

Fracionamento por processos de membranas do soro de queijo com vista ao uso na produção de bioetanol

Vânia Filipa Simões João

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

2015

Dissertação para obtenção do grau de mestre Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob orientação do Professor Doutor Raúl Barros e
coorientação da Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

Fracionamento por processos de membranas do
soro de queijo com vista ao uso na produção de
bioetanol

Vânia Filipa Simões João

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

2015

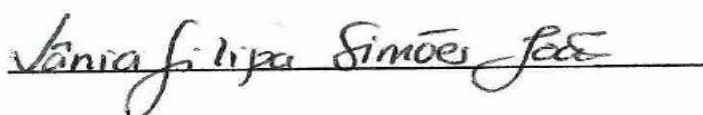
Dissertação para obtenção do grau de mestre Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob orientação do Professor Doutor Raúl Barros e
coorientação da Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

Fracionamento por processos de membranas do soro de queijo com vista ao uso na produção de bioetanol

Declaração de autoria do trabalho

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



Vânia Filipa Simões João

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

Agradecimentos

Ao professor Raúl Barros por ter aceitado o meu pedido para realização desta dissertação sob a sua orientação, assim como pelo apoio e conhecimento transmitido ao longo destes meses de trabalho.

Agradeço a professora Emília Costa pela oportunidade que me deu em realizar esta dissertação de mestrado no LEBA, pela partilha de conhecimento e disponibilidade no decorrer deste trabalho.

Às Engenheiras Brígida Rodrigues e Ana Constantino, assim como ao Engenheiro Fábio Guerreiro por estarem sempre prontos a ajudar, pelo conhecimento transmitido, pelas palavras de incentivo e pelos bons momentos passados.

Um agradecimento especial a António Canavarro, Tiago Fernandes e Ana Pereira por estarem sempre presentes e disponíveis para ajudar durante esta fase final de escrita da dissertação.

Agradeço à minha família e amigos pelo apoio e pela confiança que sempre depositaram em mim.

Resumo

O soro de queijo é um efluente da indústria de laticínios com elevada carga orgânica poluente. Uma forma de tratamento deste efluente é a sua utilização como substrato para a produção de bioetanol de 2ª geração. O objetivo desta tese de mestrado consistiu no fracionamento do soro de queijo de cabra num permeado rico em lactose e num concentrado de proteínas do soro (WPC), resultante do processo de membranas com vista à sua utilização na fermentação.

O soro foi pré-tratado através de centrifugação e microfiltração (MF), obtendo-se uma boa clarificação do soro, com a diminuição dos sólidos suspensos de 1310 mg/L para 580 mg/L.

Para fracionamento do soro testaram-se duas membranas de ultrafiltração (UF), poliétersulfona e celulose regenerada. A membrana de celulose regenerada permitiu a otimização dos rendimentos de recuperação de proteína (93,3%), de lactose (82,3%), fluxo ($0,80 \pm 0,013$ L/m².min) e coeficiente de rejeição de proteína (97, 8%).

Estudou-se a capacidade fermentativa da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 utilizando o permeado de soro concentrado (100 g/L de lactose) como substrato e diferentes fontes de azoto: extrato de levedura e peptona (YEP), WPC e na sua ausência. Não se verificaram diferenças significativas nos parâmetros de produção de etanol sendo o rendimento de etanol mais elevado de $0,353 \pm 0,010$ gEtanol/gLactose e a produtividade mais elevada de $1,12 \pm 0,043$ g/L.h para o meio suplementado com YEP.

Para melhorar as propriedades do concentrado como fonte de azoto realizaram-se ensaios de hidrólise do WPC e de velocidade de hidrólise enzimática. A protease de *Aspergillus oryzae* e o rácio enzima/substrato de 4:100 apresentou os melhores resultados, com elevada concentração de aminas livres ($105,6 \pm 0,48$ mmol/L) e velocidade de hidrólise mais elevada ($3,37 \pm 0,087$ mmol/L.h).

Estudou-se a capacidade fermentativa da levedura utilizando o WPC hidrolisado (HWPC) como fonte de azoto, não se verificando diferenças significativas no rendimento etanólico, sendo o mais elevado $0,476 \pm 0,0098$ gEtanol/gLactose sem adição de fonte de azoto. No entanto a produtividade foi mais elevada usando HWPC: $1,19 \pm 0,006$ g/L.h.

Concluiu-se que foi possível a conversão total de açúcares em etanol e que não é necessário adicionar fonte de azoto ao soro permeado, pois não há uma melhoria significativa da produção de etanol.

Palavras-chave: Ultrafiltração, Bioetanol, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, Fontes de azoto, WPC, hidrólise enzimática de proteínas

Abstract

Cheese whey is an effluent in the dairy industry which has a high organic pollutant load. One possible treatment of this effluent is to use it as a substrate in the fermentation of second generation bioethanol. The purpose of this thesis consisted in the fractioning of goat cheese whey into a permeate rich in lactose and in whey protein concentrate (WPC), resulting from a membrane process, and the use of these fractions in fermentation.

The whey was pre-treated through centrifugation and microfiltration (MF), yielding a good whey clarification, with the reduction of suspended solids from 1310 mg/L to 580 mg/L.

For whey fractionation two UF membranes were tested, polyethersulfone and regenerated cellulose. The regenerated cellulose membrane resulted in better yields of protein (93,3%) and lactose (82,3%) recovery, permeate flux ($0,78\pm 0,011$ L/min.m²) and protein retention coefficient (97,8%).

The fermentative capacity of *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 yeast was studied with whey permeated concentrated up to 100 g/L of lactose as a substrate and different sources of nitrogen: yeast extract and peptone (YEP), WPC and no added nitrogen source. No significant differences were observed in the ethanol production parameters wherein the highest ethanol yield observed was $0,353\pm 0,010$ g/g and the highest productivity $1,12\pm 0,043$ g/L.h, both using YEP.

Hydrolysis assays and enzymatic velocity assays of the WPC were performed to improve the properties of the concentrate as nitrogen source. The protease of *Aspergillus oryzae* and the 4:100 enzyme/substrate ratio represented the best results: a concentration of free amines $105,6\pm 0,48$ mmol/L and a higher hydrolysis rate $3,37\pm 0,087$ mmol/L.h.

The fermentative capacity of the yeast was studied with the hydrolyzed WPC (HWCP) as nitrogen source, in which no meaningful differences in the ethanol yield were observed. The obtained ethanol yield was $0,476\pm 0,0098$ gEthanol/gLactose with no addition of N source, but the productivity was higher with the HWPC: $1,19\pm 0,006$ g/L.h.

It was concluded that full conversion of sugars into ethanol is possible and it is not necessary to add nitrogen source to whey permeate, because there is no significant improvement in ethanol production.

Key-words: Ultrafiltration, Bioethanol, *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, Nitrogen sources, WPC, enzymatic hydrolysis of proteins

Índice

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract.....	VII
Índice Figuras	XII
Índice de Tabelas	XIII
Lista de abreviaturas	XIV
1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Produção de bioetanol a partir do soro de queijo	2
1.2.1 Soro de queijo e o seu fracionamento	3
1.2.2 Fermentação etanólica	6
1.2.2.1 Microrganismo - <i>Kluyveromyces lactis</i>	9
1.2.2.2 Fontes de azoto	11
1.2.2.3 Hidrólise Enzimática de proteínas	12
1.3 Objetivos.....	13
2. Materiais e métodos.....	14
2.1 Microrganismo.....	14
2.2 Meios de cultura	14
2.3 Condições de armazenamento e crescimento	14
2.4 Matérias-primas	16
2.4.1 Obtenção do soro de queijo permeado e do concentrado de proteínas do soro de queijo (WPC)	16
2.4.2 Concentração do soro de queijo permeado.....	17
2.5 Ensaio experimentais.....	17
2.5.1 Microfiltração do soro de queijo	17
2.5.2 Ultrafiltração do soro de queijo	18
2.5.3 Hidrólise enzimática do concentrado de proteínas do soro de queijo	19
2.5.4 Velocidade de hidrólise enzimática do concentrado de proteínas do soro de queijo	19

2.5.5	Fermentação etanólica do soro de queijo permeado concentrado a 100 g/L de lactose pela levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 com diferentes fontes de azoto	20
2.5.6	Fermentação etanólica do soro de queijo permeado concentrado a 100 g/L de lactose pela levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 com concentrado de proteínas do soro de queijo (WPC) hidrolisado e não hidrolisado como fontes de azoto	21
2.6	Parâmetros fermentativos	21
2.6.1	Determinação do crescimento celular	21
2.6.1.1	Densidade ótica.....	21
2.6.1.2	Peso seco	21
2.6.1.3	Unidades formadoras de colónias	22
2.6.2	Métodos analíticos	23
2.6.2.1	Medição do pH	23
2.6.2.2	Medição da condutividade	23
2.6.2.3	Quantificação de proteínas do soro de queijo	23
2.6.2.4	Quantificação de lactose e etanol.....	24
2.6.2.5	Determinação do grau de hidrólise	24
2.7	Caracterização da cinética de crescimento	25
2.7.1	Taxa específica de crescimento	25
2.7.2	Tempo de duplicação	25
2.7.3	Rendimento de biomassa produzida em função do substrato	26
2.7.4	Rendimento de etanol produzido em função do substrato	26
2.7.5	Produtividade máxima de etanol.....	26
2.8	Tratamento estatístico de resultados	26
3.	Resultados e discussão	27
3.1	Microfiltração do soro de queijo.....	27
3.2	Ultrafiltração do soro de queijo	30
3.3	Fermentação etanólica do soro de queijo permeado pela levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 com diferentes fontes de azoto.....	34
3.4	Hidrólise enzimática do concentrado de proteínas do soro de queijo	38
3.5	Velocidade de hidrólise enzimática do concentrado de proteínas do soro de queijo	40

3.6 Fermentação etanólica do soro de queijo permeado concentrado pela levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 com concentrado de proteínas do soro de queijo (WPC) hidrolisado e não hidrolisado como fontes de azoto	42
4. Conclusão	46
5. Perspetivas futuras	48
6. Referências Bibliográficas	49
7. Anexos	55
Anexo I – UFCs e pH	55
Anexo II- Cinética de hidrólise	56
Anexo III – UFCs e pH	57

Índice Figuras

Figura 1: Mecanismo da glicólise. Adaptado de Tortora <i>et al.</i> , 2012.	7
Figura 2: Representação da via respiratória. Adaptado de Reece <i>et al.</i> , 2013.	8
Figura 3: Representação da fermentação alcoólica. Adaptado de Voet e Voet, 2006.	8
Figura 4: Via metabólica da galactose. Adaptado de Holden <i>et al.</i> , 2003.	9
Figura 5: Fluxo (F) do soro de queijo em função do fator de concentração volumétrico (FCV) do processo de MF, com uma membrana de PVDF.	28
Figura 6: Fluxo (F) em função do FCV de soro permeado recolhido durante a UF, utilizando as membranas de (A) poliétersulfona e (B) celulose regenerada.	31
Figura 7: Concentração de proteínas no retentado (CPR) e no permeado (CPP) ao longo da ultrafiltração. (A) Membrana poliétersulfona; (B) Membrana celulose regenerada. .	32
Figura 8: Coeficiente de rejeição de proteína (CR) em função do FCV. (A) Membrana poliétersulfona; (B) Membrana celulose regenerada.	33
Figura 9: Perfil de produção de etanol e de crescimento da estirpe <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360, na fermentação do soro permeado proveniente da UF, como substrato, suplementado com (A) Extrato de levedura (3 g/L) e peptona (5 g/L), (B) WPC (8 g/L) e (C) sem adição de fonte de azoto, em Erlenmeyer.	35
Figura 10: Concentração de aminas obtida ao longo do ensaio de velocidade de hidrólise enzimática.	41
Figura 11: Perfil de crescimento da levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360, na fermentação em Erlenmeyer do soro permeado, suplementado com (A) WPC 8 g/L, (B) WPC hidrolisado 8 g/L e (C) sem adição de fonte de azoto.	43

Índice de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros de caracterização do soro para as várias etapas do processo de pré-tratamento do soro de queijo.....	28
Tabela 2: Parâmetros de caracterização dos ensaios de UF para avaliação das membranas de poliétersulfona e celulose regenerada	30
Tabela 3: Concentrações finais de proteína e lactose no WPC liofilizado e no soro de queijo permeado.	33
Tabela 4: Parâmetros cinéticos de crescimento e de produção de etanol determinados para as fermentações, em Erlenmeyer, do soro de queijo permeado como substrato com a levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 e diferentes fontes de azoto	36
Tabela 5: Valores de concentração de aminos do WPC não hidrolisado, que constitui o branco e do WPC totalmente hidrolisado	39
Tabela 6: Concentração de aminos primárias no final da hidrólise do WPC com diferentes proteases e diferentes rácios de enzima e substrato.....	39
Tabela 7: Velocidade inicial para as proteases <i>Aspergillus oryzae</i> e bromelaína utilizando o rácio 4:100.	40
Tabela 8: Parâmetros cinéticos de crescimento e de produção de etanol da levedura <i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2360 utilizando o soro de queijo permeado como substrato e 8 g/L de WPC, 8g/ de HWPC como fontes de azoto e também sem adição de fonte de azoto.	44

Lista de abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de Soro Bovino
CBO	Carência Bioquímica de Oxigênio
Cel	Células
CH ₄	Metano
CoA	Coenzima A
CQO	Carência Química de Oxigênio
CPP	Concentração Proteínas Permeado
CPR	Concentração Proteínas Retentado
DMFit	Modelação do crescimento celular em logaritmo pelo tempo em culturas descontínuas
FCV	Fator de Concentração Volumétrico
GEE	Gases de Efeito de Estufa
GH	Grau de Hidrólise
HPLC	Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência
HWPC	Concentrado de proteínas do soro de queijo hidrolisado
LEBA	Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental
MF	Microfiltração
NF	Nanofiltração
NO _x	Óxidos de azoto
OPA	o-phthaldialdehyde
OR	Osmose Inversa
SCP	Proteína Unicelular
SN-TCA	Azoto solúvel em ácido tricloroacético
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TNBS	Ácido Trinitrobenzenosulfônico
Triton x100	Polietileno glicol p – (1,1,3,3 – tetrametilbutil) – fenil éter
p/v	Peso/volume
p/p	Peso/Peso
t _d	Tempo de duplicação
t _{est}	Tempo de entrada na fase estacionária
t _{etanol máx}	Tempo de obtenção do máximo de etanol
UF	Ultrafiltração
UFCs	Unidades formadoras de colónia
WPC	Concentrado de proteínas do soro de queijo
X _{máx}	Concentração máxima de biomassa
YE	Extrato de levedura
YEP	Extrato de levedura e Peptona
YPD	Extrato de levedura, peptona, glucose
Y _{P/S}	Rendimento de produto relativamente ao substrato
Y _{X/S}	Rendimento de biomassa relativamente ao substrato

1. Introdução

1.1 Enquadramento

O efeito de estufa tem uma função importante para a vida na Terra, serve para manter o aquecimento do planeta e assim garantir a manutenção da vida, através de gases presentes na atmosfera, como o dióxido de carbono (CO₂), o metano (CH₄), óxidos de azoto (NO_x), entre outros, que retêm grandes porções de energia de radiação proveniente da superfície terrestre. Atividades de origem humana resultam no aumento da concentração destes gases na atmosfera contribuindo para o aumento da temperatura global, provocando alterações climáticas.

O CO₂ é o gás de efeito de estufa (GEE) com maior emissão, sendo uma das principais causas de aquecimento global principalmente devido ao uso de combustíveis fósseis, destacando-se o carvão, o petróleo e gás natural (Bhatia *et al.*, 2012).

Atualmente os combustíveis fósseis representam cerca de 80% da energia primária consumida no mundo, dos quais 58% é consumida apenas pelo sector dos transportes (Nigam e Singh, 2011). O esgotamento progressivo de combustíveis fósseis, o aumento do consumo de energia que leva ao aumento do preço do petróleo e as emissões de GEE deram origem a fontes de energia alternativas, renováveis, sustentáveis, eficientes e de baixo custo com menores emissões (Nigam e Singh, 2011; Balat *et al.*, 2008), tais como energia solar, nuclear, eólica, hidroelétrica (Bhatia *et al.*, 2012) e os biocombustíveis (Nigam e Singh, 2011).

Entre as muitas alternativas energéticas, os biocombustíveis tais como, hidrogénio, biogás e *syngas* (gás de síntese), surgem provavelmente como as três fontes de combustíveis mais importantes e sustentáveis no futuro (Nigam e Singh, 2011).

Os biocombustíveis podem ser classificados como biocombustíveis de 1^a ou 2^a geração. Os combustíveis de 1^a geração são produzidos a partir de matérias-primas de origem agrícola. Contudo existem preocupações sobre o abastecimento de matérias-primas, consequência da competição pelo uso de solos com culturas alimentares e o impacto que pode ter na biodiversidade (Naik *et al.*, 2010). Os combustíveis de 2^a geração são produzidos a partir de resíduos agrícolas ou industriais, que para além do seu baixo custo, têm como vantagem a ausência de preocupações éticas sobre o uso de potenciais recursos alimentares (Lima-Costa *et al.*, 2012).

Uma das respostas aos problemas mencionados poderia ser a produção de bioetanol de segunda geração a partir de resíduos agroindustriais, uma vez que a sua utilização não compete com os recursos alimentares, permite a valorização de matérias-primas com baixo valor comercial e possibilita uma alternativa para o tratamento ambiental destes resíduos (Rodrigues *et al.*, 2015). Os biocombustíveis produzidos a partir desses resíduos podem ajudar a reduzir a dependência de combustíveis fósseis assim como as emissões de CO₂, porque o CO₂ libertado durante a combustão é igual ao consumido pela planta durante a fotossíntese e portanto não aumenta o CO₂ líquido na atmosfera (Naik *et al.*, 2010).

Processos de fermentação destacam-se na produção de bioetanol, uma vez que transformam matérias-primas simples em produtos de valor acrescentado. Entre as matérias-primas mais utilizadas na fermentação etanólica estão os materiais celulósicos (resíduos florestais), ricos em amido (milho, trigo, arroz) e ricos em açúcar (cana-de-açúcar e beterraba) (Kargi e Ozmihci, 2006).

O bioetanol é um biocombustível alternativo cada vez mais importante para a substituição ou adição da gasolina. Em 2009 registou-se uma produção mundial de 19,535 milhões de galões (73,948 milhões de L) sendo estimado que em 2022 apenas nos Estados Unidos se produza 36,000 milhões de galões (136,275 milhões de L) (Domínguez-Bocanegra *et al.*, 2015; González Siso, 1996).

O soro de queijo, tratando-se de um efluente agroindustrial proveniente da indústria queijeira, também representa um problema ambiental importante, visto que é produzido em grandes quantidades e apresenta um conteúdo elevado de matéria orgânica, como proteínas e lactose (Domingues *et al.*, 1999). Processos de ultrafiltração (UF) podem ser utilizados para recuperar essas proteínas (retentado) e recuperar a lactose (permeado) com vista à posterior utilização num processo de fermentação para a produção de bioetanol (Jedrzejewska e Kozak, 2011; Kargi e Ozmihci, 2006).

1.2 Produção de bioetanol a partir do soro de queijo

Ao contrário dos combustíveis fósseis o etanol é uma fonte de energia renovável, produzida através da fermentação de açúcares e usada como substituto parcial da gasolina em alguns países. Os maiores produtores de bioetanol são os Estados Unidos, o Brasil e a China. Espera-se que no ano corrente, 2015, este mercado chegue aos 100 x 10⁹ litros produzidos (Bhatia *et al.*, 2012). Países como o Japão, Holanda, Irlanda,

Estados Unidos da América e Nova Zelândia têm implementado processos de produção de bioetanol a partir da fermentação do soro de queijo (Ahmed e Morris, 1978). Segundo um relatório apresentado em 2005 na Nova Zelândia (House, 2005) o custo de produção de bioetanol a partir do soro de queijo permeado, com um nível de incerteza de $\pm 20\%$ foi de 0,6 – 0,7 NZ\$ (0,33 – 0,39 €/L) (Ling, 2008).

Em Portugal estima-se que a produção de soro de queijo seja 500 - 560 mil toneladas por ano e grande parte deste é depois concentrado e seco (Guimarães *et al.*, 2008).

De um ponto de vista económico a conversão da lactose presente no soro em etanol é pouco competitiva quando comparada com tecnologias bem estabelecidas que utilizam a cana do açúcar ou o milho. No entanto a produção de etanol a partir do soro de queijo além de permitir o reaproveitamento de uma fonte de açúcares que de outra forma não teria qualquer uso também permite o tratamento de um efluente com uma carga orgânica elevada (Ariyanti e Hadiyanto, 2013).

1.2.1 Soro de queijo e o seu fracionamento

O soro de queijo é um efluente da indústria de laticínios, é o líquido resultante da coagulação da caseína do leite durante o processo de fabrico do queijo ou da caseína (Guimarães *et al.*, 2010).

A composição do soro de queijo depende do tipo de soro (ácido pH <5 ou doce pH 6 -7) da época, da espécie, alimentação, saúde e estágio de lactação do animal (Wit, 2001). O soro retém cerca de 55 % dos nutrientes do leite, entre os quais se encontra a lactose (4,5 – 5,0 % p/v), proteínas solúveis (0,6 – 0,8 % p/v), lípidos (0,4 – 0,5 % p/v), sais minerais (8 – 10 % de extrato seco), contém quantidades consideráveis de ácido láctico (0,05 % p/v), ácido cítrico, compostos nitrogenados não proteicos como a ureia e o ácido úrico, vitaminas do grupo B (Guimarães *et al.*, 2010), também contém gordura (0,1 – 10,6 g/L), sólidos suspensos (0,1 – 22 g/L) e nutrientes como o azoto (N) e fósforo (P), que contribuem para elevados níveis de contaminação (Prazeres *et al.*, 2012).

O soro de queijo apresenta um elevado teor de matéria orgânica, este é monitorizado pela carência bioquímica de oxigénio (CBO) e pela carência química de oxigénio (CQO) que apresentam concentrações de 50 e 80 g/L respetivamente (Zafar e Owais, 2006). O conteúdo de matéria orgânica deve-se principalmente à presença de

hidratos de carbono, como a lactose, e proteínas, como a β – lactoglobulina entre outras. (Prazeres *et al.*, 2012).

Estima-se que a produção mundial de soro de queijo seja cerca de 10^8 toneladas por ano, originando uma importante fonte de poluição ambiental, uma vez que a produção de 1 Kg de queijo acarreta a produção de aproximadamente 9 L de soro (Koushki *et al.*, 2012).

Tendo em conta a sua matéria orgânica a eliminação do soro de queijo continua a ser um problema mundial significativo para a indústria de laticínios. Antigamente o soro era descartado como um desperdício em sistemas de esgotos municipais, distribuídos por campos agrícolas (Aktaş *et al.*, 2006), rios e ribeiras e muitas fábricas eram construídas perto desses cursos de água com essa finalidade (Pescuma *et al.*, 2008; Kosikowski, 1979).

Nos últimos anos diversos esforços têm sido feitos para encontrar novas formas de utilização do soro de queijo devido à sua constituição, bem como as suas propriedades funcionais. Foram estabelecidos regulamentos que proíbem a descarga do soro de queijo em cursos de água e até mesmo em sistemas de esgotos municipais, cujos tratamentos convencionais não são apropriados para a redução da sua carga poluente (Kosikowski, 1979). Outra solução que tem sido implementada em escala industrial é a secagem do soro, para posteriormente ser usado como aditivo alimentar ou ração animal, no entanto, embora o problema da descarga esteja resolvido, nenhum valor é adicionado ao produto (Domingues *et al.*, 2010; Domingues *et al.*, 2001). Vários produtos de valor acrescentado podem ser obtidos ou produzidos a partir de soro de queijo tais como o bioetanol, a proteína unicelular (SCP), os ácidos orgânicos, os biopolímeros, os plásticos biodegradáveis (Koushki *et al.*, 2012), os concentrados de proteínas do soro (WPC), o biogás, diversos produtos farmacêuticos e suplementos alimentares (González Siso, 1996).

O primeiro passo na maioria dos processos de valorização do soro consiste na recuperação da fração proteica.

No presente trabalho, o soro utilizado foi de cabra que apresenta uma composição proteica de 3,7 -7,0 g/L, sendo a maioria β – lactoglobulina (1,8 – 2,8 g/L) e α – lactalbumina (0,6 – 1,1 g/L), também contém em pequenas quantidades proteínas solúveis tais como, imunoglobulinas, albumina do soro (0,26 – 0,3 g/L), lactoferrina (0,12 g/L) e caseino – macropéptido (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

A separação das proteínas do soro é normalmente conseguida por tecnologia de membranas. A tecnologia de membranas consiste em processos de separação utilizando membranas específicas semi-permeáveis para concentrar ou fracionar um líquido em dois com diferentes composições, permitindo a passagem seletiva de alguns compostos e impedindo a de outros. O líquido que é capaz de passar a membrana é conhecido como o permeado, enquanto o que é retido é chamado retentado ou concentrado. A eficiência das membranas é fortemente regulada por gradientes de pressão hidrostática (pressão transmembrana) e gradientes de concentração nos líquidos ao longo da membrana (Kumar *et al.*, 2013). As membranas de microfiltração (MF) permitem a passagem de partículas de tamanho inferior a limites que podem ir de 0,2 a 2 µm, dependendo da membrana usada (Kumar *et al.*, 2013), enquanto as de UF permitem a passagem de substâncias com um peso molecular de tamanho inferior a limites que podem ir de 10³ a 10⁶ Da, mais uma vez dependendo da membrana usada (Atra *et al.* 2005).

Processos de membranas como a MF, (Ye *et al.*, 2014) UF, (Daufin *et al.*, 1992; Jayaprakasha e Yoon, 2003; D'Souza e Wiley, 2003; Cancino *et al.*, 2006; Cheang e Zydney, 2004) nanofiltração (NF) (Pan *et al.*, 2011) e osmose inversa (OR) têm sido amplamente usados para desenvolver e produzir compostos proteicos derivados da indústria de laticínios, como o leite e o soro de queijo (Pouliot, 2008).

As proteínas do soro de queijo são separadas por UF e deste processo resultam duas frações: um retentado, denominado concentrado de proteínas do soro (WPC) de elevado valor nutricional, que é usado para fórmulas de alimentação infantil e bebidas enriquecidas (Daufin *et al.*, 1992), e um permeado rico em lactose que continua a contribuir para elevados valores de CBO e que deve por isso ser tratado (Guimarães *et al.*, 2008; Jedrzejewska e Kozak, 2011). Uma solução promissora seria a bioconversão da lactose em etanol, que não só reduz o impacto ambiental desta matéria orgânica, mas também apresenta uma alternativa de produção de bioetanol (Silveira *et al.*, 2005).

O processo de UF apresenta várias vantagens, como o baixo custo energético, baixo investimento, possibilidade de realizar o aumento de escala sem alterar o elevado rendimento e a pureza do produto (Wang *et al.*, 2008).

A microfiltração (MF) é aplicada principalmente como pré-tratamento para a UF do soro do queijo. O soro do queijo possui diversos componentes indesejáveis que podem ter efeitos prejudiciais sobre as propriedades funcionais do WPC, tais como as gorduras e as micelas de caseína. Estes compostos não conseguem ser completamente

removidos por centrifugação (Cancino *et al.*, 2006). A MF ou a combinação desta com a centrifugação são considerados passos de separação de micelas e gordura bastante eficazes (Cheryan, 1998).

Apesar dos benefícios dos processos por membranas, a performance destas operações é afetada pela diminuição do fluxo ao longo do tempo, devido a obstruções (*fouling*) e à polarização de concentração (Nourbakhsh *et al.*, 2014). Na polarização de concentração o soluto é retido na superfície da membrana e a sua acumulação forma uma camada com uma concentração relativamente alta, essa concentração pode chegar a valores tão elevados que essa camada transforma-se num gel, tornando assim a membrana cada vez menos permeável. Este fenómeno é reversível ao contrário do *fouling* (Van den Berg e Smolders, 1990).

Fatores como a concentração de proteínas, o pH, a temperatura, a pressão transmembranar o tamanho do poro, a interação entre constituintes ou entre constituintes e a membrana contribuem para a obstrução das membranas (Zhao *et al.*, 2000).

1.2.2 Fermentação etanólica

A fermentação pode ser definida como um processo bioquímico de oxidação redução onde ocorre a geração de ATP na ausência de oxigénio e no qual compostos orgânicos agem como dadores e aceitadores de eletrões (Guimarães, 2008).

A fermentação direta do soro de queijo ou do soro de queijo permeado em etanol não é economicamente viável, uma vez que o seu baixo conteúdo de lactose resulta em baixas concentrações de etanol (2-3 % v/v), tornando o processo de destilação muito caro. Assim é importante iniciar a fermentação com elevadas concentrações de lactose, que podem ser conseguidas através da concentração do soro por OR de modo a atingir elevadas concentrações de etanol no final da fermentação (Guimarães *et al.*, 2010).

Diversos microrganismos são capazes de produzir etanol, nomeadamente leveduras, como a *Kluyveromyces lactis*, a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Schizosaccharomyces pombe*, bactérias, como a *Zymomonas mobilis*, fungos como o *Fusariumoxys porum*, e bactérias termofílicas (Domínguez-Bocanegra *et al.*, 2015), no entanto neste trabalho optou-se por usar a *Kluyveromyces lactis*, devido ao facto desta poder metabolizar diretamente a lactose presente no soro de queijo.

A maioria dos microrganismos oxida hidratos de carbono para obtenção de energia a nível celular, sendo o mais comum a glicose. Essa energia pode ser obtida através de dois processos: a respiração celular e a fermentação (Tortora *et al.*, 2012).

A via metabólica da glicólise permite a oxidação de uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, com a produção de duas moléculas de ATP e NADH (Figura 1).

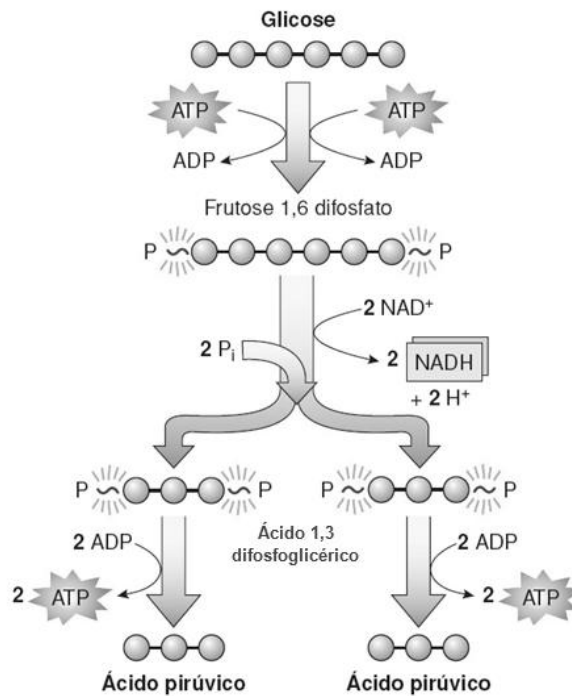


Figura 1: Mecanismo da glicólise. Adaptado de Tortora *et al.*, 2012.

Na presença de oxigênio o piruvato obtido na glicólise é encaminhado para a via respiratória que ocorre no ciclo de Krebs também conhecido como o Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA).

O piruvato sofre uma descarboxilação oxidativa formando acetil coenzima A (acetil - CoA) uma molécula de NADH e uma de CO₂. A molécula de acetil - CoA entra no ciclo de Krebs e é oxidada a CO₂, enquanto o NAD⁺ é reduzido a NADH que será usado pela cadeia transportadora de elétrons de forma a produzir ATP como parte da fosforilação oxidativa. Durante este ciclo são produzidos dois produtos a água (H₂O) e dióxido de carbono (CO₂) (Figura 2).

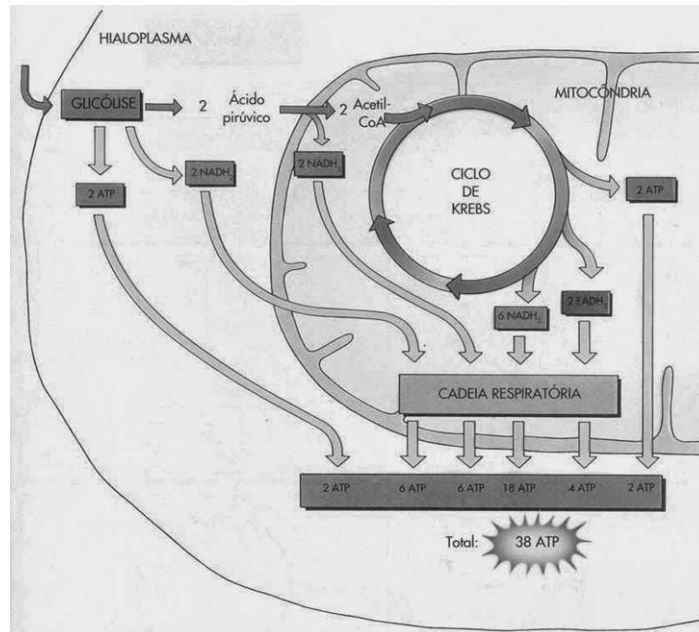


Figura 2: Representação da via respiratória. Adaptado de Reece *et al.*, 2013.

No final da respiração por cada molécula de glucose oxidada são produzidas 32 moléculas de ATP (Tortora *et al.*, 2012; Reece *et al.*, 2011).

Na ausência de oxigênio o piruvato segue a via fermentativa sendo assim convertido (descarboxilação) em acetaldeído e CO₂. O acetaldeído é reduzido pelo NADH, reação catalisada pelo enzima álcool desidrogenase de modo a produzir duas moléculas de etanol e conseqüentemente ocorre a regeneração do NAD⁺ necessário para a continuação da glicólise (Figura 3) (Tortora *et al.*, 2012; Reece *et al.*, 2011).

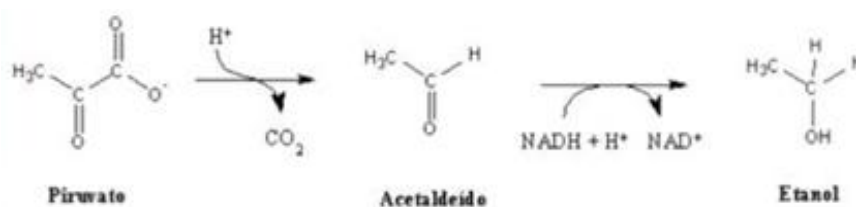
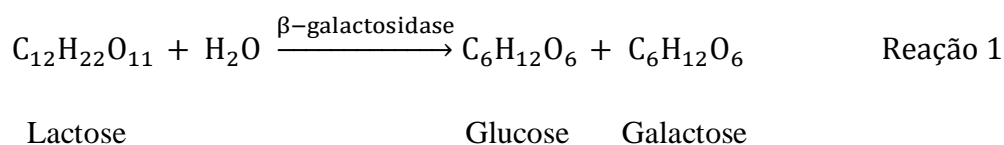


Figura 3: Representação da fermentação alcoólica. Adaptado de Voet e Voet, 2006.

1.2.2.1 Microrganismo – *Kluyveromyces lactis*

Muitas das estirpes de levedura, como por exemplo estirpes de *Saccharomyces* não conseguem fermentar a lactose em etanol, devido à ausência do enzima β -galactosidase, (Koushki *et al.*, 2012) que permite a hidrólise da lactose em glucose e galactose (Reação 1) e posterior fermentação em etanol (Domingues *et al.*, 2010).



Na maioria dos organismos a conversão da β -D-galactose num composto mais útil metabolicamente, como glucose-1-fosfato, é conseguida pela via de Leloir. Esta via é composta por 4 reações onde na fase final ocorre a epimerização da UDP-galactose em UDP-glucose (Figura 4).

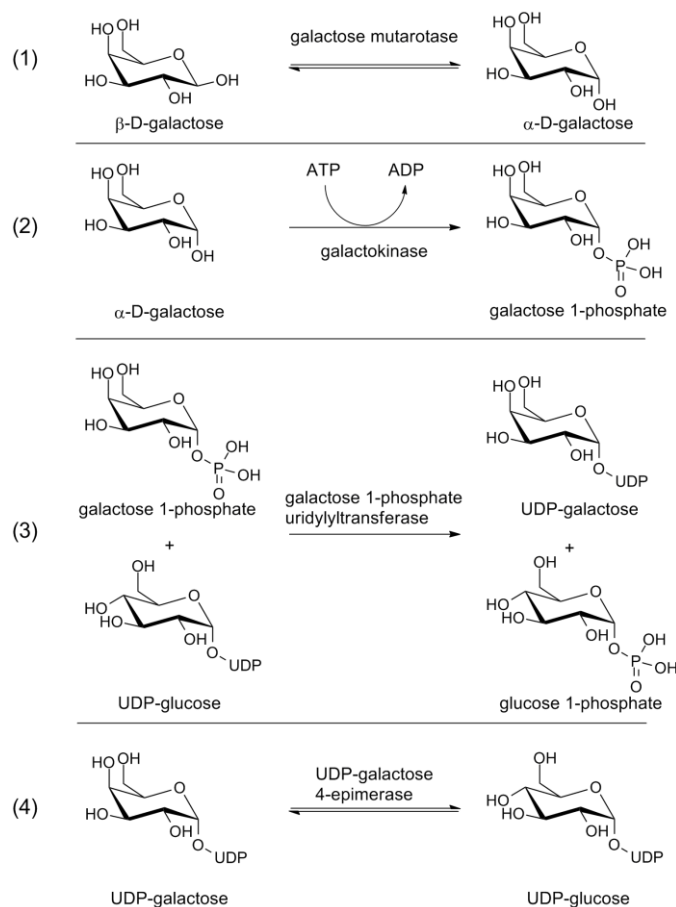


Figura 4: Via metabólica da galactose. Adaptado de Holden *et al.*, 2003.

De modo a contornar a ausência da β -galactosidase nas estirpes de *Saccharomyces* sp tem-se feito várias abordagens na construção de estirpes geneticamente modificadas que permitam que estas sejam capazes de metabolizar a lactose. São muitas as leveduras capazes de assimilar a lactose aerobiamente, mas são poucas as que a fermentam diretamente, como *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida pseudotropicalis* (Domingues *et al.*, 2010).

A levedura *Kluyveromyces lactis* tornou-se, assim numa alternativa à *Saccharomyces cerevisiae*, devido às suas aplicações industriais, bem como aos estudos que têm sido realizados sobre a sua respiração mitocondrial. Ambas pertencem ao grupo de aeróbias facultativas que apresentam a capacidade de metabolizar glucose pelas vias oxidativa (respiração) e oxidoreductiva (fermentação). A diferença recai na importância destas vias em condições aeróbias, a *Saccharomyces cerevisiae* é aeróbia fermentativa, pois a respiração representa apenas 10% do rendimento energético do metabolismo aeróbio, enquanto a levedura *Kluyveromyces lactis* é uma levedura aeróbia respiratória, ou seja a respiração predomina sobre a fermentação (Siso *et al.*, 1996).

A fermentação sob condições de aerobiose é conhecida pelo efeito de *Crabtree*, que se trata da saturação da capacidade respiratória de algumas leveduras mesmo quando existe um elevado nível de oxigénio dissolvido, desviando a fonte de carbono para a via fermentativa, assim a *K. lactis* apresenta-se como efeito de *Crabtree* negativo (González-Siso *et al.*, 2000; Breunig *et al.*, 2000).

Embora esta levedura seja capaz de fermentar em condições anaeróbias não é capaz de crescer. A presença de oxigénio é necessária em várias vias metabólicas, tais como para a produção de esteróis, ácidos gordos insaturados, pirimidinas e desoxirribonucleótidos (Ishtar Snoek e Yde Steensma, 2006).

1.2.2.2 Fontes de azoto

O carbono (C) e o azoto (N) são nutrientes essenciais no meio de fermentação. O azoto é necessário para o crescimento da levedura, influencia o rendimento de etanol e a tolerância da levedura ao etanol.

O extrato de levedura e a peptona (YEP) são as fontes de azoto mais aplicadas em escala laboratorial, (Sridee *et al.*, 2011), são fonte de nutrientes complexos, usados para o crescimento da levedura e produção de etanol (Deesuth *et al.*, 2012).

Apesar dos benefícios, estas fontes de azoto têm um grande impacto nos custos do meio e por isso tem-se desenvolvido investigação de modo a encontrar alternativas mais económicas.

Um estudo realizado por Yue *et al.*, (2012), mostra que a ureia [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] é uma fonte de azoto que tem um papel importante na produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* a partir da sacarina do sorgo, não só promoveu um aumento significativo da taxa específica de crescimento e a capacidade de tolerância ao etanol, como também aumentou o rendimento de etanol e reduziu a formação de subprodutos (Yue *et al.*, 2012).

Laopaiboon *et al.* 2009 estudaram a influência do extrato de levedura e peptona (YEP) e sulfato de amónio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] como fontes de azoto na fermentação etanólica da sacarose do sorgo. Verificou-se que o YEP não conseguiu melhorar significativamente a produtividade do etanol e que o sulfato de amónio obteve um rendimento de produto/substrato ($Y_{p/s}$) significativamente inferior quando comparado com o controlo e o meio suplementado com YEP. Este efeito negativo pode ser devido à produção de subprodutos.

Sridee *et al.*, 2011 estudaram o uso de *dried spent yeast* (DSY) um subproduto da indústria cervejeira, como uma fonte alternativa ao YEP e ao extrato de levedura (YE) na fermentação do sorgo como fonte carbono. Os resultados são muito semelhantes entre as fontes de azoto, por isso o uso de DSY será uma boa fonte de azoto alternativa ao YEP e ao YE.

No presente trabalho pretendeu-se estudar o uso do WPC como uma fonte de azoto alternativa ao YEP.

1.2.2.3 Hidrólise Enzimática de proteínas

A hidrólise enzimática de proteínas é um processo no qual as ligações peptídicas da proteína são clivadas, originando oligopéptidos, especialmente di e tripéptidos, e aminoácidos de menor peso molecular. Durante este processo ocorre o consumo de água e o aparecimento de novos grupos carboxilato e aminas livres. Estes hidrolisados apresentam um elevado valor nutricional para as leveduras e são mais rapidamente utilizados do que as proteínas no seu estado nativo ou do que os aminoácidos livres (Bandyopadhyay *et al.*, 2008).

Com a finalidade de aumentar o uso do WPC, a hidrólise enzimática pode ser usada para produzir hidrolisados proteicos com diferentes perfis de péptidos e de aminoácidos dependendo das especificidades do enzima (Silvestre *et al.*, 2013).

Os hidrolisados proteicos são amplamente usados como suplementos nutricionais, intensificadores de sabor em produtos alimentares, cosméticos, produtos para cuidado pessoal e reforço de bebidas e sumos (Bandyopadhyay *et al.*, 2008).

As características dos hidrolisados de WPC dependem essencialmente do tipo de enzima usado, do grau de hidrólise e do pré-tratamento do substrato (Kankanamge *et al.*, 2013).

Vários são os enzimas que podem ser utilizados no processo de hidrólise do WPC, como a tripsina (Silvestre *et al.*, 2013; Banach, *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2010; Mota *et al.*, 2006), quimotripsina (Custódio *et al.*, 2005; Banach *et al.*, 2013), carboxipeptidase (Custódio *et al.*, 2005), pepsina (Banach *et al.*, 2013), pancreatina (Morais *et al.*, 2013), proteases derivadas de bactérias como *Bacillus licheniformis* (Silvestre *et al.*, 2013; Mišún *et al.*, 2008; Banach *et al.*, 2013; Mota *et al.*, 2006), fungos *Aspergillus oryzae* (Silvestre *et al.*, 2012) e *Aspergillus sojae* (Morais *et al.*, 2013) e de origem vegetal como a papaína e bromelaína (Shin *et al.*, 2010; Banach *et al.*, 2013).

O grau de hidrólise (GH) é definido como a proporção do número total de ligações peptídicas que são clivadas durante o processo de hidrólise enzimática. Não existe um método padrão para a determinação do GH, no entanto existem alguns métodos que foram desenvolvidos e são normalmente usados para esse fim, como o pH-stat, o azoto solúvel em ácido tricloroacético (SN-TCA), o ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), o *o-phthalaldehyde* (OPA) e o método de Sorensen (titulação com formol).

1.3 Objetivos

Esta dissertação de mestrado tem como principais objetivos o fracionamento do soro de queijo num permeado rico em lactose e num concentrado rico em proteínas (WPC), resultante de um processo de membranas em condições otimizadas, e o estudo do uso destas frações como matérias-primas para a produção de bioetanol. Com base nestes objetivos principais definiram-se objetivos específicos a alcançar:

- Estudar as condições de operação da ultrafiltração (UF) que permitem otimizar os rendimentos de lactose no permeado e de proteínas no WPC.
- Avaliar a capacidade fermentativa da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 no substrato de soro de queijo permeado, quando suplementado com diferentes fontes de azoto. Caracterização da cinética de crescimento, e de produção de etanol.
- Otimizar o rácio de enzima/substrato e o tempo de hidrólise enzimática do WPC, usando diferentes proteases, com vista à obtenção de uma boa fonte de azoto para a produção de bioetanol.
- Estudar o uso de WPC hidrolisado como fonte de azoto para a fermentação etanólica do permeado de soro de queijo de modo a suplementar este substrato deficiente em azoto. Para isso avalia-se a capacidade fermentativa da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 no substrato de soro de queijo permeado, quando suplementado com WPC e WPC hidrolisado como fontes de azoto. Caracterização da cinética de crescimento e de produção de etanol.

Assim é objetivo deste trabalho verificar se o fracionamento do soro de queijo poderá trazer vantagens à produção de bioetanol a partir desta matéria prima residual.

2. Materiais e métodos

2.1 Microrganismo

A levedura utilizada neste estudo foi a *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 gentilmente cedida pela Professora Doutora Lídia Dionísio da Universidade do Algarve.

2.2 Meios de cultura

O meio de cultura para armazenamento da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 foi o meio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*) sólido, que é constituído por 10 g/L extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glucose e suplementado com 10 g/L de agar.

Para preparação do pré-inóculo o meio utilizado foi o YPD líquido, constituído por 10 g/L extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glucose.

Para preparação do inóculo o meio é constituído por 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona e a fonte de carbono é substituída pela mesma que se usa nos ensaios de fermentação (lactose do soro de queijo permeado) diluído a 1/3 em relação ao meio dos ensaios fermentativos.

Os meios de fermentação são constituídos por 100 g/L de lactose proveniente do permeado do soro de queijo como fonte de carbono e diferentes fontes de azoto, tais como 3 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona (YEP), 8 g/L de concentrado de proteínas do soro de queijo (WPC) ou 8 g/L de concentrado de proteínas do soro de queijo hidrolisado (HWPC).

Todos os meios foram esterilizados em autoclave (Uniclave 87, Portugal) por calor húmido a 121 ± 1 °C durante 20 minutos.

2.3 Condições de armazenamento e crescimento

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

Para preparação dos inóculos dos ensaios fermentativos, as culturas foram repicadas para placas com meio YPD sólido e incubadas em estufa (Selecta, Espanha) durante 24 a 48 h a 30 ± 1 °C. Após este período, as placas foram mantidas a 4 °C.

O pré-inóculo foi preparado, através da transferência de leveduras com uma hansa estéril para 50 mL de meio YPD líquido num Erlenmeyer de 100 mL e colocado

na agitadora orbital (IKA 4s 4000, Alemanha) a 30 ± 1 °C e com agitação de 150 rpm durante 24 h.

O inóculo, por sua vez, foi preparado através da passagem de 10 % (v/v) do pré-inóculo para 45 mL do meio de cultura descrito em 2.2, num Erlenmeyer de 100 mL e deixado a incubar na agitadora orbital (IKA-KSA4000i, Alemanha) a 30 ± 1 °C e com agitação de 150 rpm durante pelo menos 18 h.

Após este período, procede-se à contagem de células na câmara de *Neubauer* (Blau Brand, Alemanha) para determinação da concentração celular do inóculo (C_{celular}) (Equação 1). Com a concentração celular é possível calcular o volume necessário de inóculo para que fermentação seja inoculada com uma concentração de 1×10^7 células/mL (Equação 2).

$$C_{\text{celular}} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células}}{80} \times \text{Factor de diluição} \times 4 \times 10^6 \quad \text{Equação 1}$$

$$C_{\text{celular}} \times V_{\text{inóculo}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{fermentação}} \quad \text{Equação 2}$$

A concentração celular (C_{celular}) e final (C_{final}) são expressas em cél/mL, enquanto os volumes do inóculo ($V_{\text{inóculo}}$) e de trabalho da fermentação ($V_{\text{fermentação}}$) são expressos em mL.

Os ensaios de fermentação foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL com 120 mL de meio. Depois de inoculados os Erlenmeyers foram colocados na agitadora orbital (IKA 4s 4000, Alemanha) a 30 ± 1 °C e com agitação de 150 rpm durante 96 h. Os ensaios foram realizados em triplicado, o manuseamento dos Erlenmeyers e a recolha das amostras foram efetuados em condições de assepsia na câmara de fluxo laminar (Telstar Bio II A) e com a utilização de material estéril.

Os ensaios foram acompanhados pela monitorização do pH, análise da densidade ótica por espectrofotometria, contagem de células viáveis pelas unidades formadoras de colónias (UFC's) e quantificação de açúcares e etanol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (VWR Hitachi Elite LaChrom, EUA).

2.4 Matérias-primas

Neste trabalho usou-se como matéria-prima soro de queijo de cabra, gentilmente fornecido pelo Portal dos Queijos situado em São Brás de Alportel, Faro. Este soro foi recolhido após o processo de produção de requeijão e por isso apresenta uma baixa concentração de proteínas, cerca de 3 g/L e uma concentração de lactose cerca de 36 g/L.

2.4.1 Obtenção do soro de queijo permeado e do concentrado de proteínas do soro de queijo (WPC)

O soro de queijo foi fracionado para obtenção de um permeado rico em lactose e com um conteúdo baixo de proteínas e um retentado com elevada concentração de proteínas do soro.

O soro foi sujeito a um pré-tratamento, que consistiu na centrifugação do soro a 12000 rpm e à temperatura de 8 ± 1 °C durante 45 minutos (Beckman Coulter J14MC, EUA) desta forma foi possível remover a gordura que se encontra à superfície do sobrenadante e sólidos suspensos que se acumulam no pellet. De seguida efetuou-se a MF com uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF - Durapore®) da Millipore com um poro nominal de 0,65 µm, que permite a remoção dos sólidos suspensos de uma forma mais eficaz, evitando o entupimento acelerado das membranas de UF.

A ultrafiltração foi realizada usando duas membranas que apresentam o mesmo *cut-off* de 10 KDa e a mesma área de 0,005 m² apresentando apenas diferenças no seu material sendo uma de poliétersulfone (Biomax®) e outra de celulose regenerada (PLCGC) ambas da Millipore.

Os ensaios de microfiltração e ultrafiltração foram realizados numa unidade de filtração de fluxo transversal (Labscale™ TFF System e Pellicon® XL Cassettes), com uma pressão transmembranar de 1,38 bar para a MF e 1,72 bar para as membranas de UF.

O soro permeado obtido é armazenado no congelador para posterior utilização.

O retentado obtido é depois sujeito a um processo de liofilização (FreeZone 6L, EUA) à pressão de 16 Pa e à temperatura de -54 °C, para uma melhor preservação e armazenamento.

2.4.2 Concentração do soro de queijo permeado

O soro de queijo permeado, tal como o soro de queijo na sua forma original apresenta um teor de lactose de cerca de 50 g/L. Para se obter um soro com uma concentração de lactose de 100 g/L, a ser usado nos ensaios fermentativos, procedeu-se à sua concentração através de um processo de evaporação utilizando um evaporador rotativo de vácuo (Heidolph 94200, Alemanha) à temperatura de 70 °C.

2.5 Ensaaios experimentais

2.5.1 Microfiltração do soro de queijo

Realizaram-se ensaios de microfiltração utilizando uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF - Durapore®) da Millipore com um poro nominal de 0,65 µm para filtração do soro de queijo previamente centrifugado.

O ensaio foi realizado numa unidade de filtração de fluxo transversal (Labscale™ TFF System e Pellicon® XL Cassettes, 0,005 m² área de superfície membranar), com uma pressão transmembranar de 1,38 bar e um volume total de 600 mL.

Após utilização da membrana esta é regenerada com um agente surfactante triton X100 a 0,1 % e um agente químico alcalino NaOCl a 0,025 % alternadamente, à temperatura de 45 °C durante 30 minutos. Este processo é realizado duas vezes com cada agente químico.

Recolheram-se amostras de 50 mL do soro de queijo na sua forma original, após ser centrifugado, do permeado e do retentado resultantes da microfiltração e analisou-se os sólidos suspensos por gravimetria usando filtros de fibra de vidro GF/A (Whatman). As proteínas e a lactose foram quantificadas pelo método de Bradford e por HPLC respetivamente, como descrito nos pontos 2.6.2.3 e 2.6.2.4.

O soro microfiltrado obtido é armazenado no congelador para posterior utilização. Este procedimento foi repetido até se obter volume suficiente para ensaios posteriores de UF.

2.5.2 Ultrafiltração do soro de queijo

Realizam-se ensaios de UF utilizando duas membranas, uma de poliétersulfona (Biomax®) e outra de celulose regenerada (PLCGC) ambas da Millipore, apresentam um cut-off de 10 KDa e uma área de 0,005 m². Este processo permite a obtenção de um permeado com teor pobre em proteínas e um retentado com um teor elevado de proteínas.

O ensaio foi realizado para cada membrana numa unidade de filtração de fluxo transversal (Labscale™ TFF System e Pellicon® XL Cassettes), com um volume total de 500 mL.

Após utilização da membrana esta é regenerada com um agente químico alcalino NaOH a 0,1 M, à temperatura de 40 °C durante 30 minutos por três vezes.

Recolheram-se amostras de 3 mL do retentado e do permeado instantâneo da ultrafiltração ao longo do tempo com as duas membranas e quantificou-se as proteínas pelo método de Bradford e a lactose por HPLC como descrito nos pontos 2.6.2.3 e 2.6.2.4.

As membranas de ultrafiltração foram caracterizadas através do seu fluxo, calculado através da taxa de fluxo do permeado e do coeficiente de rejeição de proteína (Equação 3), que foi obtido por monitorização das concentrações de proteína no permeado (C_{Permeado}) e retentado ($C_{\text{Retentado}}$) da ultrafiltração ao longo dos ensaios.

$$C_{\text{Rejeição}}(\%) = \left(1 - \frac{C_{P_{\text{permeado}}}}{C_{P_{\text{retentado}}}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

O soro permeado obtido é armazenado no congelador para posterior utilização. Este procedimento foi repetido até se obter volume suficiente para posteriores ensaios de fermentação.

Os retentados obtidos dos vários processos de UF são sujeitos a nova UF até se atingir um fator de concentração volumétrico (FCV) de 10, para a obtenção de uma concentração de proteínas mais elevada. O FCV é o coeficiente entre volume inicial de permeado e o volume de retentado. Este é posteriormente submetido a um processo de liofilização (FreeZone 6L, EUA) com uma pressão de 16 Pa e uma temperatura de -54 °C, para uma melhor preservação e armazenamento.

2.5.3 Hidrólise enzimática do concentrado de proteínas do soro de queijo

Realizaram-se 4 ensaios de hidrólise enzimática onde foram usadas as proteases de *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, Bromelaína e Tripsina. O substrato utilizado foi o concentrado de proteínas do soro (WPC), nos rácios de enzima/substrato de 1:100, 4:100 e 8:100.

Os ensaios foram realizados em triplicado em eppendorfs de 1,5 mL, com um volume total de 0,5 mL.

As soluções de WPC (10%, p/v) foram preparadas em água destilada o que corresponde a (0,75 %, p/v) de proteína e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 3M. Adicionaram-se os enzimas em quantidade adequada, de modo a atingir os rácios enzima/substrato desejados e as soluções foram incubadas a $50 \pm 0,2$ °C em banho-maria com agitação constante de 120 rpm (Julabo SW22, Alemanha) durante um tempo total de 5 h (Silvestre *et al.*, 2012). A reação hidrolítica termina aquecendo as soluções à temperatura de $90 \pm 0,2$ °C durante 10 minutos.

Para controlar o grau de hidrólise, fez-se um controlo negativo com o WPC (10%, p/v), como descrito acima, onde não ocorre hidrólise e um positivo com a adição de 1 mL HCL 6M e inoculação durante 24h a uma temperatura de 110 °C, para obter 100% de hidrólise (Bandyopadhyay *et al.*, 2008).

Recolheram-se amostras do WPC não hidrolisado (branco), do WPC totalmente hidrolisado e do HWPC enzimaticamente ao fim de 5 h.

Neste ensaio mediu-se o grau de hidrólise através método do ácido 2,4,6 - trinitrobenzenosulfónico (TNBS) a usando do protocolo da GBiosciences, como descrito no ponto 2.6.2.5. Este método permite a quantificação de aminas primárias livres em solução.

2.5.4 Velocidade de hidrólise enzimática do concentrado de proteínas do soro de queijo

Realizou-se um ensaio de hidrólise enzimática ao longo do tempo, utilizando as proteases de *Aspergillus oryzae* e Bromelaína para hidrólise do WPC 10 % (p/v), com o rácio de 4:100 de enzima/substrato durante 8 horas.

Fez-se um controlo com as proteases num rácio de 4:100, para saber qual a sua contribuição na concentração de aminas.

Recolheram-se amostras do HWPC de hora a hora durante 8 horas.

Posteriormente realizou-se um ensaio de hidrólise enzimática em grande escala, utilizando apenas a protease de *Aspergillus oryzae*, também com o rácio de enzima/substrato de 4:100, durante 24 h, para obter uma quantidade suficiente de HWPC para utilizar em ensaios posteriores de fermentação.

Recolheram-se amostras do HWPC de 4 em 4h durante as 24 h do ensaio. Determinou-se o grau de hidrólise como descrito no ponto 2.6.2.5. Os ensaios realizaram-se como descrito no ponto 2.5.4.

2.5.5 Fermentação etanólica do soro de queijo permeado concentrado a 100 g/L de lactose pela levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 com diferentes fontes de azoto

Realizaram-se três ensaios com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, utilizando como fonte de carbono o soro de queijo permeado com uma concentração de 100 g/L de lactose e diferentes fontes de azoto, 5 g/L de peptona com 3g/L de extrato de levedura (YEP), 8 g/L de WPC e um controlo sem adição de qualquer fonte de azoto.

Os ensaios foram realizados em triplicado em Erlenmeyers de 250 mL com um volume total de meio fermentativo de 120 mL. Depois de esterilizados os meios (Uniclave 87, Portugal), foram inoculados com uma concentração inicial de células de 1×10^7 cel/mL e incubados numa agitadora orbital (IKA-KSA4000i, Alemanha) a 150 rpm e à temperatura de 30 ± 1 °C, durante 96 h. Durante o ensaio recolheram-se amostras de 2 em 2 h até às 12 h, de 3 em 3 h a partir das 24 h e de 12 em 12 h a partir das 72 h até conclusão do ensaio fermentativo, sempre em condições de esterilidade (Telstar Bio II A, Espanha).

Por cada amostra, analisou-se o crescimento celular por espectrofotometria (densidade ótica), pela contagem de células viáveis (UFCs), e por gravimetria da biomassa seca (peso seco), a concentração de lactose e de etanol por HPLC e o pH monitorizado, como descrito na metodologia no ponto 2.6.

2.5.6 Fermentação etanólica do soro de queijo permeado concentrado a 100 g/L de lactose pela levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 com concentrado de proteínas do soro de queijo (WPC) hidrolisado e não hidrolisado como fontes de azoto

Realizaram-se três ensaios com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, utilizando como fonte de carbono o soro de queijo permeado com uma concentração de 100 g/L de lactose e como fontes de azoto 8 g/L de WPC, 8 g/L de WPC hidrolisado e também um controlo sem adição de qualquer fonte de azoto. Os ensaios foram realizados como descrito em 2.5.3.

2.6 Parâmetros fermentativos

Ao longo dos ensaios foram recolhidas amostras e realizadas as análises detalhadas a seguir.

2.6.1 Determinação do crescimento celular

2.6.1.1 Densidade ótica

A densidade ótica é um parâmetro que permite acompanhar o crescimento celular pelo método de espectrofotometria (Cintra 202 – GBC, EUA) na gama do visível num comprimento de onda de 590 nm, no entanto não permite distinguir entre células viáveis e não viáveis. Antes da inoculação recolhe-se uma amostra de cada meio, que será o branco e será lido contra as amostras recolhidas ao longo do tempo. As amostras e o branco foram diluídos de modo a que a absorvância medida não ultrapassasse o valor de 0,9. É de notar que se fosse necessário fazer uma diluição diferente essa também seria feita no branco.

2.6.1.2 Peso seco

O peso seco permite determinar a concentração de biomassa, é por isso outro parâmetro que possibilita o acompanhamento do crescimento celular. Durante os ensaios de fermentação recolheu-se amostras de 1,2 mL para eppendorfs de 1,5 mL previamente secos e pesados. Esses são centrifugados (Eppendorf Centrifuge 5415D,

EUA) a 13200 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante é usado para a análise de quantificação de lactose e etanol e o *pellet* é seco (Binder FD53, EUA) a 50 ± 1 °C durante 60 h e posteriormente pesado (Precisa XB120A e Precisa 2200C IP65, Suíça) à temperatura ambiente.

Este procedimento foi realizado para todos os ensaios de fermentação, porém os resultados do peso seco obtidos não foram os esperados e por isso a biomassa seca foi estimada através da correlação entre a densidade ótica e o peso seco celular (Equação 4), previamente estabelecida no laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA) onde foram executados estes ensaios experimentais.

$$\text{Biomassa}_{\text{seca}} = 0,371 \cdot DO + 0,113 \quad \text{Equação 4}$$

A concentração de biomassa seca é expressa em g/L e a densidade ótica em unidades de absorvância.

2.6.1.3 Unidades formadoras de colónias

A contagem de Unidades Formadoras de Colónias (UFCs) permite seguir o crescimento e a viabilidade celular.

As amostras são diluídas sucessivamente em tubos de ensaio com tampão fosfato salino (PBS) 0,1M a pH 7,0, entre 10^2 e 10^5 vezes. As amostras são homogeneizadas e inocula-se 3 gotas de 20 μ L em placas de Petri com meio YPD sólido. As placas são incubadas em estufa (Incuberm – Raypa, Espanha) a 25 ± 1 °C durante 48 horas.

Posteriormente procedeu-se à contagem das colónias formadas, utilizando a Equação 5 para calcular a concentração celular:

$$C_{\text{celular}} = N^{\circ} \text{ células} \times \text{Fator Diluição} \times \frac{1}{\text{Volume inoculado}} \quad \text{Equação 5}$$

A concentração celular (C_{celular}) é expressa em cél/mL e o volume inoculado em mL.

Durante os ensaios realizados, também se procedeu à quantificação de lactose e de etanol como descrito em 2.6.2.4.

2.6.2 Métodos analíticos

2.6.2.1 Medição do pH

O pH foi medido nos ensaios de microfiltração, ultrafiltração e nos ensaios fermentativos, através de um potenciômetro (Crison Basic 2, Espanha). Nos ensaios de microfiltração e ultrafiltração o potenciômetro foi calibrado antes de cada utilização, enquanto nos ensaios fermentativos foi calibrado a cada 24 horas, para garantir a exatidão dos resultados.

2.6.2.2 Medição da condutividade

A condutividade foi medida nos ensaios de microfiltração e ultrafiltração através do condutivímetro (CRISON micro CM 2202, Espanha). Este foi calibrado antes de cada utilização, para garantir a exatidão dos resultados.

2.6.2.3 Quantificação de proteínas do soro de queijo

As proteínas foram quantificadas nos ensaios de MF e UF pelo método de Bradford (1976) a partir do protocolo da AppliChem.

Um conjunto de padrões é criado numa gama de concentração entre 0 e 0,1 g/L a partir de uma solução *stock* de soro de albumina bovina purificada (BSA). Esta deve ser armazenada em alíquotas de 1 mL.

Para a realização da curva padrão, dissolveu-se BSA numa solução salina de NaCl a 0,150 M, que é a mesma onde as amostras devem também ser diluídas. A 100 µL de amostra adicionou-se 1 mL de Reagente de Bradford previamente filtrado por decantação com um filtro #1 (Whatman). Procedeu-se à leitura da absorvância dos padrões e das amostras num comprimento de onda de 595 nm (Cintra 202 – GBC, EUA) contra um branco sem qualquer adição de proteína.

Os valores obtidos para os padrões através da medição da sua absorvância, são então utilizados para construir uma curva padrão para a qual os valores obtidos das amostras de soro de queijo podem ser comparados para determinar a sua concentração.

Como a proteína BSA tem tendência para absorver água durante o seu armazenamento, é necessário previamente obter a sua concentração exata através da medição da sua absorvância num comprimento de onda de 280 nm, usando cuvettes de quartzo, assim a solução deve apresentar uma absorvância de 0,66.

2.6.2.4 Quantificação de lactose e etanol

A lactose foi quantificada nos ensaios de MF, UF e fermentação e o etanol foi quantificado nos ensaios de fermentação através do método de HPLC.

Apenas as amostras do soro de queijo na sua forma original foram sujeitas a uma centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5415D, EUA) prévia a 13200 rpm durante 10 minutos para remoção de sólidos suspensos tal como as amostras dos ensaios fermentativos como descrito em 2.6.1.2. Seguidamente todas as amostras dos ensaios referidos foram filtradas com filtros com um diâmetro de poro de 0,22 µm (Millipore) para *vials*, para posterior análise.

O equipamento de HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom, EUA) é constituído por um detetor (IR L-2490), uma bomba (L-2130), um forno (L-2300), um injetor automático (L-2200) e uma coluna cromatográfica Aminex HPX 87H (Biorad) equipada com uma pré-coluna (Carbo-P Biorad).

A quantificação foi realizada utilizando como eluente HNO₃ 10 mM com um caudal de 0,5 mL/min e à temperatura de 45 °C. O eluente foi previamente desgaseificado num banho de ultrassons (Ultrason – Selecta, Espanha) durante 30 minutos.

2.6.2.5 Determinação do grau de hidrólise

A concentração de grupos amina primários no concentrado de proteínas do soro de queijo foi medida através do método do ácido 2,4,6 - trinitrobenzenosulfónico (TNBS), a usando o protocolo da GBiosciences. Trata-se de um método espectrofotométrico na gama do ultravioleta num comprimento de onda de 335 nm, que mede a quantidade dos cromóforos formados pela reação de aminas primárias com o TNBS.

A concentração de aminas presente nas proteínas foi doseada utilizando o aminoácido glicina (Gly) como padrão. A curva padrão foi preparada dissolvendo glicina no tampão de reação constituído por bicarbonato de sódio 0,1 M com pH 8,5, sendo este ajustado com NaOH 3M. Assim preparou-se os padrões numa gama de concentração de 0 a 0,13 mmol/L. As amostras foram também diluídas no tampão de reação. Aos padrões e às amostras adiciona-se 250 µL de uma solução de trabalho, constituída por tampão de reação e TNBS 0,01 % (v/v) preparado a partir de TNBS a 1% e incuba-se em banho-maria (Julabo SW22, Alemanha) a 37 °C durante 2 h.

Durante o período de incubação as amostras e os padrões, tal como o banho devem ser cobertos com papel de alumínio de modo a evitar a aceleração da reação por exposição à luz. Para terminar a reação adicionou-se 125 µL de HCl 1M e 250 µL de SDS a 10%.

Procedeu-se à leitura da absorvância dos padrões e das amostras num comprimento de onda de 335 nm (Cintra 202 – GBC) contra um branco sem qualquer adição de proteína, usando cuvettes de quartzo.

Os valores de absorvância obtidos para os padrões são então utilizados para construir uma curva padrão, com a qual os valores de absorvância obtidos para as amostras podem ser comparados para determinar a concentração de aminas primárias.

2.7 Caracterização da cinética de crescimento

2.7.1 Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento (μ) é determinada nos ensaios fermentativos, através do programa de modelação *on-line* DMFit (<http://modelling.combase.cc>). Esta ferramenta determina a taxa específica de crescimento baseando-se em modelos de aproximação, utilizando o logaritmo da concentração celular obtida, através do peso seco em função do tempo de fermentação. A taxa específica de crescimento é expressa em h^{-1} .

2.7.2 Tempo de duplicação

O tempo de duplicação (t_d) foi calculado usando a Equação 6:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad \text{Equação 6}$$

O tempo de duplicação é expresso em h e a taxa específica de crescimento (μ) em h^{-1} .

2.7.3 Rendimento de biomassa produzida em função do substrato

O rendimento de biomassa produzida (X) em função do substrato (S) é o declive calculado por regressão linear dos valores de biomassa em relação à lactose consumida em função do tempo. Este rendimento ($Y_{X/P}$) é expresso em g biomassa produzida / g lactose consumida.

2.7.4 Rendimento de etanol produzido em função do substrato

O rendimento de etanol produzido (P) em função do substrato (S) é o declive calculado por regressão linear dos valores de etanol em relação à lactose consumida em função do tempo. Este rendimento ($Y_{P/S}$) é expresso em g etanol produzido / g lactose consumida.

2.7.5 Produtividade máxima de etanol

A produtividade máxima de etanol trata-se do declive calculado por regressão linear dos valores de concentração de etanol até ao seu máximo produzido em função do tempo de fermentação. A produtividade máxima é expressa em g/L.h.

2.8 Tratamento estatístico de resultados

Os resultados obtidos em todos os ensaios experimentais foram sujeitos a tratamento estatístico

As regressões lineares foram efetuadas no Microsoft Office Excel 2013 e as análises de variância foram efetuadas pelo teste Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$) no software SigmaPlot versão 12.

3. Resultados e discussão

De acordo com os objetivos desta dissertação realizou-se o fracionamento do soro de queijo por membranas de forma a obter um substrato rico em lactose e uma fonte de azoto (WPC) rica em proteínas do soro, para posterior utilização em ensaios fermentativos.

Num primeiro ensaio fermentativo onde se utilizou a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 avaliou-se a capacidade fermentativa desta levedura para a produção de bioetanol usando o soro de queijo permeado proveniente da ultrafiltração. O seu desempenho fermentativo foi avaliado com diferentes suplementos de fonte de azoto, como o WPC, e uma combinação de extrato de levedura e peptona.

Delinearam-se também ensaios de hidrólise enzimática do WPC com diferentes protéases: *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, Bromelaína e Tripsina. Este processo permite melhorar as propriedades funcionais e aumentar o campo de aplicação das proteínas do soro. Os péptidos obtidos deste processo têm menor peso molecular e estrutura secundária do que as proteínas que lhes deram origem. A hidrólise enzimática pode ser usada para produzir hidrolisados proteicos com diferentes perfis de aminoácidos e péptidos que variam consoante as características do enzima utilizado (Silvestre *et al.*, 2013), estes desta forma podem ser melhor assimilados como fonte de azoto pela levedura.

Numa última fase, de modo a avaliar o uso do HWPC resultante da hidrólise enzimática e WPC na sua forma original como fontes de azoto, realizou-se um ensaio fermentativo comparativo com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360.

3.1 Microfiltração do soro de queijo

Componentes como gordura, microrganismos (bactérias) e sólidos suspensos presentes no soro de queijo promovem a curto prazo o entupimento das membranas de UF. Para que o processo de UF seja eficaz procedeu-se a um pré-tratamento do soro através de um processo combinado de centrifugação e MF. Neste ensaio de MF usou-se uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF).

Analizou-se o pH, condutividade, fluxo, teor de sólidos suspensos, assim como as concentrações de açúcar (lactose) e proteínas presentes (tabela 1) após cada etapa do pré-tratamento.

Tabela 1: Parâmetros de caracterização do soro para as várias etapas do processo de pré-tratamento do soro de queijo.

Material	S. Suspensos (mg/L)	Volume (mL)	pH	Condutividade (mS/cm)	[Proteína] (g/L)	[Lactose] (g/L)
Soro	1310	1000	5,58 ± 0,075 ^b	18,19 ± 0,16 ^a	2,73 ± 0,38 ^a	36,31 ± 2,39 ^a
Após centrifugação	900	700	5,98 ± 0,025 ^{ab}	17,21 ± 0,17 ^a	2,76 ± 0,065 ^a	36,12 ± 3,07 ^a
MF - Permeado	580	500	6,54 ± 0,015 ^a	15,37 ± 0,34 ^a	3,28 ± 1,24 ^a	34,62 ± 2,24 ^a
MF - Retentado	1116	100	6,31 ± 0,24 ^a	15,54 ± 1,9 ^a	1,84 ± 0,22 ^a	34,28 ± 4,28 ^a

Sólidos suspensos (S. Suspensos), Microfiltração (MF). Valores médios (n = 2) ± erro padrão, na coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

O soro utilizado neste trabalho é recolhido após o processo de fabrico do requeijão, o que justifica o baixo teor de proteínas nele existente.

No decorrer do ensaio de MF, verificou-se uma diminuição do fluxo (Figura 5) de 1,17 para 0,49 L/m².min. O fluxo médio apresentando é de 1,17 ± 0,68 L/m².min.

A diminuição do fluxo durante o ensaio pode ser justificada pela polarização da concentração e pela obstrução da membrana, incluindo a deposição, assim como a adsorção de proteínas nos poros (Rezaei *et al.*, 2014). Após o ensaio a membrana foi limpa com um agente químico alcalino e um agente surfactante, restaurando o fluxo para os valores iniciais (≈7 L/m².min), quando se usou apenas água destilada. Este passo é necessário para identificar a regeneração e o estado de limpeza da membrana.

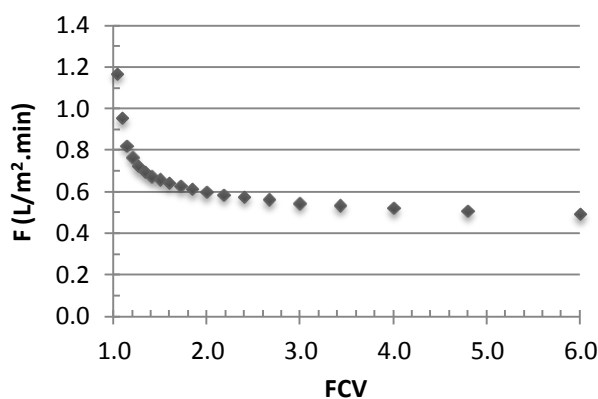


Figura 5: Fluxo (F) do soro de queijo em função do fator de concentração volumétrico (FCV) do processo de MF, com uma membrana de PVDF.

O pré-tratamento do soro de queijo (Tabela 1) permitiu um decréscimo do teor de sólidos suspensos de 1310 para 580 mg/L. Mediante este resultado pode-se dizer que um pré-tratamento constituído por centrifugação e MF poderá melhorar propriedades funcionais do WPC devido à remoção de gordura e por isso apresentar menos efeitos negativos no produto (Cheryan, 1998).

A concentração de lactose tal como a concentração de proteína são semelhantes aos valores iniciais, no entanto obteve-se uma concentração maior de proteína no permeado do que no retentado da MF com $3,28 \pm 1,24$ g/L e $1,84 \pm 0,22$ g/L respetivamente. No entanto a análise estatística indica que esta diferença não é significativa. Este resultado foi atípico e não se repetiu ao longo do trabalho experimental.

Ensaio posteriores mostram que a proteína é retida durante a MF. A membrana utilizada na MF é uma membrana polimérica (hidrofóbica) constituída por PVDF que é obtido da polimerização do difluoreto de vinilideno, este tipo de material em condições convencionais de fluxo transversal (fluxo cruzado) pode provocar a formação de uma membrana secundária ou dinâmica de partículas polarizadas, que faz com que se comporte como uma membrana de UF (Cheryan, 1998). A membrana pode também reter proteínas de elevado tamanho, como por exemplo as micelas de caseína.

Kelly e Zydney, (1997) observaram que durante a filtração do leite ou do soro de queijo, as proteínas tendem a obstruir membranas com poros muito maiores do que o tamanho dos seus monómeros ou dímeros constituintes. Isto pode ser atribuído à presença de aglomerados proteicos que podem ser até três ordens de grandeza maiores do que os monómeros.

Atualmente dois tipos principais de materiais são usados no fabrico de membranas para a MF do soro do queijo: cerâmica e polímeros. As membranas de cerâmica têm propriedades superiores às poliméricas, como elevada estabilidade química, física, térmica e microbiana, que permitem um prolongamento do tempo de vida útil e facilidade de limpeza, portanto são uma boa alternativa na indústria biotecnológica e alimentar (Golbandi *et al.*, 2013).

Os parâmetros condutividade e pH também foram avaliados. Embora a condutividade diminuísse ligeiramente do soro inicial para soro centrifugado e se mantenha semelhante entre o permeado e o retentado da MF, essa desigualdade não é significativa. O pH aumenta ao longo o pré-tratamento do soro, apresentando diferenças significativas entre o soro inicial e o soro permeado e entre o soro inicial e o soro

retentado. Essa diminuição pode ser justificada pela remoção de ácidos gordos livres como a gordura, levando a uma diminuição de acidez.

3.2 Ultrafiltração do soro de queijo

O soro permeado proveniente da MF é assim utilizado para a realização de um ensaio de UF onde o soro de queijo é fracionado em dois produtos: um retentado enriquecido em proteínas e um permeado com baixo conteúdo proteico.

Neste ensaio analisaram-se os parâmetros pH, condutividade, as concentrações de lactose e proteínas presentes no permeado e retentado, como descrito na metodologia em 2.6.2., e foi calculado o fluxo médio, o rendimento de recuperação de proteína, o rendimento da lactose e o coeficiente de rejeição da proteína, como mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros de caracterização dos ensaios de UF para avaliação das membranas de poliétersulfona e celulose regenerada

		Membranas	
		Poliétersulfona	Celulose Regenerada
Permeado	[Proteína] (g/L)	0,16 ± 0,020 ^a	0,13 ± 0,0016 ^a
	[Lactose] (g/L)	43,0 ± 0,24 ^a	43,5 ± 0,53 ^a
	pH	6,6 ± 0,05 ^a	6,6 ± 0,035 ^a
	Condutividade (mS/cm)	18,5 ± 0,11 ^a	18,1 ± 0,45 ^a
Retentado	[Proteína] (g/L)	11,6 ± 1,13 ^a	13,1 ± 1,83 ^a
	[Lactose] (g/L)	39,0 ± 4,46 ^a	42,3 ± 3,18 ^a
	pH	6,5 ± 0,0050 ^a	6,5 ± 0,010 ^a
	Condutividade (mS/cm)	16,9 ± 0,32 ^a	17,8 ± 0,13 ^a
Coeficiente Rejeição de Proteína (%)		96,4 ± 0,422 ^a	97,8 ± 0,171 ^a
Proteína Recuperada (%)		86,6	93,3
Lactose Recuperada (%)		81,2	82,3
Fluxo médio (L/min.m ²)		0,54 ± 0,017 ^b	0,80 ± 0,013 ^a

Valores médios (n = 2) ± erro padrão, na linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

Tal como se observou nos ensaios de MF, o fluxo também tende a diminuir no decorrer do processo de UF.

Na figura 6, é possível verificar que o fluxo do soro para a membrana de poliétersulfona (A) é menor ($0,49 - 0,40 \text{ L/m}^2.\text{min}$), relativamente à de celulose regenerada (B) ($0,68 - 0,56 \text{ L/m}^2.\text{min}$). O fluxo médio apresentado para a membrana de poliétersulfona é $0,54 \pm 0,017 \text{ L/m}^2.\text{min}$ e para a membrana de celulose regenerada é $0,80 \pm 0,013 \text{ L/m}^2.\text{min}$. O fluxo médio apresentado para estas membranas é superior aos fluxos mostrados na figura 6, possivelmente devido ao facto de o soro ser permeado mais rapidamente no início do ensaio.

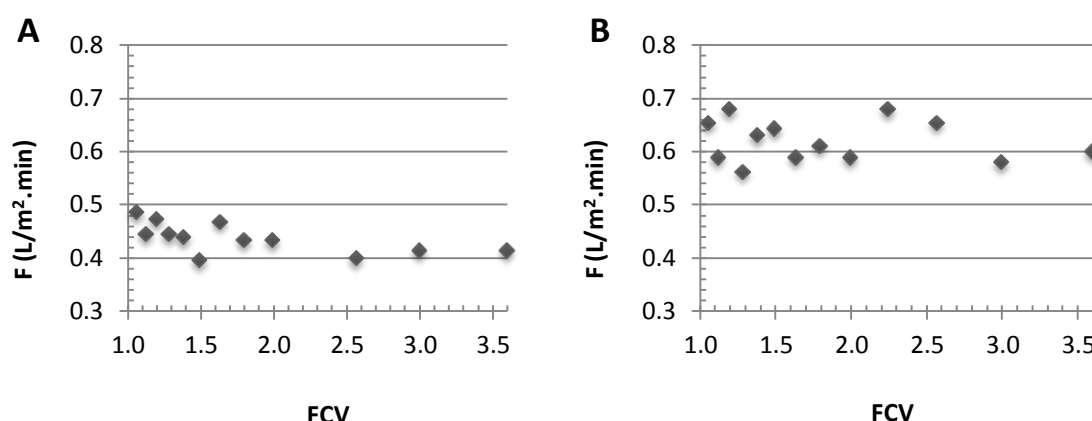


Figura 6: Fluxo (F) em função do FCV de soro permeado recolhido durante a UF, utilizando as membranas de (A) poliétersulfona e (B) celulose regenerada.

O soro de queijo como já foi mencionado anteriormente obstrui mais facilmente membranas hidrofóbicas, como por exemplo as de polisulfona, poliétersulfona, polipropileno e politetrafluoretileno, do que as membranas hidrofílicas, como a de acetato de celulose, celulose regenerada e poliacrilamida, principalmente devido às interações entre a proteína e a membrana. Sais minerais como o fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), também têm um papel importante, pois podem precipitar na membrana ou no interior dos poros e/ou interagir com a membrana, possivelmente através de pontes entre a membrana e as proteínas. A deposição destes sais e de proteínas, também está envolvido na obstrução de membranas de cerâmica (Cheryan, 1998).

A concentração de proteínas no retentado (CPR) e no permeado (CPP) aumentou gradualmente (figura 7) no decorrer da UF com a utilização das duas membranas, no entanto verifica-se que no final da UF no permeado essa concentração é muito menor do que no retentado. Essa diferença é também visível na comparação entre membranas, que apesar da CPR ser semelhante, a CPP é ligeiramente menor quando se utiliza a membrana de celulose regenerada (figura 7.B), essa diferença é justificada pelo facto da membrana de celulose ser mais eficaz na retenção de proteínas. Assim o rendimento de proteína recuperada por este processo usando as membranas de poliétersulfona e de celulose regenerada foi de 86,6 % e 93,3 % respetivamente. Já os valores de concentração de lactose no final da UF são idênticos entre membranas, apresentando assim um rendimento de recuperação da lactose de 81,2 % para a membrana de poliétersulfona e 82,3 % para a de celulose regenerada.

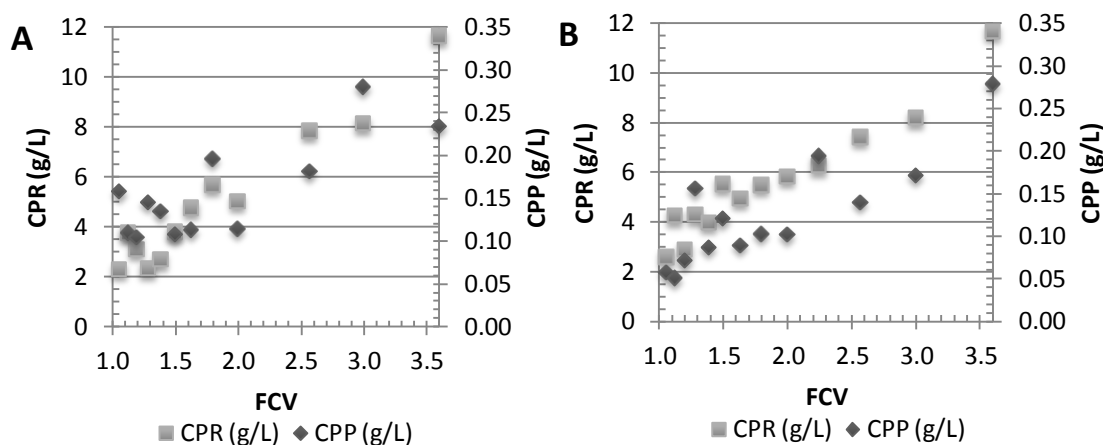


Figura 7: Concentração de proteínas no retentado (CPR) e no permeado (CPP) ao longo da ultrafiltração. (A) Membrana poliétersulfona; (B) Membrana celulose regenerada.

O coeficiente de rejeição (CR) é a capacidade da membrana reter ou rejeitar a passagem de certas moléculas. Durante o processo de UF observou-se (figura 8), que o CR é semelhante entre as membranas, sendo porém ligeiramente mais baixo para a membrana de poliétersulfona (figura 8.A) (96,4 %) que para a membrana de celulose regenerada (figura 8.B) (97,9 %). Esta diferença pode ocorrer, como já foi mencionado anteriormente, devido às membranas serem constituídas por materiais diferentes,

levando a que as proteínas tenham mais dificuldade em atravessar a membrana de poliétersulfona (hidrofóbica) do que da membrana de celulose regenerada (hidrofílica).

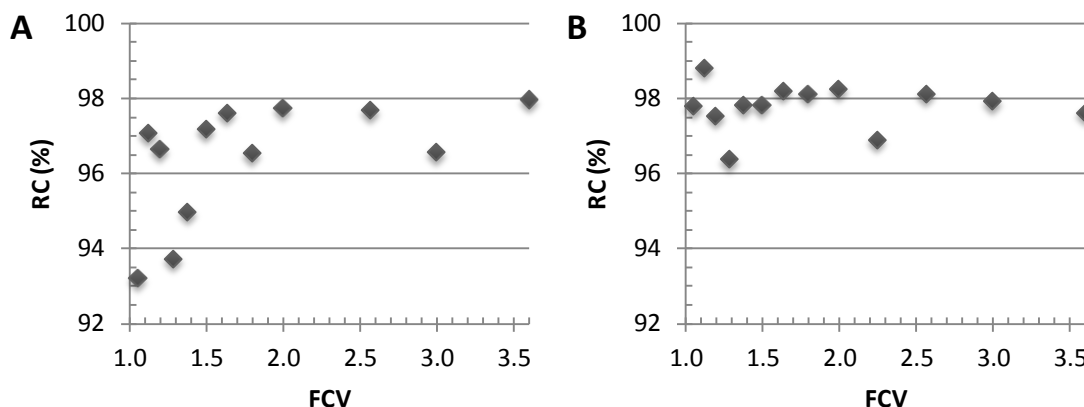


Figura 8: Coeficiente de rejeição de proteína (CR) em função do FCV. (A) Membrana poliétersulfona; (B) Membrana celulose regenerada.

Outros parâmetros como o pH e a condutividade também foram avaliados, embora não tenham sido determinantes para a escolha da membrana (tabela 2). Estes não apresentam valores significativamente diferentes quer entre o permeado e o retentado quer entre membranas.

Tendo em conta os resultados obtidos optou-se por escolher a membrana de celulose regenerada para ensaios posteriores de UF com o objetivo de acumular soro permeado e WPC que iriam servir de substrato e fonte de azoto nos ensaios de fermentação.

Após os ensaios finais de UF com a membrana selecionada é possível obter (tabela 3) um soro permeado com uma concentração de lactose e proteína de $52,95 \pm 0,21$ (g/L) e $0,99 \pm 0,028$ (g/L) respetivamente e um WPC liofilizado com um teor de lactose de 53,4 % (p/p) e de proteína de 7,5 % (p/p).

Tabela 3: Concentrações finais de proteína e lactose no WPC liofilizado e no soro de queijo permeado.

Amostra	Concentração Proteína	Concentração Lactose
WPC	7,5 % (p/p)	53,4 % (p/p)
Soro permeado	$0,99 \pm 0,028$ (g/L)	$52,95 \pm 0,21$ (g/L)

3.3 Fermentação etanólica do soro de queijo permeado pela levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 com diferentes fontes de azoto

O soro permeado obtido pela UF foi posteriormente concentrado como descrito no ponto 2.4.2, até atingir uma concentração de 100 g/L de lactose, sendo depois usado como fonte de carbono para a fermentação alcoólica. Este passo prévio de concentração é necessário para que o processo de fermentação seja rentável, pois a fermentação direta do soro de queijo que contém aproximadamente 45 a 50 g/L de lactose, apenas produz cerca de 2,5 % de etanol (Oda e Nakamura, 2009). O rendimento teórico de etanol relativo ao consumo de substrato apresentado para a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 é 0,54 g/g.

O ensaio de fermentação foi realizado, em Erlenmeyer, para avaliar a capacidade fermentativa da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 com o soro permeado como substrato concentrado a 100 g/L de lactose em três condições diferentes: sem suplemento de fonte de azoto, com 3 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona e com 8 g/L WPC, à temperatura de 30 ± 1 °C durante 96 horas.

As estirpes de levedura *Kluyveromyces* sp. são normalmente utilizadas para a fermentação do soro de queijo, uma vez que apresentam a capacidade de metabolizar a lactose. Estudos anteriormente realizados no LEBA elegeram, das estirpes estudadas, a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 como a levedura que apresenta melhor capacidade fermentativa para a fermentação do soro de queijo em bruto com uma concentração de 100 g/L de lactose, foi por isso também a levedura escolhida para a realização deste trabalho (Felizardo A. 2015).

O WPC foi avaliado neste trabalho como uma fonte de azoto alternativa e menos dispendiosa que o YEP, de forma a colmatar o défice de azoto apresentado pelo soro, uma vez que tem um baixo conteúdo proteico (0,99 g/L).

O perfil de produção de etanol, crescimento celular e consumo de lactose pela levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 com as diferentes fontes de azoto encontra-se na figura 9. Os parâmetros cinéticos de crescimento da levedura na experiência comparativa efetuada são apresentados na tabela 4.

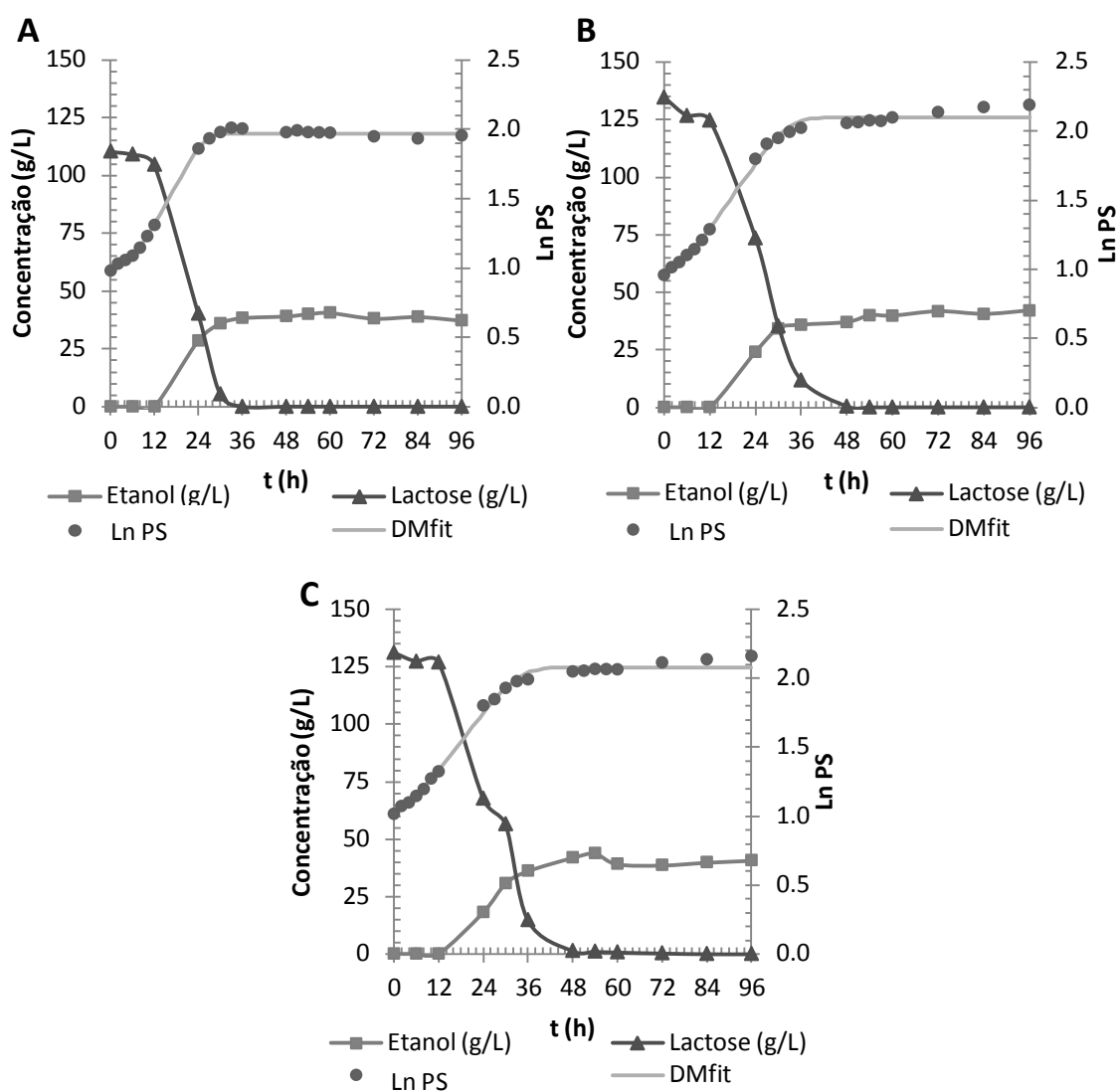


Figura 9: Perfil de produção de etanol e de crescimento da estirpe *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, na fermentação do soro permeado proveniente da UF, como substrato, suplementado com (A) Extrato de levedura (3 g/L) e peptona (5 g/L), (B) WPC (8 g/L) e (C) sem adição de fonte de azoto, em Erlenmeyer.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos de crescimento e de produção de etanol determinados para as fermentações, em Erlenmeyer, do soro de queijo permeado como substrato com a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 e diferentes fontes de azoto

	E. levedura (3 g/L) Peptona (5 g/L)	WPC (8g/L)	Sem adição fonte de azoto
Conversão de açúcares (%)	100	100	100
μ (h⁻¹)	0,0486 ± 0,00199 ^a	0,0397 ± 0,00217 ^b	0,0349 ± 0,00172 ^b
t_d (h)	14,26	17,46	19,86
t_{est} (h)	30	33	33
X_{max} (g/L)	7,44 ± 0,063 ^c	8,92 ± 0,087 ^a	8,65 ± 0,047 ^b
Etanol máx (g/L)	40,59 ± 1,48 ^a	41,94 ± 0,84 ^a	43,74 ± 0,91 ^a
t etanol máx (h)	60	96	54
Y_{x/s} (g/g)	0,035 ± 0,0032 ^a	0,033 ± 0,0033 ^a	0,031 ± 0,0046 ^a
Y_{p/s} (g/g)	0,353 ± 0,010 ^a	0,304 ± 0,018 ^a	0,312 ± 0,0061 ^a
Produtividade (g/L.h)	1,12 ± 0,043 ^a	1,04 ± 0,038 ^a	0,96 ± 0,060 ^a

Concentrado de proteínas do soro (WPC), Taxa específica de crescimento (μ), tempo de duplicação (t_d), Tempo do início fase estacionária (t_{est}) Concentração máxima de biomassa (X_{máx}), Concentração máxima de etanol (Etanol máx), Tempo de obtenção do etanol máximo (t_{etanol máx}), Rendimento de biomassa relativo ao consumo de substrato (Y_{x/s}), Rendimento de etanol relativo ao consumo de substrato (Y_{p/s}). Valores médios (n = 3) ± erro padrão, valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

A levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 é caracterizada pelo seu metabolismo respiro-fermentativo e isso verifica-se neste ensaio fermentativo. Quando se utiliza o YEP como fonte de azoto (figura 9.A), observa-se uma fase de latência de 6 h seguida de uma fase exponencial que dura 27 h. Supõe-se que tanto a via respiratória como a fermentativa encontram-se simultaneamente ativas o que levou ao esgotamento da fonte de carbono (lactose) nas primeiras 36 h de fermentação, alcançando uma biomassa máxima (X_{máx}) de 7,44 ± 0,063 g/L. A produção de etanol ocorreu principalmente durante a fase exponencial atingindo uma concentração de 38,31 ± 0,75 g/L às 36 h, quando se dá o consumo total de lactose. Com a limitação da fonte de carbono a levedura entra automaticamente em fase estacionária, no entanto, apesar de após essa hora a concentração de etanol ter estabilizado, o seu máximo (Etanol_{máx}) só se verificaria mais tarde às 60 h com 40,59 ± 1,48 g/L.

Estudos anteriores realizados no LEBA usando soro de queijo em bruto com uma concentração de 80 g/L de lactose suplementados com 3 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona, 3 g/L de ureia e sem fonte de azoto adicionada, mostram que

quando se adiciona YEP como fonte de azoto a levedura apresenta um crescimento mais rápido, uma produção de etanol e um rendimento de etanol em relação ao substrato mais elevados, comparativamente aos ensaios com ureia e sem adição de fonte de azoto (Felizardo A. 2015).

Quando se utiliza o WPC como fonte de azoto (figura 9.B), observa-se uma fase de latência que dura cerca de 4 h e uma fase exponencial de 30 h, atingindo uma biomassa de $7,82 \pm 0,077$ g/L às 48 h. A fonte de carbono é totalmente convertida em etanol às 48 h atingindo uma concentração de etanol de $36,91 \pm 2,56$ g/L. Apesar disso a concentração máxima de biomassa só se verificaria mais tarde, às 96 h com $8,92 \pm 0,087$ g/L e a concentração máxima de etanol às 54 h com $41,94 \pm 0,84$ g/L. A partir das 60 h nota-se um crescimento lento. Apesar de não ser evidente o consumo de etanol, este pode ocorrer para a manutenção celular.

Quando não há qualquer adição de fonte de azoto (figura 9.C), é possível visualizar que a levedura tem um comportamento semelhante ao que tem quando se usa WPC, pois também apresenta uma fase de latência de 4 h e uma fase exponencial de 30 h. A levedura, tal como nas fermentações anteriores também consome todo o açúcar presente no meio, neste caso por volta das 48 h, apresentando uma biomassa de $7,74 \pm 0,056$ g/L e uma concentração de etanol de $41,89 \pm 4,45$ g/L. No entanto a concentração máxima de etanol só foi registada às 54 h com $43,74 \pm 0,91$ g/L. Devido ao esgotamento da fonte de carbono a levedura entra em fase estacionária, no entanto a partir das 60 h existe um ligeiro crescimento, obtendo-se uma biomassa máxima de $8,65 \pm 0,067$ g/L no final da fermentação (96 h). Este crescimento pode ser justificado pelo consumo de etanol por parte da levedura, pois às 60 h observa-se um decréscimo de etanol de $43,74 \pm 0,91$ g/L para $39,11 \pm 2,16$ g/L. A partir das 60 h a concentração de etanol é sempre inferior à desse máximo. Todavia isso não aconteceu com a fonte de azoto YEP (figura 9.A), provavelmente devido à baixa viabilidade celular (Anexo I).

Os perfis de crescimento são semelhantes em alguns aspetos, mas através dos parâmetros cinéticos deste ensaio fermentativo (tabela 4) é possível constatar algumas diferenças.

Embora no meio com YEP a fase de latência seja maior, através do parâmetro da taxa específica de crescimento (μ) verificou-se que o crescimento é mais rápido ($0,0486 \pm 0,00199$ h⁻¹) relativamente aos meios com WPC ($0,0397 \pm 0,00217$ h⁻¹) e sem fonte de azoto ($0,0349 \pm 0,00172$ h⁻¹). Porém a biomassa máxima registada nos três ensaios apresenta diferenças significativas, sendo o meio com WPC o que apresenta a

concentração mais elevada com $8,92 \pm 0,087$ g/L seguido do meio sem adição de fonte de azoto com $8,65 \pm 0,047$ g/L e o por fim o meio com YEP com uma concentração de $7,44 \pm 0,063$ g/L. O facto da concentração de biomassa no meio com YEP ser mais baixa que nos outros meios, pode ser justificada pela perda de viabilidade das células (Anexo II). Os parâmetros de produtividade, concentração máxima de etanol e o rendimento de biomassa a partir do substrato ($Y_{X/S}$), apresentaram valores sem diferenças significativas em todas as fermentações.

Neste ensaio também se analisou o pH ao longo do processo fermentativo, como se pode consultar em anexo. Observa-se que o pH diminuiu durante a fermentação, provavelmente devido à produção de subprodutos, porém existe um aumento do pH (C) a partir das 48 h, quando se utiliza o WPC como fonte de azoto.

Assim, pode-se dizer que a adição de YEP como fonte de azoto na fermentação do soro de queijo permeado, possui a vantagem de provocar um crescimento mais rápido do que na ausência de fonte de azoto, mas têm pouca influência na cinética de acumulação de etanol no meio de crescimento.

3.4 Hidrólise enzimática do concentrado de proteínas do soro de queijo

O WPC enriquecido em proteínas foi hidrolisado enzimaticamente, com vista ao melhoramento das propriedades físicas, químicas, funcionais e nutricionais das proteínas originais (Qi e He, 2006), para que possa ser usado como fonte de azoto na fermentação alcoólica do soro de queijo permeado.

Assim, o ensaio de hidrólise enzimática do WPC como substrato foi realizado usando as proteases de *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, Bromelaína e Tripsina a diferentes rácios de enzima/substrato: 1:100, 4:100 e 8:100.

O WPC foi analisado na sua forma original, e foi hidrolisado com a adição de um ácido para obter 100% de hidrólise, estas análises serviram de controlo (tabela 5).

Observa-se uma concentração muito baixa de aminas de cerca de $9,45 \pm 0,19$ mmol/L para o WPC não hidrolisado e uma concentração de $95,61 \pm 1,18$ mmol/L, quando este é totalmente hidrolisado.

Tabela 5: Valores de concentração de aminos do WPC não hidrolisado, que constitui o branco e do WPC totalmente hidrolisado

Amostra	[Aminas] (mmol/L)
WPC não hidrolisado	9,45 ± 0,19
WPC totalmente hidrolisado	95,61 ± 1,80

A partir da tabela 6 verifica-se que todas as proteases usadas promovem o aumento da concentração de aminos livres com o aumento do rácio de enzima/substrato. As diferenças de concentração podem ser justificadas pela diferente atividade das proteases (*Bacillus licheniformis* ≥ 2,40 U/g, *Aspergillus oryzae* ≥ 500 U/g, Bromelaína ≥ 3000 U/g e Tripsina ≤ 4000 U/g). No entanto para a realização deste ensaio usou-se a mesma temperatura (50 °C) e o mesmo pH (7) para todas as proteases o que podem não ser as suas condições ótimas de funcionamento e por isso ter afetado os resultados da tripsina e da bromelaína, uma vez que apresentam maior atividade. As proteases com valores mais elevados de concentração de aminos livres foram a de *Aspergillus oryzae* e a bromelaína.

Tabela 6: Concentração de aminos primárias no final da hidrólise do WPC com diferentes proteases e diferentes rácios de enzima e substrato.

Rácio	[Aminas] (mmol/L)			
	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Bromelaína	Tripsina
1:100	41,12 ± 0,077	91,29 ± 1,32	43,79 ± 0,56	29,14 ± 0,28
4:100	52,15 ± 0,62	108,05 ± 0,022	68,72 ± 13,17	60,06 ± 2,88
8:100	64,65 ± 1,30	125,01 ± 0,88	117,47 ± 2,42	79,10 ± 0,54

As concentrações de aminos obtidas para as proteases de *Aspergillus oryzae* e Bromelaína são mais elevadas que a obtida para a hidrólise ácida total do WPC. Este resultado pode ser devido à hidrólise ácida do WPC ter sido incompleta, bem como o facto de o WPC ter na sua composição uma concentração elevada de lactose. Como a hidrólise ácida é levada a cabo a uma temperatura elevada (110 °C) pode ter provocado a hidrólise da lactose em açúcares redutores e os grupos carbonilo presentes nos

açúcares reagem com as aminas livres das proteínas, este fenómeno é conhecido como a reação de Maillard (Oh *et al.*, 2013).

Como os rácios que apresentam concentrações mais elevadas de aminas são o de 4:100 e 8:100, decidiu-se usar apenas o rácio de 4:100 e as proteases *Aspergillus oryzae* e a bromelaína para um estudo posterior para determinar a velocidade da hidrólise enzimática, porque os resultados obtidos para o rácio 8:100 não justificam a adição de uma maior quantidade de enzima, pois a adição do dobro de enzima não representa uma relação de proporcionalidade em relação ao aumento na concentração final de aminas livres.

3.5 Velocidade de hidrólise enzimática do concentrado de proteínas do soro de queijo

Realizou-se um ensaio de determinação da velocidade de hidrólise enzimática do WPC, com as proteases de *Aspergillus oryzae* e Bromelaína e o rácio de 4:100 de enzima/substrato, seleccionados no ensaio anterior, com o objetivo de escolher a protease que apresenta uma velocidade de hidrólise superior.

O ensaio de cinética de hidrólise apresenta diferenças significativas na velocidade do processo de hidrólise para as duas proteases (tabela 7). A protease de *Aspergillus oryzae* apresenta uma velocidade inicial e uma concentração de aminas livres maior do que a bromelaína e hidrolisa cerca de $3,37 \pm 0,087$ mmol/L.h, enquanto a bromelaína apenas hidrolisa $2,88 \pm 0,0097$ mmol/L.h. Por esse motivo, a protease de *Aspergillus oryzae* foi a escolhida para levar a cabo a hidrólise enzimática do WPC em maior escala, com vista à obtenção de material hidrolisado suficiente para ensaios de fermentação.

Tabela 7: Velocidade inicial para as proteases *Aspergillus oryzae* e bromelaína utilizando o rácio 4:100.

Protease	Velocidade inicial (mmol/L.h)
<i>Aspergillus oryzae</i>	$3,37 \pm 0,087^a$
Bromelaína	$2,88 \pm 0,0097^b$

Valores médios (n = 3) \pm erro padrão, valores com diferentes letras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

O último ensaio de hidrólise em grande escala teve como objetivo a obtenção do HWPC para ser usado na fermentação etanólica, como fonte de azoto (ponto 3.6). Decorreu durante 24 h, para permitir a hidrólise completa do WPC e foi monitorizado para verificar a ocorrência de hidrólise.

A protease de *Aspergillus oryzae* teve um comportamento semelhante ao observado no ensaio anterior, sendo que às 8h de hidrólise de cada ensaio a concentração de aminos era idêntica $88,08 \pm 4,10$ mmol/L (Anexo II) relativamente a $88,01 \pm 1,13$ mmol/L (figura 10). Todavia no ensaio em larga escala de hidrólise a concentração apresentada era de $105,6 \pm 0,48$ mmol/L às 24 h (figura 10). É possível verificar uma grande discrepância entre valores de concentração, este facto deve-se ao método de análise do grau de hidrólise ainda não estar uniformizado.

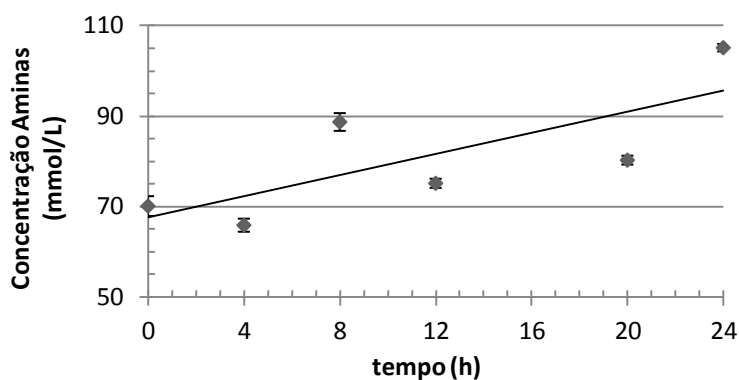


Figura 10: Concentração de aminos obtida ao longo do ensaio de velocidade de hidrólise enzimática.

O concentrado hidrolisado resultante foi usado como fonte de azoto em fermentação alcoólica posterior.

3.6 Fermentação etanólica do soro de queijo permeado concentrado pela levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 com concentrado de proteínas do soro de queijo (WPC) hidrolisado e não hidrolisado como fontes de azoto

Realizou-se um ensaio fermentativo em Erlenmeyer, para avaliar a capacidade fermentativa da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 com o soro permeado concentrado a 100 g/L de lactose como substrato e suplementado com 8 g/L de WPC, 8 g/L de HWPC como fontes de azoto, e sem qualquer adição de fonte azoto.

Analisando a figura 11 é possível observar que o comportamento da levedura é semelhante nas três fermentações. A fonte de carbono, constituída por 90 g/L de lactose proveniente do soro de queijo permeado é totalmente consumida, e conseqüentemente com o esgotamento da lactose a levedura entra em fase estacionária.

A levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 neste ensaio apresenta um metabolismo respiro-fermentativo.

Quando se usa o WPC (figura 11.A) como fonte de azoto, observa-se uma fase de latência de aproximadamente 4 h com a uma exponencial que dura 24 h, tal como, quando se usa o HWPC. Observa-se que o etanol foi principalmente obtido nas primeiras 48h e que a lactose é completamente consumida ao fim desse tempo, o que leva a crer que tanto a via respiratória como a fermentativa se encontram simultaneamente ativas. Às 48 h obtém-se uma concentração máxima de biomassa de $6,64 \pm 0,045$ g/L e uma concentração máxima de etanol de $43,76 \pm 0,07$ g/L. Após atingir as concentrações máxima de biomassa e de etanol, por volta das 60 horas de fermentação a concentração de biomassa diminuiu muito ligeiramente até ao final do ensaio, isso pode ser conseqüência da perda de viabilidade celular (Anexo III).

Nas fermentações em que se usa o meio suplementado com HWPC (figura 11.B) como fonte de azoto verifica-se uma fase de latência de 4 h, com uma exponencial que dura 24 h, atingindo a biomassa máxima às 48 h de $6,44 \pm 0,059$ g/L. A fonte de carbono é totalmente convertida às 36 h com uma produção máxima de etanol de $42,29 \pm 0,54$ g/L.

Quando não se adiciona qualquer fonte de azoto (figura 11.C) verifica-se uma fase de latência de 2 h com uma exponencial que dura 27 h, atingindo a biomassa máxima de $6,37 \pm 0,036$ g/L às 48 h. A conversão total da lactose ocorre às 48 h atingindo uma produção máxima de etanol de $43,17 \pm 0,87$ g/L, para o meio sem adição

de azoto. A concentração máxima de etanol é muito parecida para os três ensaios, por isso sem diferenças significativas.

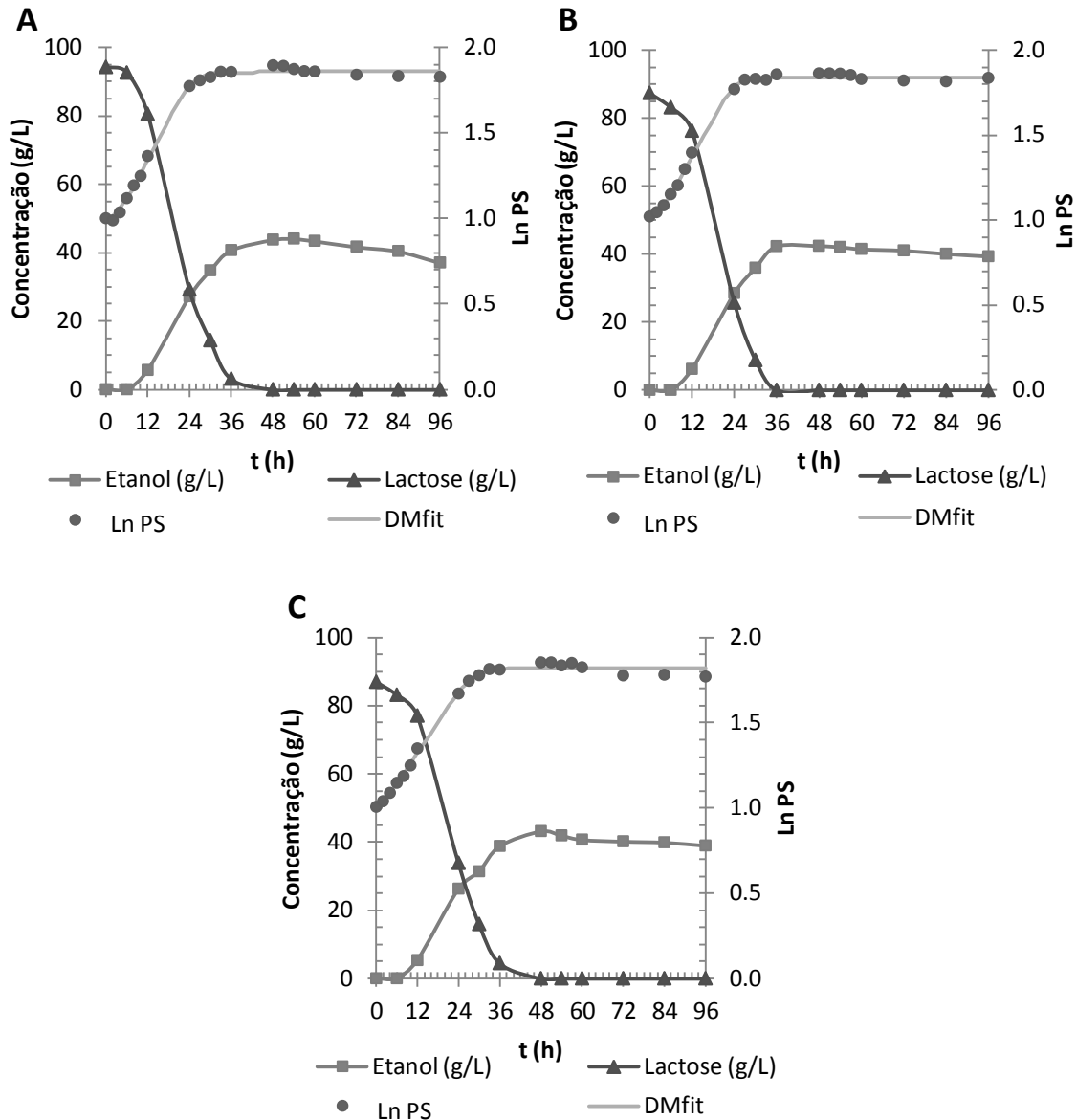


Figura 11: Perfil de crescimento da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, na fermentação em Erlenmeyer do soro permeado, suplementado com (A) WPC 8 g/L, (B) WPC hidrolizado 8 g/L e (C) sem adição de fonte de azoto.

Na tabela 8 encontram-se os parâmetros de crescimento da levedura que evidenciam que os rendimentos de biomassa ($Y_{X/S}$) e etanol ($Y_{P/S}$) relativamente ao consumo de substrato, tal como o etanol máximo produzido não apresentam diferenças estatisticamente significativas para as diferentes fontes de azoto. Porém o meio ao qual se adicionou WPC consegue atingir concentrações de biomassa maiores relativamente

às outras fontes. Conjuntamente com o HWPC como fonte de azoto, apresentam claramente um crescimento mais rápido que o meio sem adição de fonte de azoto. A produtividade apresenta diferenças significativas para todas as fontes sendo o meio no qual se adicionou HWPC o que apresenta uma produção mais rápida $1,19 \pm 0,006$ g/L.h, seguido do WPC como fonte de azoto com uma produtividade de $1,14 \pm 0,0076$ g/L.h.

Tabela 8: Parâmetros cinéticos de crescimento e de produção de etanol da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 utilizando o soro de queijo permeado como substrato e 8 g/L de WPC, 8g/ de HWPC como fontes de azoto e também sem adição de fonte de azoto.

	WPC (8 g/L)	HWPC (8g/L)	Sem adição fonte de azoto
Conversão de açúcares (%)	100	100	100
μ (h ⁻¹)	$0,0399 \pm 0,00215^a$	$0,0391 \pm 0,00189^a$	$0,031 \pm 0,00166^b$
t_d (h)	17,37	17,73	22,36
t_{est} (h)	27	27	30
X_{max} (g/L)	$6,64 \pm 0,045^a$	$6,44 \pm 0,059^b$	$6,37 \pm 0,036^b$
Etanol máx (g/L)	$43,76 \pm 0,07^a$	$42,29 \pm 0,54^a$	$43,17 \pm 0,87^a$
t etanol máx (h)	48	36	48
$Y_{x/s}$ (g/g)	$0,033 \pm 0,0023^a$	$0,032 \pm 0,0025^a$	$0,032 \pm 0,0012^a$
$Y_{p/s}$ (g/g)	$0,445 \pm 0,0072^a$	$0,471 \pm 0,0072^a$	$0,476 \pm 0,0098^a$
Produtividade (g/L.h)	$1,14 \pm 0,0076^b$	$1,19 \pm 0,006^a$	$1,07 \pm 0,011^c$

Concentrado de proteínas do soro (WPC), Concentrado de proteínas do soro hidrolisado (HWPC), Taxa específica de crescimento (μ), tempo de duplicação (t_d), tempo do início fase estacionária (t_{est}) concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$), concentração máxima de etanol (Etanol máx), tempo de obtenção do etanol máximo (t etanol máx), rendimento de biomassa relativo ao consumo de substrato ($Y_{x/s}$), rendimento de etanol relativo ao consumo de substrato ($Y_{p/s}$). Valores médios (n = 3) \pm erro padrão, valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

Neste ensaio também se analisou o pH durante o processo de fermentação.

Observa-se uma diminuição do pH (Anexo III) ao logo da fermentação até às 30 h mantendo-se depois constante. Esta diminuição dá-se provavelmente devido à produção de subprodutos.

A fermentação na qual não se adiciona fonte de azoto, apresentou um crescimento mais lento e uma concentração de biomassa máxima inferior, assim como uma produção de etanol mais lenta relativamente às outras fontes de azoto. No entanto a adição ao soro de queijo permeado a 100 g/L de lactose de fontes de azoto como o YEP,

o WPC na sua forma original e o HWPC aparentemente têm mais importância na cinética de crescimento da levedura do que na cinética de acumulação de etanol, pois os rendimentos $Y_{P/S}$ apresentados para estas fontes de azoto e para os meios sem adição de fonte de azoto são muito semelhantes, e próximos do teórico (0,54 g/g) obtido para esta levedura, como se pode observar na tabela 8.

4. Conclusão

Para uma produção de bioetanol competitiva e sustentável é necessário a aquisição de matéria-prima com um baixo custo. O soro de queijo de cabra resultante da UF foi o resíduo industrial utilizado neste estudo, apresentando um elevado teor de lactose, constituindo um bom substrato para a fermentação etanólica.

O pré-tratamento constituído por centrifugação e MF foi eficaz na remoção de sólidos suspensos, pois estes apresentaram um decréscimo acentuado de 1310 para 580 mg/L. O concentrado de proteínas foi também testado como fonte de azoto na fermentação etanólica.

No processo de UF do soro é possível concluir que a membrana de celulose regenerada é uma boa escolha para fracionamento do soro do queijo uma vez que apresentou um fluxo médio ($0,80 \pm 0,013 \text{ L/min.m}^2$) e rendimentos de lactose (82,3 %) e proteína (93,3%), superiores aos da membrana de poliétersulfona assim como permitiu a obtenção de um soro permeado com baixo teor de proteínas ($0,99 \pm 0,028 \text{ g/L}$).

Dos ensaios de estudo da capacidade fermentativa da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360, a adição de diferentes fontes de azoto: YE, WPC e HWPC ao soro de queijo permeado a 100 g/L de lactose parece melhorar muito pouco a produção de etanol pela levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360 comparativamente com a fermentação sem adição de fonte de azoto. Assim, não se justifica a adição de uma fonte de azoto dispendiosa como a YEP pois não compensa o custo, porque os rendimentos $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ e a produtividade não apresentam diferenças significativas relativamente às outras fontes de azoto. A adição do WPC, assim como do HWPC promovem um crescimento mais rápido. Os rendimentos $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ obtidos foram muito semelhantes entre si, bem como em relação à fermentação sem adição de fonte de azoto, por isso também não se justifica a adição destas fontes de azoto. O custo da hidrólise enzimática do WPC para ser usado como fonte de azoto seria elevado e não se obteria retorno. Por estes motivos seria mais vantajoso direccionar a produção do WPC à formulação e venda de produtos de valor acrescentado, como por exemplo suplementos para a indústria alimentar.

Na hidrólise e na velocidade da hidrólise enzimática pode-se concluir que a protease de *Aspergillus oryzae* foi a protease que apresentou melhores resultados na hidrólise do WPC, com uma concentração de aminas livre superior às outras proteases e com uma velocidade de hidrólise superior à da bromelaína.

Assim é possível concluir que o soro de queijo permeado é um bom substrato para a fermentação etanólica utilizando a levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360. Foi possível a conversão total da lactose em etanol, permitindo o tratamento do soro de queijo, reduzindo o impacto ambiental da carga orgânica nele presente, e representando também uma alternativa de produção de bioetanol.

5. Perspetivas futuras

Os resultados obtidos neste estudo abrem perspetivas para que se possa, no futuro, continuar a melhorar as estratégias de fermentação e hidrólise enzimática do soro de queijo abordadas. De forma a completar e clarificar alguns pontos deste trabalho, seria importante a realização de ensaios de fermentação utilizando o soro de queijo de cabra que não fosse resultante do processo de fabrico do requeijão. Isto porque esse pode apresentar um conteúdo superior de proteínas, como referido anteriormente: cerca de 7 g/L, bastante superior ao observado neste trabalho (cerca de 3 g/L). Desta forma seria de esperar que se obtivessem maiores quantidades de WPC rico em proteínas, o que poderia ter um efeito maior na atividade fermentativa da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2360.

Seria interessante realizar ensaios comparativos de fermentação do soro de queijo em bruto com o soro de queijo permeado resultante do processo de UF, de modo a identificar se a contribuição das proteínas presentes no soro em bruto seria relevante (comparativamente com o soro de queijo permeado que apresenta um conteúdo muito baixo de proteínas). Desta forma poderia excluir-se a hipótese de o soro permeado ser um substrato menos conveniente que o soro em bruto.

Seria importante otimizar as condições de hidrólise enzimática do WPC, como por exemplo variar o pH, a temperatura, utilizar outros rácios ou outras proteases, assim como otimizar o domínio do método de determinação do grau de hidrólise.

Uma outra abordagem importante seria efetuar uma análise económica da produção e venda do WPC de modo a saber se a obtenção de concentrados proteicos compensa os custos incorridos com o fracionamento do soro de queijo.

6. Referências Bibliográficas

- Ahmed, Irshad, and David Morris. 1978. "Alcohol Fuels from Whey: Novel Commercial Uses for a Waste Product." Washington DC: Free Hand Press.
- Aktaş, Nahit, I. Hakki Boyacı, Mehmet Mutlu, and Abdurrahman Tanyolaç. 2006. "Optimization of Lactose Utilization in Deproteinized Whey by *Kluyveromyces Marxianus* Using Response Surface Methodology (RSM)." *Bioresource Technology* 97 (18): 2252–59. doi:10.1016/j.biortech.2005.10.039.
- Ariyanti, Dessy, and H. Hadiyanto. 2013. "Ethanol Production from Whey by *Kluyveromyces Marxianus* in Batch Fermentation System: Kinetics Parameters Estimation." *Bulletin of Chemical Reaction Engineering and Catalysis* 7 (3): 179–84. doi:10.9767/bcrec.7.3.4044.179-184.
- Atra, Ramadan, Gyula Vatai, Erika Bekassy-Molnar, and Agnes Balint. 2005. "Investigation of Ultra- And Nanofiltration for Utilization of Whey Protein and Lactose." *Journal of Food Engineering* 67 (3): 325–32. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.04.035.
- Balat, Mustafa, Havva Balat, and Cahide Öz. 2008. "Progress in Bioethanol Processing." *Progress in Energy and Combustion Science* 34 (5): 551–73. doi:10.1016/j.pecs.2007.11.001.
- Banach, J. C., Z. Lin, and B. P. Lamsal. 2013. "Enzymatic Modification of Milk Protein Concentrate and Characterization of Resulting Functional Properties." *LWT - Food Science and Technology* 54 (2). Elsevier Ltd: 397–403. doi:10.1016/j.lwt.2013.06.023.
- Bandyopadhyay, Kakali, Gautam Misra, and Santinath Ghosh. 2008. "Preparation and Characterisation of Protein Hydrolysates from Indian Defatted Rice Bran Meal." *Journal of Oleo Science* 57 (1): 47–52. doi:10.5650/jos.57.47.
- Bhatia, Latika, Sonia Johri, and Rumana Ahmad. 2012. "An Economic and Ecological Perspective of Ethanol Production from Renewable Agro Waste: A Review." *AMB Express* 2 (1). AMB Express: 65. doi:10.1186/2191-0855-2-65.
- Breunig, Kd, M Bolotin-Fukuhara, Mm Bianchi, D Bourgarel, C Falcone, I Ferrero, L Frontali, et al. 2000. "Regulation of Primary Carbon Metabolism in *Kluyveromyces Lactis*." *Enzyme and Microbial Technology* 26 (9-10): 771–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10862884>.
- Cancino, Beatriz, Valentina Espina, and Claudia Orellana. 2006. "Whey Concentration Using Microfiltration and Ultrafiltration." *Desalination* 200 (1-3): 557–58. doi:10.1016/j.desal.2006.03.463.
- Cheang, Beelin, and Andrew L. Zydney. 2004. "A Two-Stage Ultrafiltration Process for Fractionation of Whey Protein Isolate." *Journal of Membrane Science* 231 (1-2): 159–67. doi:10.1016/j.memsci.2003.11.014.
- Cheryan, Munir. 1998. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Vasa. doi:97-62251.

- Custódio, M. F., a. J. Goulart, D. P. Marques, R. Giordano, R. L. C. Giordano, and R. Monti. 2005. "Hydolysis of Cheese Whey Proteins with Trypsin, Chymotrypsin and Carboxypeptidase A." *Alimentos E Nutrição Araraquara* 16 (2): 105–9.
- D', N M D Souza, and D E Wiley. 2003. "Whey Ultrafiltration : Effect of Operating Parameters on Flux and Rejection." *Chemical Engineering*, 1–6.
- Daufin, G., F. Michel, and U. Merin. 1992. "Study of Ultrafiltration of Defatted Whey Protein Concentrates (WPC) Withdrawn from an Industrial Plant ." *Le Lait* 72 (2): 185–99. doi:10.1051/lait:1992213.
- Deesuth, Orawan, Pattana Laopaiboon, Prasit Jaisil, and Lakkana Laopaiboon. 2012. "Optimization of Nitrogen and Metal Ions Supplementation for Very High Gravity Bioethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice Using an Orthogonal Array Design." *Energies* 5 (9): 3178–97. doi:10.3390/en5093178.
- Domingues, Lucília, Maria M. Dantas, Nelson Lima, and José a. Teixeira. 1999. "Continuous Ethanol Fermentation of Lactose by a Recombinant Flocculating *Saccharomyces Cerevisiae* Strain." *Biotechnology and Bioengineering* 64 (6): 692–97. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19990920)64:6<692::AID-BIT8>3.0.CO;2-J.
- Domingues, Lucília, Pedro M R Guimarães, and Carla Oliveira. 2010. "Metabolic Engineering of *Saccharomyces Cerevisiae* for Lactose/whey Fermentation." *Bioengineered Bugs* 1 (3): 164–71. doi:10.4161/bbug.1.3.10619.
- Domingues, Lucília, Nelson Lima, and José a. Teixeira. 2001. "Alcohol Production from Cheese Whey Permeate Using Genetically Modified Flocculent Yeast Cells." *Biotechnology and Bioengineering* 72 (5): 507–14. doi:10.1002/1097-0290(20010305)72:5<507::AID-BIT1014>3.0.CO;2-U.
- Domínguez-Bocanegra, Alma Rosa, Jorge Antonio Torres-Muñoz, and Ricardo Aguilar López. 2015. "Production of Bioethanol from Agro-Industrial Wastes." *Fuel* 149: 85–89. doi:10.1016/j.fuel.2014.09.062.
- Golbandi, R., M. a. Abdi, a. a. Babaluo, a. B. Khoshfetrat, and T. Mohammadlou. 2013. "Fouling Study of TiO₂-Boehmite MF Membrane in Defatting of Whey Solution: Feed Concentration and pH Effects." *Journal of Membrane Science* 448. Elsevier: 135–42. doi:10.1016/j.memsci.2013.07.039.
- González Siso, M. I. 1996. "The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: A Review." *Bioresource Technology* 57 (1): 1–11. doi:10.1016/0960-8524(96)00036-3.
- González-Siso, Mi, Ma Freire-Picos, E Ramil, M González-Domínguez, Rodríguez Torres A, and Me Cerdán. 2000. "Respirofermentative Metabolism in *Kluyveromyces Lactis*: Insights and Perspectives." *Enzyme and Microbial Technology* 26 (9-10): 699–705. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10862875>.
- Guimarães, Pedro M R, J. A. Teixeira, and L. Domingues. 2008. "Alcoholic Fermentation of Lactose by Engineered Flocculent."
- Guimarães, Pedro M R, José A. Teixeira, and Lucília Domingues. 2010. "Fermentation of Lactose to Bio-Ethanol by Yeasts as Part of Integrated Solutions for the Valorisation of Cheese Whey." *Biotechnology Advances* 28 (3). Elsevier Inc.: 375–84. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.002.

- Guimarães, Pedro Miguel Reis. 2008. "Physiology of Yeasts in Alcoholic Fermentation Processes." *Tese de Doutorado Em Engenharia Química E Biológica Pela Universidade Do Minho*.
- Hernández-Ledesma, Blanca, Mercedes Ramos, and José Ángel Gómez-Ruiz. 2011. "Bioactive Components of Ovine and Caprine Cheese Whey." *Small Ruminant Research* 101 (1-3): 196–204. doi:10.1016/j.smallrumres.2011.09.040.
- House, John Wickliffe. 2005. "Estimate of the Energy Potential for Fuel Ethanol from Putrescible Waste in New Zealand."
- Ishtar Snoek, I., and H. Yde Steensma. 2006. "Why Does *Kluyveromyces Lactis* Not Grow under Anaerobic Conditions? Comparison of Essential Anaerobic Genes of *Saccharomyces Cerevisiae* with the *Kluyveromyces Lactis* Genome." *FEMS Yeast Research* 6 (3): 393–403. doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00007.x.
- Jayaprakasha, H M, and Y C Yoon. 2003. "Production of Functional Whey Protein Concentrate by Monitoring the Process of Ultrafiltration."
- Jedrzejewska, M, and K Kozak. 2011. "Ethanol Production from Whey Permeate in a Continuous Anaerobic Bioreactor by *Kluyveromyces Marxianus*." *Environmental Technology* 32 (1-2): 37–42. doi:10.1080/09593331003616805.
- Kankanamge, Renda, Chaturika Jeewanthi, Hyun-dong Paik, Myeong-hee Kim, Na-kyoung Lee, Soo-yeon Kim, and Yoh Chang Yoon. 2013. "CHARACTERISTICS OF WHEY PROTEIN HYDROLYSATES FROM CHEESE WHEY , FAVORS ON VARIOUS FOOD."
- Kargi, Fikret, and Serpil Ozmihci. 2006. "Utilization of Cheese Whey Powder (CWP) for Ethanol Fermentations: Effects of Operating Parameters." *Enzyme and Microbial Technology* 38 (5): 711–18. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.11.006.
- Kelly, Sean T., and Andrew L. Zydney. 1997. "Protein Fouling during Microfiltration: Comparative Behavior of Different Model Proteins." *Biotechnology and Bioengineering* 55 (1): 91–100. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970705)55:1<91::AID-BIT11>3.0.CO;2-6.
- Kosikowski, Frank V. 1979. "Whey Utilization and Whey Products." *Journal of Dairy Science* 62 (7): 1149–60. doi:10.3168/jds.S0022-0302(79)83389-5.
- Koushki, Mohammadreza, Mojtaba Jafari, and Mohammadhosein Azizi. 2012. "Comparison of Ethanol Production from Cheese Whey Permeate by Two Yeast Strains." *Journal of Food Science and Technology* 49 (5): 614–19. doi:10.1007/s13197-011-0309-0.
- Kumar, P, N Sharma, R Ranjan, S Kumar, Z F Bhat, and D K Jeong. 2013. "Perspective of Membrane Technology in Dairy Industry: A Review." *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 26 (9): 1347–58. doi:10.1093/biostatistics/manuscript-acf-v5.
- Laopaiboon, Lakkana, Sunan Nuanpeng, Penjit Srinophakun, Preekamol Klanrit, and Pattana Laopaiboon. 2009. "Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice Using Very High Gravity Technology: Effects of Carbon and Nitrogen Supplementations." *Bioresource Technology* 100 (18). Elsevier Ltd: 4176–82. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.046.

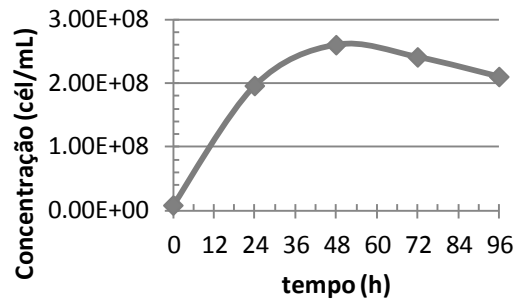
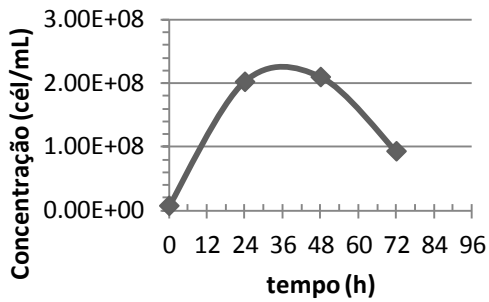
- Lima-Costa, Maria Emília, Catarina Tavares, Sara Raposo, Brígida Rodrigues, and José M. Peinado. 2012. "Kinetics of Sugars Consumption and Ethanol Inhibition in Carob Pulp Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae* in Batch and Fedbatch Cultures." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39 (5): 789–97. doi:10.1007/s10295-011-1079-4.
- Ling, Kc. 2008. "Whey to Ethanol: A Biofuel Role for Dairy Cooperatives?" <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Whey+to+Ethanol+:+A+Biofuel+Role+for+Dairy+Cooperatives+?#0> \n <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Whey+to+ethanol:+A+biofuel+role+for+dairy+cooperatives?#0>.
- Mišún, D., L. Čurda, and P. Jelen. 2008. "Batch and Continuous Hydrolysis of Ovine Whey Proteins." *Small Ruminant Research* 79 (1): 51–56. doi:10.1016/j.smallrumres.2008.07.008.
- Morais, Harriman Aley, Marialice Pinto Coelho Silvestre, Mauro Ramalho Silva, Viviane Dias Medeiros Silva, Marina Andrade Batista, Ana Cristina Simões e Silva, and Josiane Niccácio Silveira. 2013. "Enzymatic Hydrolysis of Whey Protein Concentrate: Effect of Enzyme Type and Enzyme:substrate Ratio on Peptide Profile." *Journal of Food Science and Technology* 52 (January): 1–10. doi:10.1007/s13197-013-1005-z.
- Mota, M. V T, I. M P L V O Ferreira, M. B P Oliveira, C. Rocha, J. a. Teixeira, D. Torres, and M. P. Gonçalves. 2006. "Trypsin Hydrolysis of Whey Protein Concentrates: Characterization Using Multivariate Data Analysis." *Food Chemistry* 94 (2): 278–86. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.016.
- Naik, S. N., Vaibhav V. Goud, Prasant K. Rout, and Ajay K. Dalai. 2010. "Production of First and Second Generation Biofuels: A Comprehensive Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2): 578–97. doi:10.1016/j.rser.2009.10.003.
- Nigam, Poonam Singh, and Anoop Singh. 2011. "Production of Liquid Biofuels from Renewable Resources." *Progress in Energy and Combustion Science* 37 (1). Elsevier Ltd: 52–68. doi:10.1016/j.peccs.2010.01.003.
- Nourbakhsh, Himan, Zahra Emam-Djomeh, Hossein Mirsaeedghazi, Mahmoud Omid, and Sohrab Moieni. 2014. "Study of Different Fouling Mechanisms during Membrane Clarification of Red Plum Juice." *International Journal of Food Science and Technology* 49 (1): 58–64. doi:10.1111/ijfs.12274.
- Oda, Yuji, and Kenji Nakamura. 2009. "Production of Ethanol from the Mixture of Beet Molasses and Cheese Whey by a 2-Deoxyglucose-Resistant Mutant of *Kluyveromyces Marxianus*." *FEMS Yeast Research* 9 (5): 742–48. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00519.x.
- Oh, N. S., H. a. Lee, J. Y. Lee, J.Y. Joung, K. B. Lee, Y. Kim, K. W. Lee, and S. H. Kim. 2013. "The Dual Effects of Maillard Reaction and Enzymatic Hydrolysis on the Antioxidant Activity of Milk Proteins." *Journal of Dairy Science* 96 (8): 4899–4911. doi:10.3168/jds.2013-6613.
- Pan, Kai, Qi Song, Lei Wang, and Bing Cao. 2011. "A Study of Demineralization of Whey by Nanofiltration Membrane." *Desalination* 267 (2-3): 217–21. doi:10.1016/j.desal.2010.09.029.

- Pescuma, Micaela, Elvira María Hébert, Fernanda Mozzi, and Graciela Font de Valdez. 2008. "Whey Fermentation by Thermophilic Lactic Acid Bacteria: Evolution of Carbohydrates and Protein Content." *Food Microbiology* 25 (3): 442–51. doi:10.1016/j.fm.2008.01.007.
- Pouliot, Yves. 2008. "Membrane Processes in Dairy Technology-From a Simple Idea to Worldwide Panacea." *International Dairy Journal* 18 (7): 735–40. doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.005.
- Prazeres, Ana R., Fátima Carvalho, and Javier Rivas. 2012. "Cheese Whey Management: A Review." *Journal of Environmental Management* 110. Elsevier Ltd: 48–68. doi:10.1016/j.jenvman.2012.05.018.
- Qi, Wei, and Zhimin He. 2006. "Enzymatic Hydrolysis of Protein: Mechanism and Kinetic Model." *Frontiers of Chemistry in China* 1 (3): 308–14. doi:10.1007/s11458-006-0026-9.
- Reece, Jane B, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, and Robert B. Kackson. 2011. *Biology*. 10th ed. Pearson.
- Rezaei, H, F Zokaee Ashtiani, and A Fouladitajar. 2014. "FOULING BEHAVIOR AND REZAEI, H., ASHTIANI, F. Z., & FOULADITAJAR, A. (2014). FOULING BEHAVIOR AND PERFORMANCE OF MICROFILTRATION MEMBRANES FOR WHEY TREATMENT IN STEADY AND UNSTEADY-STATE CONDITIONS, 31(02), 503–518.PERFORMANCE OF MICROFILTRATION MEMBRANES" 31 (02): 503–18.
- Rodrigues, B., J.M Peinado, S. Raposo, A. Constantino, C. Quintas, and M.E. Lima-Costa. 2015. "Kinetic and Energetic Parameters of Carob Wastes Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae* : Crabtree Effect, Ethanol Toxicity, and Invertase Repression" 25 (6): 837–44.
- Shin, Hyun Soo, Sang Bum Kim, Soo Cheol Kang, Muhammad Ajmal Khan, Hyeon Shup Kim, Hyun Jung Shin, and Chi Hoon Chang. 2010. "Production of Low Antigenic Cheese Whey Protein Hydrolysates Using Mixed Proteolytic Enzymes." *Science of Food and Agriculture* 10 (2): 103. doi:10.1002/jsfa.
- Silveira, W. B., F. J V Passos, H. C. Mantovani, and F. M L Passos. 2005. "Ethanol Production from Cheese Whey Permeate by *Kluyveromyces Marxianus* UFV-3: A Flux Analysis of Oxido-Reductive Metabolism as a Function of Lactose Concentration and Oxygen Levels." *Enzyme and Microbial Technology* 36 (7): 930–36. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.01.018.
- Silvestre, Marialice P C, Maitê C. da Silva, Mariana W S de Souza, Viviane D M Silva, Marcos J B de Aguiar, and Mauro R. Silva. 2013. "Hydrolysis Degree, Peptide Profile and Phenylalanine Removal from Whey Protein Concentrate Hydrolysates Obtained by Various Proteases." *International Journal of Food Science and Technology* 48 (3): 588–95. doi:10.1111/ijfs.12003.
- Silvestre, Marialice Pinto Coelho, Harriman Aley Morais, Mauro Ramalho Silva, Mariana Wanessa Santana de Souza, and Viviane Dias Medeiros Silva. 2012. "Preparation and Analysis of Hydrolysates from Whey Protein Concentrate Using the Proteases from *Bacillus Licheniformis* and *Aspergillus Oryzae*." *International Journal of Food Science and Technology* 47 (7): 1532–39. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03003.x.
- Siso, M. I González, E. Ramil, M. E. Cerdán, and M. a. Freire-Picos. 1996. "Respirofermentative Metabolism in *Kluyveromyces Lactis*: Ethanol Production and the

- Crabtree Effect.” *Enzyme and Microbial Technology* 18 (8): 585–91. doi:10.1016/0141-0229(95)00151-4.
- Smithers, Geoffrey W. 2008. “Whey and Whey Proteins-From ‘Gutter-to-Gold.’” *International Dairy Journal* 18 (7): 695–704. doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.008.
- Sridee, Worawut, Lakkana Laopaiboon, Prasit Jaisil, and Pattana Laopaiboon. 2011. “The Use of Dried Spent Yeast as a Low-Cost Nitrogen Supplement in Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice under Very High Gravity Conditions.” *Electronic Journal of Biotechnology* 14 (6). doi:10.2225/vol14-issue6-fulltext-5.
- Tortora, Gerard J., Berdell R. Funke, and Christine L. Case. 2012. *Microbiologia*. 10^a ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed.
- Van den Berg, G.B., and C.A. Smolders. 1990. “Flux Decline in Ultrafiltration Processes.” *Desalination* 77: 101–33. doi:10.1016/0011-9164(90)85023-4.
- Wang, Lei, Xudong Wang, and Ken-ichi Fukushi. 2008. “Effects of Operational Conditions on Ultrafiltration Membrane Fouling.” *Desalination* 229 (1-3): 181–91. doi:10.1016/j.desal.2007.08.018.
- Wit, J.N. 2001. “Lecturer ’ S Handbook on Whey and Whey Products.” *The European Whey Products Association.*, 91.
- Ye, Hui, Jinjin Lei, Yuzhong Zhang, Hong Li, Guangfen Li, Zhanping Cao, and Liping Xie. 2014. “Investigation of Microfiltration for Pretreatment of Whey Concentration Investigation of Microfiltration for Pretreatment of Whey Concentration,” no. April: 37–41.
- Yue, Guojun, Jianliang Yu, Xu Zhang, and Tianwei Tan. 2012. “The Influence of Nitrogen Sources on Ethanol Production by Yeast from Concentrated Sweet Sorghum Juice.” *Biomass and Bioenergy* 39. Elsevier Ltd: 48–52. doi:10.1016/j.biombioe.2010.08.041.
- Zafar, Salman, and Mohammad Owais. 2006. “Ethanol Production from Crude Whey by *Kluyveromyces Marxianus*.” *Biochemical Engineering Journal* 27 (3): 295–98. doi:10.1016/j.bej.2005.05.009.
- Zhao, Yan-ju, Kai-fen Wu, Zhen-jun Wang, Liang Zhao, and Shu-shen Li. 2000. “Fouling and Cleaning of Membrane - a Literature Review.pdf.” *Journal of Environmental Sciences*, 11.

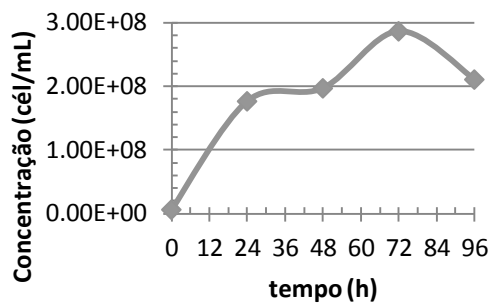
7. Anexos

Anexo I – UFCs e pH

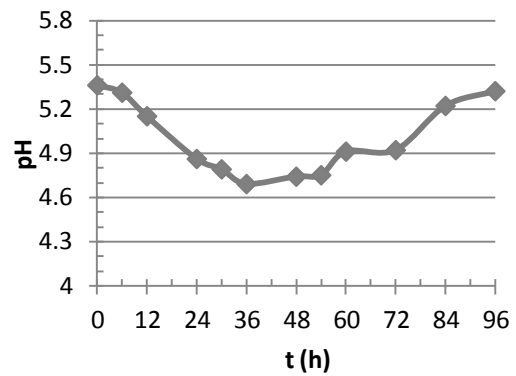
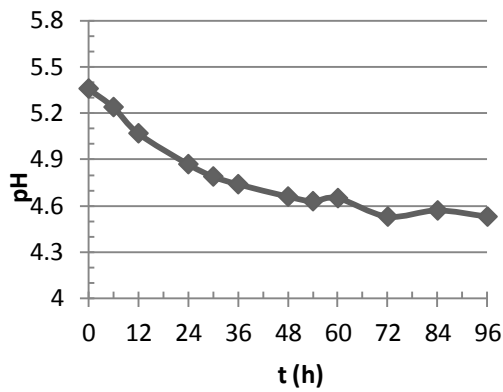


◆ A - K. lactis (5 g/L peptona e 3 g/L YE)

◆ B - K. lactis (8 g/L WPC)

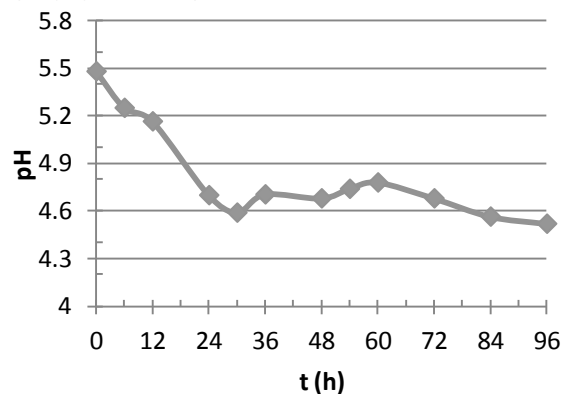


◆ C - K. lactis (s/ fonte azoto)



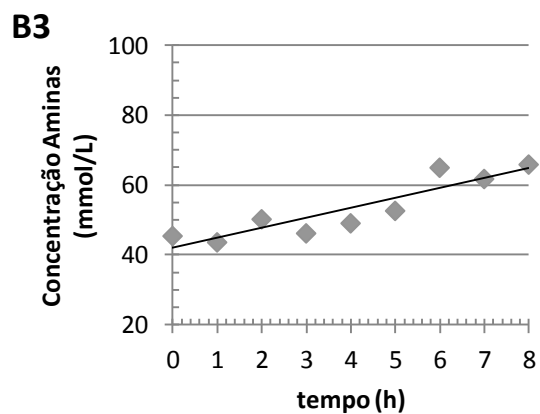
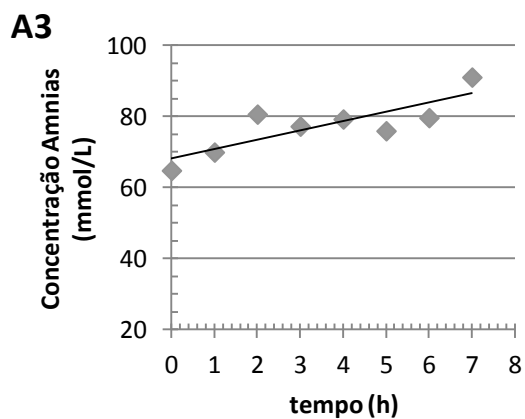
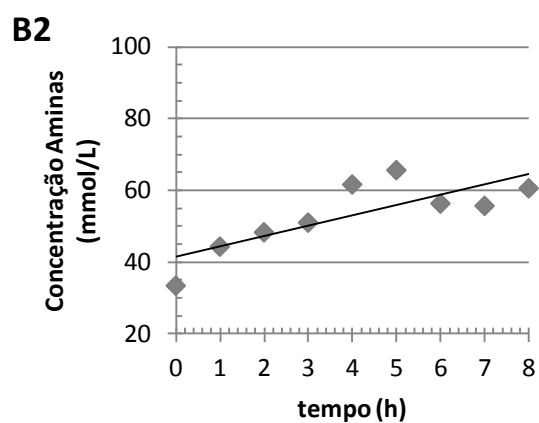
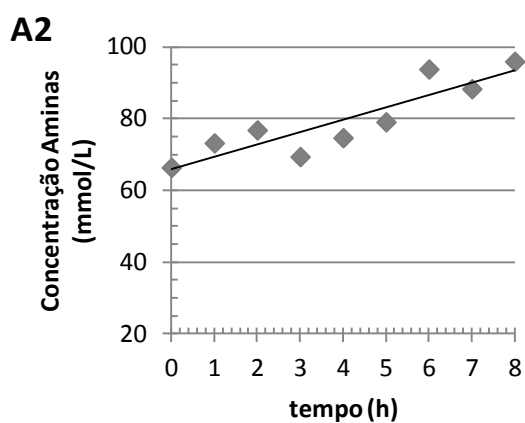
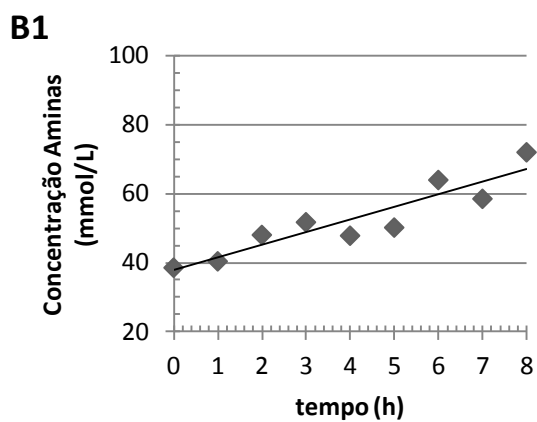
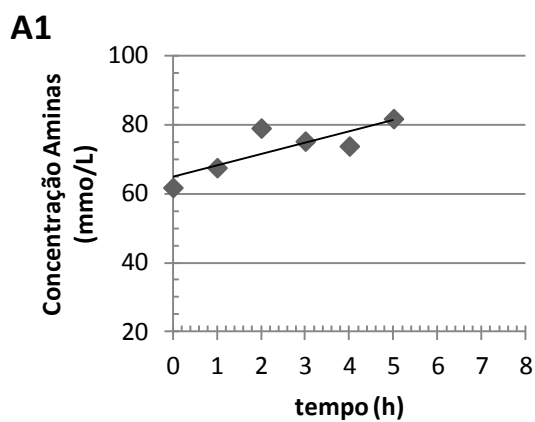
◆ A - K. lactis (5 g/L peptona e 3 g/L YE)

◆ B - K. lactis (8 g/L WPC)



◆ C - K. lactis (s/ fonte azoto)

Anexo II- Cinética de hidrólise



Hidrólise cinética usando as proteases de *Aspergillus oryzae* (A) e a Bromelaina (B) num rácio de enzima:substrato de 4:100.

Anexo III – UFCs e pH

