014 ⁵¹.

O açúcar mais abundante na utilização industrial da levedura *S. cerevisiae* é sem dúvida a sacarose, daí o seu sucesso na produção de etanol a partir da cana do açúcar. A hidrólise deste dissacarídeo em glucose e frutose ⁵² ocorre maioritariamente fora da célula pelo enzima invertase (Figura 4) extracelular presente em geral na parede celular da levedura.

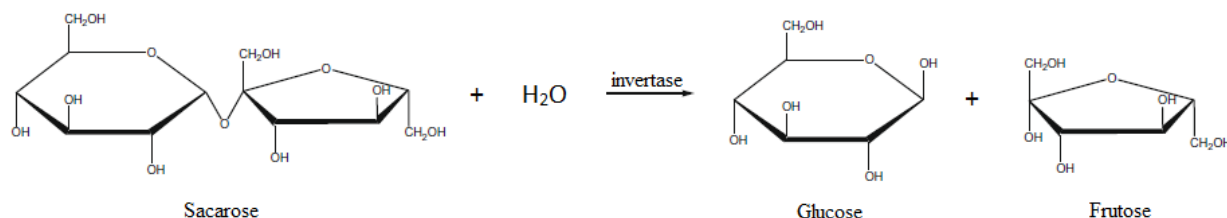


Figura 4. Representação esquemática da hidrólise da sacarose em glucose e frutose. Adaptado de Pito *et al.*, 2009 ⁵².

Seguidamente, o transporte destes dois glicosídeos é feito mediante numerosas famílias de transportadores de açúcar, sendo que nesta levedura estima-se serem cerca de vinte proteínas capazes de fazer o transporte de glucose e frutose por difusão facilitada através da membrana plasmática ^{17 48 53}. Mais de 90 % da glucose é metabolizada pelo ciclo da glicólise ⁵⁴.

O transporte da galactose é feito através da permease Gal2p ⁵⁵. Após entrar na célula, a galactose é endereçada para a via de Leloir (Figura 5), de forma a ser convertida em glucose-1-fosfato ⁵⁶. Seguidamente, esta glucose-1-fosfato é fosforilada a glucose-6-fosfato através do enzima *fosfoglucomutase* ⁵⁷ de forma a poder ser metabolizada pelo ciclo da glicólise ou pela via das pentoses fosfatadas (Figura 6) ^{58 59}.

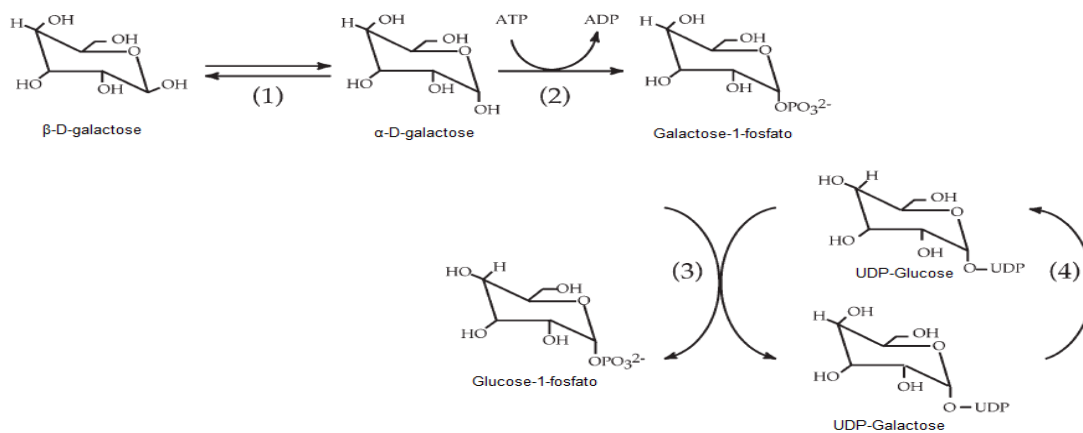


Figura 5. Representação esquemática da via de Leloir. Os enzimas responsáveis pela catálise de cada reação estão representadas pelos números. (1) *galactose mutase*, (2) *galactocinase*, (3) *Galactose-1-fosfato uridililtransferase* e (4) *UDP-glucose 4-epimerase*. Adaptado de Holden *et al.*, 2004 ⁵⁶.

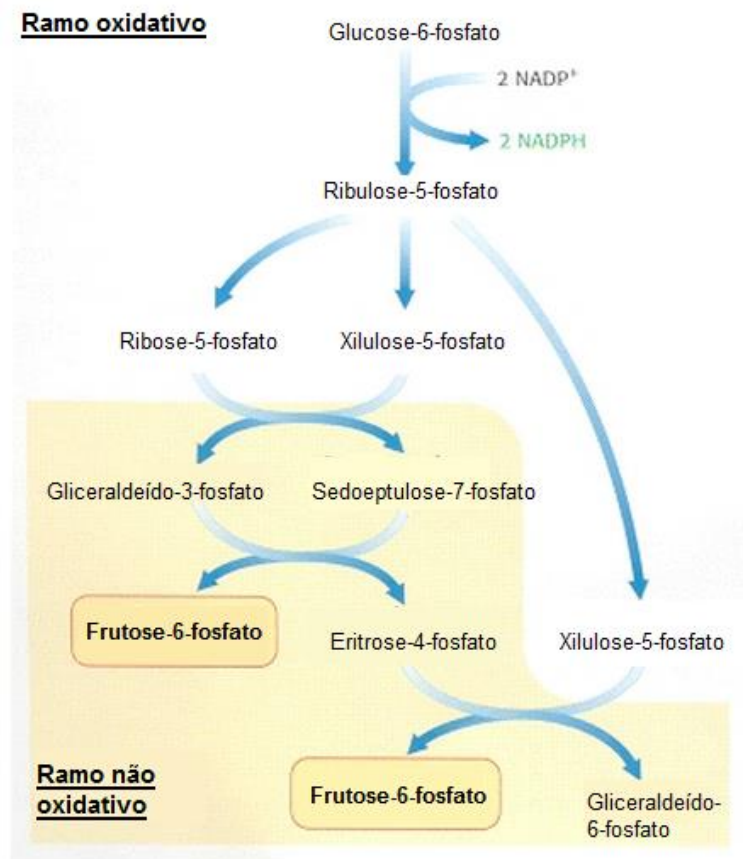


Figura 6. Esquema representativo da Via das Pentoses Fosfatadas. Esta via é composta por um ramo oxidativo que dá origem ao NADPH e um ramo não oxidativo que faz a conversão dos açúcares fosforilados em pentoses fosfatadas. Adaptado de Berg *et al.*, 2002 ⁵⁹.

Durante o processo fermentativo, as leveduras podem ser expostas a diversos stresses ambientais e nutricionais que podem também alterar a sua eficiência na produção de etanol. Na levedura *S. cerevisiae* as principais fontes de stress são a pressão osmótica (25 % (p/v)), temperatura (35~38 °C), pH (< 3,5), íons de sódio (> 500 mg/L), ácido acético (0,05% (p/v)) e ácido láctico (0,8% (p/v)) ¹⁴.

1.3.3.2 Levedura *Kluyveromyces lactis*

A levedura que hoje possui o nome de *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), era conhecida originalmente como *Saccharomyces lactis*, mas desde a descoberta da sua incapacidade em fermentar pão, foi agrupada no género *Kluyveromyces* em 1965⁶⁰.

Desde 1950, a levedura *K. lactis* tem sido extensivamente utilizada na preparação comercial de produtos lácticos sem lactose. Esta levedura não patogénica tem a capacidade de degradar lactose nos seus monossacarídeos constituintes, glucose e galactose (Figura 7), devido à presença do enzima β -galactosidase. Esta capacidade de utilizar lactose como fonte de carbono é também aproveitada pela indústria na produção em larga escala deste enzima^{61 62}.

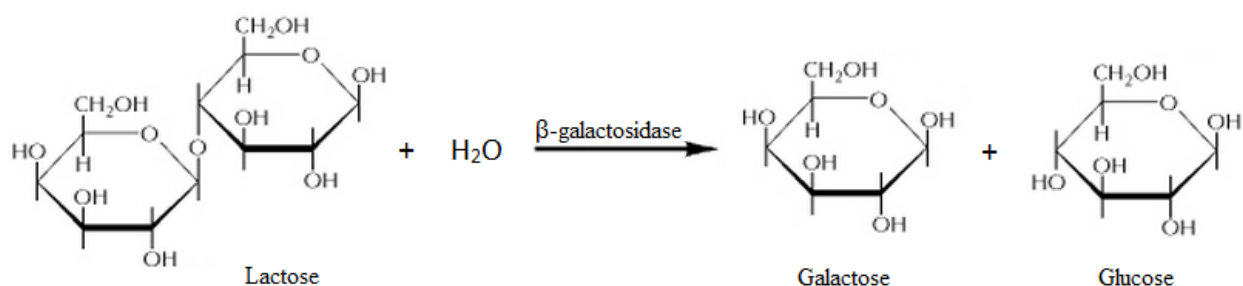


Figura 7. Representação esquemática da hidrólise da lactose em galactose e glucose, através da catálise pelo enzima β -galactosidase. Adaptado de Cooper, 2000⁶².

Tal como na levedura *S. cerevisiae*, o piruvato produzido no ciclo da glicólise pode ter destinos distintos. Quando o piruvato é convertido pelo ciclo do ácido cítrico, o mecanismo oxidativo sobrepõe-se. Quando o piruvato é reduzido a etanol, o metabolismo fermentativo sobrepõe-se. Estes dois destinos do piruvato podem existir simultaneamente, tornando a levedura respiro-fermentativa.

As leveduras, não formam um grupo homogéneo no que respeita ao seu metabolismo e rendimento energético. Algumas espécies preferem utilizar vias fermentativas, ao passo que outras preferem a via respiratória. A diferença está na importância destas vias em condições aeróbicas. Na levedura *K. lactis*, em condições aeróbicas, a respiração sobrepõe-se sempre à fermentação, ao passo que na levedura *S. cerevisiae* a respiração apenas representa cerca de 10 % do seu metabolismo em condições aeróbicas.

Esta capacidade fermentativa em condições aeróbicas da levedura *S. cerevisiae* é explicada devido à existência de elevadas concentrações de glucose no meio. Em meios contendo concentrações superiores a cerca de 2% (p/v) deste açúcar, ocorre uma diminuição da taxa específica de consumo de oxigénio, juntamente com uma diminuição da transcrição de genes que codificam componentes da via respiratória, resultando inibição do metabolismo de fosforilação oxidativa. A este fenómeno de fermentação alcoólica em condições aeróbicas para elevadas concentrações de açúcares dá-se a designação de efeito *Crabtree*. Deste modo, a levedura *S. cerevisiae* é designada como *Crabtree* positiva, enquanto a levedura *K. lactis* é considerada *Crabtree* negativa.

Este conceito conduz à ideia de que a produção de ATP não é apenas influenciada pela sua característica genómica, mas também pelas condições ambientais de crescimento. Por isso, a concentração de açúcares e oxigénio parecem ser os principais parâmetros que determinam a preferência por determinada via metabólica e consequentemente, a sua produção de etanol^{63 64 43}.

No que respeita ao consumo de lactose, este dissacarídeo é primeiramente incorporado na célula através de uma permease codificada pelo gene *LAC12* e seguidamente hidrolisado pelo enzima β -galactosidase, codificada pelo gene *LAC4*. A glucose resultante deste processo é enviada para o ciclo da glicólise e a galactose para a via de Leloir^{54 43}. O rendimento teórico máximo de etanol produzido por grama de lactose consumida corresponde a 0,54 g_{etanol} / g_{lactose}^{65 43}.

O transporte da glucose é feito através de um dos transportadores de hexoses existentes nas membranas celulares da levedura *K. lactis*, dependendo da concentração exterior de glucose e das necessidades nutricionais da célula. Uma vez dentro, a glucose é primeiramente fosforilada por uma *hexocinase* a glucose-6-fosfato para poder ser metabolizada pelo ciclo da glicólise ou pelo ciclo das pentoses fosfatadas, sendo que na levedura *K. lactis* a maior parte da glucose é metabolizada por este último^{54 66}.

A galactose extracelular pode ser transportada através da permease da lactose mas com baixa afinidade ou então pelo transportador da glucose de elevada afinidade, que é codificado pelo gene *Hgt1*⁵⁴.

Ao contrário da levedura *S. cerevisiae* em que o transporte de hexoses é feito apenas através de sistemas de difusão facilitada, a *K. lactis* tem incorporado um sistema de transporte ativo, capaz de transportar frutose para o citoplasma e que é codificado pelo gene *FRT1*^{54 53}.

No processo fermentativo existem diversos efeitos inibitórios que têm sido mencionados por alguns autores. Estes, apontam como principais causas, a elevada concentração de açúcares no meio associada a uma elevada sensibilidade osmótica, baixa tolerância ao etanol e efeitos inibitórios derivados de elevadas concentrações de sais. Embora estes efeitos sejam dependentes de cada estirpe, as condições de fermentação, em particular o oxigênio e a disponibilidade de outros nutrientes no meio, podem também desempenhar um papel fundamental a esse respeito ³⁷.

1.4 Aperfeiçoamento da produção de bioetanol

1.4.1 Mistura de substratos

Um dos maiores desafios na produção de etanol tem sido a diminuição dos seus custos de produção através do aumento dos rendimentos etanólicos, aumento da conversão dos açúcares de forma que o preço final para o consumidor seja economicamente competitivo.

Uma das formas de redução está associada ao melhoramento da tecnologia fermentativa, através da utilização de misturas de substratos e que é referida na literatura por alguns autores como por exemplo a utilização de melação de beterraba com o soro do queijo ⁶⁷ e água da maceração de milho com soro do queijo ⁶⁸.

Este método tem por objetivo aumentar a quantidade de açúcares fermentáveis pelos microrganismos de forma a atingir produtividades elevadas, como é o caso da mistura de açúcares fermentáveis da polpa de alfarroba e do soro do queijo.

Este substrato misto composto por alfarroba e soro do queijo pode ser também vantajoso do ponto de vista ambiental, se o soro representar a fração líquida que solubiliza os açúcares da alfarroba, evitando a utilização da água para a produção do extrato de açúcares.

1.4.2 Mistura de populações celulares

Por vezes, a mistura de substratos obriga à existência em mais que um microrganismo capaz de fermentar todos os açúcares presentes.

No caso em particular da mistura entre os açúcares da alfarroba com os do soro do queijo, este conjunto de açúcares faz com que a utilização de uma única levedura no processo fermentativo não seja a opção mais adequada para a fermentação do substrato da forma mais eficiente.

A levedura *S. cerevisiae* é capaz de fermentar os açúcares presentes na alfarroba e com rendimentos elevados em condições de baixo arejamento¹⁷. Em contrapartida, esta levedura é incapaz de consumir lactose, dado que lhe falta o enzima β -galactosidase e a permease que transporta este dissacarídeo. Esta incapacidade impede a levedura *S. cerevisiae* de utilizar o soro do queijo como substrato fermentativo.

A levedura *K. lactis* é capaz de utilizar essa lactose presente no soro do queijo para produção de etanol, mas, apesar da sua proximidade filogenética, ainda existem certos aspetos tecnológicos em que as leveduras *Kluyveromyces* não podem competir com as leveduras *Saccharomyces*.

Contudo, estratégias de fermentação utilizando cultura mistas têm sido utilizadas com sucesso para produção de etanol com o objetivo de ultrapassar as limitações do substrato, como o exemplo das culturas mistas compostas por *Zymomonas mobilis* (*Z. mobilis*) / *S. cerevisiae*⁶⁹, *Kluyveromyces fragilis* / *Z. mobilis*⁷⁰ e *Kluyveromyces marxianus* / *S. cerevisiae*⁷¹.

Para além dos efeitos inibitórios abordados nas secções 1.3.3.1 e 1.3.3.2 relacionados com cada estirpe, existe outro fator adicional que é preciso ter em conta quando se misturam populações celulares. No caso em particular da levedura *S. cerevisiae* com a levedura *K. lactis*, alguns autores referem que esta última pode ter um comportamento tóxico que impede o crescimento da levedura *S. cerevisiae*. Este comportamento é definido na literatura por efeito *killer* e está relacionado com a excreção de dois plasmídeos com cadeia linear dupla de DNA, *pGK11* (k1) e *pGK12* (k2) que codificam exotoxinas, bloqueando assim o ciclo de divisão celular da levedura *S. cerevisiae* na fase G1^{72 73 74}. Contudo, este comportamento é dependente de fatores como o pH, fonte de carbono e temperatura⁷³.

1.5 Objetivos

Esta dissertação de mestrado foi realizada no laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental, (LEBA), localizado na Faculdade de Ciências e Tecnologia e integra o Centro de Investigação Marinha e Ambiental, (CIMA) da Universidade do Algarve.

Tem como objetivo principal a produção de bioetanol a partir de resíduos e de efluentes industriais numa perspetiva de reutilização e de obtenção de um biocombustível de 2ª geração.

A estratégia utilizada foi obter um substrato enriquecido em açúcares fermentáveis por uma população mista de microrganismos e caracterizar cineticamente o processo de produção de bioetanol.

Os objetivos específicos a alcançar foram:

- Preparar um substrato misto, selecionando a melhor proporção de massa de alfarroba; em soro do queijo.
- Estabelecer uma cultura mista, otimizando a melhor proporção de cada levedura para uma boa eficiência fermentativa e caracterizando a cinética de produção de etanol, consumo de açúcares para as diferentes condições de açúcar.
- Avaliar a compatibilidade das estirpes selecionadas no que respeita ao comportamento *killer* e às interações de competição pelo substrato.
- Estudar a influência do arejamento, micro-arejamento e anoxia na produção de etanol pela cultura mista em reator biológico (STR)
- Estudar o processo fermentativo do substrato misto, em modos de operação *batch* e *fed-batch*, com o objetivo de aumentar a produtividade máxima de etanol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Utilizaram-se resíduos da polpa de alfarroba (*Kibbles*) fornecidos pela Empresa Industrial Farensense, Lda e o efluente, soro do queijo foi disponibilizado pela queijaria “O Portal dos Queijos” em São Brás de Alportel.

2.1.1 Processo de obtenção do substrato misto

De forma a tornar mais eficaz a extração, foi removida a humidade dos *kibbles* da alfarroba através de um processo de secagem numa estufa (Binder FD53, EUA), a 50 ± 1 °C durante a noite. Após serem retirados da estufa e arrefecidos à temperatura ambiente durante duas horas, foram triturados por um moinho (IKA-MF10B, Alemanha) de modo a ser obtida uma farinha fina. Seguidamente, foi feita a homogeneização em balões *erlenmeyer* de 1 L, com diferentes rácios alfarroba (peso): soro (volume) e diferentes tempos de extração, numa agitadora orbital (IKA-KS4000i, Alemanha) a 150 rpm e temperatura de 25 ± 1 °C. Os diferentes rácios e tempos de extração serão aprofundados na secção 2.4.1.

O extrato obtido foi centrifugado numa ultracentrifuga (Beckman Coulter J2-MC, EUA) com um rotor J14 a 12 000 rpm e temperatura de 4 °C durante 30 min. O sobrenadante final foi armazenado a -21 ± 1 °C, até utilização posterior.

2.1.2 Processo de obtenção do extrato concentrado de alfarroba

A humidade dos *kibbles* de alfarroba, bem como o seu processo de secagem e moagem foram realizados como descrito no ponto anterior para o substrato misto.

Seguidamente, foi procedida a extração aquosa utilizando um rácio 30 % (p/v) de farinha de alfarroba e água destilada. Esta mistura foi homogeneizada em balões *erlenmeyer* de 2 L, numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 150 rpm e uma temperatura de 30 ± 1 °C durante 1 h.

O extrato obtido foi centrifugado numa ultracentrifuga (Beckman Coulter J2-MC, EUA) com um rotor J14, a 12 000 rpm e temperatura de 4 °C durante 25 min. O sobrenadante recolhido foi filtrado a vácuo, utilizando filtros com uma porosidade de 0.45 µm (Whatman 1). Geralmente, nesta fase o extrato obtido apresenta uma concentração total de açúcares dissolvidos de 140 g/L. Desta forma foi procedida à sua concentração a partir de um evaporador rotativo (Heidolph 94200, Alemanha), com um banho entre 75 °C e 80 °C. No fim deste processo o extrato final apresenta uma concentração de açúcares totais de aproximadamente 940 g/L. Este extrato de alfarroba concentrado foi armazenado a uma temperatura de -21 ± 1 °C para utilização posterior.

2.2 Microrganismos

Nesta dissertação de mestrado foram utilizadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* do Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA-1) e a levedura *Kluyveromyces lactis* 2360 do Centro de Biodiversidade de Fungos (CBS), disponibilizada pela Professora Doutora Lúcia Dionísio da Universidade do Algarve.

2.3 Meios de cultura, armazenamento e condições de crescimento

2.3.1 Armazenamento

Para o armazenamento a longo prazo a cultura foi mantida a -80 ± 1 °C por tempo indeterminado em microtubos, sendo utilizado para conservação o meio *Yeast extract Peptone Dextrose* (YPD) líquido, constituído por 10 g/L extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glucose e suplementado com 30 % (v/v) de glicerol. Este meio, assim como todos os outros utilizados neste trabalho foram esterilizados por autoclavagem (Uniclave 87, Portugal) a 121 ± 1 °C durante 20 minutos.

O armazenamento a curto prazo foi feito através da repicagem das leveduras, separadamente, para placas contendo meio YPD sólido. Este meio é constituído por 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona 20 g/L de glucose e 10 g/L de agar. Posteriormente, são incubadas numa estufa (Selecta, Espanha) durante 48 a 72 h à temperatura de 30 ± 1 °C.

Todo este processo, assim como os que serão descritos em 2.3.2, 2.3.3 e 2.3.4 foram feitos em assepsia através da utilização de um bico de *Bunsen* e material estéril.

2.3.2 Pré-inóculo

De modo a criar a adaptação das leveduras a um meio líquido, para que dessa forma possam crescer em suspensão, é necessária a preparação de um pré-inóculo em meio YPD líquido, constituído por 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glucose. Seguidamente, são inoculadas as leveduras, em processos separados, utilizando 50 ml deste meio, num balão *erlenmeyer* de 100 ml, em duplicado. Este pré-inóculo é mantido numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 150 rpm e temperatura de 30 ± 1 °C, durante 48 h para fermentações em balão *erlenmeyer* ou reator biológico STR.

2.3.3 Inóculo

De forma a criar a adaptação das leveduras ao substrato misto, é necessário proceder ao seu crescimento num meio líquido, constituído por 3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona e 1/3 da concentração de substrato misto utilizado nas fermentações. Este inóculo é preparado em balão *erlenmeyer*, em duplicado, com 10 % da suspensão celular proveniente do pré-inóculo e incubado numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 30 ± 1 °C e 150 rpm durante pelo menos 30 h.

2.3.4 Processo de obtenção da cultura mista

Após o período de crescimento dos inóculos de cada estirpe, procedeu-se a sua contagem celular na câmara de *Neubauer* (Blau Brand, Alemanha) de forma a poder calcular o volume de inóculo necessário para iniciar a fermentação com a concentração celular de 1×10^7 células/ml. Esta é a concentração total das duas estirpes juntas. A concentração de cada estirpe a ser adicionada varia consoante a proporção de leveduras *S. cerevisiae*: *K. lactis* que é utilizada para a fermentação e irá ser aprofundada na secção 2.4.2.

2.3.5 Crescimento em balão *erlenmeyer*

O crescimento em balão *erlenmeyer* é feito em triplicado em regime de total esterilidade, recorrendo para isso à utilização de material estéril e uma câmara de fluxo laminar (Telstar Bio II A, Espanha). Estas fermentações foram realizadas em balões *erlenmeyer* de 250 ml, com 150 ml de meio, constituído por 3 g/L de extrato de levedura 5 g/L de peptona e perfeito com substrato misto até um volume de 150 ml.

Após inoculação, os balões foram incubados numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 150 rpm e 30 ± 1 °C durante 96 h. Em todas as fermentações é recolhida uma amostra momentos antes da inoculação e outra imediatamente após, bem como em períodos regulares até ao seu final de forma a ser possível acompanhar o crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol.

2.3.6 Crescimento em reator biológico STR

As fermentações em reator biológico STR foram realizadas em modo de operação descontínuo (*batch*) ou semi-contínuo (*fed-batch*). Foi utilizado um reator mecanicamente agitado (STR) de 3-L, com 2,4 L de volume de trabalho (ADI 1010/1025, Applikon, Holanda). O meio é constituído por 3 g/L de extrato de levedura 5 g/L de peptona e substrato misto, cuja concentração de açúcares total variou entre 198 a 251 g/L.

Todas as fermentações são feitas a 30 °C e a sua duração, arejamento e a agitação variam conforme os objetivos.

O reator está ligado a uma unidade de controlo externa que monitoriza diferentes parâmetros do processo, como a temperatura, percentagem de oxigénio dissolvido (% dO₂), pH e agitação. Estes parâmetros são também acompanhados em tempo real com o programa informático *bioXpert*, versão 2.1.

A unidade de controlo contém também um fluxímetro que está ligado a uma bomba de ar para regular o caudal de arejamento. Para além disso, o reator está também ligado a uma manta de aquecimento, um dispersor de ar em forma de L, um rotor de agitação ligado a uma turbina de *Rushton*, sondas de temperatura, pH e % dO₂ e também um condensador, que por sua vez está

ligado a um segundo condensador, de modo a evitar a perda de etanol por evaporação. O ar utilizado no arejamento do meio é esterilizado através da sua passagem por um filtro estéril com membrana hidrofóbica, que tem uma porosidade de 0,2 μm (Millipore). Os gases libertados para o exterior também passam através de um filtro estéril com membrana hidrofóbica, com uma porosidade de 0,2 μm (Millipore) e que se encontra a jusante do segundo condensador.

De modo a ser possível acompanhar o crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol ao longo do tempo, em todas as fermentações foi recolhida uma amostra momentos antes da inoculação e outra imediatamente após, bem como em períodos regulares até ao seu final. A recolha destas amostras foi feita com a utilização de frascos previamente esterilizados por autoclavagem (Uniclave 87, Portugal), com o ambiente circundante esterilizado por um maçarico.

2.4 Ensaaios experimentais

2.4.1 Preparação do substrato misto, alfarroba: soro

O processo de obtenção do substrato misto foi realizado em triplicado e foram testados três rácios alfarroba: soro (p/v) correspondentes a 20, 30 e 40 % (p/v). Cada um foi submetido a dois tempos de extração diferentes, 1 e 2h com o solvente, soro do queijo, com e sem proteína.

O soro utilizado é o efluente do fabrico de queijo de cabra na fábrica “Portal dos Queijos”, Portugal.

No caso da extração utilizando soro sem proteína, este foi desproteínizado pelo método térmico a 121 °C durante 20 min (Uniclave 87, Portugal).

O procedimento geral para obter este substrato misto encontra-se descrito em 2.1.1.

No final do processo, para além da medição do volume recuperado, foram também retiradas amostras para quantificação dos açúcares por HPLC, descrito em 2.5.2.1, medição do pH (CRISON microCM 2202, Espanha) e condutividade (CRISON microCM 2202, Espanha).

2.4.2 Ensaios com diferentes concentrações de açúcar total e diferentes proporções das culturas de leveduras *S. cerevisiae*: *K. lactis*

Foram realizados ensaios em balão *erlenmeyer* de forma a testar duas concentrações de açúcares totais. Uma das concentrações utilizadas corresponde ao substrato misto a 40 % (p/v) e a segunda, 1/2 da concentração desse mesmo substrato. Para cada uma destas concentrações foram também testados três rácios de leveduras na população mista, *S. cerevisiae*: *K. lactis* (% células/ml), 70:30 (70S:30K), 50:50 (50S: 50K) e 30:70 (30S:70K). Cada um dos rácios utilizados corresponde a um inóculo total de concentração 1×10^7 células/ml.

Os ensaios foram realizados em balão *erlenmeyer* de 250 ml contendo 150 ml de meio e cuja sua composição foi descrita em 2.3.5.

Foi retirada uma amostra momentos antes da inoculação e outra imediatamente após a mesma. A partir daí, foram retiradas amostras com intervalos de 2 h até às 14 h, de 3 h das 24 às 72 h, de 6 h das 72 às 84 h e uma amostra no final da fermentação às 96 h. Estas amostras serviram para a leitura da densidade ótica (DO) por espectrofotometria, contagem de células viáveis por unidades formadoras de colónias (UFC's), concentração de biomassa pelo peso seco e quantificação de açúcares e etanol por HPLC, como serão aprofundados na secção 2.6.

2.4.3 Avaliação da produção de toxinas “killer” das estirpes celulares

Para testar o comportamento *killer* das leveduras, procedeu-se ao crescimento celular destas, individualmente, em meio *Yeast Malt* (YM) contendo extrato de levedura 6 g/L, extrato de malte 6 g/L, peptona 10 g/L, glucose 20 g/L e agar 40 g/L.

A atividade *killer* foi testada às temperaturas de 20 e 30 °C, em placas de *Petri* com meio contendo extrato de levedura e malte + azul metileno (YM + MB). Este meio é composto pelo meio YM, posteriormente ajusta-se o seu pH para 5,5 com uma solução tampão de citrato de sódio seguido de tamponização com essa mesma solução. No final, foi adicionado ao meio uma solução de azul metileno com uma concentração de 0,015 g/L.

Após 3 dias de crescimento numa estufa (Selecta, Espanha) a 30 ± 1 °C é feita a contagem celular, com o objetivo de preparar uma suspensão de concentração 1×10^6 células/ml de cada levedura em separado. Esta suspensão é feita utilizando tampão fosfato salino (PBS).

Seguidamente, são transferidos 100 µl de cada suspensão para placas de *Petri* distintas. Após um período de 20 min, quando estas suspensões já foram espalhadas com uma ança em L e plenamente secas à temperatura ambiente, é colocada biomassa celular na superfície seca da placa, com diâmetro não superior a 6mm, proveniente da placa de crescimento da levedura ao qual se pretende testar a sensibilidade às toxinas.

Todo este processo foi realizado em regime assepsia com a utilização de um bico de *Bunsen* e esterilização de todo o material e soluções, na autoclave (Uniclave 87, Portugal) a 121 °C durante 20min.

A estirpe que produz as toxinas é colocada por cima da suspensão, ou seja, a partir da biomassa proveniente da placa de crescimento. A estirpe sensível às toxinas foi colocada em suspensão e a presença de atividade *killer* é verificada pela existência de uma auréola em redor da biomassa e que surge pela ausência de crescimento celular da levedura em suspensão nessa zona.

2.4.4 Influência do micro-arejamento na fermentação do substrato misto em STR

A fermentação utilizando baixos níveis de arejamento foi feita em reator biológico STR de 3-L, em modo de operação *batch*, utilizando um fluxo de ar correspondente a um micro-arejamento 0,042 vvm, agitação de 250 rpm e à temperatura de 30 ± 1 °C.

Esta fermentação foi realizada com o substrato misto a 40 % (p/v) e a população mista na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e corresponde a uma concentração de inóculo de 1×10^7 células/ml.

Foi retirada uma amostra momentos antes da inoculação e outra imediatamente após a mesma. A partir daí, foram retiradas amostras com intervalos de 2 h até às 14 h, de 3 h das 24 às 72 h, de 6 h das 72 às 84 h e uma amostra no final da fermentação às 96 h. Com estas amostras procedeu-se à leitura da densidade ótica (DO) por espectrofotometria, contagem de células viáveis por unidades formadoras de colónias (UFC's), concentração de biomassa pelo peso seco e quantificação de açúcares e etanol por HPLC, como serão aprofundados na secção 2.6

2.4.5 Influência de condições de anoxia na fermentação do substrato misto em STR

A fermentação foi realizada em reator biológico STR de 3-L, em modo de operação *batch*, a 30 ± 1 °C, com a utilização do substrato misto a 40 % (p/v) e a população mista na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e corresponde a uma concentração de inóculo de 1×10^7 células/ml.

Durante o período entre as 0 e 48 h a agitação foi mantida a 60 rpm e não houve qualquer arejamento, ou seja, 0 % de oxigênio dissolvido no meio (dO_2). Para certificar a veracidade da ausência de O_2 durante este período, adicionou-se N_2 no meio momentos antes de inocular e em períodos regulares até ao seu final. Este N_2 injetado é esterilizado através da sua passagem por uma membrana hidrofóbica, com uma porosidade de 0,2 μm (Millipore).

A partir das 48 h foi alterado o arejamento e a agitação para 0,13 vvm e 250 rpm, respetivamente, mantendo-se nestes valores até ao final da fermentação às 96 h.

Foi retirada uma amostra momentos antes da inoculação e outra imediatamente após a mesma. A partir daí, foram retiradas amostras com intervalos de 2 h até às 14 h, de 3 h das 24 às 72 h, de 6 h das 72 às 84 h e uma amostra às 96 h. Estas amostras serviram para a leitura da densidade ótica (DO) por espectrofotometria, contagem de células viáveis por unidades formadoras de colónias (UFC's), concentração de biomassa pelo peso seco e quantificação de açúcares e etanol por HPLC, como serão aprofundados na secção 2.6.

2.4.6 Fermentação do substrato misto com arejamento e em sistema *Fed-batch*

A fermentação em modo de operação *fed-batch* foi realizada em reator biológico STR de 3-L, com um arejamento de 0,13 vvm, agitação de 250 rpm e temperatura de 30 ± 1 °C. Todos estes parâmetros operacionais se mantiveram constantes durante todo o período em que decorreu a fermentação.

Foi utilizado o substrato misto a 40 % (p/v) e a população mista na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e corresponde a uma concentração de inóculo de 1×10^7 células/ml.

Esta fermentação foi suplementada às 48 e às 78 h com 50 g/L de açúcares da alfarroba. Estes açúcares são provenientes do extrato concentrado de alfarroba descrito em 2.1.2 e foi

previamente esterilizado numa autoclave (Uniclave 87, Portugal) a 121 °C durante 20 min, bem como todo o material utilizado na sua adição.

Foi retirada uma amostra momentos antes da inoculação e outra imediatamente após a mesma. A partir desse momento, foram retiradas amostras com intervalos de 2 h até às 14 h, de 3 h das 24 às 84 h, de 6 h das 96 às 108 h e uma amostra às 120 h. Nos momentos de adição de açúcares, ou seja, às 48 e 78h foram retiradas amostras, antes e logo após a adição. Estas amostras serviram para a leitura da densidade ótica (DO) por espectrofotometria, contagem de células viáveis por unidades formadoras de colónias (UFC's), concentração de biomassa pelo peso seco e quantificação de açúcares e etanol por HPLC, como serão aprofundados na secção 2.5.

2.5 Parâmetros fermentativos

2.5.1 Determinação do crescimento celular

2.5.1.1 Densidade ótica

Todas as amostras foram sujeitas a leitura da densidade ótica por espectrofotometria, de modo a ser possível acompanhar o crescimento celular. Esta leitura foi realizada a um comprimento de onda de 590 nm, num espectrofotómetro (Cintra 202 – GBC, Inglaterra) utilizando o *software GBC Spectral*. A amostra do meio de fermentação retirada momentos antes da inoculação foi utilizada como branco. Tanto as amostras, como o branco apresentavam uma diluição de 1:20.

2.5.1.2 Peso seco

Para a determinação dos pesos secos celulares de fermentações em balão *erlenmeyer*, foram retiradas amostras em duplicado para microtubos de centrífuga de 1,5 ml. As amostras foram centrifugadas (Eppendorf AG, Centrifuge 5415 D, Alemanha) a 13 000 rpm durante 10 min e o *pellet* resultante secado numa estufa (Binder FD53, EUA) a 50 ± 1 °C durante um período mínimo de 72 h, após este tempo de secagem foram pesados.

Em fermentações realizadas em reator biológico STR, foram retiradas amostras de 7 ml em triplicado para tubos de centrifuga de 15 ml e seguidamente centrifugados (Hettich Zentrifugen Universal 320, Alemanha) a 5 000 rpm durante 10 min. O *pellet* resultante foi secado numa estufa (Binder FD53, EUA) a 50 ± 1 °C durante um período mínimo de 72 h, após este tempo de secagem foram pesados.

Em ambos os casos, antes da sua utilização, todos os tubos foram previamente esterilizados por autoclavagem (Uniclave 87, Portugal) a 121 °C durante 20 min, secados numa estufa (Binder FD53, EUA) a 50 ± 1 °C durante aproximadamente 48 h. Depois de arrefecidos à temperatura ambiente durante uma hora, foram pesados através de uma balança analítica de precisão (XB 120A Precisa, Suíça).

2.5.1.3 Número de células viáveis

O crescimento celular pode ser acompanhado pela contagem de células viáveis através da determinação de unidades formadoras de colónia (UFC's). Desta forma, foram retiradas diariamente 100 µl de amostra. Este volume foi adicionado a 9,9 ml de tampão fosfato salino (PBS). Depois de homogeneizada esta suspensão por agitação (VELP Scientifica, Itália), é lhe retirada 1ml e adicionada a 9ml de PBS. Assim sucessivamente até a obtenção das diluições $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$. Este procedimento é feito em triplicado, o PBS foi previamente esterilizado por autoclavagem (Uniclave 87, Portugal) a 121 °C durante 20 min.

Após realização de todas as diluições necessárias, são adicionados 20 µl de cada diluição em placas de *Petri* com meio sólido de YPD ou agar lisina. O meio YPD é utilizado para o crescimento das leveduras *S. cerevisiae* e *K. lactis*, enquanto que o meio agar lisina apenas é utilizado para o crescimento da levedura *K. lactis*.

Este procedimento é feito em triplicado. O meio YPD sólido é constituído por 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona 20 g/L de glucose e 10 g/L de agar e o meio agar lisina composto por 10 g/L de glucose, 0,6 g/L de L-lisina 15 g/L de agar e 4 g/L de extrato de levedura sem aminoácidos e sulfato de amónio (DIFCO, EUA). Este extrato contém todos os nutrientes essenciais e vitaminas necessárias para o cultivo da levedura, exceto fonte de carbono e azoto.

As colónias são contadas ao fim de 3 dias e o número total de células viáveis no meio fermentativo é calculado a partir da multiplicação do número de colónias contadas pelo seu fator de diluição.

O número de células viáveis de cada levedura na população mista é calculada através da diferença entre o número de colónias do meio YPD e agar lisina.

Todo este processo é feito em condições de esterilidade, utilizando para esse efeito uma câmara de fluxo laminar (Telstar Bio II A, Espanha) ou bico de *Bunsen* e material estéril.

2.5.2 Métodos analíticos

2.5.2.1 Quantificação de açúcares e etanol

A quantificação dos açúcares (sacarose, frutose, glucose e lactose) e etanol foram determinados por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Para isso, foi utilizado o sobrenadante proveniente das amostras para o peso seco, como descrito em 2.5.1.2. Estes sobrenadantes foram filtrados para *vials* de HPLC com filtros de seringa contendo um diâmetro de poro de 0,2 μ m (Milipore).

O equipamento de HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom) é constituído por uma bomba (L-2130), um auto-injetor (L-2200), um detetor (IR L-2490), uma pré-coluna (Carbo-P Biorad) e uma coluna cromatográfica (Aminex HPX-87P Biorad) que está ligada a um forno externo com sistema de monitorização da temperatura. A preparação do eluente foi feita através da adição de 692 μ l de uma solução contendo 10 mM de HNO₃. Posteriormente, este eluente foi sujeito a um banho de sonicação (Ultrason - Salecta) durante 30 min. A quantificação foi feita com um fluxo de 0,5 ml/min à temperatura de 83 °C durante 30 min.

2.5.2.2 Monitorização do pH

O pH foi medido apenas nas fermentações realizadas em reator biológico STR e a sua monitorização feita em tempo real com o programa informático *bioXpert*, versão 2.1. A calibração da sonda foi feita momentos antes de a colocar no meio fermentativo.

2.5.2.3 Monitorização do oxigénio

A percentagem de O₂ dissolvida (% dO₂) no meio foi medida apenas nas fermentações realizadas em reator biológico STR e a sua monitorização feita em tempo real a partir do programa informático *bioXpert*, versão 2.1.

2.6 Caracterização da cinética de crescimento

2.6.1 Taxa específica de crescimento (μ)

A taxa específica de crescimento foi determinada através do programa informático de modelação *on-line* DMFit (<http://modelling.combase.cc>)⁷⁵. Este *software*, utiliza modelos de aproximação e constrói uma regressão linear a partir do logaritmo da concentração celular determinado através do peso seco em função do tempo de fermentação. O declive da reta obtida é o resultado da taxa específica de crescimento, expressa em h⁻¹.

2.6.2 Rendimento da biomassa produzida por unidade de massa de substrato consumido ($Y_{X/S}$)

O rendimento de biomassa produzida (X) em função do substrato consumido (S) corresponde ao valor do declive que é calculado a partir da regressão linear da concentração de biomassa obtidos a partir do peso seco, em g/L, em função dos açúcares totais consumidos, em g/L. Este rendimento é expresso em g biomassa produzida/g substrato consumido.

2.6.3 Rendimento de etanol produzido por unidade de massa de substrato consumido ($Y_{P/S}$)

O rendimento de etanol produzido (P) em função do substrato consumido (S) corresponde ao valor do declive que é calculado, a partir da regressão linear da concentração de etanol produzido, em g/L, em função dos açúcares totais consumidos, em g/L. Este rendimento é expresso em g etanol produzido/g substrato consumido.

2.6.4 Produtividade máxima de etanol

A produtividade de etanol corresponde ao valor do declive que é calculado a partir da regressão linear da concentração de etanol produzido, em g/L, em função do tempo de fermentação, em h.

2.7 Tratamento estatístico

Todos os dados obtidos foram sujeitos a tratamento estatístico. As regressões lineares foram efetuadas no *software Microsoft Office Excel 2013* e as análises de variância efetuadas pelo teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$) no *software SigmaPlot* versão 12.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pretendeu-se com a presente dissertação, numa primeira fase preparar um substrato misto, de alfarroba e soro, e analisar a compatibilidade das leveduras *S. cerevisiae* e *K. lactis* numa população mista de leveduras. Numa segunda fase desenvolveram-se estudos para a produção de etanol, usando o substrato misto alfarroba: soro como fonte de carbono e azoto.

3.1 Preparação do substrato misto, alfarroba: soro

Numa primeira fase do trabalho, procurou-se obter um substrato misto constituído por alfarroba e soro do queijo. Pretende-se preparar este substrato de forma a minimizar o consumo de água no processo de extração dos açúcares da alfarroba, visto que utiliza o soro como fração líquida, solvente dos açúcares da alfarroba.

Para tal, desenvolveu-se um novo processo extrativo em que o soro foi utilizado como solvente em vez de água. Foram testados 3 rácios alfarroba (peso): soro (volume) correspondentes a 20, 30 e 40 % (p/v). Cada um destes rácios foi submetido a dois tempos de extração diferentes, 1 e 2h. Para além disso, foi ainda otimizada a extração utilizando o solvente, o soro do queijo com e sem proteína.

A partir dos resultados obtidos com o tempo de extração de 1 h, presentes na tabela 1, verifica-se um aumento de 77 % dos açúcares da alfarroba solubilizados no rácio 30 % (p/v) em relação ao rácio 20 % (p/v) e um aumento de apenas 10 % da solubilização destes açúcares no rácio 40 % (p/v) em relação ao de 30 % (p/v).

A concentração mais elevada de açúcares de alfarroba presentes no substrato misto é de 130,07 g/L, correspondente ao rácio 40 % (p/v).

Foi verificado que a concentração de lactose presente no substrato misto em qualquer dos rácios testados é similar à presente no soro do queijo (47,5 g/L), como expetável, visto não haver reações com lactose durante o processo de extração. Assim, a concentração de açúcares totais é de 176,90 g/L e é composta por 26,5 % de lactose, 34,7 % de sacarose, 23,1 % de frutose e 15,2 % de glucose, correspondendo igualmente ao rácio 40 % (p/v) (Tabela 1).

A totalidade de açúcares da alfarroba presentes neste rácio representa 73,5 % do total de açúcares presentes no substrato (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração média de açúcares dissolvidos no soro com proteína, concentração total de açúcares presentes no substrato misto para os rácios 20, 30 e 40 % (p/v), com o tempo de extração de 1 hora e temperatura de 25 °C.

	Concentração (g/L)					
	Lactose	Sacarose	Frutose	Glucose	Açúcares totais da alfarroba	Açúcares totais
Soro	47,50 ± 0,55 ^c	0,00	0,00	0,00	-	47,50 ± 0,551
20 % (p/v)	46,84 ± 0,54 ^{cd}	28,47 ± 7,76 ^{hi}	24,15 ± 1,20 ^b	14,12 ± 0,54 ^e	66,75 ± 9,50 ^c	113,58 ± 10,04 ^f
30 % (p/v)	46,84 ± 0,54 ^{cd}	55,92 ± 4,01 ^{ac}	37,84 ± 1,33 ^a	24,46 ± 0,49 ^d	118,21 ± 5,83 ^b	165,05 ± 6,37 ^{cd}
40 % (p/v)	46,84 ± 0,54 ^{cd}	61,34 ± 3,29 ^{ab}	41,84 ± 2,45 ^a	26,89 ± 1,53 ^d	130,07 ± 7,27 ^{ab}	176,90 ± 7,81 ^{abc}

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). Este teste estatístico foi realizado em conjunto com os dados das tabelas 3, 4 e 6.

Uma das estratégias para aumentar a solubilização dos açúcares da alfarroba no soro, consiste no aumento do tempo de extração. Desta forma, procedeu-se à extração com a duração de 2 h (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Valores médios de pH e condutividade para as amostras de soro com proteína a as amostras de substrato misto com os rácios 20, 30 e 40 % (p/v), com o tempo de extração de 2h e temperatura de 25 °C.

	pH	Condutividade (µS/cm)
Soro	6,46 ± 0,01 ^a	16,59 ± 0,22 ^d
20% (p/v)	5,49 ± 0,03 ^c	15,31 ± 0,11 ^e
30% (p/v)	5,37 ± 0,02 ^d	13,02 ± 0,03 ^g
40% (p/v)	5,250 ± 0,003 ^g	12,24 ± 0,08 ^h

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). Este teste estatístico foi realizado em conjunto com os dados da tabela 5.

O substrato misto preparado com rácios 20 % (p/v), 30 % (p/v), 40 % (p/v) (Tabela 2) apresenta valores de pH e condutividade inferiores ao do soro do queijo. O pH do soro difere consoante o tipo de queijo que é produzido e pode variar entre 5 e 7³⁷. O pH e condutividade

diminuem à medida que o rácio aumenta. Esta diminuição sugere que a dissolução dos açúcares da alfarroba no substrato acidifica o meio e apresenta uma menor força iónica do que no soro.

Tabela 3. Concentração média de açúcares dissolvidos no soro com proteína, concentração total de açúcares presentes no substrato misto e percentagem de volume recuperado para os rácios 20, 30 e 40 % (p/v), com o tempo de extração de 2 horas e temperatura de 25 °C.

	Concentração (g/L)						
	Lactose	Sacarose	Frutose	Glucose	Açúcares totais da alfarroba	Açúcares totais	% Vol. Recuperado
Soro	46,24 ± 0,37 ^d	0,00	0,00	0,00	0,00	46,24 ± 0,37	-
20% (p/v)	46,24 ± 0,37 ^d	50,00 ± 1,85 ^{b c d e f}	17,24 ± 0,26 ^c	37,89 ± 2,24 ^c	105,13 ± 4,35 ^b	151,37 ± 4,72 ^d	73,00 ± 0,82 ^{a b}
30% (p/v)	46,24 ± 0,37 ^d	54,72 ± 0,56 ^{a d}	22,69 ± 0,36 ^b	51,13 ± 0,17 ^b	128,53 ± 1,09 ^{a b}	174,77 ± 1,45 ^{b c}	71,00 ± 0,41 ^b
40% (p/v)	46,24 ± 0,37 ^d	66,38 ± 1,91 ^a	26,40 ± 1,51 ^b	50,64 ± 3,18 ^b	143,42 ± 6,60 ^a	189,66 ± 6,96 ^{a b}	63,00 ± 0,82 ^d

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). Este teste estatístico foi realizado em conjunto com os dados da tabela 1, 4 e 6.

A concentração de lactose é igual em todos os rácios testados para preparar o substrato misto e igual ao teor deste açúcar determinado no soro (46,24 g/L), visto que este açúcar apenas existe na composição do leite (Tabela 3). Verificou-se um aumento de 22,4 % na concentração de açúcares solubilizados da alfarroba no rácio 30 % (p/v), em relação ao de 20 % (p/v) e um aumento de 11,6 % no rácio de 40 % (p/v) em relação ao 30 % (p/v). Isto sugere que rácios mais elevados acima deste último, poderão não ser muito eficientes em termos de extração e rentável economicamente, visto que o gasto de maiores quantidades de alfarroba não irá resultar na solubilização dos açúcares da alfarroba superior a 12 %. Para além disso temos que a percentagem de volume da fração líquida recuperada diminui para rácios mais elevados o que poderá também dificultar a sua aplicação como meio fermentativo.

A concentração mais elevada de açúcares totais presentes no substrato pertence ao rácio 40 % (p/v), com uma concentração de 189,66 g/L de açúcares totais. Este rácio é composto por 24,4 % de lactose, 35 % de sacarose, 13,9 % de frutose e 26,7 % de glucose. A concentração de açúcares solubilizados da alfarroba representa neste rácio 75,6 % da totalidade de açúcares presentes (Tabela 3).

Comparando os dois tempos de extração, é possível verificar a partir da figura 8 C, que em todos os rácios com 2 h de extração consegue-se solubilizar quantidades mais elevadas de açúcares da alfarroba no soro. Essa diferença é mais acentuada no rácio 20 % (p/v), com um aumento de 57,5 %. Apesar desse aumento, a concentração total de açúcares e a concentração de açúcares da alfarroba presentes nesse rácio, apresentam valores de 151,4 g/L e 105,1 g/L, respetivamente, não permitindo chegar perto da solubilização obtida em 2 h de extração no rácio 40 % (p/v), representando assim -36,4 %, de açúcares da alfarroba solubilizados em relação a esse rácio. Por este motivo a sua seleção seria desvantajosa para a acumulação de elevadas concentrações de etanol durante a sua fermentação.

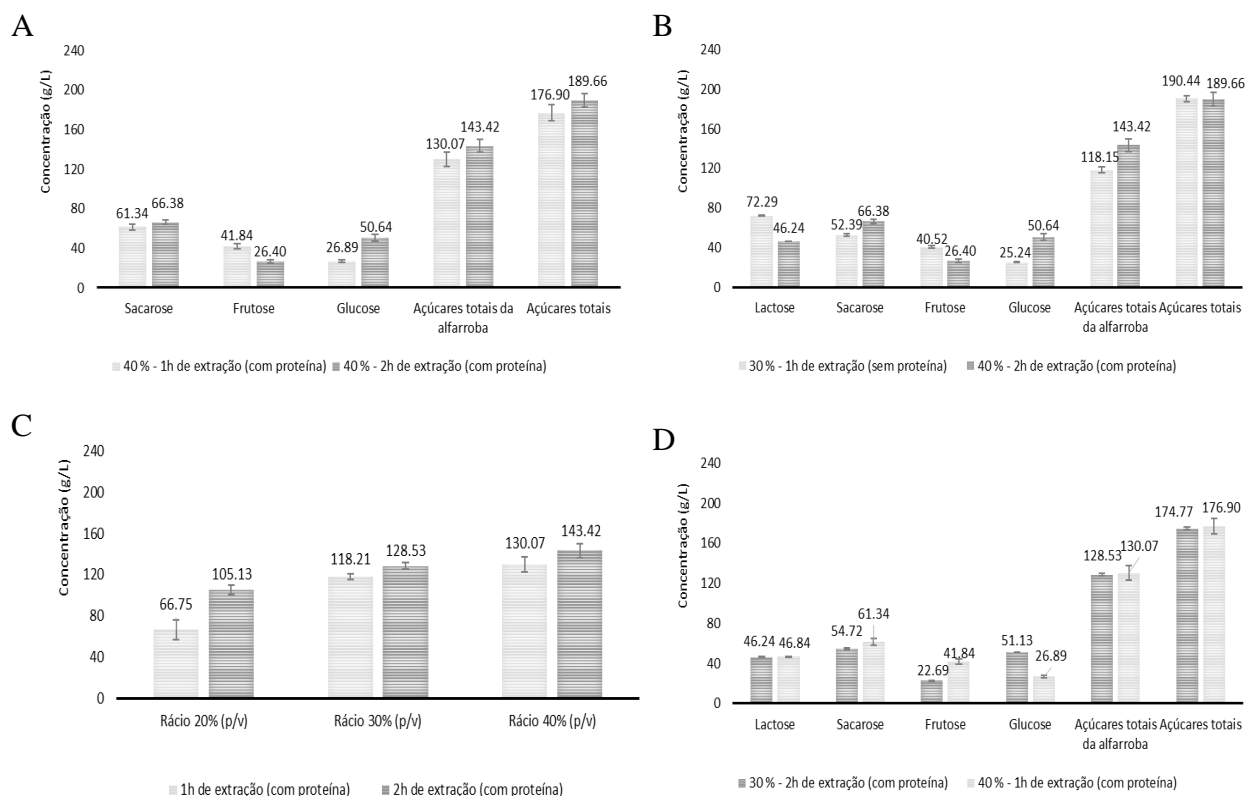


Figura 8. Concentração de açúcares dissolvidos no soro. **(A)** Soro com proteína, utilizando o substrato misto a 40 % (p/v) com 1 e 2 h de extração. **(B)** Soro com e sem proteína, utilizando o substrato misto a 30 e 40 % (p/v) com 1 e 2 h de tempo de extração. **(C)** Açúcares totais da alfarroba dissolvidos no soro com proteína, para os rácios 20, 30 e 40 % (p/v) com o tempo de extração de 1 e 2 h. **(D)** Açúcares dissolvidos no soro com proteína, utilizando o substrato misto a 30 e 40 % com 1 e 2 h de tempo de extração.

Na figura 8 D pode-se também observar que os rácios 40 % (p/v) com 1 h de extração e 30 % (p/v) com 2 h de extração conseguem solubilizar aproximadamente a mesma concentração de açúcares da alfarroba (≈ 130 g/L). Neste caso, a escolha do melhor rácio seria o de 40 % com 1h de extração porque nestas condições é possível solubilizar aproximadamente a mesma quantidade de açúcares em metade do tempo, apesar da desvantagem de se utilizarem maiores quantidades de alfarroba. Outra hipótese, seria manter o rácio 40 % (p/v) e aumentar o tempo de extração de 1 para 2 h, de modo a que assim se pudesse, eventualmente, solubilizar mais 10 % de açúcares da alfarroba, tal como é obtido pelo rácio 40 % (p/v) com 2h de extração.

Comparando estes dois últimos rácios, ou seja 40 % (p/v) a 1 e 2 h de extração (Figura 8 A), pode-se ver que a concentração de sacarose e glucose é superior no rácio 40 % (p/v) com 2 h de extração. No que respeita à frutose, este monossacarídeo tem uma concentração mais elevada quando a extração é feita a 1 h, sendo isto verificável para qualquer rácio. Em contrapartida, a glucose é sempre superior nos rácios com 2 h de extração, isto traduz-se numa vantagem adicional para o rácio 40 % (p/v), visto que a levedura *S. cerevisiae* tem preferência para consumir primeiro a glucose em vez da frutose, em substratos contendo alfarroba¹⁷.

Apesar da desvantagem de demorar 2 h no processo de extração, o rácio 40 % (p/v) exhibe uma concentração total de açúcares de 189,66 g/L e um máximo de solubilização de açúcares de alfarroba de 143,42 g/L (Tabela 3), o que é 10,3 % mais elevado do que o obtido com 1 h. Estas vantagens, tornam este rácio o mais favorável para obter elevadas concentrações etanol no processo fermentativo. Contudo, a elevada concentração de açúcares também pode ter um impacto negativo no crescimento das leveduras devido à sensibilidade osmótica. Esse estudo será aprofundado na secção 3.2.1

Foram realizados ensaios em que o soro foi desproteínizado (processo descrito em 2.4.1) numa perspetiva de melhorar a extração dos açúcares da alfarroba.

Com os resultados obtidos a partir do tempo de extração de 1 hora (Tabela 4), pode ver-se que a concentração de lactose presente no soro tem um valor de 72,37 g/L e é superior à do soro com proteína em 52,4 %, sugerindo que o processo de desproteínização tenha produzido um aumento de solubilidade dos açúcares de alfarroba no soro.

Tabela 4. Concentração média de açúcares dissolvidos no soro sem proteína e concentração total de açúcares presentes no substrato misto para os rácios 20, 30 e 40 % (p/v), com o tempo de extração de 1 hora e temperatura de 25 °C.

	Concentração (g/L)					
	Lactose	Sacarose	Frutose	Glucose	Açúcares totais da alfarroba	Açúcares totais
Soro	72,37 ± 0,07 ^b	0,00	0,00	0,00	0,00	72,37 ± 0,07
20 % (p/v)	72,29 ± 0,07 ^b	21,01 ± 2,76 ⁱ	25,33 ± 0,84 ^b	13,89 ± 0,53 ^e	60,23 ± 4,13 ^c	132,52 ± 4,20 ^e
30 % (p/v)	72,29 ± 0,07 ^b	52,39 ± 1,25 ^{a f}	40,52 ± 1,20 ^a	25,24 ± 0,51 ^d	118,15 ± 2,96 ^b	190,44 ± 3,03 ^{a b}
40 % (p/v)	72,29 ± 0,07 ^b	45,96 ± 0,53 ^{c d e f g}	39,37 ± 0,76 ^a	24,32 ± 0,83 ^d	109,66 ± 2,11 ^b	181,95 ± 2,18 ^{a b}

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). Este teste estatístico foi realizado em conjunto com os dados das tabelas 1, 3 e 6.

A quantidade de açúcares da alfarroba solubilizados no soro aumenta em 96,2 % no rácio 30 % (p/v) em relação ao rácio 20 % (p/v) e existe uma perda na solubilização destes açúcares em 7,2 % no rácio 40 % (p/v) em comparação com o rácio 30 % (p/v) (Tabela 4). Isto indica que, apesar de uma concentração de açúcares totais ligeiramente mais elevada que na extração utilizando soro com proteína, este rácio 40 % (p/v) torna-se desvantajoso por solubilizar uma menor quantidade de açúcares da alfarroba. Além da desproteínização do soro conter um gasto energético associado e funcionar como uma operação no processo de fabrico do substrato. Neste ensaio, o rácio mais favorável aparenta ser o de 30 % (p/v), onde se atinge a solubilização mais elevada de açúcares da alfarroba, 118,15 g/L e um total de açúcares presentes no substrato de 190,44 g/L (Tabela 4).

No processo utilizando duas horas de extração (Tabela 5 e 6), pode ver-se que existe um ligeiro aumento de lactose no soro em 8 % relativamente à extração com uma hora e pode dever-se ao facto de ter sido utilizado um lote de soro com um teor proteico mais elevado e que a sua extração tenha concentrado mais ainda este açúcar. Verifica-se tal como no soro completo que o substrato misto apresenta valores de pH e de condutividade inferiores à amostra de soro (Tabela 5). O pH do soro sem proteína é inferior ao do soro completo e tem um valor de 5,89. A condutividade do soro desproteínizado é significativamente superior à do soro com proteína.

Tabela 5. Valores médios obtidos de pH e condutividade para as amostras de soro sem proteína e rácios 20, 30 e 40 % (p/v). Com o tempo de extração de 2 h e temperatura de 25 °C.

	pH	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)
Soro	5,89 \pm 0,01 ^b	26,40 \pm 0,09 ^a
20% (p/v)	5,33 \pm 0,02 ^{d e}	22,03 \pm 0,23 ^b
30% (p/v)	5,32 \pm 0,02 ^{d f}	17,69 \pm 0,14 ^c
40% (p/v)	5,30 \pm 0,01 ^{e f g}	13,62 \pm 0,11 ^f

Valores médios (n=3) \pm erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05). Este teste estatístico foi realizado em conjunto com os dados da tabela 2.

Tabela 6. Concentração média de açúcares dissolvidos no soro sem proteína, concentração total de açúcares presentes no substrato misto e percentagem de volume recuperado para os rácios 20, 30 e 40 % (p/v), com o tempo de extração de 2 hora e temperatura de 25 °C.

	Concentração (g/L)						% Vol. Recuperação
	Lactose	Sacarose	Frutose	Glucose	Açúcares totais da alfarroba	Açúcares totais	
Soro	78,19 \pm 0,78 ^a	0,00	0,00	0,00	0,00	78,19 \pm 0,78	-
20% (p/v)	78,19 \pm 0,78 ^a	52,41 \pm 3,42 ^{a e}	18,21 \pm 0,87 ^c	40,44 \pm 0,88 ^c	111,06 \pm 5,17 ^b	189,25 \pm 5,95 ^{a b}	75,33 \pm 1,20 ^a
30% (p/v)	78,19 \pm 0,78 ^a	45,49 \pm 2,32 ^{c d e f h}	22,56 \pm 0,48 ^b	50,50 \pm 1,13 ^b	118,55 \pm 3,93 ^b	196,74 \pm 4,71 ^a	66,33 \pm 0,88 ^c
40% (p/v)	78,19 \pm 0,78 ^a	35,25 \pm 1,39 ^{g h}	25,61 \pm 1,01 ^b	60,30 \pm 1,09 ^a	121,16 \pm 3,50 ^b	199,36 \pm 4,28 ^a	60,67 \pm 1,45 ^d

Valores médios (n=3) \pm erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05). Este teste estatístico foi realizado em conjunto com os dados das tabelas 1, 3 e 4.

Pelas tabelas 4 e 6, é possível verificar que os rácios 30 e 40 % (p/v) com uma e duas horas de extração têm concentrações totais de açúcar e solubilizações de açúcares da alfarroba semelhantes.

Comparando melhor os dois tempos de extração utilizando soro desproteínizado, pode-se dizer que o melhor resultado obtido é apresentado pelo rácio 30 % (p/v) com uma hora de extração (Tabela 4). Isto porque nesta condição, se economiza uma hora de extração para solubilizar a mesma quantidade de açúcares da alfarroba que no rácio 30 % (p/v) com duas horas e apenas existe uma perda de açúcares totais presentes no substrato de 4,7 % em relação ao máximo obtido pelo rácio 40 % (p/v) com duas horas de extração.

Comparando o rácio 30 % (p/v) e uma hora de extração com soro desproteínizado e o rácio 40 % (p/v) com duas horas de extração utilizando soro com proteína (Figura 8 B), pode ver-se que apesar do rácio 40 % (p/v) apresentar um conteúdo inferior em lactose, os açúcares totais presentes no substrato são semelhantes, isto porque a concentração de açúcares solubilizados da alfarroba é 21,4 % superior neste rácio. Este resultado é vantajoso, visto que a levedura *S. cerevisiae* é capaz de converter os açúcares da alfarroba em etanol com elevados rendimentos ¹⁷.

Em comparação com a levedura *S. cerevisiae*, a levedura *K. lactis* possui uma tolerância ao etanol inferior ⁷⁶, a utilização de 72,29 g/L de lactose significaria uma desvantagem no processo fermentativo visto que a levedura *K. lactis* poderia começar a sofrer efeitos inibitórios do etanol antes de conseguir degradar toda a lactose presente no substrato.

3.2 Estabelecimento de uma população mista de leveduras

O conjunto de açúcares presentes no substrato misto anteriormente obtido, faz com que a utilização de uma única levedura não seja a opção mais adequada para a fermentação do substrato da forma mais eficiente. A levedura *S. cerevisiae* é capaz de fermentar os açúcares presentes na alfarroba com rendimentos elevados (sacarose glucose e frutose) ¹⁷, mas em contrapartida, não é capaz de fermentar a lactose presente no soro, visto que não possui o enzima β -galactosidase ⁷⁷, que é necessária para quebrar a ligação glicosídica deste dissacarídeo. Este enzima, encontra-se presente em outros microrganismos como a levedura *K. lactis* ⁵⁴ fazendo assim com que esta, seja capaz de utilizar o soro como substrato fermentativo para a produção de etanol ³⁷.

A cultura mista, constituída por duas leveduras de géneros diferentes (*Saccharomyces* e *Kluyveromyces*) foi estabelecida em diferentes proporções de populações, em diferentes condições de açúcar, bem como através de ensaios que visam investigar a produção de toxinas *killer* por parte destas estirpes celulares.

3.2.1 Influência da concentração de açúcares para diferentes rácios de leveduras

Dois ensaios em *erlenmeyer* foram realizados para avaliar três rácios de leveduras na população mista, 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis* (70S:30K), 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* (50S:50K) e 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis* (30S:70K). Cada uma destas proporções foi estudada em duas concentrações de açúcares iniciais, 121 e 236 g/L, de modo a analisar diferentes cinéticas possíveis na produção de etanol e no consumo de açúcares.

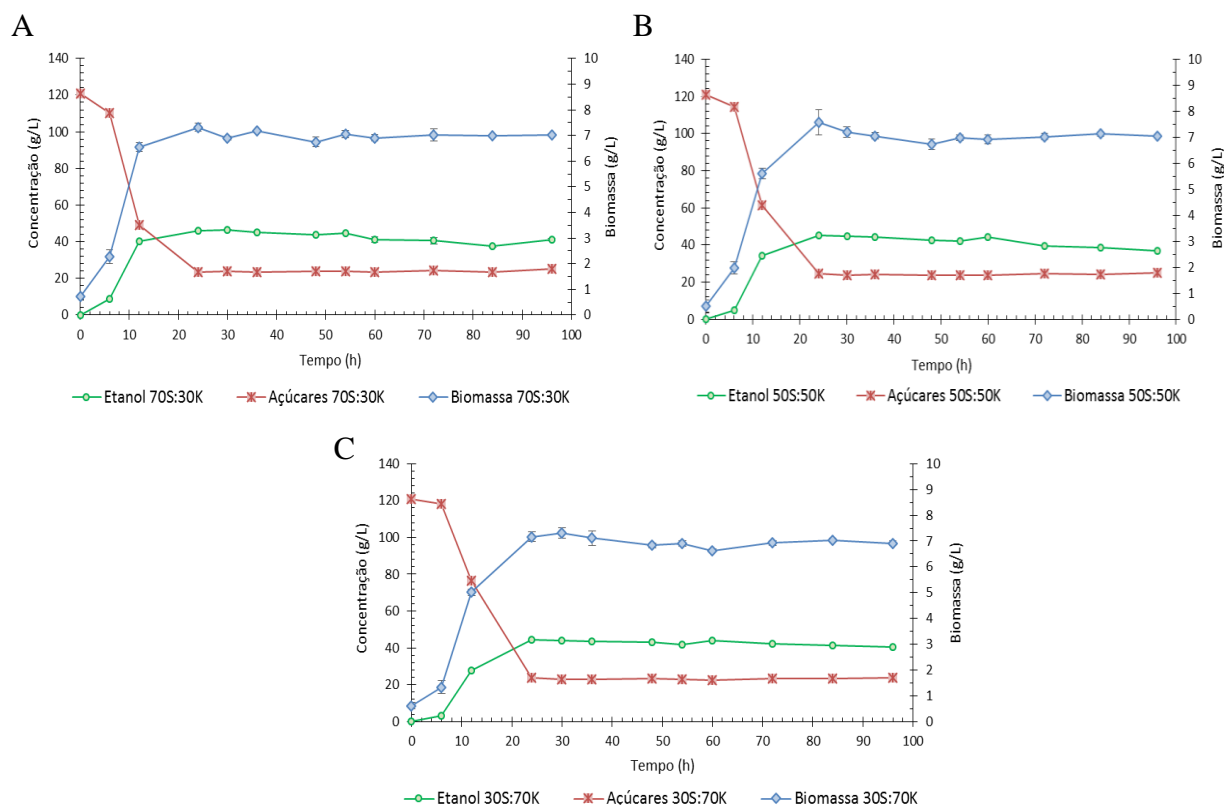


Figura 9. Perfil de, produção de etanol, consumo de açúcares, e crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista, nas proporções (A) 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis* (B) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e (C) 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h utilizando o substrato misto a 40 % (p/v) e a concentração total de açúcares iniciais de 121 g/L.

O ensaio realizado com a concentração de açúcar total de 121 g/L, apresenta uma composição em açúcares individuais de sacarose + lactose, glucose e frutose de 67,5 g/L, 32,1 g/L e 21,3 g/L, respetivamente e estima-se uma concentração inicial de lactose de 29,5 g/L.

Pode observar-se que o crescimento celular nos três casos é muito semelhante (Figura 9). Tanto a biomassa máxima obtida, como a taxa específica de crescimento são muito próximos entre todos os rácios testados para esta condição de açúcares, embora o rácio 30S:70K apresente uma taxa específica de crescimento inferior (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), com utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista nas proporções 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h e o substrato utilizado apresentava uma concentração total de açúcares de 121 g/L.

Rácio	μ (h ⁻¹)	X _{máx} (g/L)	[Et] _{max.} (g/L)	t _{Et max.} (h)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	P _{Et} (g/L.h)	Conversão açúcares total (%)
70S:30K	0,250±0,011 ^a	7,32 ± 0,17 ^a	46,50 ± 0,07 ^c	30	0,495 ± 0,046 ^a	0,067 ± 0,007 ^a	1,612 ± 0,446 ^a	79,1 ± 0,6 ^b
50S:50K	0,211±0,007 ^{ab}	7,58 ± 0,49 ^a	45,14 ± 0,10 ^c	24	0,499 ± 0,047 ^a	0,070 ± 0,007 ^a	2,024 ± 0,507 ^a	79,3 ± 0,4 ^b
30S:70K	0,166±0,007 ^{ad}	7,31 ± 0,16 ^a	44,61 ± 0,05 ^c	24	0,487 ± 0,053 ^a	0,065 ± 0,007 ^a	2,000 ± 0,368 ^a	80,3 ± 0,5 ^b

Taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa (X_{máx}), concentração máxima de etanol acumulado ([Et]_{máx}), tempo de obtenção da concentração máxima de etanol acumulado (t_{Et max.}), rendimento de produto obtido em função dos açúcares consumidos (Y_{P/S}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/S}), produtividade de etanol (P_{Et}) e percentagem de conversão de açúcares totais (Conversão açúcares total) para os diferentes rácios de leveduras testados. 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). Este teste estatístico foi realizado em conjunto com os dados da tabela 8.

Não se verifica praticamente fase de latência para qualquer uma das culturas ensaiadas. No ensaio 70S:30K, a fase exponencial de crescimento teve uma duração curta, cerca de 14 h (Figura 9 A), mas nos outros ensaios, 50S:50K e 30S:70K a fase exponencial terminou aproximadamente às 24 h (Figura 9 B e C). O final desta fase corresponde ao início de um patamar no perfil do consumo de açúcares totais (Figura 9) em todas as fermentações, cujo açúcar remanescente, cerca de 24 g/L não foi possível de ser fermentado, sugerindo que a sua composição será lactose, a qual não é fermentável pela levedura *S. cerevisiae*. Verifica-se igualmente, que a produção de etanol ocorre maioritariamente durante a fase exponencial e fase de desaceleração do crescimento e termina quando o consumo de açúcares estabiliza às 24 h (Figura 9), confirmando assim que a concentração do açúcar remanescente, não é fermentável pelas culturas mistas estabelecidas em diferentes proporções.

No que diz respeito ao perfil individual de consumo de açúcares do substrato misto, pode-se dizer que também é praticamente idêntico nos três rácios estudados (Figura 10).

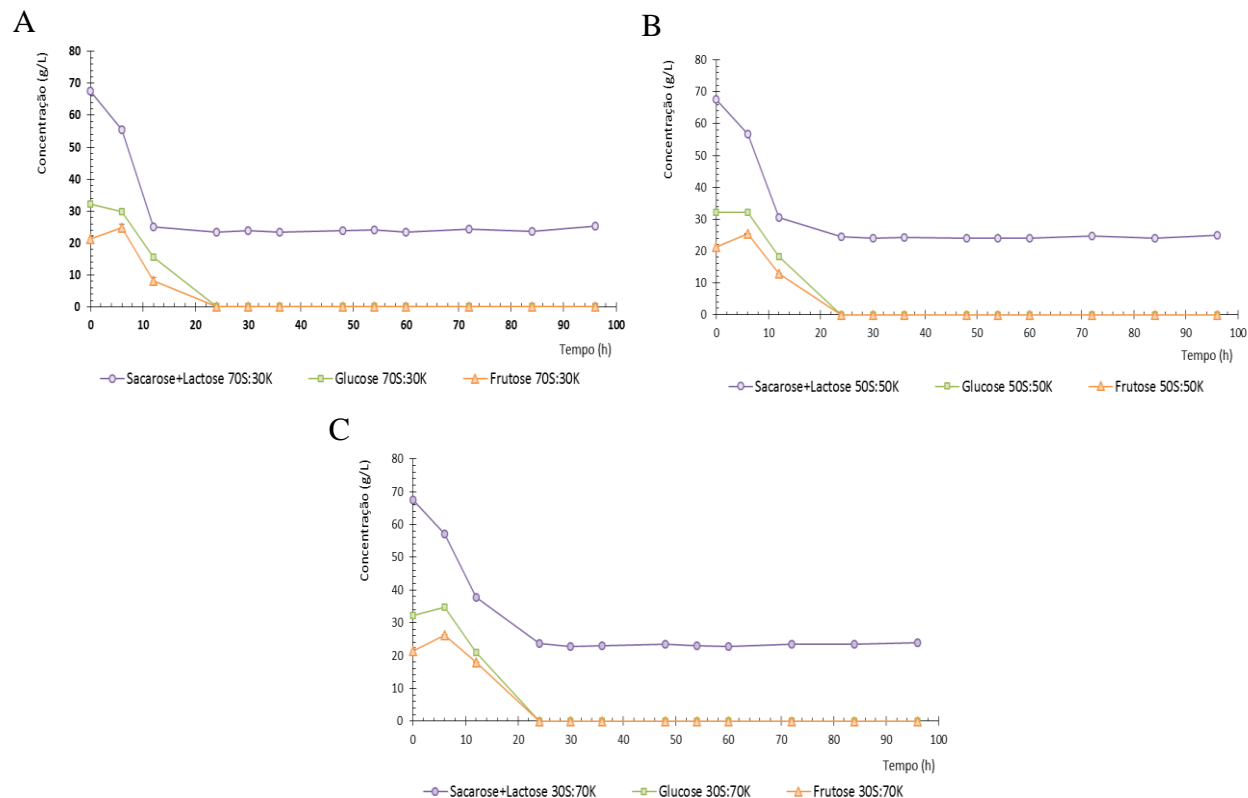


Figura 10. Perfil de consumo de açúcares individuais presentes no substrato misto a 40 %, pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista com as proporções, (A) 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, (B) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e (C) 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* com a duração de 96 h, utilizando a fermentação do substrato misto a 40 % (p/v) que contém uma concentração total de açúcares iniciais de 121 g/L.

Uma nota importante nesta fermentação, bem como em todas as outras realizadas neste trabalho, é que a quantificação dos dois dissacarídeos presentes, sacarose e lactose, não foi possível fazer separadamente ao longo do tempo de fermentação, por razões técnicas. Por serem dois dissacarídeos com estruturas moleculares muito similares, visto que ambos são compostos por uma glucose e que a sua diferença apenas reside na ligação a uma frutose, no caso da sacarose, ou uma galactose, no caso da lactose. Tal, faz com que os tempos de retenção na coluna de HPLC utilizada sejam muito próximos, o que origina uma sobreposição das áreas dos picos no cromatograma. No entanto, estima-se que a concentração inicial de lactose e sacarose neste ensaio seja de 29,5 g/L e 38 g/L, respetivamente. Estes valores são estimados a partir da concentração de lactose do soro do queijo que é utilizada na preparação do substrato misto, na secção 3.1. Ao longo da fermentação

apenas se determinou a soma das concentrações de sacarose e lactose ao longo do tempo, como demonstrado na figura 10.

Como referido anteriormente, a concentração inicial de sacarose + lactose, glucose e frutose neste ensaio foram de 67,5 g/L, 32,1 g/L e 21,3 g/L respetivamente, estimando-se uma concentração de lactose de aproximadamente 29,5 g/L. Durante as primeiras 6 h, em todos os rácios de leveduras testados, existe uma diminuição da concentração de sacarose e lactose, que pode ter origem na atividade extracelular do enzima *invertase*, dado que existe simultaneamente um aumento na concentração de frutose durante esse período (Figura 10). A partir das 6 h assiste-se a um decréscimo mais acentuado destes dissacarídeos, juntamente com um decréscimo da glucose e frutose. Estes podem ser explicados devido ao elevado consumo de açúcares por parte da cultura mista na fase exponencial de crescimento.

Às 24 h verifica-se o consumo total das duas hexoses (Figura 10 A, B, C), concluindo assim, que estes dois açúcares são preferencialmente metabolizados por parte da cultura mista nestas condições. Tal não acontece à concentração de sacarose + lactose, que estabiliza após as 24 h, com valores de 23,4, 24,5 e 23,7 g/L, para os rácios 70S:30K, 50S:50K, 30S:70K, respetivamente.

A concentração mais elevada de etanol é atingida no rácio com maior percentagem de *S. cerevisiae*, com um valor de 46,5 g/L, mas que não é estatisticamente diferente dos valores obtidos pelos restantes rácios (Tabela 7). Consequentemente, o rendimento $Y_{P/S}$ é semelhante em todos os rácios testados para esta concentração de açúcares obtendo-se assim valores de 0,495 g/g, 0,499 g/g e 0,487 g/g, para os rácios de leveduras 70S:30K, 50S:50K e 30S:70K, respetivamente.

Das três proporções de leveduras testadas como cultura mista, o rendimento $Y_{X/S}$ foi superior no rácio 50S:50K, mas também não é significativamente diferente em relação aos obtidos pelos rácios de leveduras 70S:30K e 30S:70K (Tabela 7).

A produtividade de etanol mais elevada foi atingida no rácio 50S:50K, representando um aumento de 20,3% e 0,1% em relação aos rácios 70S:30K e 30S:70K, respetivamente (Tabela 7). Esta diferença de 20,3% pode ser explicada pelo facto de no rácio 70S:30K se ter atingido o máximo de etanol às 30 h e apenas uma concentração de etanol superior ao rácio 50S:50K em 3% e que foi atingido às 24 h. Tal diferença já não existe entre os rácios 50S:50K e 30S:70K, porque as concentrações máximas foram atingidas ao mesmo tempo de fermentação.

Relativamente à percentagem de conversão de açúcares, em nenhum dos casos foi obtido 100% de conversão dos açúcares totais (Figura 10 A, B e C), apesar da concentração inicial de açúcares não ser muito elevada e esta percentagem foi muito semelhante entre os três rácios testados (Tabela 7).

O segundo ensaio, realizado com a concentração de açúcares totais de 236 g/L, apresenta uma composição em açúcares individuais, sacarose + lactose, glucose e frutose de 108,4 g/L, 81,1 g/L e 46,3 g/L, respetivamente. Estima-se uma concentração inicial de lactose entre 45-50 g/L. Pode observar-se pela figura 11 B, C e D que as curvas de crescimento celular e de produção de etanol são semelhantes entre todos os rácios de leveduras testados, à semelhança do que acontecia no ensaio realizado com uma concentração total de açúcares de 121 g/L. Tanto a biomassa máxima obtida como a taxa específica de crescimento apresentam valores muito próximos entre si (Tabela 8).

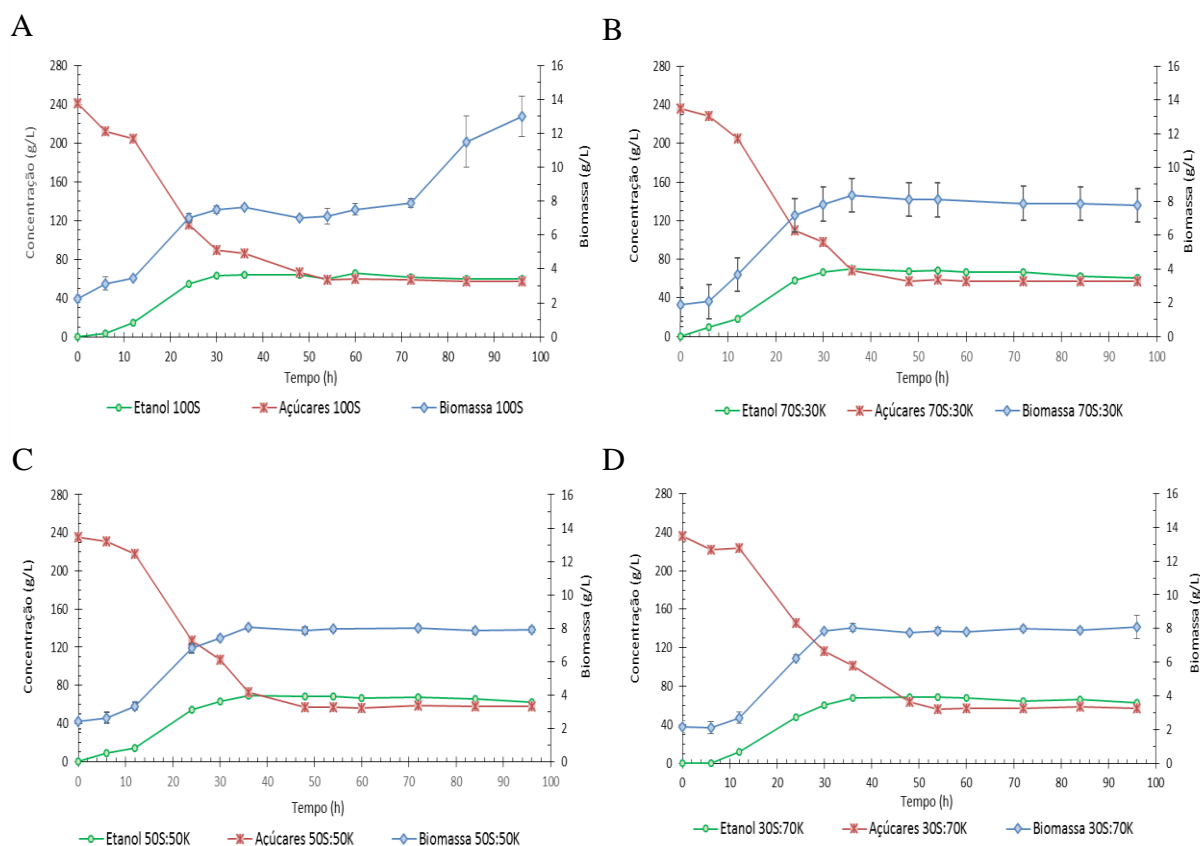


Figura 11. Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular, da levedura *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura (A) e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 nas proporções (B) 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, (C) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*, e (D) 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis* (D). As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h e em agitadora orbital a 30 °C e 150 rpm utilizando a fermentação do substrato misto a 40 % (p/v) de concentração total de açúcares iniciais de 236 g/L.

Tabela 8. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), com utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista, nas proporções 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h e o substrato misto apresentava uma concentração total de açúcares de 236 g/L.

Rácio	μ (h ⁻¹)	X _{máx} (g/L)	[Et] max. (g/L)	t _{Et max.} (h)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	P _{Et} (g/L.h)	Conversão açúcares total (%)
70S:30K	0,064 ± 0,005 ^{de}	8,36 ± 0,25 ^a	70,03 ± 0,77 ^b	36	0,451 ± 0,024 ^a	0,040 ± 0,002 ^a	2,163 ± 0,194 ^a	75,8 ± 0,4 ^c
50S:50K	0,061 ± 0,005 ^{de}	8,03 ± 0,15 ^a	68,96 ± 1,22 ^b	36	0,463 ± 0,028 ^a	0,036 ± 0,002 ^a	2,127 ± 0,198 ^a	75,4 ± 0,4 ^c
30S:70K	0,094 ± 0,012 ^{bcd}	8,06 ± 0,24 ^a	68,88 ± 0,47 ^b	54	0,438 ± 0,058 ^a	0,047 ± 0,002 ^a	1,510 ± 0,228 ^a	75,7 ± 0,3 ^c

Taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa (X_{máx}), concentração máxima de etanol acumulado ([Et]_{máx}), tempo de obtenção da concentração máxima de etanol acumulado (t_{Et máx}), rendimento de produto obtido em função dos açúcares consumidos (Y_{P/S}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/S}), produtividade de etanol (P_{Et}) e percentagem de açúcares totais consumidos (conversão açúcares total), para os diferentes rácios de leveduras testados. 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). Este teste estatístico foi realizado em conjunto com os dados da tabela 7.

Neste ensaio em que a concentração de açúcares totais é de 236 g/L, existe uma fase de latência superior em todas as proporções de leveduras estudadas (Figura 11 B, C e D), relativamente às condições de açúcar anterior, 121 g/L. Apesar disso, a fase exponencial de crescimento para todas as culturas mistas tem a duração de aproximadamente 14 h. O final desta fase de crescimento celular nas fermentações realizadas com os rácios de leveduras 70S:30K e 50S:50K é atingido quando os açúcares deixam de ser consumidos, embora não esgotados, pelo que o perfil de consumo de açúcares totais pelas culturas mistas se mantém constante (Figura 11 B e C), este facto evidencia que a cultura mista não foi capaz de fermentar todos os açúcares. Com a utilização do rácio de leveduras 30S:70K ainda se verifica um consumo de 59,5 g/L de açúcar após ser atingida a fase estacionária de crescimento (Figura 11 D), sugerindo assim que a ocorrência desta fase estacionária pode ser atribuída a outros fatores, nomeadamente a concentração de etanol associada à presença de sal no meio fermentativo que possa estar a inibir o crescimento celular desta cultura mista ou da estirpe ativa da cultura mista.

Neste ensaio, verifica-se também que o açúcar remanescente é comum em todas as culturas de leveduras e corresponde à concentração de sacarose + lactose, com um valor de aproximadamente 57,5 g/L (Figura 11 B, C e D). Sugerindo que a sua composição será apenas lactose, a qual não é fermentável pela levedura *S. cerevisiae*, tal como no ensaio anterior. Além disso, um estudo realizado em paralelo no laboratório, com a fermentação do substrato misto a

40 % (p/v) e um inóculo contendo apenas a levedura *S. cerevisiae* em cultura pura (Figura 11 A), demonstrou que a curva de crescimento celular, bem como o perfil de consumo de açúcares e produção de etanol ao longo do tempo, são semelhantes aos que foram determinados para a população mista em qualquer um dos rácios testados nesta condição de açúcar (Figura 11), sugerindo assim que o comportamento cinético e o perfil de consumo de açúcares da cultura mista poderão estar a ser determinados pela levedura *S. cerevisiae* com maior capacidade fermentativa.

Relativamente à produção de etanol, verifica-se que para os rácios 70S:30K e 50S:50K a sua acumulação durante a fermentação ocorre maioritariamente durante a fase exponencial e fase de desaceleração do crescimento e não acumula quando o consumo de açúcares começa a estabilizar às 36 h (Figura 11 B e C). Na proporção de leveduras 30S:70K a produção de etanol também ocorre maioritariamente durante a fase exponencial de crescimento e de desaceleração, mas após a estabilização da concentração de etanol às 36 h ainda existe um consumo de 44,8 g/L de açúcares (Figura 11 D). Este consumo de açúcares mais lento, não afeta, contudo, a produção de etanol, mas pode indicar que esta cultura mista apresente maior sensibilidade ao etanol.

Como anteriormente referido, a concentração inicial de sacarose + lactose, glucose e frutose neste ensaio foi de 108,4 g/L, 81,1 g/L e 46,3 g/L, respetivamente e estima-se uma concentração inicial de lactose entre 45-50 g/L.

Relativamente ao perfil individual de consumo de açúcares pelos três rácios de leveduras estudados, é possível analisar que em todos, a concentração de sacarose + lactose decresce até às 48 h, seguindo-se de uma estabilização a partir desse período, com valores no final da fermentação de 57,1 g/L, 58,1 g/L e 57,2 g/L para os rácios 70S:30K, 50S:50K e 30S:70K, respetivamente (Figura 12 B, C e D).

Contrariamente ao que acontecia no primeiro ensaio, em que o consumo de açúcares era praticamente idêntico nos três casos, neste em particular existem ligeiras diferenças, principalmente no período inicial até às 12 h de fermentação e no tempo que demoram a ser totalmente consumidos os monossacarídeos, glucose e a frutose.

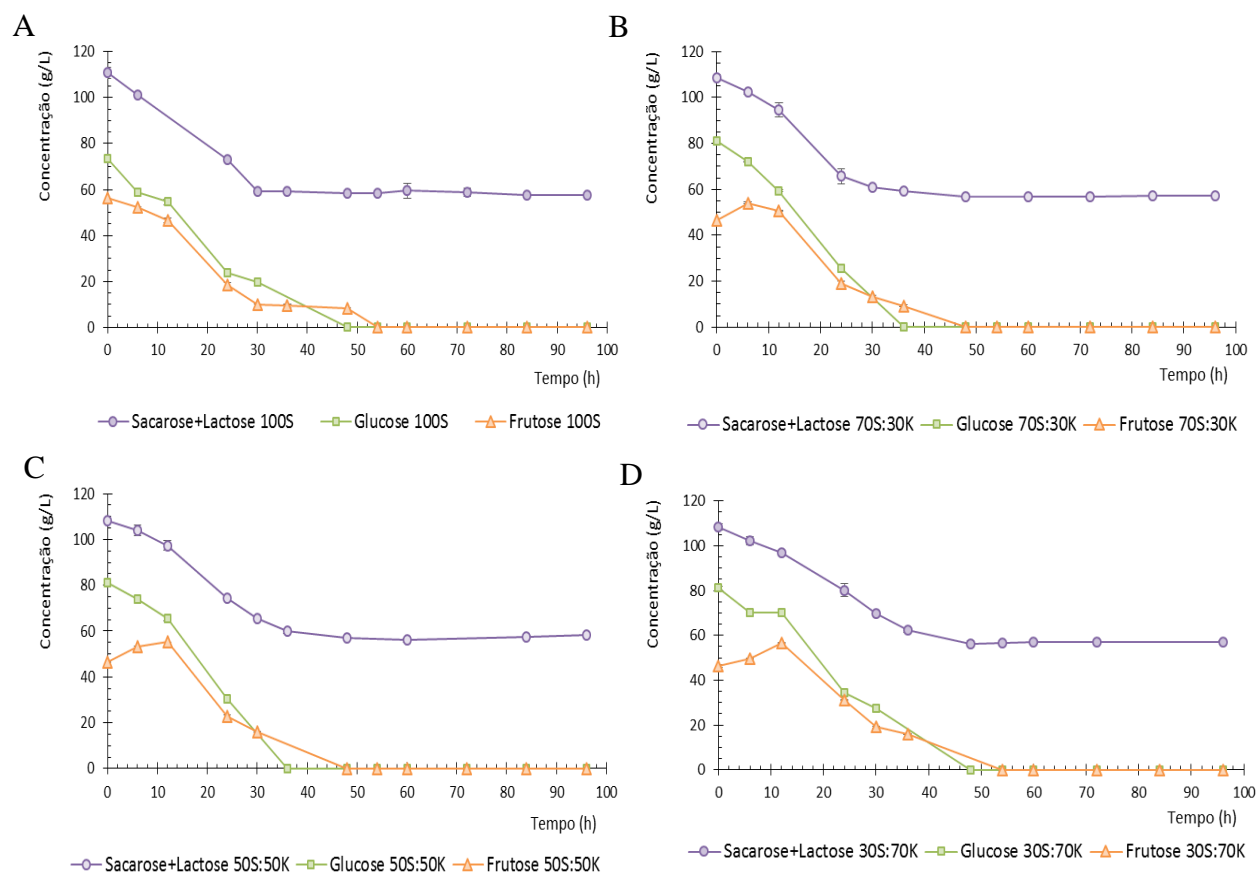


Figura 12. Perfil de consumo de açúcares individuais do substrato misto, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura (A) e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, com as proporções (B) 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, (C) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e (D) 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em erlenmeyer durante 96 h numa agitadora orbital a 30 °C e 150 rpm, utilizando a fermentação do substrato misto a 40 % (p/v) que contém uma concentração total de açúcares de 236 g/L

Com rácio 70S:30K (Figura 12 B) existe um aumento da concentração de frutose em 16,7 % nas primeiras 6 h, relativamente ao valor inicial deste açúcar. Este aumento pode ter origem na atividade extracelular do enzima *invertase*, visto que, tal como no ensaio anterior, a concentração de sacarose + lactose diminui nesse período. Tal aumento não se verifica na concentração de glucose, pois uma vez que este é o açúcar preferencial da cultura mista, a sua taxa de consumo é maior do que a sua taxa de produção por hidrólise da sacarose. Este consumo de glucose para 59,4 g/L às 12 h, é o mais acentuado dos três rácios testados e pode ser explicado pela existência de uma maior concentração da levedura *S. cerevisiae* no inóculo.

Quando tem início a fase exponencial de crescimento celular, o consumo de glucose e frutose, bem como a hidrólise dos dissacarídeos dá-se de uma forma mais acentuada, levando assim, ao esgotamento da glucose às 36 h e da frutose às 48 h (Figura 12 B). Este comportamento de consumo primeiramente de um açúcar e depois de outro é comum nos três rácios deste ensaio e leva à conclusão que existe uma preferência no consumo de glucose em relação à frutose por parte da cultura mista nestas condições (Figura 12 B, C e D).

O rácio 50S:50K apresenta duas diferenças no consumo de açúcares em relação ao rácio 70S:30K. A primeira é que no período inicial a concentração de frutose aumenta até às 12 h e a segunda diferença diz respeito ao consumo de glucose nesse período, que não é tão acentuado como no rácio 70S:30K (Figura 12 B e C).

Com o rácio 30S:70K o aumento da concentração de frutose no período até às 12 h é idêntico ao do rácio 50S:50K (Figura 12 C e D). O consumo de glucose nesse período difere entre os restantes pelo facto de existir uma estabilização da concentração de glucose no período entre as 6 h e as 12 h. Essa estabilização pode ser explicável devido à existência de um maior tempo de latência neste rácio, cuja percentagem da levedura *S. cerevisiae* é também menor e que significa que neste período de adaptação celular ao meio, o consumo de açúcares é mais reduzido. Neste rácio, o esgotamento de glucose e frutose acontece também mais tarde do que nos restantes, às 48 e 54 h, respetivamente (Figura 12 D).

A concentração de etanol obtida neste ensaio foi mais uma vez, semelhante entre os rácios testados (Tabela 8). A concentração mais elevada foi atingida pelo rácio com maior percentagem da levedura *S. cerevisiae*, com a concentração de 70,03 g/L. Apesar disso, esse valor não é significativamente diferente dos restantes obtidos (Tabela 8). A vantagem dos rácios de leveduras 70S:30K e 50S:50K em relação ao restante é que o valor máximo de etanol obtido foi atingido às 36 h o que significa uma redução em 18 h do que aquele que é obtido no rácio 30S:70K e que torna a sua produtividade mais baixa em relação aos outros dois por esse motivo.

O rendimento $Y_{P/S}$ é semelhante entre todas as proporções de leveduras e o valor mais elevado é de 0,463 g/g. Esse valor é atingido com o rácio de leveduras 50S:50K (Tabela 8).

O rendimento $Y_{X/S}$ é mais elevado no rácio 30S:70K, mas o valor obtido, 0,047 g/g é semelhante ao dos rácios 70S:30K e 50S:30K (Tabela 8).

Em qualquer um dos rácios testados, não foi obtido 100 % conversão de açúcares (Figura 11 B, C e D) e a percentagem de conversão de açúcares totais foi semelhante entre todos os rácios de leveduras estudados, cerca de 75 % (Tabela 8).

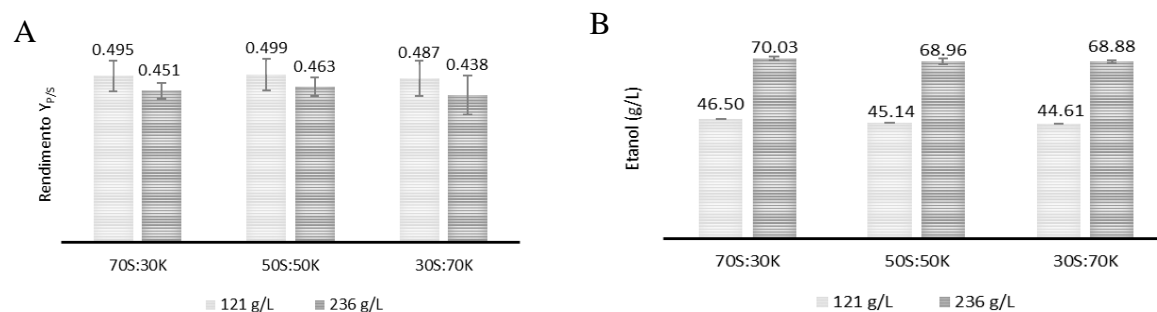


Figura 13. Resultados dos diferentes parâmetros estudados para a cultura mista, composta por *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 nas proporções 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis* nas duas condições de açúcar testadas. (A) Rendimento de produto obtido em função do substrato consumido, (B) concentração máxima de etanol obtido.

É possível observar que na concentração de 121 g/L de açúcares totais, a taxa específica de crescimento é superior relativamente aos outros ensaios. Também a concentração máxima de etanol é atingida mais cedo (24-30 h) do que nos ensaios realizados com a concentração de açúcares mais elevada. Da mesma forma acontece com os rendimentos $Y_{P/S}$ (Figura 13 A) e $Y_{X/S}$ que são sempre mais elevados nas condições de açúcares totais de 121 g/L, sugerindo que a conversão de açúcares se dá de uma forma mais eficiente com a utilização de concentrações de açúcares inferiores. Por outro lado nesta condição (121 g/L), de modo a igualar a concentração máxima de etanol atingida a 236 g/L de açúcares totais seriam necessárias mais horas de fermentação, para além das 24 a 36 h, inviabilizando o processo fermentativo,

De forma a poder alcançar elevadas concentrações de etanol, a utilização de concentrações elevadas de açúcares é fundamental. A partir da figura 13 B pode ver-se que as concentrações máximas de etanol obtidas no ensaio realizado a 236 g/L, são superiores em 50,6 %, 52,8 % e 54,4 %, para os rácios 70S:30K, 50S:50K e 30S:70K, respetivamente, quando comparadas com o ensaio realizado com a concentração de açúcares total de 121 g/L. Por este motivo, neste trabalho foi escolhida esta concentração de açúcares para posteriores fermentações em reator biológico STR.

Todos os parâmetros fermentativos estudados com a concentração do substrato misto a 236 g/L são semelhantes ou até estatisticamente iguais entre a cultura pura de levedura *S. cerevisiae* e cultura mista com a levedura *K. lactis* (Tabela 9). Estes resultados apontam para que a levedura *K. lactis* em cultura mista, não consiga alcançar crescimento celular durante todo o processo fermentativo, justificando assim a presença de lactose no final das fermentações realizadas para as duas concentrações de açúcares totais. Isto significa, que a totalidade de açúcares consumidos e etanol produzido durante todo o processo se deva à capacidade fermentativa em condições aeróbicas da levedura *S. cerevisiae*.

Tabela 9. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), com utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura e com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista, nas proporções 70 % *S. cerevisiae*: 30 % *K. lactis*, 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e 30 % *S. cerevisiae*: 70 % *K. lactis*. As fermentações foram realizadas em *erlenmeyer* durante 96 h e o substrato misto apresentava uma concentração total de açúcares de 236 g/L.

Rácio	μ (h ⁻¹)	X _{máx} (g/L)	[Et] _{max} (g/L)	t _{Et max} (h)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	P _{Et} (g/L.h)	Conversão açúcares total (%)
70S:30K *	0,064 ± 0,005 ^a	8,36 ± 0,25 ^a	70,03 ± 0,77 ^a	36	0,451 ± 0,024 ^a	0,040 ± 0,002 ^{a,b}	2,163 ± 0,194 ^a	75,8 ± 0,4 ^a
50S:50K *	0,061 ± 0,005 ^a	8,03 ± 0,15 ^a	68,96 ± 1,22 ^a	36	0,463 ± 0,028 ^a	0,036 ± 0,002 ^{b,c}	2,127 ± 0,198 ^a	75,4 ± 0,4 ^a
30S:70K *	0,094 ± 0,012 ^a	8,06 ± 0,24 ^a	68,88 ± 0,47 ^a	54	0,438 ± 0,058 ^a	0,047 ± 0,002 ^a	1,510 ± 0,228 ^a	75,7 ± 0,3 ^a
100S	0,047 ± 0,008 ^a	7,90 ± 0,47 ^{**a}	65,96 ± 0,94 ^b	60	0,410 ± 0,035 ^a	0,030 ± 0,003 ^c	2,020 ± 0,210 ^a	75,3 ± 0,8 ^a

*Dados provenientes do capítulo 3.2.1 Tabela 8.

**Os valores da concentração de biomassa às 84 e 96 h foram desprezados devido a erros de pesagem.

Taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa (X_{máx}), concentração máxima de etanol acumulado ([Et]_{máx}), tempo de obtenção da concentração máxima de etanol acumulado (t_{et máx}), rendimento de produto obtido em função dos açúcares consumidos (Y_{P/S}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/S}), produtividade de etanol (P_{et}) e percentagem de açúcares totais consumidos (conversão açúcares total), para os diferentes raios de leveduras testados e em cultura pura com a levedura *S. cerevisiae* LEBA-1. 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).

Visto que os resultados obtidos nestes dois ensaios de concentrações em açúcares totais de 121 e 236 g/L não foram influenciados pela concentração de *K. lactis* no inóculo, o rácio de leveduras 50S:50K foi selecionado como o mais favorável para estudos posteriores em reator biológico STR, pela vantagem de eliminar numa primeira fase de estudo a variável associada à utilização de percentagens de leveduras diferentes no inóculo e que de algum modo poderiam influenciar negativamente conclusões futuras

3.2.2 Avaliação da produção de toxinas “killer” das estirpes celulares

Para avaliar a compatibilidade das leveduras *S. cerevisiae* e *K. lactis* como cultura mista, é necessário implementar ensaios que visam detetar a produção de toxinas *killer* por parte destas estirpes.

Estas toxinas são mencionadas na literatura por diversos autores^{72 73 74} e a sua produção está relacionada com a excreção de dois plasmídeos com cadeia linear dupla de DNA, pGK11 (k1) e pGK12 (k2) por parte da levedura *K. lactis*. Estes plasmídeos codificam exotoxinas, que bloqueiam o ciclo de divisão celular da levedura *S. cerevisiae* na fase G1⁷⁸. Contudo, este comportamento é dependente de estirpe e de fatores como o pH e temperatura⁷³. Deste modo, foram realizados ensaios em placas de *Petri* para analisar a atividade *killer* das leveduras em questão, em duas temperaturas diferentes, 20 e 30 °C.

Na figura 14 encontram-se representados os resultados dos ensaios. As letras A, B, C e D correspondem ao teste de atividade *killer* das leveduras *K. lactis* contra *S. cerevisiae* a 20 °C, *S. cerevisiae* contra *K. lactis* a 20 °C, *K. lactis* contra *S. cerevisiae* a 30 °C e *S. cerevisiae* contra *K. lactis* a 30 °C, respetivamente.

A presença de toxinas *killer* é verificada a partir da existência de uma auréola em redor da biomassa, ou seja, da levedura que se encontra no centro de cada imagem. Esta auréola é produzida pela ausência de crescimento celular da levedura que foi colocada por espalhamento no meio, ou seja, a levedura que cresce em redor da biomassa.

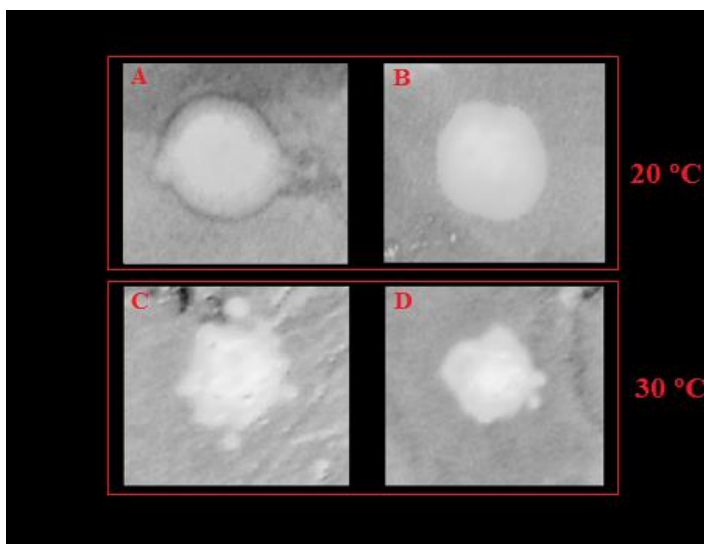


Figura 14. Resultado dos ensaios de detecção da presença de toxinas *killer* produzidas pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 à temperatura de 20 e 30 °C. (A) sensibilidade positiva da levedura *S. cerevisiae* às toxinas *killer* produzidas pela levedura *K. lactis* a 20 °C, (B) sensibilidade negativa da levedura *K. lactis* às toxinas produzidas pela levedura *S. cerevisiae* a 20 °C, (C) sensibilidade negativa da levedura *S. cerevisiae* às toxinas *killer* produzidas pela levedura *K. lactis* a 30 °C e (D) sensibilidade negativa da levedura *K. lactis* às toxinas *killer* produzidas pela levedura *S. cerevisiae* a 30 °C.

A partir da figura 14, verifica-se que apenas a imagem A apresenta uma zona de inibição, podendo concluir-se assim que existe produção de toxinas por parte da levedura *K. lactis* e que inibem o crescimento da levedura *S. cerevisiae* a 20 °C. Nas imagens B e D não existe qualquer zona de inibição produzida pela levedura *S. cerevisiae* contra a levedura *K. lactis* a 20 ou 30 °C. Como já referido na introdução, a produção de toxinas *killer* por parte das leveduras depende de vários fatores, como o pH e a temperatura. Relativamente ao pH, o meio no qual foi ensaiada a atividade *killer* contém um pH aproximadamente igual ao do substrato misto 40 % (p/v), com valores de 5,5 e 5,25, respetivamente. Em relação à temperatura, este parâmetro é mantido sempre constante, a 30 °C, em todas as fermentações realizadas neste trabalho. Nesta condição, é possível verificar pela imagem C que não existe atividade *killer* a essa temperatura pela levedura *K. lactis* contra a levedura *S. cerevisiae*.

Dada esta compatibilidade a 30 °C, estas duas leveduras foram utilizadas como cultura mista na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* em todas as fermentações que se seguem

3.3 Influência do micro-arejamento na fermentação do substrato misto em STR

Na literatura encontram-se publicações acerca da fermentação da lactose presente no soro do queijo^{39 44 37}, mas a informação disponível é limitada no que respeita ao efeito do arejamento e as condições ótimas de operação que maximizam o fluxo metabólico para a via fermentativa das leveduras respiro-fermentativas, como é o caso da levedura *K. lactis*. Alguns autores⁴³ demonstram que em condições de arejamento muito reduzidas e concentrações de lactose semelhantes à que está presente neste substrato misto é possível fermentar a lactose presente no soro do queijo com rendimentos de 0,51 g/g, sendo que o rendimento máximo teórico é de 0,54 g etanol/g lactose.

O objetivo deste ensaio foca-se em estudar o efeito do micro-arejamento, na produção de etanol pela cultura mista e o metabolismo dos diferentes açúcares presentes no substrato misto. Para isso foi realizada uma fermentação em reator biológico STR de 3-L, com o substrato misto a 40 % (p/v) e a cultura mista na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. Esta fermentação foi realizada à temperatura de 30 °C, com um fluxo de ar de 0,042 vvm e agitação de 250 rpm.

A fermentação foi iniciada com 198,3 g/L de açúcares totais, entre os quais 89,7 g/L pertencem a sacarose + lactose, 64,5 g/L glucose e 44,1 g/L frutose. À semelhança dos ensaios anteriores, estima-se uma concentração inicial de lactose entre 45-50 g/L.

A partir da figura 15 pode ver-se que o crescimento celular nesta fermentação é muito semelhante quando comparado com o ensaio realizado em *erlenmeyer*, nas mesmas condições de concentração da fonte de carbono e cultura mista. O tempo de latência dura aproximadamente 8 h e a fase exponencial termina às 36 h. Atinge-se uma concentração celular máxima às 48 h, com um valor que é inferior em 10,3 %, que aquele que é atingido no ensaio em *erlenmeyer* e a taxa específica de crescimento é ligeiramente superior nesta fermentação, com um valor de 0,102 h⁻¹ (Tabela 10). O final da fase exponencial corresponde à depleção de todos os açúcares à exceção da lactose, confirmando novamente que a levedura *K. lactis* não metabolizou este açúcar, embora tenha presente o enzima β -galactosidase⁶¹ o que indicia que apenas a cultura da levedura *S. cerevisiae* esteja ativa e tenha capacidade para fermentar os açúcares presentes na polpa de alfarroba.

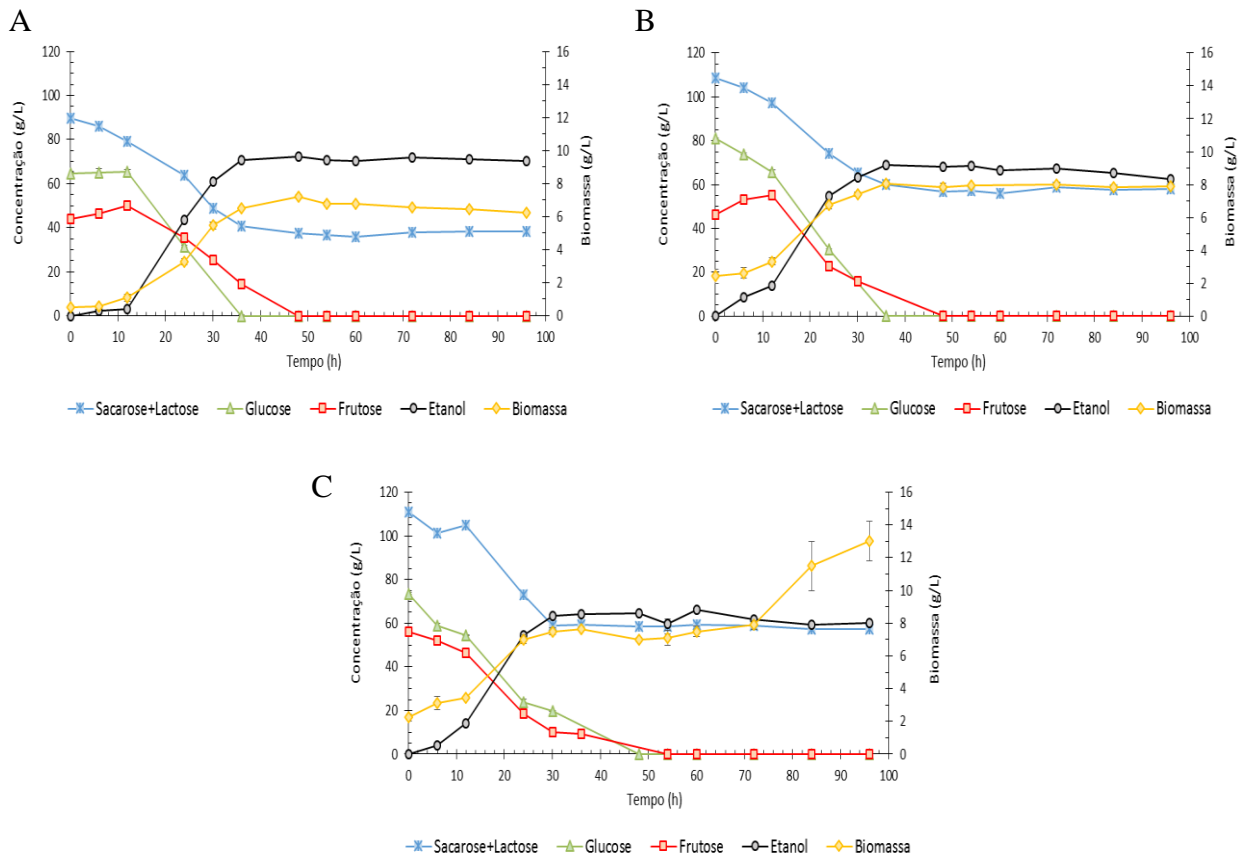


Figura 15. Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular da cultura pura da levedura, *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 (A) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* em reator biológico STR de 3-L a 30°C, 250 rpm e 0,042 vvm (B) 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* em erlenmeyer a 30 °C e 150 rpm e (C) 100 % *S. cerevisiae* em erlenmeyer a 30 °C e 150 rpm. Todas as fermentações foram realizadas com a fermentação do substrato misto a 40 % (p/v).

No que diz respeito ao consumo de açúcares, o baixo fluxo de ar fornecido (0,042 vvm) no ensaio em STR, parece ter algum impacto no seu consumo nas primeiras 12 horas, comparativamente com o ensaio realizado em erlenmeyer nas mesmas condições de açúcar (Figura 15 A e B). Nesta fermentação, assiste-se à diminuição da concentração de sacarose + lactose nas primeiras 12 h, juntamente com um aumento da concentração de frutose e sem alteração da concentração de glucose. Este aumento espera-se que seja devido à presença de atividade extracelular do enzima *invertase*. A diferença entre as duas fermentações neste período, é a concentração de glucose nesta fermentação, que se mantém constante, ao contrário do que

acontecia na fermentação em *erlenmeyer* com similar teor de açúcares em que se verificava um consumo de 15,5 g/L deste açúcar. Este facto pode sugerir que nas primeiras 12 h de fermentação houve alguma metabolização da lactose pela levedura *K. lactis*, mas não é conclusivo, porque pode também ter ocorrido consumo da glucose proveniente da hidrólise da sacarose. No entanto, a fase de latência, assim como todo o perfil de crescimento e fermentação em ambos os ensaios permanece similar.

Tabela 10. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), com a utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. As fermentações decorreram durante 96 h em reator biológico de 3-L a 30 °C, 0,042 vvm e 250 rpm ou em *erlenmeyer* a 30 °C e 150 rpm.

Rácio	μ (h ⁻¹)	$X_{\text{máx}}$ (g/L)	[Et] _{max.} (g/L)	t _{Et max.} (h)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	P _{Et} (g/L.h)	Conversão açúcares total (%)
50S:50K STR	0,102 ± 0,009 ^a	7,20 ± 0,12 ^a	72,23 ± 0,94 ^a	48	0,484 ± 0,021 ^a	0,041 ± 0,003 ^a	1,623 ± 0,252 ^a	80,7 ± 1,1 ^a
50S:50K Erlenmeyer *	0,061 ± 0,005 ^b	8,03 ± 0,15 ^a	68,96 ± 1,22 ^{a,b}	36	0,463 ± 0,028 ^a	0,036 ± 0,002 ^a	2,127 ± 0,198 ^a	75,4 ± 0,4 ^b
100S *	0,047 ± 0,008 ^b	7,90 ± 0,47 ^{**a}	65,96 ± 0,94 ^b	60	0,410 ± 0,035 ^a	0,030 ± 0,003 ^a	2,020 ± 0,210 ^a	75,3 ± 0,8 ^b

*Dados provenientes do capítulo 3.2.1 Tabela 9.

**Os valores da concentração de biomassa às 84 e 96 h foram desprezados devido a erros de pesagem.

Taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), concentração máxima de etanol acumulado ([Et]_{max}), tempo de obtenção da concentração máxima de etanol acumulado (t_{et máx}), rendimento de produto obtido em função dos açúcares consumidos (Y_{P/S}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/S}), produtividade de etanol (P_{Et}) e percentagem de açúcares totais consumidos (conversão de açúcares total %), para o rácio de leveduras testado em cultura mista e cultura pura com a levedura *S. cerevisiae* LEBA-1. 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).

Após o início da fase exponencial de crescimento, existe um decréscimo acentuado de todos os açúcares, o que leva ao consumo total da glucose aproximadamente às 36 h e da frutose aproximadamente às 48 h (Figura 15 A), enquanto que a concentração de sacarose + lactose estabiliza após as 48 h e mantém-se assim constante até ao final da fermentação, onde a concentração destes dois açúcares é de 38,2 g/L. Este comportamento é muito semelhante entre as duas fermentação (em *erlenmeyer* e em reator biológico STR com a mesma composição da fonte de carbono) e leva à conclusão que mesmo em condições de micro-arejamento, o açúcar com maior afinidade com a cultura mista é a glucose. A outra conclusão importante é que estas condições de arejamento não levaram à fermentação completa da lactose pela levedura *K. lactis* nesta fermentação, como havia sido sugerido anteriormente.

A concentração celular máxima da cultura mista, concentração máxima de etanol obtido, os rendimentos $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ e as produtividades de etanol obtidas são estatisticamente iguais quando comparados com a fermentação realizada em *erlenmeyer* (Tabela 10).

De uma forma geral, pode concluir-se também que o perfil fermentativo para as condições de arejamento testadas volta a coincidir com o perfil de crescimento celular e consumo de açúcares obtido com a cultura pura da levedura *S. cerevisiae* (Figura 15 A e C)

A lactose continua a não ser consumida, mesmo quando já não existe no meio glucose e frutose (Figura 15 A), o que indicia que a levedura *K. lactis* não cresce nem fermenta durante todo o processo.

3.4 Influência de condições de anoxia na fermentação do substrato misto em STR

O objetivo desta fermentação é maximizar a produção de etanol pela cultura mista, utilizando diferentes condições de oxigenação celular⁴³. Para tal, foi realizada uma fermentação em reator biológico STR de 3-L, com a cultura mista na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* e o substrato misto 40 % (p/v). Numa primeira fase (0-48 h) foram criadas condições de anaerobiose, seguida de uma segunda fase (48-96 h) com arejamento.

Como já foi descrito em 1.3.3.2 o efeito *Crabtree* é um fenómeno fisiológico microbiano que caracteriza a preferência que as leveduras têm em utilizar determinadas vias metabólicas, na presença ou ausência de oxigénio. Esta característica é explicada devido à existência de concentrações de glucose superiores a 2 % no meio e que origina uma diminuição da taxa específica de consumo de oxigénio, juntamente com uma diminuição da transcrição de genes que codificam componentes da via respiratória. Por este motivo, a levedura *S. cerevisiae* em condições aeróbicas e concentrações de glucose superiores a 2 %, converte o piruvato produzido pelo ciclo da glicólise maioritariamente pela via oxiredutiva, favorecendo assim a produção de etanol. De forma contrária, nas mesmas condições, a levedura *K. lactis* utiliza a via oxidativa como principal via metabólica, favorecendo a respiração celular e sendo por isso desvantajoso para a produção de etanol.

Nas primeiras 48 h a agitação foi mantida a 60 rpm e não existiu arejamento, ou seja, em sistema anaeróbico para que o processo fermentativo da *K. lactis* seja favorecido. No segundo período, entre as 48 e as 96 h, a agitação foi alterada para 250 rpm e o arejamento para 0,13 vvm, condições ótimas de produção de etanol da levedura *S. cerevisiae* já descritas¹⁷.

No que respeita ao crescimento celular, pode ver-se a partir da Figura 16 A que existe uma fase de latência de aproximadamente 12 h, seguida de uma fase exponencial que termina às 48 h de crescimento. O início da fase estacionária parece corresponder ao momento de consumo total dos monossacarídeos glucose e frutose.

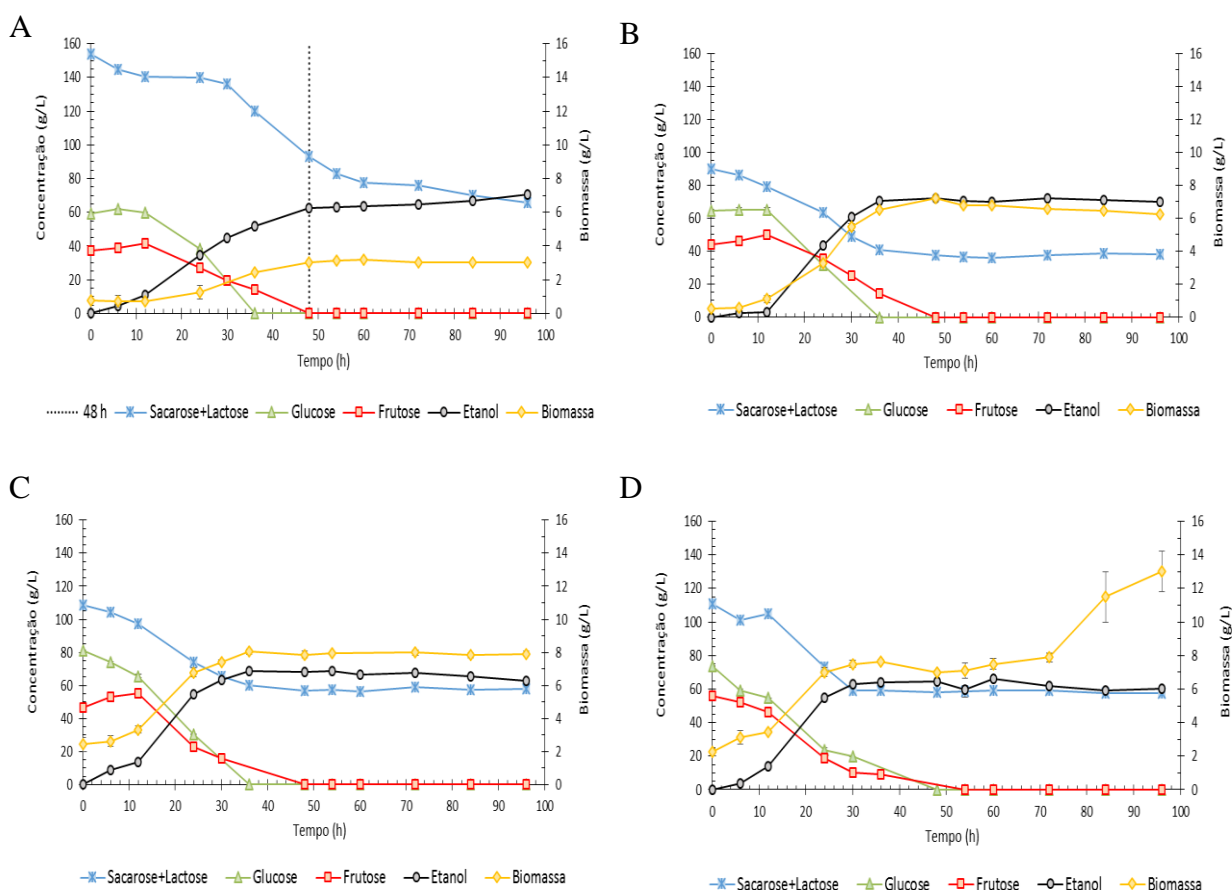


Figura 16. Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. (A) em reator biológico STR de 3-L a 30 °C, 60 rpm e 0,042 vvm até às 48 h e 250 rpm e 0,13 vvm das 48 às 96 h (B) em reator biológico STR de 3-L a 30 °C, 250 rpm e 0,042 vvm (C) em erlenmeyer numa agitadora orbital a 30 °C e 150 rpm (D) em erlenmeyer com a cultura pura da levedura *S. cerevisiae* numa agitadora orbital a 30 °C 150 rpm.

A biomassa máxima foi atingida na fase estacionária, 12 h após a alteração do arejamento, com uma concentração de 3,2 g/L. Esta concentração máxima é inferior em 60,1 % e 55,6 % em

relação às registadas no ensaio em *erlenmeyer* para este rácio (Figura 16 C) e na fermentação com micro-arejamento (Figura 16 B), respetivamente. De forma contrária, nesta fermentação registou-se um valor mais elevado na taxa específica de crescimento, $0,207 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 11), quando comparado com as duas fermentações anteriores.

Tabela 11. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), com a utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 em cultura pura e em cultura mista com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. As fermentações decorreram em reator biológico STR de 3-L e em *erlenmeyer* durante 96 h.

Rácio	μ (h^{-1})	$X_{\text{máx}}$ (g/L)	[Et] _{max.} (g/L)	$t_{\text{Et max.}}$ (h)	Conversão açúcares total (%)
50S:50K STR2	$0,207 \pm 0,079^a$	$3,19 \pm 0,03^b$	$70,66 \pm 0,51^a$	96	$73,9 \pm 1,4^b$
50S:50K STR1 *	$0,102 \pm 0,009^a$	$7,20 \pm 0,12^a$	$72,23 \pm 0,94^a$	48	$80,7 \pm 1,1^a$
50S:50K <i>erlenmeyer</i> *	$0,061 \pm 0,005^a$	$8,03 \pm 0,15^a$	$68,96 \pm 1,22^{a,b}$	36	$75,4 \pm 0,4^b$
100S <i>erlenmeyer</i> *	$0,047 \pm 0,008^a$	$7,90 \pm 0,47^{**a}$	$65,96 \pm 0,94^b$	60	$75,3 \pm 0,8^b$

*Dados provenientes do capítulo 3.3 Tabela 10.

**Os valores da concentração de biomassa às 84 e 96 h foram desprezados devido a erros de pesagem.

Taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), concentração máxima de etanol acumulado ($[\text{Et}]_{\text{máx}}$), tempo de obtenção da concentração máxima de etanol acumulado ($t_{\text{et máx}}$), e percentagem de açúcares totais consumidos (conversão de açúcares total %), para o rácio de leveduras testado como cultura mista em diferentes fermentações e em cultura pura com a levedura *S. cerevisiae* LEBA-1. Valores médios ($n=3$) \pm erro padrão, numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls ($P<0.05$).

A fermentação foi iniciada com 250,5 g/L de açúcares totais, entre os quais 154,0 g/L são sacarose + lactose, 59,4 g/L glucose e 37,2 g/L frutose. Estima-se uma concentração inicial de lactose entre 45-50 g/L.

Durante as primeiras 12 h (Figura 16 A) o consumo de açúcares é muito semelhante à fermentação realizada com micro-arejamento de 0,042 vvm (Figura 16 B). Assiste-se uma vez mais a diminuição na concentração de sacarose + lactose, juntamente com um aumento da concentração de frutose, o que significa como já se tinha concluído anteriormente, a hidrólise da sacarose pelo enzima extracelular *invertase*. Posteriormente a este período, na fase exponencial de crescimento, existe um consumo mais acentuado dos dois monossacarídeos e que leva à exaustão primeiramente da glucose às 36 h e da frutose às 48 h, tal como acontecia na fermentação com micro-arejamento. Em relação à concentração de sacarose + lactose, após o início da fase

exponencial a concentração destes dois dissacarídeos permanece praticamente constante até às 30 h, momento em que volta a diminuir até às 60 h. Durante este período não é perceptível se existe a hidrólise da sacarose ou o consumo da lactose pela levedura *K. lactis*. Tal pode ser explicado por se tratar de uma fase de crescimento em que o consumo de açúcares é mais elevado e por isso, os dois açúcares produzidos através da hidrólise da sacarose sejam rapidamente metabolizados pelas leveduras da população mista. Esta parece ser a explicação mais plausível, visto que a concentração de açúcares não consumidos é representada apenas por sacarose + lactose, com um valor de 65,5 g/L e a concentração inicial de lactose entre 45-50 g/L.

Foi no período de ausência de arejamento e durante a fase exponencial de crescimento que foi produzido 88,5 % do total de etanol, apesar da concentração máxima só ter sido atingida às 96 h, com o valor de 70,7 g/L (Tabela 12).

Durante as primeiras 48 h (Tabela 12), a percentagem de conversão de açúcares totais foi de 62,79 %, obtendo-se assim um rendimento $Y_{P/S}$ de 0,418 g/g e que é ligeiramente inferior ao que foi registado na fermentação com micro arejamento. De um modo análogo, também o rendimento $Y_{X/S}$ foi inferior, com um valor de 0,015 g/g. Durante o período entre as 48 h e as 96 h de fermentação, apenas foram consumidos 11,06 % do total de açúcares. Esta percentagem traduziu-se em rendimentos $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ de 0,376 g/g e 0,012 g/g.

Como era de prever a partir destes resultados, a produtividade de etanol (Tabela 12) foi mais elevada nas primeiras 48 h, com 1,430 g/L.h, ao passo que no segundo período a produtividade diminuiu para 0,158 g/L.h.

Tabela 12. Parâmetros fermentativos determinados para os dois períodos em que decorreu a fermentação com a utilização da cultura mista composta pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. A fermentação decorreu durante 96 h em reator biológico de 3-L. Durante as primeiras 48 h não houve arejamento e a agitação foi colocada a 60 rpm, das 48 às 96 h estes parâmetros foram alterados para 0,13 vvm e 250 rpm, respetivamente. O substrato misto utilizado, 40 % (p/v) apresentava uma concentração total de açúcares de 251 g/L.

	[Et] _{ac} (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	P _{Et} (g/L.h)	Conversão açúcares total (%)
0-48 h STR2	62,63 ± 1,30 ^b	0,418 ± 0,027 ^a	0,015 ± 0,003 ^a	1,431 ± 0,090 ^a	62,8 ± 0,2 ^a
48-96 h STR2	70,66 ± 0,51 ^a	0,376 ± 0,072 ^a	0,012 ± 0,002 ^a	0,158 ± 0,022 ^b	11,1 ± 0,6 ^b

Concentração máxima de etanol acumulado ([Et]_{ac}), rendimento de produto obtido em função dos açúcares consumidos (Y_{P/S}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/S}), produtividade de etanol (P_{Et}) e percentagem de açúcares totais consumidos (conversão de açúcares total %), nas duas fases da fermentação. 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).

Comparando esta fermentação com as realizadas em micro-arejamento e em *erlenmeyer* com este rácio e mesma condição de açúcar (Figura 16 A, B e C), podemos concluir que esta fermentação não trouxe vantagens em relação às anteriores. Esta fermentação originou máximos de etanol tardios, e por consequência, produtividades inferiores. Às 48 h a concentração de etanol nesta fermentação é de 62,6 g/L, ao passo que no ensaio em *erlenmeyer* e na fermentação com micro-arejamento eram de 68,1 g/L e 72,2 g/L, respetivamente.

Em todas as fermentações realizadas até ao momento com a fermentação do substrato misto a 40 % (p/v) e a população mista composta pela proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis* atinge-se uma concentração máxima de etanol na ordem de 70 g/L e em nenhuma delas a lactose é consumida totalmente. Nesta fermentação, bem como em todas as restantes realizadas estima-se que não existe consumo significativo desse açúcar. Deste modo, pode concluir-se que a utilização de baixos níveis de arejamento ou mesmo a sua ausência, não representam uma vantagem significativa no que respeita à produção de etanol por esta cultura mista de leveduras.

O facto da levedura *K. lactis* não se conseguir desenvolver no meio fermentativo, ou seja, a ausência de crescimento celular desta levedura durante a fermentação, como se tem vindo a sugerir, leva a colocar a hipótese de testar o efeito do arejamento (0,13 vvm) e adição programada de nutrientes que poderá ter algum efeito na produção de etanol.

3.5 Fermentação do substrato misto com arejamento e em sistema *Fed-batch*

Uma das alternativas que visa o aumento da produção de etanol pelas leveduras, é a implementação de outros sistemas de operação em reator biológico.

O modo de operação *fed-batch*, é um sistema semi-contínuo que tem por característica fundamental, a adição contínua ou periódica de nutrientes, quando existe a depleção da fonte de carbono. Esta adição, não pode ultrapassar o volume de trabalho do reator e não existe saída de efluentes.

A presente fermentação foi iniciada utilizando o substrato misto a 40 % (p/v) e com a cultura mista composta pelas leveduras *S. cerevisiae* e *K. lactis* na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. O crescimento de cada levedura na população mista foi também alvo de estudo. Neste ensaio pretendeu-se avaliar o efeito do arejamento e a adição programada de fonte de carbono.

Esta fermentação foi realizada em reator biológico, a 30 °C, com agitação e um fluxo de arejamento de 250 rpm e 0,13 vvm, respetivamente. Foi feita uma adição de extrato concentrado de alfarroba às 48 e 96 h, com uma concentração de 52,2 e 58,5 g/L, respetivamente.

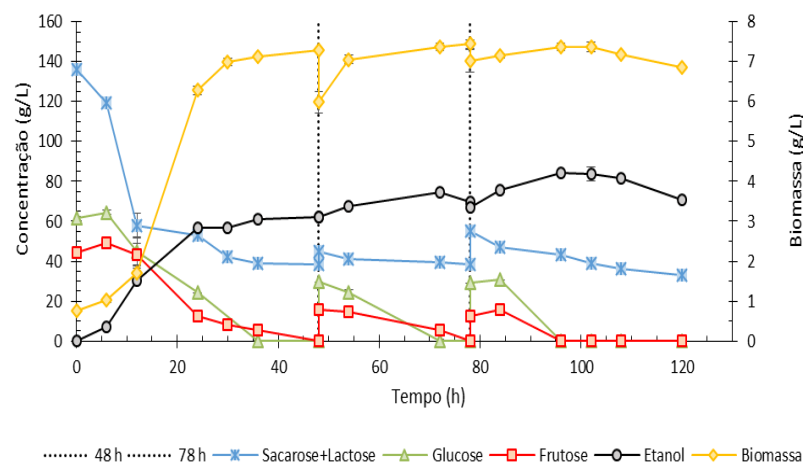


Figura 17. Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento da cultura mista, composta pelas leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. A fermentação foi realizada com o substrato misto a 40 % (p/v), em reator biológico STR de 3-L em modo de operação *fed-batch* durante 120 h. O substrato apresentava uma concentração total de açúcares de 242 g/L e o reator foi alimentado às 48 e 78 h com extrato de alfarroba com concentração de açúcares de 52 g/L e 59 g/L, respetivamente.

O crescimento celular da cultura mista durante as primeiras 48 h (Figura 17) é muito semelhante ao ensaio realizado em *erlenmeyer* com esta concentração da fonte de carbono e com esta proporção de leveduras. Com o aumento do arejamento para 0,13 vvm, a duração da fase de latência é ligeiramente mais curta comparativamente à existente nas fermentações anteriores realizadas em reator biológico STR. Após esta fase de adaptação celular, teve início a fase exponencial de crescimento, cujo final se registou aproximadamente às 24 h de fermentação, sem que tal correspondesse ao esgotamento de açúcares. A fase de desaceleração do crescimento, pode ser atribuída à presença de etanol que atingiu cerca de 56,6 g/L às 24 h e cuja toxicidade pode estar associada à presença do sal do soro do queijo, que facilita o transporte intracelular de iões Cl, alterando dessa forma a capacidade fermentativa da célula.

Às 48 e 78 h, como referido, fizeram-se adições programadas de meio de crescimento, extrato de alfarroba. Por análise da figura 17 observa-se um decréscimo na concentração celular, seguido de uma rápida recuperação. Estes decréscimos são explicados pela adição do meio, o qual diminui a concentração de células no meio. A adição de extrato de alfarroba possibilitou um aumento na respiração celular e fermentação alcoólica como se observa na figura 17. A taxa específica de crescimento teve um valor de $0,153 \text{ h}^{-1}$ e a biomassa máxima foi atingida às 78 h de fermentação, previamente à adição do extrato de alfarroba (Tabela 13). A acumulação de etanol durante o processo teve um aumento constante nos três períodos de tempo, 0-48 h, 48-78 h e 78-120 h, correspondendo assim a máximos etanólicos parciais de 62,4 g/L, 74,8 g/L e 84,0 g/L, respetivamente (Tabela 14).

Tabela 13. Parâmetros fermentativos do substrato misto a 40 % (p/v), utilizando a cultura mista composta pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. A fermentação foi realizada em reator biológico em modo *fed-batch*. O arejamento e agitação foram mantidos constantes, com valores de 0,13 vvm e 250 rpm, respetivamente. O substrato misto apresentava uma concentração total de açúcares de 242 g/L e as adições de 52 g/L e 59 g/L de extrato concentrado de alfarroba foram feitas às 48 e 78 h, respetivamente.

Rácio	μ (h^{-1})	$X_{\text{máx}}$ (g/L)	[Et] máx. (g/L)	$t_{\text{Et máx.}}$ (h)	Conversão açúcares total (%)
50S:50K	$0,153 \pm 0,020$	$7,44 \pm 0,28$	$84,03 \pm 2,09$	96	$90,7 \pm 1,2$

Taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), concentração máxima de etanol acumulado ($[\text{Et}]_{\text{máx.}}$), tempo de obtenção da concentração máxima de etanol acumulado ($t_{\text{et máx.}}$), e percentagem de açúcares totais consumidos (conversão de açúcares total %), para o rácio de leveduras testado como cultura mista..

A concentração total de açúcares iniciais foi de 241,9 g/L, dos quais 136,3 g/L pertencem a concentração de sacarose + lactose, 61,3 g/L glucose e 44,2 g/L frutose. Estima-se que a concentração de lactose inicial seja de 45-50 g/L.

O perfil de consumo de açúcares nas primeiras 48 h (Figura 17) é de uma forma geral, semelhante a todas as fermentações realizadas até ao momento. Existe uma diminuição da concentração de sacarose + lactose nas primeiras 12 h, que pode ser explicada pela atividade do enzima invertase tal como em todas as fermentações realizadas anteriormente, dado que ao mesmo tempo existe um aumento da concentração de frutose e glucose no meio. Após esse aumento, os dois monossacarídeos são rapidamente consumidos, levando ao esgotamento primeiramente da glucose às 36 h e da frutose às 48 h. A concentração de sacarose + lactose estabiliza a partir das 36 h até às 48 h, onde atinge um valor de 38,5 g/L.

No final das primeiras 48 h, foi adicionado ao reator 52,2 g/L de extrato concentrado de alfarroba, que origina um aumento de 6,6 g/L na concentração de sacarose, 29,6 g/L de glucose e 16 g/L de frutose. Após a adição, volta a existir a hidrólise da sacarose até às 54 h e às 78. A glucose esgota-se às 72 h e a frutose às 78h (Figura 17).

Após 78 h de fermentação, é adicionado 58,5 g/L de extrato concentrado de alfarroba, que eleva a concentração de sacarose, glucose e frutose em 17 g/L, 28,9 g/L e 12,6 g/L, respetivamente. O consumo de açúcares neste período foi semelhante ao anterior com a exceção de que os dois monossacarídeos se esgotam ao mesmo tempo, 96 h. A concentração de açúcares residuais é composta apenas por sacarose + lactose e detém um valor de 32,8 g/L (Figura 17).

A percentagem total de conversão de açúcares é de 90,7 %. O período de maior consumo pertence às primeiras 48 h, onde foram metabolizados 57,7 % de açúcares e que deram origem a 62,4 g/L de etanol neste período. Esta concentração de etanol é obtida com um rendimento $Y_{P/S}$ de 0,315 g/g e uma produtividade de 1,762 g/L.h (Tabela 14).

Tabela 14. Parâmetros fermentativos determinados para os três períodos em que decorreu a fermentação, utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 em cultura mista, na proporção 50 % *S. cerevisiae*: 50 % *K. lactis*. A fermentação foi realizada em reator biológico em modo *fed-batch*. O arejamento e agitação foram mantidos constantes com valores de 0,13 vvm e 250 rpm, respetivamente. O substrato misto apresentava uma concentração total de açúcares de 242 g/L e as adições de 52 g/L e 59 g/L de extrato concentrado de alfarroba foram feitas às 48 e 78 h, respetivamente.

	[Et] _{ac} (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	P _{Et} (g/L.h)	Conversão açúcares total (%)
0-48 h	62,38 ± 0,92 ^c	0,315 ± 0,010 ^a	0,034 ± 0,004 ^a	1,762 ± 0,226 ^a	57,7 ± 1,0 ^a
48-78 h	74,77 ± 1,10 ^b	0,290 ± 0,056 ^a	0,0090 ± 0,0005 ^b	0,508 ± 0,097 ^b	14,9 ± 2,0 ^b
78-120 h	84,03 ± 2,09 ^a	0,332 ± 0,061 ^a	0,006 ± 0,002 ^b	0,901 ± 0,177 ^{a,b}	18,1 ± 0,9 ^b

Concentração máxima de etanol acumulado ([Et]_{ac}), rendimento de produto obtido em função dos açúcares consumidos (Y_{P/S}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/S}), produtividade de etanol (P_{Et}) e percentagem de açúcares totais consumidos (conversão de açúcares total %), nas três fases da fermentação. 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).

Entre as 48 e as 78 h foram consumidos 14,9 % do total de açúcares e leva a um aumento em 12,4 g/L na concentração de etanol às 72 h. Esta concentração de etanol foi atingida com um rendimento Y_{P/S} de 0,290 g/g e uma produtividade de 0,508 g/L.h (Tabela 14).

Entre as 78 e as 120 h foi registada a concentração máxima de etanol, 84,0 ± 2,1 g/L às 96 h, com um rendimento Y_{P/S} superior relativamente às duas fases anteriores, contendo um valor de 0,332 g/g (Tabela 14).

O rendimento Y_{X/S} foi mais elevado nas primeiras 48 h, com um valor de 0,034 g/g (Tabela 14)

Comparativamente com as fermentações realizadas anteriormente, pode-se dizer que em sistema *fed-batch* se atingiu o valor mais elevado de etanol obtido, com 84,0 g/L. Este valor tem uma superioridade média de 20 % em relação às fermentações realizadas em reator biológico STR e em *erlenmeyer* com esta proporção de leveduras na população mista, sendo a concentração total de açúcares consumidos 319,8 g/L.

Comparando o primeiro período de tempo em que a produção de etanol é mais elevada em todas as fermentações realizadas, podemos afirmar que o rendimento Y_{P/S} obtido, foi inferior ao das fermentações realizadas com micro-arejamento e em anoxia.

Os tempos de adição do extrato concentrado de alfarroba poderiam eventualmente ser melhorados, visto que a glucose, que é o açúcar preferencial e a frutose, já não existem às 48 e 78 h. Desta forma, o *fed-batch* poderia ter sido realizado mais eficazmente se as adições tivessem sido feitas às 36 e 72 h. Tal como o tempo total de fermentação que poderia ter sido reduzido para aproximadamente 96 h, visto que a partir desse tempo começa a ocorrer morte celular e uma diminuição da concentração de etanol que chega a atingir 70,7 g/L às 120 h.

Por último, para além do crescimento celular da cultura mista através do peso seco, a viabilidade celular de cada levedura ao longo do tempo também foi alvo de estudo, através da contagem de unidades formadoras de colónia. Os resultados indicam que fermentação foi iniciada com $3,4 \times 10^6$ células/ml da levedura *S. cerevisiae* e $3,6 \times 10^6$ células/ml de *K. lactis*. Ao fim de 6 h de fermentação a concentração celular de *S. cerevisiae* é $7,8 \times 10^6$ células/ml e $3,4 \times 10^6$ células/ml de *K. lactis*. No final da fase exponencial de crescimento da cultura mista, a concentração de *S. cerevisiae* é $1,9 \times 10^8$ células/ml ao passo que a de *K. lactis* é de $1,3 \times 10^6$ células/ml. Às 84 h de fermentação já não existiam células viáveis da levedura *K. lactis*. Estes resultados comprovam claramente que durante a fermentação, utilizando esta cultura mista, ocorre morte celular por parte da levedura *K. lactis*, mesmo em condições aeróbicas.

4 CONCLUSÕES

Para que a produção de bioetanol seja rentável e economicamente competitiva com outros combustíveis, vários fatores devem ser estudados de modo tornar mais eficaz a sua produção, bem como diminuir os seus custos que lhe estão diretamente associados.

O presente trabalho, focou-se na procura de novas fontes de carbono para a produção de bioetanol de segunda geração, através da construção de um substrato contendo uma mistura de açúcares da alfarroba e açúcares do soro do queijo. Foram testados vários rácios alfarroba: soro (p/v), 20 % (p/v), 30 % (p/v) e 40 % (p/v) e os resultados apontam para que estes resíduos provenientes do setor agroindustrial sejam tecnicamente compatíveis para a produção deste biocombustível. A melhor opção e que traduz um processo de extração mais eficiente, foi obtida com a utilização do rácio 40 % (p/v) e 2 h de extração, onde foram solubilizados um total de 143,42 g/L açúcares da alfarroba. Este rácio contém um total de 189,66 g/L de açúcares fermentáveis presentes.

A estratégia seguida para fermentar os açúcares foi a de estabelecimento de uma população mista em ensaios realizados em balão *erlenmeyer* com diferentes proporções *S. cerevisiae*: *K. lactis* em duas condições de açúcares totais, 121 g/L e 236 g/L, bem como através de ensaios que visaram investigar a produção de toxinas *killer* por parte das estirpes *Saccharomyces cerevisiae* LEBA-1 e *Kluyveromyces lactis* CBS 2360. Os resultados indicam que de uma forma geral, independentemente da concentração inicial de açúcares, todas as proporções de leveduras testadas crescem no meio fermentativo e as concentrações celulares mais elevadas são atingidas inclusive no ensaio realizado com maior concentração de açúcares iniciais, com valores entre 8,0-8,4 g/L de biomassa. Por outro lado a utilização de concentrações de açúcares menos elevadas (121 g/L) também é vantajoso no que respeita à obtenção de melhores rendimentos de produto e biomassa obtida a partir do substrato consumido. Concluiu-se também que não existem diferenças significativas entre os rácios testados de leveduras testados e que a concentração de açúcares iniciais de 236 g/L permitiu atingir concentrações máximas de etanol de ≈ 70 g/L em todos os rácios testados, com rendimentos $Y_{P/S}$ entre 0,438 e 0,463 g_{Etanol}/g_{substrato} e rendimentos $Y_{X/S}$ entre 0,036 e 0,047 g_{Biomassa}/g_{Substrato}. Em relação à compatibilidade das leveduras *S. cerevisiae* e *K. lactis* no que respeita à produção de toxinas *killer* concluiu-se que à temperatura de 20 °C apenas a

levedura *K. lactis* produz toxinas *killer* contra a levedura *S. cerevisiae* e que à temperatura em que são realizadas as fermentações, 30 °C, nenhuma das estirpes celulares manifesta a produção dessas toxinas.

Para aumentar a eficiência fermentativa da cultura de leveduras, foram realizadas fermentações em reator biológico de modo a avaliar a influência do micro-arejamento e condições de anoxia na produção de etanol. De uma forma geral, os resultados sugerem que o arejamento não têm influência significativa na sua produção.

Outras alternativas que visam o aumento da produção de etanol são a introdução da operação em sistema *fed-batch*. Nesta fermentação foi atingido um valor máximo na concentração de etanol de 84,0 g/L com um consumo total de 320 g/L de açúcares. O rendimento $Y_{P/S}$ mais elevado durante a fermentação foi registado nas primeiras 48 h, com um valor de 0,315 $\text{g}_{\text{Etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$, mas que apesar disso é inferior a todas as fermentações restantes.

Ficou provado que ocorre perda de viabilidade celular da levedura *K. lactis* logo após a inoculação da cultura mista e durante todo o processo fermentativo, podendo atingir morte celular no final do processo. Por esse motivo a lactose não é consumida em todas as fermentações. Deste modo, pode concluir-se que a cultura mista formada pelas leveduras *S. cerevisiae* e *K. lactis* não será a mais indicada para a fermentação deste substrato.

5 TRABALHOS FUTUROS

Alguns resultados obtidos neste trabalho requerem uma análise mais profunda. Nomeadamente a quantificação da sacarose e lactose que precisa de ser realizada individualmente de modo a ser mais perceptível o perfil de consumo de cada um destes dissacarídeos ao longo do tempo de fermentação.

A cultura mista formada pelas leveduras *S. cerevisiae* e *K. lactis* não se comportou de uma forma eficiente nos processos fermentativos devido à ausência de crescimento celular por parte da levedura *K. lactis*. Uma das alternativas pode passar pela substituição desta levedura por outras, que têm sido reportadas na literatura devido à sua capacidade de conversão da lactose em etanol, tais como *Kluyveromyces marxianus*⁷⁷, *Kluyveromyces fragilis*⁷⁹ e *Candida pseudotropicalis*³⁷.

Outra alternativa à substituição da estirpe celular, passa pela adição do enzima β -galactosidase^{80 81} à fermentação, que tem a capacidade de hidrolisar a lactose nos seus monossacarídeos constituintes, glucose e galactose e que podem posteriormente ser metabolizados pela levedura *S. cerevisiae*. A adição deste enzima pode ser feita de duas formas básicas. A adição na sua forma solúvel que é normalmente utilizada em processos *batch* ou a adição na forma imobilizada que é frequentemente utilizada em processos contínuos. Devido ao elevado custo destes enzimas, a adição do enzima em sistemas imobilizados é a opção mais económica pela sua vantagem de reutilização⁸².

A tecnologia de DNA recombinante também pode funcionar como alternativa à utilização de outras estirpes celulares e a adição de β -galactosidase, através da manipulação de funções enzimáticas, transporte e sistemas de regulação na célula, pode-se tornar a levedura *S. cerevisiae* capaz de metabolizar lactose convertendo-a em etanol⁸³.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Prajapati, J. B. & Nair, B. M. *Handbook of Fermented Functional Foods*. 2–8 (2003).
2. Buchholz, K. & Collins, J. The roots-a short history of industrial microbiology and biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3747–62 (2013).
3. Barnett, J. A history of research on yeasts 1: Work by chemists and biologists 1789-1850. *Yeast* **14**, 1439–51 (1998).
4. Barnett, J. Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology* **149**, 557–67 (2003).
5. Guimarães, P. Miguel R. *Physiology of Yeasts in Alcoholic Fermentation Processes*. (2008).
6. Barnett, J. & Lichtenthaler, F. W. A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. *Yeast* **18**, 363–88 (2001).
7. Barnett, J. A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. *Yeast* **20**, 509–43 (2003).
8. Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G. & Zacchi, G. Bio-ethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* **24**, 549–56 (2006).
9. Sánchez, O. J. & Cardona, C. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* **99**, 5270–95 (2008).
10. Wildenborg, T. & Lokhorst, A. Introduction on CO₂ Geological Storage . Classification of Storage Options. *Oil Gas Sci. Technol.* **60**, 513–15 (2005).
11. Borines, M. G., de Leon, R. L. & Cuello, J. L. Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp. *Bioresour. Technol.* **138**, 22–9 (2013).
12. *Report from the commission to the european parliament and council- Progress towards achieving the Kyoto and EU 2020 objectives*. 2–20 (2013).
13. Decreto-lei nº 117/2010 de 25 de Outubro. Diário da República - n.º 207 - I Série.
14. Bai, F. W., Anderson, W. & Moo-Young, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* **26**, 89–105 (2008).
15. Balat, M., Balat, H. & Öz, C. Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy Combust. Sci.* **34**, 551–573 (2008).

16. John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M. & Pandey, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* **102**, 186–93 (2011).
17. Lima-Costa, M. E., Tavares, C., Raposo, S., Rodrigues, B. & Peinado, J. M. 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 (2012).
18. Walter, A., Rosillo-Calle, F., Dolzan, P., Piacente, E. & Borges da Cunha, K. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. *Biomass and Bioenergy* **32**, 730–748 (2008).
19. Raposo, S., Pardão, J. M., Díaz, I. & Lima-costa, M. E. Kinetic modelling of bioethanol production using agro-industrial by-products. *Int. J. Energy Environ.* **3**, 1–8 (2009).
20. Balat, M. & Balat, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Appl. Energy* **86**, 2273–82 (2009).
21. Sánchez-Segado, S., Lozano L., de Los Ríos, A., Hernández-Fernández, F., Godínez, C., Juan, D. Process design and economic analysis of a hypothetical bioethanol production plant using carob pod as feedstock. *Bioresour. Technol.* **104**, 324–8 (2012).
22. Rodrigues, B. Produção de bioetanol a partir de resíduos industriais de alfarroba. *tese Mestr.* (2012).
23. Cardona, C. a & Sánchez, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresour. Technol.* **98**, 2415–57 (2007).
24. Crago, C. L., Khanna, M., Barton, J., Giuliani, E. & Amaral, W. Competitiveness of Brazilian sugarcane ethanol compared to US corn ethanol. *Energy Policy* **38**, 7404–7415 (2010).
25. Al-Judaibi, A. A. Effect of Some Fermentation Parameters on Ethanol Production from Beet Molasses by *Saccharomyces cerevisiae* CAIM13. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* **6**, 301–306 (2011).
26. Sánchez, S., Lozano, L., Godínez, C., Juan, D., Pérez, A., Hernández, F. Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas. *Appl. Energy* **87**, 3417–24 (2010).
27. Zhang, C., Xie, G., Li, S., Ge, L. & He, T. The productive potentials of sweet sorghum ethanol in China. *Appl. Energy* **87**, 2360–2368 (2010).
28. Koppram, R., Tomás-Pejó, E., Xiros, C. & Olsson, L. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. *Trends Biotechnol.* **32**, 46–53 (2014).

29. Vaheed, H., Shojaosadati, S. A. & Galip, H. Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 101–11 (2011).
30. Biner, B., Gubbuk, H., Karhan, M., Aksu, M. & Pekmezci, M. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chem.* **100**, 1453–55 (2007).
31. Informação cedida gentilmente pelo Agrupamento de Alfarroba e Amêndoa do Algarve (AGRUPA). (2014).
32. Ercan, Y., Irfan, T. & Mustafa, K. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresour. Technol.* **135**, 365–71 (2013).
33. Bengoechea, C., Romero, A., Villanueva, A., Moreno, G., Alaiz, M., Millán, F., Guerrero, A., Puppo, M. Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins. *Food Chem.* **107**, 675–83 (2008).
34. Santos, M., Rodrigues, A. & Teixeira, J. A. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochem. Eng. J.* **25**, 1–6 (2005).
35. Roukas, T. Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 54–59 (1999).
36. Prazeres, A. R., Carvalho, F. & Rivas, J. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.* **110**, 48–68 (2012).
37. Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A. & Domingues, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol. Adv.* **28**, 375–84 (2010).
38. Gannoun, H., Khelifi, E., Bouallagui, H., Touhami, Y. & Hamdi, M. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. *Bioresour. Technol.* **99**, 6105–11 (2008).
39. Zafar, S. & Owais, M. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. Eng. J.* **27**, 295–98 (2006).
40. Saddoud, A., Hassaïri, I. & Sayadi, S. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresour. Technol.* **98**, 2102–8 (2007).
41. Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M. & Lyberatos, G. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous

- process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour. Technol.* **100**, 3713–7 (2009).
42. Carvalho, F., Prazeres, A. R. & Rivas, J. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci. Total Environ.* **445-446**, 385–96 (2013).
 43. Silveira, W. B., Passos, F. J. V., Mantovani, H. C. & Passos, F. M. L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 930–36 (2005).
 44. Koushki, M., Jafari, M. & Azizi, M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 614–9 (2012).
 45. Ozmihci, S. & Kargi, F. Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 169–174 (2007).
 46. Oda, Y., Nakamura, K., Shinomiya, N. & Ohba, K. Ethanol fermentation of sugar beet thick juice diluted with crude cheese whey by the flex yeast *Kluyveromyces marxianus* KD-15. *Biomass and Bioenergy* **34**, 1263–66 (2010).
 47. Gupta, A. & Verma, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **41**, 550–567 (2015).
 48. Badotti, F. *et al.* Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **7**, 4 (2008).
 49. Meijer, M. M., Boonstra, J., Verkleij, A. J. & Verrips, C. T. Kinetic analysis of hexose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in continuous culture. *Biochim. Biophys. Acta* **1277**, 209–16 (1996).
 50. Wills, C. Regulation of Sugar and Ethanol Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 245–80 (1990).
 51. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Essential Cell Biology, 4th Edition.* 424–34 (2014).
 52. Pito, D. S., Fonseca, I. M., Ramos, A. M., Vital, J. & Castanheiro, J. E. Hydrolysis of sucrose using sulfonated poly(vinyl alcohol) as catalyst. *Bioresour. Technol.* **100**, 4546–50 (2009).
 53. Diezemann, A. & Boles, E. Functional characterization of the Frt1 sugar transporter and of fructose uptake in *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.* **43**, 281–8 (2003).
 54. Rodicio, R. & Heinisch, J. J. Yeast on the milky way : genetics , physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **30**, 165–77 (2013).

55. Reifenger, E., Boles, E. & Ciriacy, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* **245**, 324–33 (1997).
56. Holden, H. M., Thoden, J. B., Timson, D. J. & Reece, R. J. Galactokinase: structure, function and role in type II galactosemia. *Cell. Mol. life Sci.* **61**, 2471–84 (2004).
57. Grossiord, B., Vaughan, E. E., Luesink, E. & de Vos, W. M. Genetics of galactose utilisation via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. *Lait* **78**, 77–84 (1998).
58. Bro, C., Knudsen, S., Regenber, B., Olsson, L. & Nielsen, J. Improvement of Galactose Uptake in *Saccharomyces cerevisiae* through Overexpression of Phosphoglucumutase : Example of Transcript Analysis as a Tool in Inverse Metabolic Engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6465–72 (2005).
59. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemistry, 5th edition.* (W H Freeman, 2002).
60. Bonekamp, F. J. & Oosterom, J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* - a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 1–3 (1994).
61. Van Ooyen, A. J. J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M., Jacobs, D., Colussi, P., Taron, C. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast Res.* **6**, 381–92 (2006).
62. Cooper, G. M. *The Cell: A Molecular Approach, 2nd edition.* (Sinauer Associates, 2000).
63. González-Siso, M. I., Freire-Picos, M., Ramil, E., González-Domínguez, M., Rodríguez Torres A., Cerdán, M. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Insights and perspectives. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 699–705 (2000).
64. Siso, M. I. G., Ramil, E., Cerdán, M. E. & Freire-Picos, M. A. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis* : Ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 585–91 (1996).
65. Ozmihci, S. & Kargi, F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations. *Bioresour. Technol.* **98**, 2978–84 (2007).
66. Milkowski, C., Krampe, S., Weirich, J., Hasse, V., Boles, E., Breunig, K. Feedback Regulation of Glucose Transporter Gene Transcription in *Kluyveromyces lactis* by Glucose Uptake. *J. Bacteriol.* **183**, 5223–9 (2001).
67. Oda, Y. & Nakamura, K. Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Yeast Res.* **9**, 742–8 (2009).

68. Silva, A. C., Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. a & Domingues, L. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 973–82 (2010).
69. Abate, C., Callieri, D., Rodríguez, E. & Garro, O. Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 580–3 (1996).
70. Szambelan, K., Nowak, J. & Czarnecki, Z. Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. *Biotechnol. Lett.* **26**, 845–8 (2004).
71. Guo, X., Zhou, J. & Xiao, D. Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 532–8 (2010).
72. Butler, R., John, H. & Stark, J. R. Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1749–57 (1991).
73. Panchal, C. J., Meacher, C., Oostrom, J. V. A. N. & Stewart, G. G. Phenotypic Expression of *Kluyveromyces lactis* Killer Toxin Against *Saccharomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 257–260 (1985).
74. Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. & Polonelli, L. Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 369–400 (1997).
75. Baranyi, J. & Roberts, T. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 277–294 (1994).
76. Singh, N. L., Prasad, R., Mishra, P. K. & Srivastava, P. Kinetics studies of product inhibition in alcoholic fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* **70**, 373–378 (2011).
77. Magalhães-Guedes, K. T., Rodrigues, A., Gervasio, I. M., Gervasio, I., Peraro do Nascimento, A., Schwan, R. Ethanol production from deproteinized cheese whey fermentations by co-cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *African J. Microbiol. Res.* **7**, 1121–7 (2013).
78. Schickel, J., Helmig, C. & Meinhardt, F. *Kluyveromyces lactis* killer system: analysis of cytoplasmic promoters of the linear plasmids. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1879–86 (1996).
79. Dragone, G., Mussatto, S. I., Almeida e Silva, J. B. & Teixeira, J. A. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass and Bioenergy* **35**, 1977–82 (2011).

-
80. Rejikumar, S. & Devi, S. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing β -galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly(vinyl alcohol). *Int. J. Food Sci. Technol.* **36**, 91–8 (2001).
 81. Demirhan, E., Apar, D. K. & Özbek, B. A modelling study on hydrolysis of whey lactose and stability of β -galactosidase. *Korean J. Chem. Eng.* **27**, 536–545 (2010).
 82. Haider, T. & Husain, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by β galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **48**, 576–80 (2009).
 83. Domingues, L., Guimarães, P. M. R. & Oliveira, C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. *Bioeng. Bugs* **1**, 164–71 (2010).