

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**Produção de Etanol por Leveduras em Biorreatores com Células Livres e  
Imobilizadas Utilizando Soro de Queijo**

Renata Ferreira Silveira  
Química Industrial – UFSM

Dissertação apresentada como requisito á obtenção do grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre – RS, Brasil.  
Abril de 2006.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPG-MAA) da Universidade do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Ao Prof. Dr. **Marco Antonio Záchia Ayub**, orientador da pesquisa, pela oportunidade de trabalhar neste projeto e fazer parte do grupo de pesquisas do BiotecLab.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Rosane Rech** minha eterna admiração e gratidão pela amizade, apoio, paciência e dedicação ao longo de toda sua co-orientação e, principalmente por ter acreditado no desenvolvimento do projeto quando todos duvidavam.

Às bolsistas de iniciação científica **Daniella e Karla** pelo empenho e amizade durante a realização do projeto.

Aos funcionários e professores do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que de alguma forma colaboraram com a pesquisa.

Aos colegas do BiotecLab pelo companheirismo. Ao **João, Juliano e Geizecler** pela amizade sincera, compreensão e apoio incondicional.

À minha **família querida** que sempre acreditou em mim e na minha força de vontade: obrigada pelo apoio, carinho, incentivo e dedicação.

# Produção Contínua de Etanol em Biorreator por Células de Levedura

## Imobilizadas

Autor: Renata Ferreira Silveira.

Orientador: Marco Antonio Záchia Ayub, PhD.

Co-orientador: Rosane Rech, Dr<sup>a</sup>.

### Resumo

Este projeto tem como finalidade o estudo da produção contínua de etanol em biorreator, por células de levedura imobilizadas por envolvimento, usando como meio de cultivo soro de queijo, um resíduo industrial potencialmente poluente.

Na primeira etapa do estudo foi determinada, usando processo em batelada, a temperatura ótima para ser aplicada nos biorreatores de 30<sup>o</sup>C para a *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 e de 37<sup>o</sup>C para a *Saccharomyces cerevisiae* recombinante BLR 014.

Posteriormente, foram realizados cultivos em biorreator contínuo de mistura completa (CSTR) com as células livres em suspensão para comparação com a produtividade de cultivos imobilizados. Os resultados mostraram que para a *K. marxianus* a taxa máxima a ser aplicada ao sistema é de 0,20 h<sup>-1</sup> e para a *S. cerevisiae* recombinante de 0,10 h<sup>-1</sup>.

Na etapa final, foram realizados os cultivos com as células imobilizadas por envolvimento em alginato de cálcio usando biorreator de fluxo pistonado com diferentes taxas de diluição (0,05 h<sup>-1</sup>, 0,10 h<sup>-1</sup> e 0,20 h<sup>-1</sup>). Os resultados sugerem que ambas as cepas de levedura perdem produtividade com o decorrer do tempo de cultivo nas taxas de diluição maiores, provavelmente pela perda de viabilidade.

Com o objetivo de averiguar se a perda de produtividade foi causada pela técnica de imobilização ou pela presença de componentes tóxicos no soro de queijo foram realizados experimentos com *K. marxianus* e uma cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* Kl em meio complexo YEPD. A cepa comercial não apresentou a perda de produtividade e a *K. marxianus* mostrou o mesmo perfil para ambos os meios, demonstrando que a imobilização e a composição do soro não afetam a produtividade, assim provavelmente esta queda seja causada por características no crescimento e metabolismo das cepas em questão.

Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente –

Tecnologia de Bioprocessos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (130). Abril, 2006.

## Continuous Ethanol Fermentation by Immobilized Yeasts Cell in Reactor

Author: Renata Ferreira Silveira.

Advisor: Marco Antonio Záchia Ayub, PhD.

Co-advisor: Rosane Rech, Dr<sup>a</sup>.

### ABSTRACT

The aim of this present work was to study a continuous alcohol production from cheese whey (potential pollutant) using immobilized yeasts cells.

In the first step of this work, the best temperature to be used on the bioreactor was determined using batch cultures. The temperature was 30°C to *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 and 37°C to *Saccharomyces cerevisiae* recombinant BLR 014.

After this, were made cultivations on continuous stirred tank reactor (CSTR) using free cells for productivity comparison with immobilized cells reactors. Our results showing that maximum dilution rate to *K. marxianus* was 0.20 h<sup>-1</sup> and to *S. cerevisiae* recombinant was 0,10 h<sup>-1</sup> before cells wash out.

In the final step, were made cultivations using alginate-immobilized cells in a plug-flow reactor with different dilution rates (0.05 h<sup>-1</sup>, 0.10 h<sup>-1</sup> and 0.20 h<sup>-1</sup>). The results suggest that both yeast strains lost productivity when the high dilution rates was applied on the sistem, probably because the lost of cells viability.

To investigate if the lost of productivity was consequence of immobilization technique or the presence of toxics or inhibitory components, were made cultivations on a complexe medium using a comercial strain *S. cerevisiae* Kl and *K. marxianus*. The results showing that the comercial strain did not loose productivity so drastically and the *K. marxianus* showing the same behavior. In addition, the productivity lost probably was a consequence of metabolism and growth characteristics of the strains.

Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (130.p)

April, 2006.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Produção de Etanol .....	15
2.2 Soro de Queijo.....	17
2.2.1 Produção de Etanol a partir de Soro de Queijo.....	22
2.3 Biorreatores .....	24
2.3.1 Configuração dos Biorreatores .....	27
2.3.1.1 Biorreator de Tanque Agitado .....	29
2.3.1.2 Biorreator de Leito Empacotado .....	29
2.3.2 Modo de Operação dos Biorreatores .....	30
2.3.2.1 Operação Contínua em Biorreatores Agitados .....	31
2.3.2.2 Operação Contínua em Biorreatores de Fluxo Pistonado.....	32
2.3.3 Comparação entre os Modelos e Modos de Operação de Biorreatores .....	34
2.4 Procedimentos de Imobilização.....	36
2.4.1 Vantagens e Desvantagens da Imobilização .....	39
2.4.2 Impactos da Imobilização.....	41
2.4.2.2 Efeitos da Heterogeneidade da Biomassa Imobilizada .....	43
2.4.3 Técnica de Envolvimento .....	44
2.4.4 Matriz- Suporte: Alginato de Cálcio.....	46
2.5 Bioconversão da Lactose .....	48
2.6 Levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	50
2.7 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante .....	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	57
3.1 Reagentes Químicos .....	57
3.2 Microrganismos .....	58
3.3 Manutenção das Culturas dos Microrganismos.....	59
3.4 Teste de Pureza para as Culturas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante .....	60
3.5 Preparo do Pré-inóculo.....	61
3.6 Obtenção da Suspensão de Células e Técnica de Imobilização .....	62
3.7 Cultivo em Batelada .....	63
3.8 Cultivo em Biorreator Mistura Completa ou Mecanicamente Agitado (CSTR) .....	64
3.9 Cultivo em Biorreator Tubular de Fluxo Pistonado (PFR).....	65
3.10 Técnicas Analíticas.....	67
3.10.1 Biomassa .....	68
3.10.1.1 Densidade Ótica.....	68
3.10.1.2 Peso Seco.....	68
3.10.1.3 Viabilidade Celular .....	69
3.10.2 Medida de Açúcares Redutores Totais .....	70
3.10.3 Medida de Etanol .....	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	72
4.1 Cultivos em Batelada com Células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	72
4.2 Cultivos em Batelada com Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante.....	77

4.3 Cultivos em Biorreator Contínuo de Mistura Completa (CSTR) com Células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante.....	83
4.3.1 Teste de Estabilidade em Biorreator CSTR .....	83
4.3.2 Experimentos com Taxas de Diluição Variáveis em Biorreator CSTR com Células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	88
4.3.3 Teste de Diferentes Taxas de Diluição em Biorreator CSTR com Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante .....	91
4.4 Cultivos em Biorreator Contínuo de Fluxo Pistonado com Células Imobilizadas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Recombinante .....	94
4.4.1 Teste de Diferentes Taxas de Diluição em Biorreator PFR com Células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> em Soro de Queijo .....	94
4.4.2 Teste de Diferentes Taxas de Diluição em Biorreator PFR com Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante em Soro de Queijo .....	102
4.5 Cultivos em Biorreator Contínuo de Fluxo Pistonado com Células Imobilizadas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Comercial e <i>Kluyveromyces marxianus</i> com Meio Complexo .....	107
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	114
6. BIBLIOGRAFIA .....	116
7. APÊNDICE.....	131

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principais Tipos de Biorreatores.....	27
<b>Figura 2:</b> Métodos Básicos de Imobilização (Kourkoutas, 2004).....	38
<b>Figura 3:</b> Esquemas de Obtenção de Esferas de Alginato contendo Células de Leveduras pela Técnica de Envolvimento.....	45
<b>Figura 4:</b> Degradação da Lactose por Células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (Lee, 1996).....	49
<b>Figura 5:</b> Esquema de Biorreator Contínuo de Mistura Completa (CSTR) com Células Livres em Suspensão.....	65
<b>Figura 6:</b> Esquema do Modelo de Biorreator de Fluxo Pistonado com Células Imobilizadas (Najafpour,2004).....	67
<b>Figura 7:</b> Consumo de Açúcares Redutores e Produção de etanol por Células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 Livres e Imobilizadas em Ca-alginato experimentos em “shaker”.....	74
<b>Figura 8:</b> Consumo de Açúcares Redutores e Produção de etanol por Célula de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante BLR 0,14 Livres e Imobilizadas em Ca-alginato experimentos em “shaker”.....	78
<b>Figura 9:</b> Comparação na Produção de Etanol com Células Livres e Imobilizadas de <i>K. marxianus</i> CBS 6556 e <i>S. cerevisiae</i> recombinante BLR 014.....	82
<b>Figura 10:</b> consumo de açúcares redutores (lactose), produção de etanol, biomassa, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator mistura completa mecanicamente agitado com células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBs 6556 a 30 <sup>0</sup> C. D= 0,05 h <sup>-1</sup> .....	84
<b>Figura 11:</b> consumo de açúcares redutores, produção de etanol, biomassa, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator mistura completa mecanicamente agitado com células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante BLR 014 a 37 <sup>0</sup> C. D= 0,05 h <sup>-1</sup> .....	86

<b>Figura 12:</b> consumo de açúcares redutores, produção de etanol e biomassa em cultivo em biorreator contínuo mistura completa mecanicamente agitado com células livres de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 a 30 <sup>0</sup> C, com variação na taxa de diluição.....	89
<b>Figura 13:</b> comparação entre a produtividade ( $Q_P$ ) e a conversão lactose em etanol ( $Y_{P/S}$ ) em diferentes taxas de diluição em biorreator CSTR com <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 livres em suspensão a 30 <sup>0</sup> C.....	90
<b>Figura 14:</b> consumo de açúcares redutores, produção de etanol e biomassa em cultivo em biorreator contínuo mistura completa mecanicamente agitado com células livres de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante BLR 014 a 37 <sup>0</sup> C, com variação na taxa de diluição.....	92
<b>Figura 15:</b> consumo de açúcares redutores, produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator de fluxo pistonado com células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 a 30 <sup>0</sup> C. $D=0,05\text{ h}^{-1}$ e $X_0=0,04\text{g}$ de células por mL de alginato.....	95
<b>Figura 16:</b> consumo de açúcares redutores, produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator de fluxo pistonado com células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 a 30 <sup>0</sup> C. $D=0,10\text{ h}^{-1}$ e $X_0=0,04\text{g}$ de células por mL de alginato.....	97
<b>Figura 17:</b> consumo de açúcares redutores, produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator de fluxo pistonado com células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 a 30 <sup>0</sup> C. $D=0,20\text{ h}^{-1}$ e $X_0=0,04\text{g}$ de células por mL de alginato.....	99



<b>Figura 18:</b> Comparação da produtividade ( $Q_p$ ) e a taxa de conversão em diferentes taxas de diluição em biorreator PFR com <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 imobilizadas em Ca-alginato a 30°C com diferentes concentrações iniciais de células imobilizadas.....	101
<b>Figura 19:</b> Consumo de açúcares redutores, produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator de fluxo pistonado com células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante BLR 014 a 37°C. $D= 0,05 \text{ h}^{-1}$ e $X_0= 0,04\text{g}$ de células por mL de alginato.....	103
<b>Figura 20:</b> Consumo de açúcares redutores, produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator de fluxo pistonado com células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante BLR 014 a 37°C. $D= 0,10 \text{ h}^{-1}$ e $X_0= 0,04\text{g}$ de células por mL de alginato.....	105
<b>Figura 21:</b> consumo de açúcares redutores, produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator contínuo de fluxo pistonado com células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KI imobilizadas em Ca-alginato a 37°C. $D= 0,10 \text{ h}^{-1}$ $X_0= 0,04 \text{ g}$ de células por mL de alginato.....	108
<b>Figura 22:</b> consumo de açúcares redutores, produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator contínuo de fluxo pistonado com células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KI imobilizadas em Ca-alginato a 37°C. $D= 0,20 \text{ h}^{-1}$ $X_0= 0,04 \text{ g}$ de células por mL de alginato.....	109
<b>Figura 23:</b> consumo de açúcares redutores, produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator contínuo	

de fluxo pistonado com células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556  
imobilizadas em Ca-alginato a 30<sup>0</sup>C. D= 0,10 h<sup>-1</sup> X<sub>0</sub>= 0,04 g de células por mL  
de alginato.....111

**Figura 24:** consumo de açúcares redutores, produção de etanol, biomassa  
liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator contínuo  
de fluxo pistonado com células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556  
imobilizadas em Ca-alginato a 30<sup>0</sup>C. D= 0,20 h<sup>-1</sup> X<sub>0</sub>= 0,04 g de células por mL  
de alginato.....112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação Geral dos Biorreatores (Schmidell.Et Al., 2001).....	26
<b>Tabela 2:</b> Composição do Soro de Queijo em Pó Elegê. ....	58
<b>Tabela 3:</b> Características do Biorreator Tubular de Fluxo Pistonado.....	66
<b>Tabela 4:</b> Curva de Calibração Método do DNSA.....	71
<b>Tabela 5:</b> Conversão da Lactose em Etanol para 24 h de Cultivos com Células Livres e Imobilizadas a 30 <sup>0</sup> C, 37 <sup>0</sup> C e 45 <sup>0</sup> C.....	75
<b>Tabela 6:</b> Conversão da Lactose em Etanol para 24 h de Cultivos com Células Livres e Imobilizadas a 25 <sup>0</sup> C, 30 <sup>0</sup> C e 37 <sup>0</sup> C.....	80
<b>Tabela 7:</b> Produtividade ( $Q_P$ ) e a conversão em etanol ( $Y_{P/S}$ ) na taxa de diluição de 0,05 h <sup>-1</sup> em biorreator CSTR com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante BLR 014 livres em suspensão a 37 <sup>0</sup> C.....	100

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

<b>DBO</b>	Demanda Bioquímica de Oxigênio
<b>WPC</b>	Concentrado protéico de soro de queijo
<b>CSTR</b>	Biorreator Tanque Agitado Contínuo (“continuous stirred tank reactor”)
<b>PFR</b>	Biorreator de Fluxo Pistonado (“plug-flow”)
<b>GRAS</b>	“Generally Recognized as Safe”
<b>MYPD</b>	Meio de Armazenamento para Leveduras
<b>YEPD</b>	Meio de Crescimento Complexo para Leveduras
<b>YNB</b>	Meio Base de Nitrogênio sem aminoácidos e sulfato de amônio (‘Yeast nitrogen base’)
<b>DNSA</b>	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
<b>rpm</b>	Rotações por Minuto
<b>Km</b>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<b>Sc<sup>R</sup></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante
<b>Sc</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KI comercial

## 1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo, um subproduto da indústria laticinista, é um poluente potencial das águas residuárias devido à sua alta concentração de substâncias orgânicas (principalmente lactose e proteínas) as quais impõem um alto valor na demanda bioquímica de oxigênio às plantas de tratamento de efluentes.

Uma parte deste soro pode ser tratada através de processos preliminares para a produção de concentrados protéicos e ração animal, todavia estes processos têm alto custo e ainda geram uma grande quantidade de permeado rico em lactose, cuja disposição permanece sendo um problema ambiental.

Dentro deste contexto, o presente projeto propõe uma alternativa tecnológica que tem sido abordada com sucesso: a utilização do soro como substrato para a propagação de biomassa, para a conversão da lactose e geração de produtos de interesse (etanol). Uma forma de otimizar e intensificar o processo de redução da carga poluente do soro de queijo é a associação deste às técnicas de imobilização de biomassa celular as quais apresentam inúmeras vantagens, tais como o aumento da estabilidade celular, melhoria da produtividade, redução da fase de crescimento não produtivo, diminuição dos

custos de purificação e possibilidade de fermentações em colunas de operação contínua.

O estudo visa, portanto, aliar a diminuição da carga poluente de um efluente industrial com a obtenção de um produto de interesse comercial de alta pureza e alto valor agregado a baixos custos de produção pelo desenvolvimento de cultivos em biorreatores de operação contínua com células imobilizadas. Onde, especificamente, serão utilizadas células de leveduras de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 e *Saccharomyces cerevisiae* BLR 014 recombinante imobilizadas por envolvimento em gel de alginato e acondicionadas em biorreatores de fluxo pistonado (PFR), visando a conversão da lactose em biomassa e etanol.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Produção de Etanol**

A ampla diversidade e versatilidade dos microrganismos têm conduzido ao desenvolvimento e ampliação das fermentações industriais nos dias atuais. Esses microrganismos atuam como catalisadores da síntese de produtos, que podem ser desde pequenas moléculas (como etanol) ou macromoléculas extremamente complexas (como enzimas) (Mazid, 1993).

O desenvolvimento de pesquisas para a produção de biocombustíveis alternativos tem sido bastante significativo nos últimos anos, devido principalmente à preocupação com a exaustão das reservas de combustíveis fósseis, como por exemplo o petróleo. Desta forma a produção de etanol tem emergido como uma das estratégias mais viáveis no que diz respeito a fontes não convencionais de energia, uma vez que esse bioproduto tem inúmeras aplicações tanto na área farmacêutica, quanto na química ou alimentícia (Zafar et al., 2005).

A importância socioeconômica da produção biológica de etanol no Brasil e no mundo, tendo em vista a utilização deste produto como fonte combustível ecologicamente correta tem ganhado atenção das últimas décadas, principalmente pelas tentativas de implantação do uso de

combustíveis alternativos, visando à redução do consumo de combustíveis fósseis, além dos avanços nas pesquisas e nos procedimentos tecnológicos do processo fermentativo (Marques, 2004).

A utilização de etanol como combustível decorreu da necessidade de reduzir a dependência do país à importação de petróleo, desta forma foi criado o PROALCOOL, que inicialmente foi atrativo aos usineiros e produtores de cana-de-açúcar. Entretanto, foi estabelecida uma situação complexa envolvendo órgãos governamentais e a PETROBRÁS que questionaram a eficiência do plano a ser adotado e a impossibilidade de sua implantação com sucesso (Santos, 2002). Apesar disso, o PROALCOOL foi implementado com pesados investimentos estatais e privados e obteve enorme sucesso entre as décadas de 70 e 80, todavia com aumentos no preço do açúcar e a necessidade de ampliação das áreas de cultivo a atratividade da produção de etanol por essa via foi reduzida, demonstrando a necessidade de melhores métodos de planejamento, no que tange a variáveis sociais, ambientais e econômica (Santos, 2002).

Simultaneamente ao desenvolvimento do PROALCOOL, outras alternativas de produção de etanol têm sido desenvolvidas com relativo êxito. Como por exemplo, a utilização de resíduos agrícolas (como bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, trigo, soja e milho) por microrganismos geneticamente modificados para a bioconversão dos açúcares em etanol com alta produtividade (Alterthum, 1995). Alterthum e colaboradores (1995) têm estudado a produção de etanol em grande escala, a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, empregando *Escherichia coli* recombinante.



Com a perspectiva de crescimento da demanda de álcool combustível, como aditivo de função ambiental (pela redução das emissões de CO dos carros) tecnologias capazes de melhorar a performance do processo ganham importância fundamental no país, assim ganhos em eficiência da produção e diminuição de custos de operação são fatores preponderantes para a competitividade em mercados mundiais (Brito, 2003). Em vista disso, Queiroz (2003) desenvolveu uma levedura modificada em laboratório capaz de sedimentar logo depois de terminada a fermentação, reduzindo assim custos de separação com centrifugação, tanto em energia quanto de manutenção de equipamentos.

Nos Estados Unidos a indústria que produz etanol como combustível a ser adicionado à gasolina, como forma de redução da dependência na importação de petróleo e estímulo a economia nacional principalmente nas áreas rurais, tem tido um crescimento explosivo nos últimos 15 anos (Taylor, 1996). A partir disso, interesse no melhoramento do processo de produção de etanol tem conduzido a pesquisas no sentido de melhorar a modelagem e operação dos fermentadores pela introdução do uso de fermentadores em cascata contínua com separação do produto final (Taylor, 1996).

## **2.2 Soro de Queijo**

O soro de queijo é o líquido remanescente da precipitação e remoção da caseína do leite durante a produção de queijo, mesmo sendo considerado um efluente industrial este bioproduto contém cerca de 55% dos

nutrientes do leite, sendo composto por 4,5-5% de lactose, 0,6-0,8% de proteínas solúveis (albuminas e globulinas), 0,4-0,5% de lipídeos e 8-10% de sais minerais, principalmente cloreto de sódio e cloreto de potássio, além de fosfato de cálcio. Existem também outros componentes no soro, tais como ácido láctico e cítrico, compostos nitrogenados na formação não protéica (como por exemplo uréia e ácido úrico), além de vitaminas do complexo B. Existem duas variedades de soro de queijo que são produzidas como efluente industrial, dependendo da técnica empregada para a precipitação da caseína. Portanto, o soro de queijo pode ser classificado como soro de queijo ácido e o soro doce. O soro de queijo ácido é o menos utilizado quando comparado com a variedade doce, principalmente por sua composição apresentar alto grau de cinzas, elevada concentração de sais e baixo conteúdo protéico, fato que confere um flavor ácido que prejudica sua aceitação quando empregado em alimentação (González Siso, 1996; Becerra et al, 2001; Szczodrak, 2000; Ponsano, 1995).

A indústria produtora de queijos gera grandes quantidades de soro como efluente, de acordo com Kosikowski (1979) cerca de 9 Kg de soro é gerado por Kg de queijo produzido, por esse motivo o soro tem sido usado em sua forma original na alimentação animal e também tem sido processado para a obtenção de soro em pó e bebidas lácteas (Ponsano, 1995). Entretanto, mesmo com as diversas possibilidades de exploração do soro de queijo que têm sido estudadas nos últimos anos, aproximadamente metade da produção mundial ainda não é tratada ou utilizada e é descartada como efluente (González Siso, 1996; Becerra et al, 2001; Szczodrak,2000).

O soro de queijo, mesmo passando pelo processo de desidratação, contém cerca de 65% de lactose e 10-15% de proteínas, fato que torna sua disposição um problema para a indústria laticinista, tanto quando sua disposição na forma líquida original. As altas concentrações de matéria orgânica, principalmente na forma de lactose, presentes no soro de queijo o tornam um efluente potencialmente poluente, por impor uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sendo considerado um problema às plantas de tratamento de efluentes líquidos. A disposição contínua do soro de queijo pode prejudicar a estrutura física e química do solo, diminuindo sua produtividade e ocasionando sérios problemas às águas residuárias e ambientais, como por exemplo o processo de eutrofização de rios e lagos (Ponsano, 1995; Gonzalez Siso, 1996; Belém, 1998).

Segundo Ponsano et al. (1995) o soro de queijo requer um tratamento despoluente antes de ser descartado junto ao meio ambiente, fato que acarreta um aumento dos custos de disposição deste resíduo para a indústria em questão. As atuais políticas governamentais de proteção ao meio ambiente, além de órgãos que controlam e fiscalizam a poluição ambiental, juntamente com o reconhecimento do valor nutricional e comercial do soro de queijo como um bioproduto de valor agregado, fez com que aumentasse o interesse em pesquisas com a finalidade de introduzir novos métodos de disposição e aproveitamento do soro. Portanto, o soro de queijo, tradicionalmente considerado como um bioproduto indesejável passou a ser reconhecido como uma fonte potencial de nutrientes que tem estimulado o

desenvolvimento de processos viáveis comercialmente de conversão do soro em bioprodutos de alto valor agregado.

Uma das formas de aproveitamento do soro de queijo é seu processamento para a fabricação de produtos alimentícios, tanto na sua forma líquida ou na forma de soro de queijo enriquecido, como concentrados protéicos e bioprodutos com lactose. O soro de queijo sem tratamento pode servir diretamente tanto como suplemento na ração animal, como pode ser usado como fertilizante na agricultura (apesar de gerar depósitos salinos) (Gonzáles Siso, 1996). O soro de queijo, quando passa por tratamentos preliminares, pode ser utilizado como soro enriquecido ou condensado, soro desmineralizado, desproteínizado e soro com ausência de lactose. O principal uso destes últimos é na alimentação animal e em pequenas quantidades podem ser usados na alimentação humana. Outro produto bastante explorado é o concentrado de proteína do soro (whey protein concentrate –WPC) que são aplicados a vários tipos de alimentos usados na dieta de recém nascidos e diabéticos (Gonzáles Siso, 1996).

Contudo durante a fabricação de vários destes produtos é gerado um permeado com alto conteúdo de lactose como subproduto, o qual permanece o problema de disposição pela alta demanda bioquímica de oxigênio. A partir disso, diversas possibilidades de utilização deste açúcar têm sido consideradas, tais como a cristalização da lactose para a fabricação de suplementos na alimentação infantil e a sua aplicação em produtos farmacêuticos (Yves, 1979). Ou ainda sua aplicação na fermentação direta da lactose ou fermentação da glicose e galactose (obtidas da hidrólise da lactose)

por culturas microbianas na obtenção de outros bioprodutos, como por exemplo etanol ou biogás (metano) (Mendez et al., 1998; Yan et al, 1992).

O tratamento do soro por fermentação da lactose usando culturas microbianas tem sido bastante desenvolvido (Gekas & López-Leiva, 1985; Shukla, 1975; Friend & Shahani, 1979; Hobman, 1984; Mawson, 1988), diferentes espécies de microrganismos tem sido selecionados por sua capacidade de fermentar soluções concentradas de lactose e produzir etanol com mais de 90% de eficiência na conversão (Moulin e Galzy, 1984; Castilo, 1990). Outra alternativa que tem sido considerada é a engenharia genética, com a técnica do DNA recombinante, que possibilita a utilização em soro de queijo de cepas que quando selvagens não metabolizam a lactose (Russel, 1986).

A utilização de soro de queijo como substrato para o crescimento de diferentes microrganismos capazes de utilizar a lactose como fonte de carbono e energia, além de diminuir a carga poluente e gerar produtos lácteos de interesse comercial, pode também, quando usadas leveduras como nos estudos de Ponsano *et al.* (1995), produzir álcool como um metabólito secundário, que pode ser usado na fabricação de bebidas alcoólicas e como combustível. Já a levedura, pode ser recuperada por centrifugação e usada na alimentação humana e animal.

A fermentação aeróbia e anaeróbia do soro de queijo por células de *Kluyveromyces marxianus* tem sido proposta como um tratamento para redução do potencial poluente do soro e na obtenção de produtos como:

proteínas celulares, enzimas (poligalacturonase ou carboxipeptidase), biomassa e etanol (Belém e Lee, 1998).

### **2.2.1 Produção de Etanol a partir de Soro de Queijo**

O etanol pode ser produzido por processos bioquímicos, utilizando como substrato resíduos agroindustriais que eventualmente podem ser prejudiciais para o meio ambiente, como o soro de queijo (Zafar et al., 2005). Portanto, a fermentação alcoólica da lactose, presente no soro, por processos altamente produtivos pode ser considerada uma alternativa de biorremediação de um efluente potencialmente poluente, além de gerar um bioproduto de interesse comercial (Ponsano, 1995; Gonzalez Siso, 1996; Belém, 1998). Uma forma de otimização do processo é a utilização de sistemas de imobilização com células vivas, tanto de bactérias como de leveduras, que fermentam de forma contínua carboidratos para obtenção de etanol com bioproduto final. A técnica de imobilização mais empregada nesses casos é o envolvimento em gel hidrofílico, nos quais pode se destacar as matrizes formadas por alginatos e carragenas. Os reatores mais amplamente difundidos para essa finalidade são os de leito fixo vertical, horizontal ou paralelo (Pradella, 2001).

Ponsano (1975) utilizou a *Kluyveromyces fragilis* na fermentação alcoólica de soro de queijo para a diminuição da demanda bioquímica de oxigênio e produção de etanol, onde foram obtidos cerca de 14 g.L<sup>-1</sup> do produto depois da sua separação por destilação com uma redução de 72% da DBO inicial. Já os estudos de Silveira et al. (2005) a *Kluyveromyces marxianus*

foi testada usando o soro de queijo em culturas em batelada com diferentes condições de oxigenação (aeróbia, hipóxica e anóxica) e os resultados mostraram que em níveis de oxigênio baixo os valores de conversão de etanol foram muito próximos do valor teórico, sendo que as taxas de produção de etanol foram maiores em anoxia (cerca de 80 g.L<sup>-1</sup> quando a concentração inicial de lactose é de 170 g.L<sup>-1</sup>), demonstrando que a concentração de oxigênio afeta de forma significativa a produção de etanol.

A obtenção de etanol pela fermentação da lactose tem recebido grande atenção e a procura por microrganismos que tem a capacidade de produzir álcool diretamente da lactose é bastante ampla, sendo que a maioria das plantas comerciais tem como escolha cepas de *Kluyveromyces fragilis*, uma vez que o número de microrganismos produtores é limitado. A partir disso, uma alternativa que vem sendo estudada é a técnica de DNA recombinante, que pela expressão de genes que codificam enzimas de degradação da lactose ( $\beta$ -galactosidase e lactose permease) de *Kluyveromyces fragilis* em outros microrganismos com por exemplo a *Saccharomyces cerevisiae* (Russel, 1986).

Souza Junior e colaboradores (2001) estudaram a utilização do soro de queijo como meio de crescimento e fermentação para cepas recombinantes de *Kluyveromyces marxianus* cuja presença do vetor juntamente com a ausência de efeitos negativos no metabolismo criam a possibilidade de um sistema microbiano adequado ao processamento do soro juntamente com a formação de produtos de valor comercial (etanol).

Por outro lado, estudos demonstram que a produção de etanol a partir do soro de queijo não concentrado não é economicamente viável,

principalmente pela quantidade de etanol obtido tornar o processo de destilação de alto custo, uma vez que as concentrações finais do produto não ultrapassam 2% (Tin e Mawson, 1993). Desta forma muitas cepas capazes de fermentar a lactose em concentrações elevadas têm sido selecionadas para a produção do etanol com eficiência de 90% (Castilo, 1990; Moulin e Galzy, 1984).

### **2.3 Biorreatores**

Os biorreatores são os reatores nos quais ocorrem uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores, que podem ser enzimas ou células microbianas, animais ou vegetais que tenham sua capacidade metabólica mantida. Os biorreatores mais amplamente difundidos são aqueles que empregam células microbianas e são utilizados desde 1940 na produção industrial de diversos bioprodutos, tais como enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos, além do tratamento de resíduos industriais e domésticos (Schmidell e Facciotti, 2001).

Os reatores que empregam microrganismos têm suas características relacionadas ao tipo de célula microbiana usada e podem ter diferentes efeitos no que se refere aos fenômenos de transporte de massa, isto é, reatores que empregam microrganismos unicelulares têm um comportamento reológico distinto dos que empregam fungos filamentosos (Schmidell e Facciotti, 2001).

A escolha do modelo de biorreator empregado para determinado processo, utilizando as técnicas de imobilização ou não, é uma etapa bastante



importante, pois o conhecimento da cinética de reação e do modo como os reatores biológicos funcionam são fundamentais para a eficiência do processo. Quando se trata do modelo do biorreator empregado deve considerar aspectos como configuração e tamanho do biorreator, condições do processo e modo de operação, uma vez que estes aspectos têm um impacto significativo no processo (Doran, 1997). A operação em batelada, especialmente em tanques agitados, é uma escolha relativamente barata e flexível podendo ser usada em muitos processos industriais; já a operação contínua requer modelos específicos de biorreatores e envolve um gasto enorme de capital para sua implantação, contudo tem vantagens como custos reduzidos de manutenção e controle automático (Mazid, 1993).

Atualmente novos modelos de biorreatores têm sido pesquisados com o objetivo de intensificar a produção e aumentar a produtividade, como o caso do uso de biorreatores em cascata contínua com separação do produto final que visam evitar a queda na produtividade pela inibição pelo produto final. Esse modelo de biorreator tem sido usado com sucesso por Taylor et al. (1996) na produção de etanol por células de levedura e posterior recuperação.

Existem várias formas de classificação dos biorreatores, a Tabela 1 mostra uma forma de classificação mista baseado na forma de Kleinstreuer (1987), que é a mais abrangente empregada até o momento.

**Tabela1:** classificação geral dos biorreatores (Schmidell.et al., 2001 pg 181).

---

### Classificação Geral dos Biorreatores

#### (I) Reatores em fase aquosa (Fermentação submersa)

##### (I.1) Células / enzimas livres

- reatores agitados mecanicamente (STR)
- reatores agitados pneumaticamente
  - coluna de bolhas
  - reatores “air-lift”
- reatores de fluxo pistonado (PFR)

##### (I.2) Células / enzimas imobilizadas em suporte

- reatores com leito fixo
- reatores com leito fluidizado
- outros

##### (I.3) Células / enzimas confinadas entre membranas

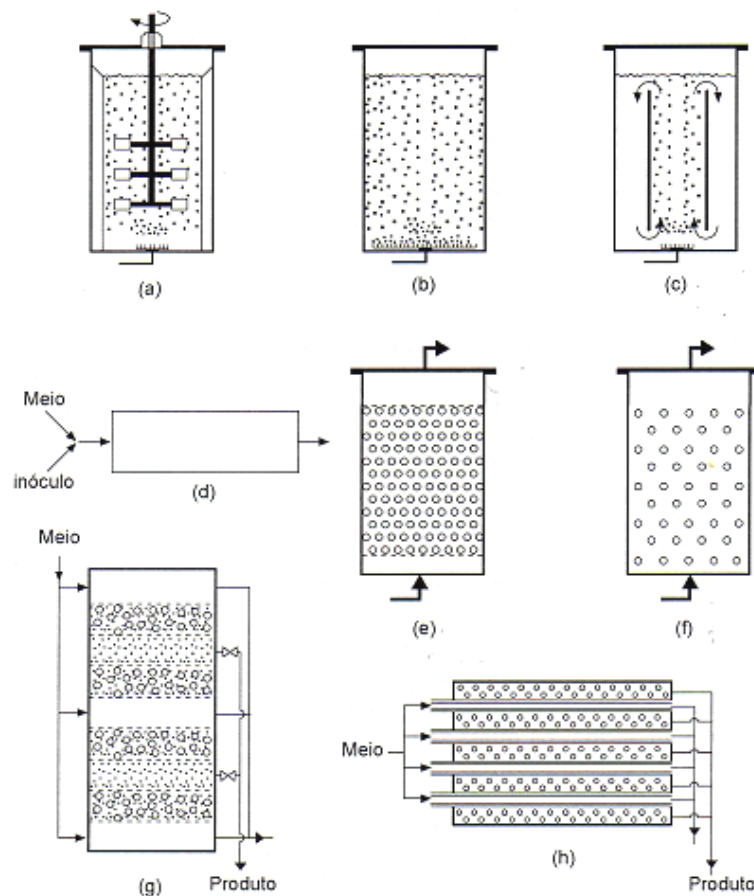
- reatores com membranas planas
- reatores de fibra oca

#### (II) Reatores em fase não-aquosa (Fermentação semi-sólida)

- reatores estáticos (com bandejas)
  - reatores com agitação (tambor rotatório)
  - reatores com leito fixo
  - reatores com leito fluidizados gás-sólido
-

### 2.3.1 Configuração dos Biorreatores

Diferentes configurações de biorreatores são empregadas nos diversos bioprocessos industriais, entretanto os mais usados são os tanques cilíndricos agitados ou não. Atualmente novos modelos estão constantemente sendo desenvolvidos para atender a aplicações especiais ou para novas formas de biocatalisadores, tais como utilização de tecidos de plantas e animais ou células e enzimas imobilizadas ou aqueles que operam com altas densidades celulares (Doran, 1997). As principais configurações de biorreator são mostradas na Figura 1.



**Figura 1:** Principais tipos de biorreatores: (a) tanque agitado, (b) coluna de bolhas, (c) air-lift, (d) fluxo pistonado, (e) leito fixo com células imobilizadas, (f) leito fluidizado com células imobilizadas, (g) membrana plana e (h) fibra oca (Pradella, 2001).

A configuração dos biorreatores é um dos fatores mais importantes na aplicação de técnicas de imobilização na produção de bebidas alcoólicas, desta forma diversos modelos de biorreatores têm sido estudados em escala laboratorial, empregando células imobilizadas em processos em batelada ou contínuos na fabricação de vinhos, cervejas e produção de etanol. Muitas destas configurações têm se mostrado promissoras para o escalonamento na aplicação industrial (Kuorkoutas et al., 2004). Reatores imobilizados de leito fluidizado têm demonstrado resultados bastante positivos, enquanto que reatores de tanque agitado mecanicamente a elevada aeração tem resultado em um perfil de aroma menos balanceado ao final do processo. Conseqüentemente, bebidas como a cerveja tem uma alta concentração de diacetil e baixo nível de álcool e ésteres (Okabe et al, 1992).

Na produção de etanol, tanto para bebidas quanto para combustível, várias configurações de biorreatores empregam células imobilizadas (Bravo e Gonzales, 1991; Roukas, 1994). Na maioria dos casos são usados sistemas de biorreatores de leito empacotado em batelada ou contínuo, além de tanques agitados de fluxo contínuo (Goksungur e Zorlu, 2001). Entretanto, diversos outros modos de operação e configurações vêm sendo testados e comparados, principalmente quanto à eficiência e produtividade, entre estas se pode citar: leito fluidizado, leito empacotado ou reatores agitados operados em batelada, ou batelada alimentada e de forma contínua (Kuorkoutas et al., 2004).

### **2.3.1.1 Biorreator de Tanque Agitado**

Este modelo de biorreator é o mais amplamente utilizado e consiste em um cilindro com agitação mecânica no qual são comuns relações de diâmetro-altura de 2:1 ou 3:1, que pode ser usado tanto para células ou enzimas livres quanto immobilizadas, contudo cuidados adicionais devem ser tomados no sentido de evitar danos as partículas de biocatalisador causado pela agitação mecânica. Tipicamente, apenas 70-80% do volume do reator é preenchido com o meio líquido, para permitir o desprendimento de gases formados durante o processo (Doran, 1997).

Os biorreatores agitados mecanicamente são também conhecidos como reatores de mistura completa e, sua capacidade é bastante variável e depende do tipo de processo no qual esta sendo empregado (Schmidell e Facciotti, 2001).

### **2.3.1.2 Biorreator de Leito Empacotado**

Este modelo de biorreator, conhecido também como biorreator de leito fixo por impedir que haja movimentação relativa das partículas, é usado principalmente para células ou enzimas immobilizadas ou particuladas, consiste em um tubo vertical empacotado com as partículas de biocatalisador, sendo que os danos causados pelo atrito entre as partículas são mínimos quando comparado com o tanque agitado. A alimentação pode ser feita de forma ascendente ou descendente, formando uma fase líquida contínua entre as

partículas de catalisador dentro da coluna. A transferência de massa entre o meio líquido e os biocatalisadores sólidos é facilitada quanto maior é a taxa de diluição através do leito. Cuidados devem ser tomados no sentido de prevenir a perda de catalisador na saída de líquido no final da coluna e as partículas de biocatalisador devem ser relativamente resistentes a pressão exercida pelo seu próprio peso de modo evitar sua deformação (Doran, 1997).

### **2.3.2 Modo de Operação dos Biorreatores**

A estratégia de operação tem um efeito significativo na eficiência do processo, tanto quanto a configuração do reator biológico, afetando a conversão do substrato, concentração de produto, suscetibilidade a contaminações, entre outros (Doran, 1997). Portanto, outro fator importante que afeta o desempenho dos biorreatores é o modo de operação, existem infinitas formas de condução de reatores biológicos, dependendo das características do microrganismo, meio de cultivo e objetivos específicos do processo produtivo. Assim, não é possível abordar todas as formas de operação de um processo, entretanto são destacados dois tipos principais: batelada ou descontínuo simples e contínuo (Schmidell e Facciotti, 2001).

O processo em batelada é descrito como utilização de um meio de cultivo (adequado ao desenvolvimento do microrganismo e acúmulo do produto) que é adicionado ao reator, juntamente com o inóculo composto pelas células microbianas. Depois de determinado período o caldo fermentado é retirado e o produto é recuperado. Já na operação contínua existe uma

alimentação contínua de meio de cultivo a uma determinada vazão constante, sendo que o volume é mantido constante dentro do reator pela retirada de caldo fermentado também a uma vazão constante (Carvalho e Sato, 2001; Facciotti, 2001).

Os processos contínuos se caracterizam principalmente por ser um sistema que pode ser operado por longos períodos de tempo em estado estacionário, condição na qual as variáveis de estado (concentração de células, substrato e produto) permanecem constantes ao longo do tempo.

Domingues (2001) testou um biorreator do tipo “air-lift” operado de forma contínua para a fermentação alcoólica de soro de queijo, empregando uma cepa floculante de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. Seus resultados demonstraram uma redução significativa na carga poluente do soro de queijo acompanhado com uma produtividade de etanol de aproximadamente 10 g.L<sup>-1</sup> e uma taxa de bioconversão de 80% do valor teórico, portanto, com uma eficiência superior a obtida usando os processos convencionais.

### **2.3.2.1 Operação Contínua em Biorreatores Agitados**

Os reatores agitados de operação contínua são largamente empregados nas indústrias de bebidas, produção de levedo para panificação e tratamento de resíduos. Este tipo de operação é usado para células ou enzimas livres em suspensão, o catalisador é freqüentemente retirado do sistema na saída de produtos, entretanto no caso de culturas celulares o crescimento celular supre com células adicionais esta perda, já no caso de

enzimas esta característica se torna um problema que pode ser facilmente solucionado pelo emprego de técnicas de imobilização (Doran, 1997).

Neste modo de operação, o substrato é constantemente suplementado no reator e o produto é constantemente removido numa mesma taxa, fato que teoricamente elimina o efeito de inibição pela alta concentração de açúcar e acumulação de substrato (Hack et al., 1994). Contudo para a produção de etanol por células de levedura existe um problema quanto à aplicação de culturas contínuas, devido à produção de biomassa e etanol terem sua condição ideal em estados opostos, ou seja, o crescimento é estimulado pela presença de oxigênio enquanto que a produção de etanol a partir de carboidratos requer condições anaeróbias. Desta forma, durante a produção de etanol a produção de biomassa é baixa e eventualmente pode conduzir a lavagem das células no biorreator, fato que pode ser superado com o emprego de técnicas de imobilização. (Banat, 1998).

### **2.3.2.2 Operação Contínua em Biorreatores de Fluxo Pistonado**

Nos biorreatores de fluxo pistonado ideais não ocorre mistura longitudinal, o meio líquido que entra no reator, passa através deste e não interage com os elementos fluidos vizinhos, isto ocorre devido às altas vazões empregadas, que minimizam as variações na velocidade média das partículas do fluido. De modo geral, são reatores tubulares que podem ser alimentados de forma ascendente ou descendente e, em casos especiais, de forma horizontal. Em reatores tubulares de fluxo pistonado o líquido flui a uma velocidade



constante ao longo da coluna e todas as partes têm o mesmo tempo de residência do líquido no reator. Uma vez que ocorre a metabolização do substrato nas partículas de catalisador um gradiente de concentração de substrato e produto se desenvolve na direção do fluxo, ou seja, na entrada de alimentação a concentração de substrato é maior que a de produto e na saída do tubo a concentração de produtos é maior que a de substrato, conseqüentemente regiões de diferentes eficiências são formadas ao longo da coluna, uma região de alta eficiência junto à alimentação e uma de baixa eficiência ao final do tubo (Doran, 1997; Carvalho e Sato, 2001; Facciotti, 2001; Gouth, 1998).

Chibata et al (1986) notaram que o emprego de biorreatores contínuo com células imobilizadas pode ser empregado vantajosamente nas seguintes situações: (1) quando as enzimas utilizadas são intracelulares; (2) quando as enzimas são instáveis, após serem isoladas das células e/ou antes ou depois do processo de imobilização; (3) quando substratos e produtos têm baixo peso molecular e podem atravessar com facilidade a matriz de imobilização.

Gough e McHale (1998) estudaram a produção de etanol, a partir de melaço, usando uma cepa imobilizada em alginato de *Kluyveromyces marxianus* capaz de crescer a 45<sup>0</sup>C em biorreator de fluxo pistonado operado de forma contínua. Seus resultados, comparados com os obtidos pelo grupo em estudos anteriores, sugerem que esta forma de configuração proporciona uma alternativa eficiente aos sistemas de batelada alimentada (Gough et al., 1997; Love et al., 1998), apesar da alta concentração do melaço comprometer

a viabilidade do microrganismo e a sua funcionalidade quanto à produção de etanol.

### **2.3.3 Comparação entre os Modelos e Modos de Operação de Biorreatores**

O desempenho relativo dos diferentes tipos de biorreatores pode ser comparado considerando aspectos como conversão de substrato e concentração de produtos em biorreatores semelhantes quanto ao tamanho. De um modo geral, as características cinéticas dos reatores tubulares de fluxo pistonado (PFR) são as mesmas que os reatores em batelada, ou seja, o tempo de residência de um biorreator PFR é igual ao tempo de cultivo de um biorreator de tanque agitado operado em batelada. Entretanto, nestes últimos tipos de biorreatores, a concentração é uniforme em todo o volume de trabalho, fato que não ocorre nos PFRs, nos quais é formado um gradiente de concentração ao longo do tubo (Doran, 1997).

Os benefícios associados aos modelos de biorreatores em particular ou ao seu modo de operação dependem diretamente das características cinéticas do processo em questão. Contudo, geralmente, a taxa de reação é alta no início das culturas em batelada ou na entrada dos biorreatores PFR, devido à alta concentração de substrato. Subseqüentemente, a taxa de reação diminui gradualmente com o consumo de substrato e, no caso dos reatores agitados mecanicamente operados continuamente, este é diluído quase que

instantaneamente e a taxa de reação é comparativamente menor em todo o biorreator (Doran, 1997).

Na prática, os reatores em batelada são preferidos aos biorreatores PFRs devido a problemas de operação em processos que liberam grandes quantidades de dióxido de carbono ou outros gases que podem ficar retidos (Doran, 1997).

Nos biorreatores agitados mecanicamente operados de forma contínua (CSTR), o substrato é imediatamente exposto a uma grande densidade celular, assim a taxa de conversão neste tipo de reator é bastante alta. Portanto, este modelo de biorreator operado em taxas de diluição ideais tem uma produtividade 10/20 vezes maior que os biorreatores PFR ou em batelada. Assim os reatores CSTR oferecem vantagens significativas sobre outros modos de operação (Doran, 1997).

Apesar das vantagens apresentadas nos tipos de reatores PFR e CSTR a maioria das fermentações comerciais são operadas na forma de batelada, devido a vantagens práticas apresentadas com este modo de operação, tais como (1) baixo risco de contaminações quando comparado a forma contínua; (2) menores riscos de falha em equipamentos e controladores, problemas freqüentes em operações contínuas; (3) menor estabilidade genética apresentada na operação contínua por longos períodos de tempo, ou seja, em batelada o inóculo fresco proporciona maior controle sobre as características genéticas da cultura. (Doran, 1997). Considerando todos os aspectos apresentados, a contaminação é uma das principais razões que

impedem a aplicação de processos contínuos em escala industrial (VirKajarvi et al, 2001).

Moser apresentou dados comparativos para a produção de etanol em dois tipos de reator, reator agitado operado de forma contínua e em reator tubular de fluxo pistonado. Seus resultados indicaram que existem situações em que se obtém produtividades mais elevadas quando utiliza o biorreator de fluxo pistonado (Moser, 1991).

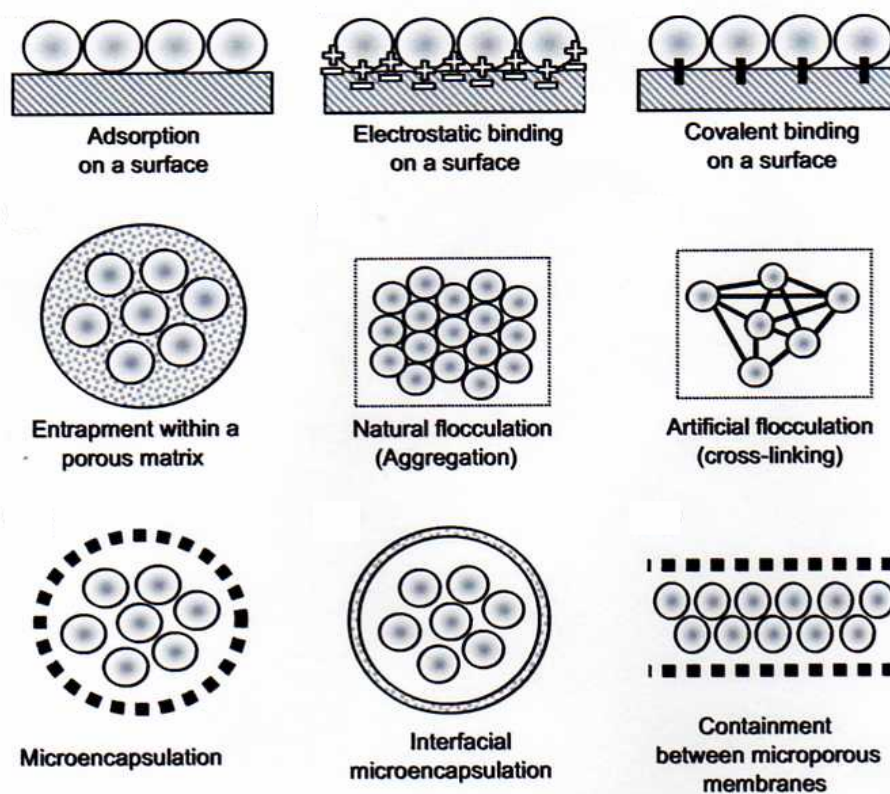
A produção de ácido láctico em fermentações em batelada confirmadamente apresenta uma baixa produtividade, em vista disso a produção contínua de ácido láctico com objetivo de aumentar a produtividade em volumes reduzidos de biorreator tem sido estudada (Richter e Nottelmen, 2004). Pesquisas recentes demonstraram que, em comparação com a operação em batelada, a produtividade de sistemas contínuos foi dobrada e só não alcançou valores maiores possivelmente pela lavagem de células ativas do biorreator. Assim, para evitar a perda de biomassa ativa modelos de biorreator com reciclo de células tem sido estudados (Richter e Nottelmen, 2004).

#### **2.4 Procedimentos de Imobilização**

O sistema com células imobilizadas é definido como a localização ou compartimentação de células viáveis em uma região definida na estrutura do suporte de modo a preservar a atividade catalítica das células em questão. A tecnologia de imobilização tem sido bastante desenvolvida nas últimas décadas e suas aplicações têm alcançado campos como o médico, analítico, biotecnológico e de biotransformação, sendo uma das principais estratégias de

otimização de processos. Os sistemas com células imobilizadas são particularmente eficientes para a obtenção de produtos de baixo peso molecular a partir de células microbianas e de plantas (biotransformações). Exemplos incluem a utilização de células de levedura imobilizadas para a produção de etanol, tratamento de efluentes líquidos com células de bactérias nitrificantes imobilizadas, entre outros (Zhang & Franco, 2002).

Os sistemas com células imobilizadas, de um modo geral, podem ser classificados como de ocorrência natural (formação de biofilmes) ou de forma artificial. Nos sistemas ocasionais ocorre a adsorção espontânea das células a matriz por interações eletrostáticas não específicas e a posterior colonização do suporte conduzindo a formação de um biofilme no qual os microrganismos são envolvidos dentro de uma matriz de polímeros extracelulares que são secretados pelas próprias células. Na segunda categoria as células microbianas são artificialmente envolvidas ou ligadas a uma ampla variedade de matrizes-suporte capazes de manter ou não a viabilidade celular, dependendo do grau de adequação do procedimento usado. A ligação das células ao suporte pode ser obtida por ligações covalentes, através da utilização de agentes promotores de ligação cruzada (mais amplamente utilizado é o glutaraldeído), entretanto este procedimento é geralmente incompatível com a viabilidade celular (Junter & Jouenne, 2004). Os sistemas que utilizam géis de polissacarídeos, particularmente os hidrogéis de alginato de cálcio, são os mais adequados para a preservação da viabilidade celular e atividade metabólica (Gerbsch & Buchholz, 1995). Os principais tipos de imobilização são mostrados na Figura 2.



**Figura 2:** Métodos básicos de imobilização (Kourkoutas, 2004).

De um modo geral, os sistemas com células imobilizadas são operados em biorreatores nos quais são realizadas biosínteses ou bioconversões que geram uma diversidade de compostos, desde metabólitos primários até biomoléculas de alto valor, além de sua aplicação no tratamento de efluentes domésticos ou industriais contendo diferentes tipos de poluentes, como metais pesados ou compostos recalcitrantes (Junter & Jouenne, 2004).

Entretanto, existe um paradoxo no desenvolvimento e nas pesquisas envolvendo a imobilização de células; os estudos básicos do comportamento fisiológico das células imobilizadas têm permanecido em segundo plano comparado com suas aplicações, ou seja, existe um grande número de aplicações práticas para a utilização dos sistemas imobilizados, contudo as investigações fundamentais do comportamento microbiano no estado

imobilizado ainda permanecem sem entendimento (Junter et al., 2002). O comportamento fisiológico das células imobilizadas é estudado apenas em nível macroscópico, pela observação das modificações na atividade metabólica quando comparada à eficiência biocatalítica das células imobilizadas com culturas em suspensão. Portanto, existe a necessidade de um melhor conhecimento sobre os fenômenos de estresse e falta de nutrientes inerentes da imobilização, que afetam as rotas metabólicas, para fortalecer a potencialidades práticas de utilização dos sistemas com células imobilizadas em processos biotecnológicos (Junter et al., 2002<sup>a</sup>).

#### **2.4.1 Vantagens e Desvantagens da Imobilização**

Os sistemas com células imobilizadas apresentam inúmeras vantagens, entre as quais podem ser citadas (Junter et al., 2004; Zhang, 2002):

(1) melhora na estabilidade do biocatalisador (células/suporte): esta estabilidade envolve características mecânicas e biológicas, as últimas significando aumento no tempo de operação e resistência a longos períodos de armazenamento, pelo rejuvenescimento periódico do biocatalisador em um meio rico em nutrientes, permitindo a manutenção da atividade catalítica por períodos de tempo prolongados;

(2) minimização dos custos de separação pela facilidade de recuperação do biocatalisador: a capacidade de crescimento em estado imobilizado torna possível a regeneração das culturas depois

de sua incubação em condições hostis, tais como exaustão de nutrientes e presença de compostos tóxicos;

(3) permite a operação contínua sem a lavagem das células: pela ligação ou envolvimento da biomassa que assegura uma retenção eficaz, minimizando as perdas celulares quando altas taxas de diluição são aplicadas ao sistema;

(4) alta produtividade volumétrica: como consequência da alta densidade celular obtida em sistemas com células imobilizadas;

(5) melhora no controle do processo;

(6) aumento da uniformidade do produto;

(7) alta densidade celular: obtida pela capacidade das células em se multiplicar (até determinada extensão) dentro da matriz de imobilização durante a metabolização do substrato;

(8) proteção contra contaminações e proteção contra a inibição por produtos: gerada pela barreira física estabelecida pela matriz suporte.

(9) diminuição do volume dos biorreatores com consequente diminuição de custos de operação, entre outras.

Por outro lado os sistemas que usam a imobilização em suportes podem adotar diferentes densidades, distribuições e modelos de crescimento celular, dependendo das condições empregadas. Essas condições incluem os fatores físicos, como tipo e estrutura do gel; fatores químicos (composição do meio e condições de imobilização), além dos fatores biológicos, tais como



características de crescimento e morfologia das cepas usadas, tamanho e idade do inóculo (Zhang & Franco, 2002). A cinética de crescimento, transferência de massa e estabilidade do sistema é estabelecida pela relação entre estes fatores (químicos e biológicos) e conseqüentemente afeta o modelo de biorreator e modo de operação, assim como o escalonamento e otimização do processo (Zhang, 2002; Groboilot, 1994).

### **2.4.2 Impactos da Imobilização**

Os biocatalisadores (células/suporte), especialmente quando se trata de microrganismos, se adaptam ao seu ambiente por modificações em seu metabolismo. A formação do bioproduto, em sistemas imobilizados, depende de como impactos fisiológicos causados por variações em diferentes porções da matriz suporte podem afetar o metabolismo, como por exemplo a ausência de crescimento na parte central das esferas de imobilização. No caso dos processos de imobilização por envolvimento, nos quais a imobilização efetuada é mecânica, as células experimentam um estresse mecânico que afeta de forma significativa fatores como a transferência de nutrientes e produtos, além do crescimento e atividade da cultura (Katzbauer & Narodoslowsky, 1995) .

#### **2.4.2.1 Limitações de Transferência de Massa no Sistema com Células Imobilizadas**

Em sistemas com células imobilizadas podem ser caracterizadas duas zonas distintas, nas quais ocorrem as reações metabólicas: uma região líquida homogênea e uma fase sólida composta pelas células imobilizadas. Diferentes fatores afetam a atividade células nestas regiões, tais como limitações na difusão de solutos na camada externa que rodeia a matriz de imobilização; limitação na difusão de solutos dentro da matriz gel-células; liberação de células da matriz para o meio líquido; modificações fisiológicas das células que permanecem dentro da matriz e a atividade metabólica das células que foram liberadas da matriz (Zhang, 2002). Dentre esses aspectos os mais importantes são as limitações na transferência de massa, uma vez que o substrato deve passar pela fase líquida, transpor o filme líquido externo e a interface líquido-sólido, o líquido dentro da fase sólida do gel, as microcolônias para então atingir as células onde ocorrem as reações metabólicas. Por outro lado, o produto extracelular deve efetuar o caminho oposto, partindo das células para a fase líquida externa. Esses obstáculos acarretam um gradiente de concentração de substrato e produto que gera uma redução gradual da taxa média de reação da superfície para o centro da matriz de imobilização (Zhang, 2002).

Desta forma a biomassa ativa fica confinada a uma fina camada externa na superfície da matriz de imobilização e dentro desta existe depleção de substrato e portanto biomassa reduzida. Em suma, fica claro que as limitações de transferência de massa contribuem amplamente para a heterogeneidade da biomassa dentro do suporte que gera alterações no estado

metabólico celular e afetam a eficiência e qualidade dos processos (Zhang, 2002).

#### **2.4.2.2 Efeitos da Heterogeneidade da Biomassa Imobilizada**

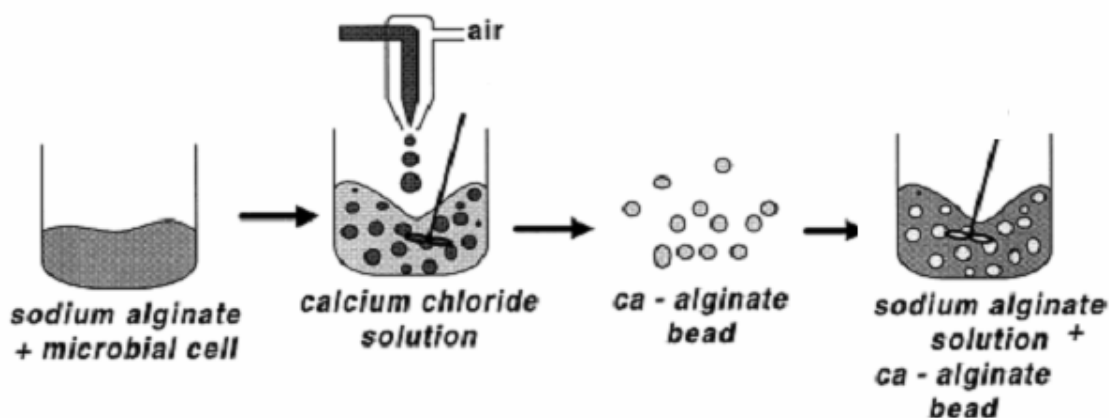
Um dos fenômenos que ocorrem nos sistemas com células imobilizadas é o crescimento celular perto da superfície da matriz suporte e a ausência deste (ou morte celular) no centro da matriz, acarretando uma distribuição heterogênea de biomassa dentro do suporte. Como consequência, as características da fase de imobilização podem afetar as propriedades de transferência de massa de nutrientes ou produtos, assim como as propriedades fisiológicas das células imobilizadas. As limitações de transferência de massa impostas pela imobilização contribuem largamente para a heterogeneidade da biomassa na matriz, fato que pode resultar em diferenças no microambiente das células imobilizadas e das células livres (Zhang, 2002).

Outro aspecto que pode afetar a distribuição da biomassa celular dentro do suporte é a heterogeneidade na estrutura da própria matriz de imobilização. Existem diferentes tipos de modificações na estrutura da matriz, tais como casca superficial, microcanais, eixos radiais, cavidades discretas, camadas de blocos concêntricos de gel, blocos amorfos de gel, entre outros (Saucedo et al., 1994). Na imobilização em alginato, por exemplo, as esferas poderiam ser formadas de modo que a concentração de alginato na superfície fosse maior que dentro, resultando em um gel anisotrópico em consequência

do método de geleificação depender da taxa de difusão dos íons cálcio através do alginato (Zhang, 2002).

### **2.4.3 Técnica de Envolvimento**

A técnica de envolvimento (Figura 3) é a mais difundida entre os procedimentos de imobilização de células vivas, fato explicado pela sua facilidade de aplicação, baixa toxidez e alta capacidade de retenção celular, entre outras vantagens operacionais. A técnica de envolvimento se baseia no confinamento de determinada população celular em uma matriz polimérica que forma um gel hidrofílico em determinadas condições especiais, de forma que os poros da matriz são menores que as células (permitindo seu confinamento), contudo permite a passagem de meio de cultura para dentro das partículas de gel e de produtos para fora destas, estabelecendo um fluxo de substrato e produto (Pradella, 2001). Outra importante vantagem da imobilização de células dentro de um carreador (quando comparada à imobilização na superfície deste) é a alta funcionalidade das preparações, uma vez que a incorporação em gel oferece proteção devido à presença física da camada de carreador entre as células e o ambiente (Martynenco, 2003).



**Figura 3:** Esquema de obtenção das esferas de alginato contendo as células de levedura pela técnica de envolvimento.

Os materiais mais empregados como matriz suporte são os polímeros naturais como ágar, carragena, agarose, quitosana, alginato e pectina, todavia polímeros sintéticos como géis de poliacrilamida e poliuretano também podem ser usados. A geleificação destes materiais naturais pode ocorrer pelo abaixamento da temperatura (no caso do ágar) ou pelo contato com cátions bivalentes (como o  $\text{Ca}^{2+}$ ) que modifica a estrutura da matriz de modo a promover a geleificação. A desvantagem deste método de imobilização consiste no fato de existir uma limitação imposta pela difusão de substratos e produtos dentro das partículas, desta forma aspectos como tamanho da partícula, difusibilidade através da matriz e a concentração celular devem ser cuidadosamente escolhidos e otimizados para assegurar a eficiência do processo (Pradella, 2001).

A estrutura mais amplamente empregada das matrizes é a esférica por apresentar maior área superficial e assim facilitar a transferência de massa. A técnica de formação das esferas é realizada em duas etapas: a primeira de

dispersão (extrusão) na qual as células/suporte são passadas através de uma seringa e as gotas caem diretamente na solução geleificante. A segunda fase é a de endurecimento que pode ser por resfriamento ou adição de um agente geleificante ou ainda pela simples estabilização das esferas já formadas pelo contato com a solução geleificante por um período maior (Groboillot et al, 1994).

#### **2.4.4 Matriz- Suporte: Alginato de Cálcio**

O alginato é um polissacarídeo natural composto por monômeros de ácido D-manurônico e L-glucorômico arranjados ao acaso em longas cadeias. Dependendo da origem, sua composição e características reológicas variam largamente (Penna, 1998). A seqüência de resíduos de ácido glucorômico, arranjados em blocos, é a provável característica que confere aos alginatos a propriedade de geleificação na presença de cátions divalentes, uma vez que a presença de grandes quantidades destas aumenta a afinidade por agentes promotores de ligações cruzadas. Os alginatos são classificados como soluções não Newtonianas, devido à distribuição das cadeias e ao seu comportamento de fluido pseudoplástico (Serp et al., 2000).

Os alginatos são gomas extraídas de algas marrons da classe *Phaeophyceae*, tais como *Macrosistis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* e *Laminaria hyperborea*. A composição precisa dos alginatos varia dependendo da espécie do qual foi extraído e da região de origem desta, fato que resulta em diferenças nas propriedades reológicas e capacidade de extrusão das

esferas mesmo dentro de um mesmo local de fornecimento ou lote industrial (Serp et al., 2000).

Os alginatos são empregados como matriz de imobilização por sua capacidade de formar géis em água gelada quando íons de cálcio estão presentes. Durante o processo de formação das esferas, sais solúveis de alginato são misturados com soluções aquosas de íons multivalentes, principalmente cálcio, para que ocorra a geleificação. A geleificação é a etapa na qual os polieletrólitos carboxílicos presentes em cada unidade de açúcar da cadeia se ligam aos íons em solução para formar retículos na superfície de cada partícula de alginato, conseqüentemente uma rede tridimensional é formada partindo da camada mais externa para o interior da gota (Groboillot et al, 1994).

A estabilidade do gel, tamanho das esferas e resistência mecânica é fortemente influenciada pelas condições de envolvimento e pelas propriedades físico-químicas do alginato empregado, uma vez que a composição dos monômeros e a seqüência destes afeta as propriedades mecânicas e de intumescência das esferas de alginato (Groboillot et al, 1994).

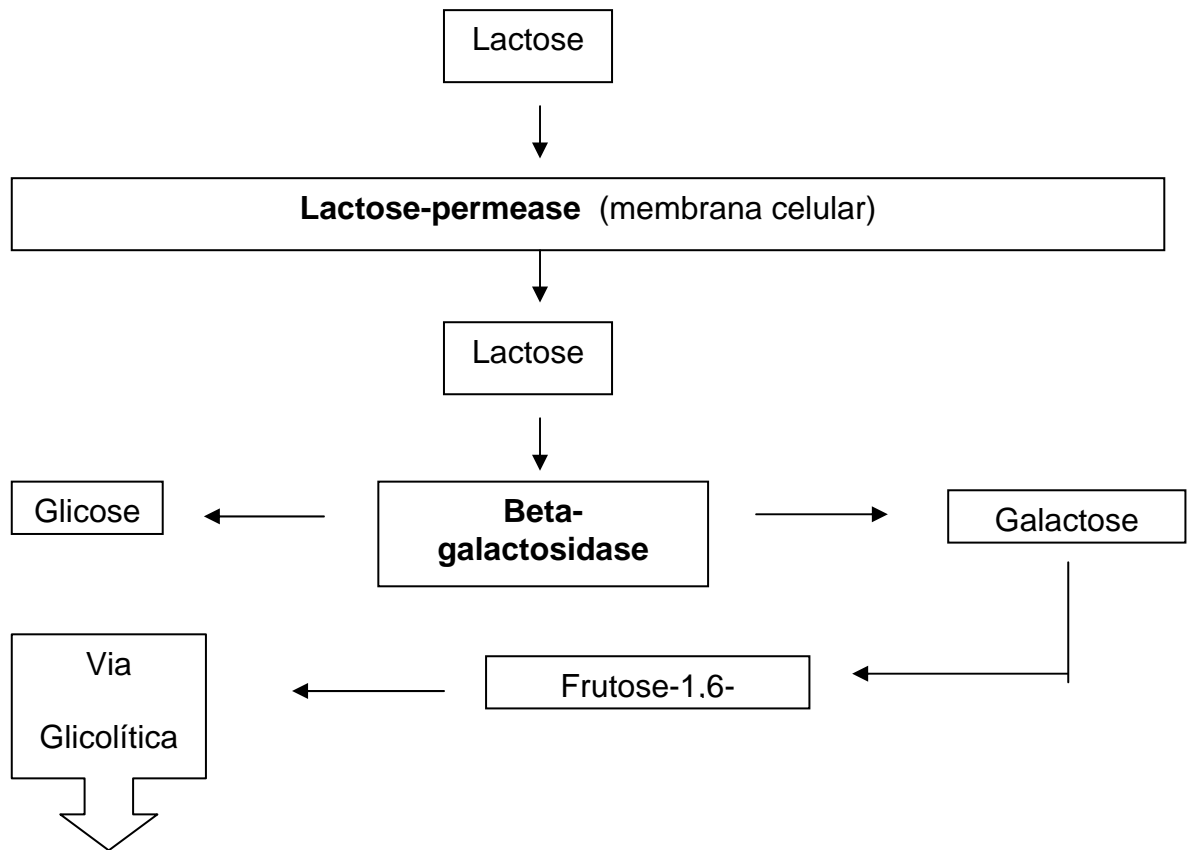
Sogoyan (1998) demonstrou que células de levedura imobilizadas em alginato de cálcio tiveram sua capacidade de fermentar a sacarose aumentada em seis vezes quando comparada com as células livres, por outro lado, a capacidade de proliferação das células diminuiu 10-11 vezes, sugerindo que a imobilização impõe uma barreira espacial que afeta o crescimento e a distribuição celular.

## 2.5 Bioconversão da Lactose

A hidrólise da lactose é um processo realizado enzimaticamente, que tem demonstrado grande interesse por parte dos pesquisadores; inicialmente pela grande demanda mundial de produtos livres de lactose por consumidores com intolerância a lactose. Outro fator a ser considerado, é o número de métodos para determinação da cinética da hidrólise que vem sendo descritos anteriormente (Barken et al., 1989; Carrara e Rubiolo, 1996, 1997). O modelo cinético predominante para descrever a hidrólise enzimática da lactose é a expressão da taxa de Michaelis-Menten com inibição pelo produto (galactose), onde o método convencional para determinação é obtido pela taxa de reação como função da concentração de substrato (Zhoun, 2002).

O mecanismo de absorção e hidrólise da lactose (Figura 4) ocorre após o seu transporte através da parede celular, mediado pelo sistema lactose-permease. Dentro da célula o dissacarídeo é desdobrado em glicose e galactose pela lactase ( $\beta$ -galactosidase). Estes açúcares são, então, metabolizados através da via glicolítica normal (Berry *et al.*, 1987).





**Figura 4:** Degradação da lactose por *Kluveromyces marxianus* (adaptado de Lee, 1996).

A  $\beta$ -galactosidase é uma enzima intracelular produzida por microrganismos que usam lactose para produzir energia. Existem basicamente dois caminhos para a utilização da  $\beta$ -galactosidase. A enzima em sua forma solúvel, utilizada em processos em batelada e sua forma imobilizada, que é aplicada em processos contínuos. Apesar do custo elevado da enzima  $\beta$ -galactosidase, uma das vantagens do sistema com as células imobilizadas é a diminuição de custos e utilização de processos contínuos (Szcodrak, 2000).

Segundo Becerra et al. (2001) a atividade da  $\beta$ -galactosidase em *Kluyveromyces lactis* por unidade de biomassa celular foi maior para as células imobilizadas em alginato que as livres no mesmo meio.

## 2.6 Levedura *Kluyveromyces marxianus*

A *Kluyveromyces marxianus* é um microrganismo unicelular, nucleado, que não possui motilidade, pode se reproduzir sexualmente (conjugação) ou assexualmente (fissão), apresenta uma forma ovóide e, tem aplicação industrial por sua capacidade de utilizar a lactose como fonte de carbono e energia, além de crescer em uma ampla faixa de temperatura (30<sup>o</sup> a 45<sup>o</sup>C) (Belém et al., 1998). O gênero *Kluyveromyces*, assim como a *Saccharomyces cerevisiae* é classificado como termotolerante, que de acordo com o Critério de Watson (1987) tem uma temperatura máxima de crescimento de 48<sup>o</sup>C, contudo estudos de Hughes (1984) relataram que a levedura é capaz de produzir etanol à 40<sup>o</sup>C e crescer até a 49<sup>o</sup>C ou mesmo a 52<sup>o</sup>C dependendo da espécie (Banat et al, 1992), categorizando-a assim como um microrganismo termofílico.

A fisiologia da levedura *Kluyveromyces marxianus* é bastante influenciada por características como concentração inicial de substrato e a acumulação final de etanol durante o processo, uma vez que a taxa de fermentação da lactose é reduzida em concentrações de açúcar acima de 2% e pela acumulação de mais de 5% de etanol (Guimarães, 1999). Entretanto, nos estudos de Stocker e Marison (1993) foi relatado o máximo de

biotransformação do soro de queijo de 30-35% usando técnicas de imobilização, comprovando o efeito protetor da imobilização contra a inibição pelo produto final (etanol).

O processo de tolerância a altas concentrações de etanol ainda não é completamente compreendido, mas existe a hipótese de que os fosfolipídios presentes na membrana plasmática desempenhem uma função importante no mecanismo de tolerância, pelo fato do etanol alterar a polaridade da membrana celular e causar interrupção do crescimento em concentrações elevadas. Existe ainda a possibilidade do etanol alterar a atividade de algumas ATPases da membrana celular ou atuar na inibição do sistema de transporte da fonte de carbono através da membrana (Banat, 1998). Alguns autores investigaram a cinética de inibição pelo etanol em algumas cepas de *Kluyveromyces* e concluíram que concentrações iniciais de etanol elevadas podem inibir o crescimento específico, mas não tem efeito sobre a concentração final de etanol ou a produtividade celular e consumo de açúcar (Bajpai, 1982).

Diferentemente do gênero *Saccharomyces*, que não pode ser explorado na produção de etanol a partir do soro de queijo por não metabolizar a lactose, a *Kluyveromyces* é capaz de assimilar a lactose por um mecanismo fermentativo que é limitado pela capacidade de transporte do açúcar, no qual o nível de oxigênio presente é um controle crítico no fluxo metabólico fermentativo (efeito Crabtree). Em adição, a capacidade de assimilação da lactose de algumas espécies do gênero, diferem da *Saccharomyces* pela regulação do metabolismo do açúcar, especialmente no que se refere à repressão causada pelo excesso de glicose no meio, ou seja, altas

concentrações de substrato favorecem o fluxo metabólico no sentido da rota fermentativa, juntamente com baixos níveis de oxigênio, fato que aumenta a produtividade do etanol. Outra vantagem da utilização da *Kluyveromyces marxianus* é apresentar um efeito Kluver negativo para a lactose, isto é, a levedura é capaz de crescer em lactose mesmo na ausência de respiração (Silveira, 2005).

O gênero *Kluyveromyces marxianus* tem sido amplamente usado em propostas industriais devido as suas características fisiológicas e a síntese de bioprodutos como, por exemplo: enzimas hidrolíticas, biomassa para indústria alimentícia, ribonucleotídeos, oligossacarídeos, oligopeptídeos e sua alta eficiência na produção de proteínas heterólogas (Galvão de Souza, 2001). Em adição, oferece inúmeras vantagens quanto à operação dos processos industriais, entre as quais pode se destacar: (1) alta velocidade de crescimento, fato que tem grande importância para a indústria alimentícia; (2) aceitabilidade como microrganismo seguro (GRAS-Generally Recognized as Safe); (3) alta atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase (Belém et al., 1998); (4) faixa de temperatura ótima de crescimento em torno de 40°C, fato que diminui os custos com resfriamento e riscos de contaminação (Furlan et al., 1995). A levedura pode crescer em substratos como inulina, xilana e pectina que são degradados por enzimas extracelulares. Entretanto, quando a lactose é usada como substrato a sua utilização pela célula é intracelular (Espinoza et al., 1992).

A diversidade de processos industriais, relatados na literatura, que empregam a utilização da levedura *K. marxianus* demonstram a versatilidade de utilização deste microrganismo. Entre eles está a produção de lactase

(Mahoney *et al.*, 1974; Bales & Castillo, 1979), algumas vezes simultaneamente com inulinase (Hewitt & GrootWassink, 1984) e com pectinases (Espinoza *et al.*, 1992). Em todos estes processos o soro de queijo ou sua fração glicídica foram usados como meio de cultura, uma vez que as leveduras do gênero *Kluyveromyces marxianus* são capazes de metabolizar lactose, o açúcar presente no soro e assim diminuir sua carga poluente.

Mesmo com todas as aplicações industriais potenciais referente a *Kluyveromyces marxianus* existe uma escassez de informação na literatura quanto à fisiologia desta espécie no que se refere ao metabolismo central do carbono e sua regulação quando comparado com o transporte de açúcares que tem sido amplamente estudado e detalhado por diferentes autores (Postma e Broek, 1990; Gasnier, 1987). Bellaver (2004) estudou a baixa tendência de formar etanol por células de *K. marxianus* CBS 6556 e sua relação com o efeito Crabtree-negativo inerente a essa espécie. Seus resultados sugerem que a baixa produtividade na formação de etanol é uma consequência da falta de capacidade desta levedura em manter o fluxo glicolítico constante, devido à dispersão do fluxo de carbono para a biosíntese de carboidratos ou para a rota metabólica da pentose fosfato.

## **2.7 Levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

A *Saccharomyces cerevisiae* é, juntamente com a bactéria *E. coli*, o microrganismo mais estudado ao nível de genética, bem como de aplicação industrial. Graças a isso, tem sido amplamente utilizada em estudos de

clonagens. O potencial fermentativo da *Saccharomyces* é bastante conhecido, contudo não pode ser explorado para a produção de etanol a partir do soro de queijo, devido à falta de um mecanismo assimilatório para a lactose (complexo enzimático lactose-permease e  $\beta$ -galactosidase) (Silveira, 2005). Uma alternativa que tem sido utilizada é a técnica do DNA recombinante, que permite a expressão dos genes que codificam a  $\beta$ -galactosidase e lactose-permease de *Kluyveromyces* em *Saccharomyces*. Desta forma, a levedura pode se desenvolver diretamente no soro de queijo e produzir etanol ou qualquer outro produto fermentativo, contudo as leveduras recombinantes têm um crescimento bastante lento e estabilidade genética reduzida, ocasionando uma baixa produtividade quando usadas em processos que utilizam biorreatores com células livres (Jeong et al., 1991).

Domingues (2000) investigou a fermentação alcoólica em permeado de soro de queijo usando biorreatores operados de forma contínua, realizada por uma cepa floculante de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. A levedura recombinante foi construída com a expressão dos genes que codificam a  $\beta$ -galactosidase e lactose-permease (*LAC4* e *LAC12*, respectivamente) de *Kluyveromyces marxianus*. Os resultados mostraram que a levedura foi capaz de usar o soro de queijo como única fonte de carbono e energia, com uma produtividade de etanol superior a alcançada pelos métodos convencionais.

O gênero *Saccharomyces* é conhecido por apresentar um efeito Crabtree positivo, onde a levedura é capaz de utilizar a rota fermentativa mesmo em condições de aerobiose. O efeito Crabtree, em *Saccharomyces*,

tem sido bastante estudado e, a idéia inicial de que a capacidade respiratória limitada seja causada pela formação de etanol em condições aeróbias perde espaço para outras hipóteses, tais como: capacidade limitada da acetil-CoA sintetase na rota do piruvato desidrogenase; capacidade limitada do maquinário anaeróbio ou efeito de ácidos orgânicos na respiração (acoplamento) ou ainda alterações no sistema de transporte de açúcar (Bellaver, 2004).

Na *Saccharomyces cerevisiae*, a concentração de açúcar que determina a escolha entre a rota respiratória ou fermentativa, no qual os genes do metabolismo respiratórios são sujeitos a repressão pelo excesso de glicose, diferindo do que ocorrem em *K. lactis*, onde a respiração não sofre repressão e o metabolismo fermentativo e oxidativo ocorrem simultaneamente (Silveira, 2005).

Um grande número de pesquisas tem demonstrado que a imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio aumentam a taxa de conversão da glicose em etanol cerca de 2,7 vezes quando comparado com culturas em suspensão, fato relacionado ao aumento da resistência das células de levedura à inibição por seus metabólitos (etanol), principalmente por modificações na composição lipídica da membrana celular das células imobilizadas (Martynenko, 2002). Portanto, a imobilização das células de *Saccharomyces cerevisiae* aumenta a produtividade de etanol quando comparada com células livres em suspensão.

Jamai et al. (2001) comparou a produção de etanol por células de *Saccharomyces cerevisiae* livres e imobilizadas em alginato de cálcio e seus

resultados sugerem que a repressão catabólica (causada pela glicose) inibe as enzimas respiratórias e induz a fermentação (efeito Crabtree) aumentando a produtividade do etanol depois da imobilização, assim como a eficiência da fermentação não é afetada pelo aumento dos níveis de etanol nas células imobilizadas.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Reagentes Químicos**

Nas preparações dos meios de cultura utilizou-se lactose, um produto da Casa da Química Indústria e Comércio Ltda; peptona bacteriológica obtida da Oxoid Brasil Ltda; extrato de levedura e extrato de malte da BIOBRÁS S. A. Diagnósticos; glicose anidra, da LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda e YNB (yeast nitrogen base sem aminoácidos e sulfato e amônio) um produto Difco Laboratories (Detroit, USA).

Alginato de sódio, usado como matriz de imobilização, foi um produto VETEC Química Fina Ltda ou LABSYNTH Produtos para Laboratório. Cloreto de cálcio, solução geleificante, foi um produto Casa da Química Indústria e Comércio Ltda.

Nas análises para a quantificação de açúcares redutores totais, o ácido 3,5-dinitrosalicílico foi um produto Sigma- Aldrich (Inc. St. Louis, USA), tartarato de sódio e potássio da Reagen Brasil e hidróxido de sódio da Casa da Química Indústria e Comércio Ltda..

Nas análises de cromatografia gasosa o reagente n-propanol usado como padrão interno foi um produto J. T. Baker Produtos Químicos Ltda

e a curva de calibração foi realizada com álcool etílico PA-ACS um produto Casa da Química Indústria e Comércio Ltda.

O soro de queijo em pó, usado como substrato nas diferentes fermentações, foi um produto Elegê, obtido por evaporação e secagem (por atomização) em câmaras de secagem, cuja composição é dada na Tabela 2.

**Tabela 2:** composição do soro de queijo em pó Elegê.

	% VD	Amostra de 30 g
Valor calórico	4	370,0 kcal
Carboidratos	6	77,0 g
Proteínas	7	12,0 g
Gorduras totais	0	1,0 g
Gorduras saturadas	0	0,5 g
Colesterol	0	**
Fibra alimentar	0	0,0 g
Cálcio	6	0,168g
Ferro	7	0,00335 g
Sódio	6	0,460 g

\*\* quantidade não significativa

### 3.2 Microrganismos

As leveduras utilizadas foram *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 e *Saccharomyces cerevisiae* BLR 014 recombinante fornecidas pelo próprio Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências e Tecnologia dos Alimentos da UFRGS. As cepas de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 foram originalmente obtidas do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico de Joinville, enquanto que as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* BLR 014 recombinante foram resultado de um projeto de doutorado realizado no BiotecLab. Utilizou-se a cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* BLR014 (*Mata ade2-1 his3-11 leu2-3,112 ura3-1 trp1*), contendo também os genes *LAC12* e *LAC4*, que codificam, respectivamente, as enzimas lactose-permease e  $\beta$ -galactosidase em *Kluyveromyces lactis* (Rech 2003).

Em determinados experimentos, também foi utilizada uma *Saccharomyces* comercial a KI uma levedura Killer do tipo K2, identificada como *Saccharomyces cerevisiae* e isolada pelo Prof. P. Barre/Institut de la Recherche Agronomique/Montpellier, France. É uma das leveduras secas mais utilizadas no meio enológico (Giachini, 1996; Linzmaier, 1996).

### **3.3 Manutenção das Culturas dos Microrganismos**

Os microrganismos foram mantidos em placas de Petri (Bioplast, Brasil) em meio contendo (g.L<sup>-1</sup>): ágar-ágar, 20; extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona bacteriológica, 5 e glicose anidra, 10 (MYPD), como o descrito por Furlan *et al.*, 1995. Em períodos curtos de armazenagem, o meio usado foi composto por (g.L<sup>-1</sup>): ágar-ágar, 2; extrato de levedura, 10; peptona

bacteriológica, 20 e glicose anidra, 20 (YEPD). As placas foram incubadas a 30°C por 24h para *Kluyveromyces marxianus* e 48h para a *Saccharomyces cerevisiae* (para a formação das colônias isoladas) e posteriormente armazenadas em refrigerador a 4°C por períodos de 30 a 60 dias.

A cultura em estoque foi transferida de uma placa para outra mensalmente, de modo a assegurar a inocuidade e a capacidade metabólica das cepas para as fermentações em biorreator.

### **3.4 Teste de Pureza para as Culturas de *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

As placas contendo os microrganismos em estoque foram mensalmente repicadas e testadas em placas contendo meio seletivo composto por (g.L<sup>-1</sup>): sulfato de amônio, 0,5; YNB (yeast nitrogen base sem aminoácidos e sulfato de amônio), 1,7; glicose ou lactose ou maltose, 50; ágar-ágar, 20. No caso das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, o meio foi suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> de aminoácidos (histidina, triptofano e leucina), além de adenina e uracil. As placas foram incubadas por 24-48h em estufa a 30°C. Após o período de incubação foi verificada a formação de colônias isoladas nas placas contendo glicose e lactose, enquanto que nas placas com a fonte de carbono maltose não houve crescimento dos microrganismos (controle negativo). Uma vez interpretados os resultados, as placas foram preservadas a 4°C para posterior utilização.

### 3.5 Preparo do Pré-inóculo

Colônias isoladas de levedura foram assepticamente transferidas para um frasco Erlenmeyer de 1000mL, contendo 300mL do meio líquido YEPD (extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup>, peptona bacteriológica e glicose anidra, 20 g.L<sup>-1</sup>) e incubados em agitador rotacional (modelo NT711 da Nova Técnica, Brasil) com 150-200 rpm por 18-24h para as células de *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* KI de 42-48h para *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. Esta diferença no período de crescimento para os dois gêneros de levedura deve-se ao fato da *Saccharomyces cerevisiae* recombinante necessitar de um tempo maior de crescimento (fase de crescimento logarítmico mais lenta quando comparada com a *K. marxianus*) para a obtenção da quantidade celular desejada para a imobilização.

Para estabelecer as melhores condições de crescimento, o meio de cultura, assim como condições ambientais foram controlados para ambas as amostras (temperatura 30<sup>o</sup>C e pH 7,0 e temperatura 37<sup>o</sup>C e pH 7,0 para *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente). O meio e as condições de cultivo do pré-inóculo foram sempre os mesmos do experimento para o qual foi preparado.

Nos experimentos em biorreator mistura completa com células livres, o pré-inóculo foi feito com soro de queijo hidrolisado 70g.L<sup>-1</sup>, suplementado com extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>. As proteínas do soro de queijo foram previamente hidrolisadas com um complexo enzimático comercial, composto por proteases ( ALLIZIN ALC 0,4 mL.L<sup>-1</sup>), pH 7,0 e temperatura 55<sup>o</sup>C

por 30 minutos. Este pré-tratamento tem o objetivo de inibir a desnaturação das proteínas do soro e evitar a formação de precipitado após a esterilização em autoclave (121<sup>o</sup>C, 15 minutos); e foi realizado sempre que o soro de queijo foi utilizado nas fermentações ou como pré-inóculo.

### **3.6 Obtenção da Suspensão de Células e Técnica de Imobilização**

Após o período de crescimento exponencial as células foram recolhidas por centrifugação (Hitachi Himac CR 21 E, Japão) e imobilizadas por envolvimento em gel, como descrito anteriormente por Kierstan *et al.*, 1977.

As células de levedura foram centrifugadas (Hitachi Himac CR 21 E, Japão) a 4000rpm por 5 minutos a 30<sup>o</sup>C, lavadas por duas vezes com água destilada estéril e então, ressuspendidas pela adição de 25 mL de água destilada estéril a 4<sup>o</sup>C. Esta suspensão de células foi misturada a uma solução de alginato de sódio 40 g L<sup>-1</sup>, previamente preparada e esterilizada (autoclave 121<sup>o</sup>C, 15 minutos).

A mistura (suspensão celular/alginato) foi adicionada por gotejamento, através de uma bomba peristáltica, em uma solução estéril de cloreto de cálcio 0,1M. As gotas geleificadas pelo contato com os íons Ca<sup>2+</sup> formaram partículas esféricas de cerca de 2,5 mm de diâmetro contendo as células de levedura em seu interior. O gotejamento da suspensão de células/alginato, durante aproximadamente 20 minutos, na solução de CaCl<sub>2</sub> foi realizado a uma temperatura de 35<sup>o</sup>C. Após o gotejamento as esferas foram

estabilizadas agitando-se por 30 minutos a solução de cloreto de cálcio 0,1 M contendo as esferas em banho-agitado, as quais foram recolhidas depois de determinado período e lavadas novamente por três vezes com água destilada estéril a 4<sup>o</sup>C e acondicionadas em biorreator.

Foram realizados experimentos com a concentração de células (peso úmido) em relação à solução de alginato de 0,04 g/ mL, 0,05 g/mL e 1 g/mL.

### **3.7 Cultivo em Batelada**

Nestes experimentos, células livres em suspensão e imobilizadas na matriz foram cultivadas em paralelo e mantidas em incubadora agitadora orbital (modelo NT711 da Nova Técnica, Brasil) por 24 h a 150-200 rpm nas mesmas condições de cultura em diferentes temperaturas, no caso da *Kluyveromyces marxianus* nas temperaturas de 30<sup>o</sup>C, 37<sup>o</sup>C e 45<sup>o</sup>C e para a *Saccharomyces cerevisiae* recombinante nas temperaturas de 25<sup>o</sup>C, 30<sup>o</sup>C e 37<sup>o</sup>C.

Depois do período de crescimento exponencial as células foram recolhidas e centrifugadas como descrito anteriormente, e então separadas em duas alíquotas, estas com aproximadamente o mesmo peso úmido.

Uma destas alíquotas foi re-suspendida e adicionada assepticamente direto a frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo o soro de queijo hidrolisado 70 g.L<sup>-1</sup>. A outra foi imobilizada na matriz de alginato, por gotejamento, como descrito anteriormente e então as esferas, contendo as

leveduras, foram adicionadas aos frascos contendo este meio na proporção de 0,5 g de esferas por mL de meio.

Amostras para análise da bioconversão da lactose, produção de etanol e biomassa liberada das esferas foram recolhidas em intervalos de tempo regulares, sendo estas amostras destrutivas, ou seja, depois de recolhida a alíquota, o restante do meio e a suspensão celular são descartados adequadamente.

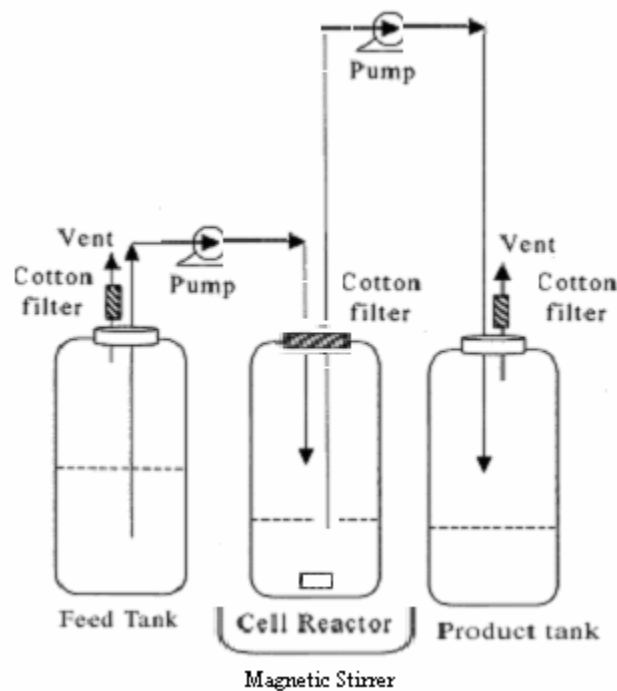
Todos os experimentos, para ambas as espécies de levedura, foram conduzidos em duplicata.

### **3.8 Cultivo em Biorreator Mistura Completa ou Mecanicamente Agitado (CSTR)**

Os experimentos em biorreator de mistura completa, com as células de levedura livres em suspensão, foram realizados em frascos Durhan de 250 mL, com temperatura controlada em estufa e agitados com agitador magnético em um volume de trabalho de 200 mL, como mostrado na Figura 5. Todos os experimentos foram realizados com soro de queijo  $70 \text{ g.L}^{-1}$  alimentado em diferentes taxas de diluição ( $0,05 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,10 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,15 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,20 \text{ h}^{-1}$ ), através de bomba peristáltica, o efluente líquido em excesso foi retirado, mantendo constante o nível do líquido dentro do frasco. Amostras de 5 mL foram recolhidas do topo do biorreator, em intervalos de 24h, para análise de consumo de substrato, concentração de produto e formação de biomassa. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.



Estes experimentos tinham como objetivo estabelecer a taxa de diluição máxima alcançada antes que as células de levedura livres em solução sofressem lavagem (“wash out”) do biorreator.



**Figura 5:** Esquema do biorreator contínuo de mistura completa (CSTR) com células livres em suspensão.

### 3.9 Cultivo em Biorreator Tubular de Fluxo Pistonado (PFR)

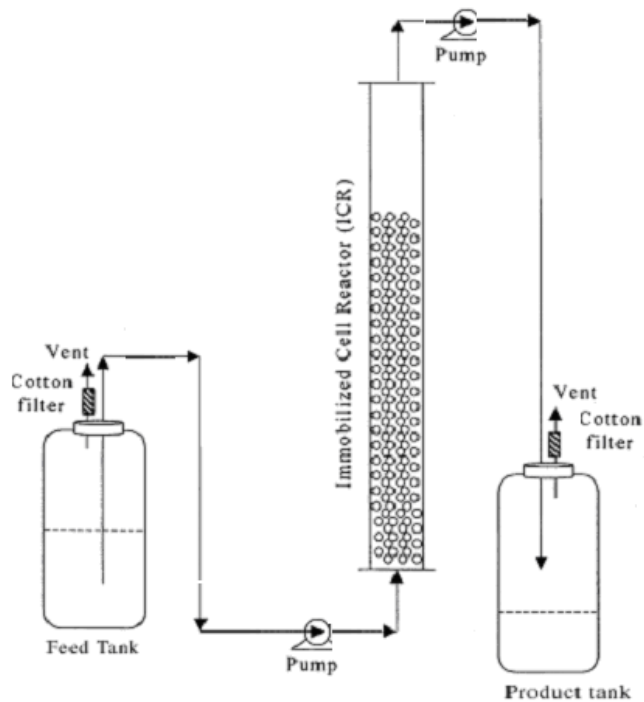
As fermentações contínuas foram realizadas usando biorreator tubular de fluxo pistonado empacotado com esferas de aproximadamente 2,5 mm de Ca-alginato contendo as células de levedura (Figura 6). O biorreator, um cilindro de vidro termorresistente, cujas características são mostradas na Tabela 3, foi previamente esterilizado por autoclavagem a 121<sup>0</sup>C por 20 minutos e posteriormente preenchido com as esferas de Ca-alginato, na

proporção de 0,5 g de esferas por mL de meio de alimentação. A solução estéril de meio foi alimentada continuamente de forma ascendente em diferentes taxas de diluição ( $0,05 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ h}^{-1}$  e  $0,2 \text{ h}^{-1}$ ). O efluente líquido em excesso foi retirado no topo do biorreator, mantendo constante o nível do líquido dentro da coluna. Os experimentos foram realizados com meio complexo YEPD para a *Saccharomyces* comercial (extrato de levedura,  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , peptona bacteriológica e glicose anidra,  $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) e com soro de queijo hidrolisado  $70 \text{ g.L}^{-1}$  para as demais cepas de levedura .

O sistema foi acondicionado em estufa para a manutenção da temperatura,  $30^{\circ}\text{C}$  para *K. marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* KI ou  $37^{\circ}\text{C}$  para a *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. Amostras de 5 mL foram recolhidas do topo do biorreator, em intervalos de 24h, para análise de consumo de substrato, concentração de produto e liberação de biomassa das esferas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

**Tabela 3:** Características do biorreator tubular de fluxo pistonado

Empacotamento	Esferas de Ca-alginato
Altura da coluna	58 cm
Diâmetro interno	2,60 cm
Volume total do biorreator	320 mL
Peso das esferas	100 g
Volume de soro de queijo	200 mL



**Figura 6:** Esquema adaptado de Najafpour (2004) do modelo de biorreator de fluxo pistonado (PFR) com células imobilizadas.

### 3.10 Técnicas Analíticas

As amostras recolhidas dos biorreatores (5 mL) foram previamente preparadas antes de serem analisadas quanto à biomassa liberada das esferas, consumo dos açúcares redutores totais (lactose) e produção de etanol. Inicialmente 2 mL de amostra foram centrifugados em centrífuga de bancada 16000xg (Eppendorf Bench Centrifuge 5410, Brinkmann Instruments Inc., Alemanha) por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado novamente, a partir desta, foram retiradas aliquotas 0,5 mL para a análise de etanol e 1,5 mL para a medida de açúcares redutores totais. O pellet formado

na primeira centrifugação foi lavado por duas vezes com água destilada estéril a 4°C e posteriormente medida a concentração celular.

As amostras, depois de centrifugadas, foram congeladas a -10°C e armazenadas até a realização dos procedimentos analíticos necessários, exceto no caso da biomassa que foi analisada imediatamente após a centrifugação.

### **3.10.1 Biomassa**

#### **3.10.1.1 Densidade Ótica**

A concentração celular foi estimada pela medida da absorvidade em espectrofotômetro (Hitachi U-1100, Japão) no comprimento de onda visível de  $\lambda = 600\text{nm}$  nas amostras recolhidas e centrifugadas como descrito anteriormente. As amostras foram diluídas quando necessário para assegurar a linearidade do aparelho (leituras menores que 1,0). De um modo geral, as amostras provenientes de biorreatores imobilizados foram diluídas 10 vezes e as dos biorreatores com células em suspensão foram diluídas 100 vezes.

#### **3.10.1.2 Peso Seco**

Para estabelecer uma relação entre a concentração celular obtida com as leituras em espectrofotômetro  $DO_{600}$  e o peso seco em  $\text{g.L}^{-1}$  foi

realizada uma curva padrão. Neste experimento as células foram inoculadas em meio YEPD e incubadas a 30°C por 18-24h para a *Kluyveromyces marxianus* e 37°C por 42-48h para as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e KI. Após o período de incubação, alíquotas de 80 mL foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos (Hitachi Himac CR 21 E, Japão), os pellets formados foram lavados por duas vezes com água destilada estéril e secos em estufa a 75°C por 72h até o estabelecimento de massa constante. Uma outra alíquota após a centrifugação e lavagem foram realizadas diluições seriadas para a medida da densidade ótica ( $DO_{600}$ ).

### **3.10.1.3 Viabilidade Celular**

A proporção de células viáveis liberadas das esferas de alginato durante a fermentação foi estimada usando a técnica de coloração com solução corante azul de metileno composta por ( $g.L^{-1}$ ): citrato de sódio dihidratado, 20; azul de metileno, 0,1. Uma parte de amostra (0,1 mL) foi misturada a uma parte da solução de corante para a inspeção microscópica e para a contagem em câmara de Neubauer.

A inspeção microscópica objetivava averiguar a inocuidade do sistema (risco de contaminação).

### 3.10.2 Medida de Açúcares Redutores Totais

O consumo da lactose ao longo da fermentação foi determinado pela quantificação de açúcares redutores totais pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico-DNSA (CHAPLIN, 1986). No qual 0,1 mL da amostra, previamente centrifugada, é adicionada a 1 mL de solução de DNSA composta por  $\text{g.L}^{-1}$ : ácido 3,5-dinitrosalicílico, 1; tartarato de sódio e potássio, 300 (dissolvidos em 200 mL de NaOH 2M). A mistura foi aquecida em banho-maria  $100^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, a concentração de lactose foi estimada pela medida da absorvidade em espectrofotômetro (Hitachi U-1100, Japão) no comprimento de onda visível  $\lambda = 570 \text{ nm}$  e relacionada a uma curva de calibração usando solução-mãe de lactose  $5 \text{ g.L}^{-1}$  em concentrações diferentes, construída como o mostrado na Tabela 4. As amostras foram preparadas em duplicata e diluídas quando houve necessidade para assegurar a linearidade do aparelho (leituras abaixo de 1,0).

**Tabela 4:** Curva de calibração método do DNSA.

Concentração final mg/mL	Solução-mãe de glicose 5 g.L <sup>-1</sup> (μL)	H <sub>2</sub> O (μL)
1	20	80
2	40	60
3	60	40
4	80	20
5	100	0

### 3.10.3 Medida de Etanol

A concentração de etanol das amostras, previamente preparadas, foi determinada por cromatografia gasosa usando um cromatógrafo a gás HP (Hewlett-Packward 5890A, Canadá), com uma coluna capilar de 50 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro do tipo Simplicity-5 (Sulpeco Co, Estados Unidos). O aparelho foi programado com uma temperatura de injeção e do detector de 250<sup>0</sup> C e a temperatura da coluna de 50<sup>0</sup>C. O método para a determinação do etanol foi realizado utilizando como padrão interno o n-propanol, onde uma curva de calibração (Apêndice 1 ) foi construída pela adição de quantidades constantes de n-propanol (padrão interno) a uma solução de soro de queijo hidrolisado 70 g.L<sup>-1</sup> com concentrações variadas de etanol.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

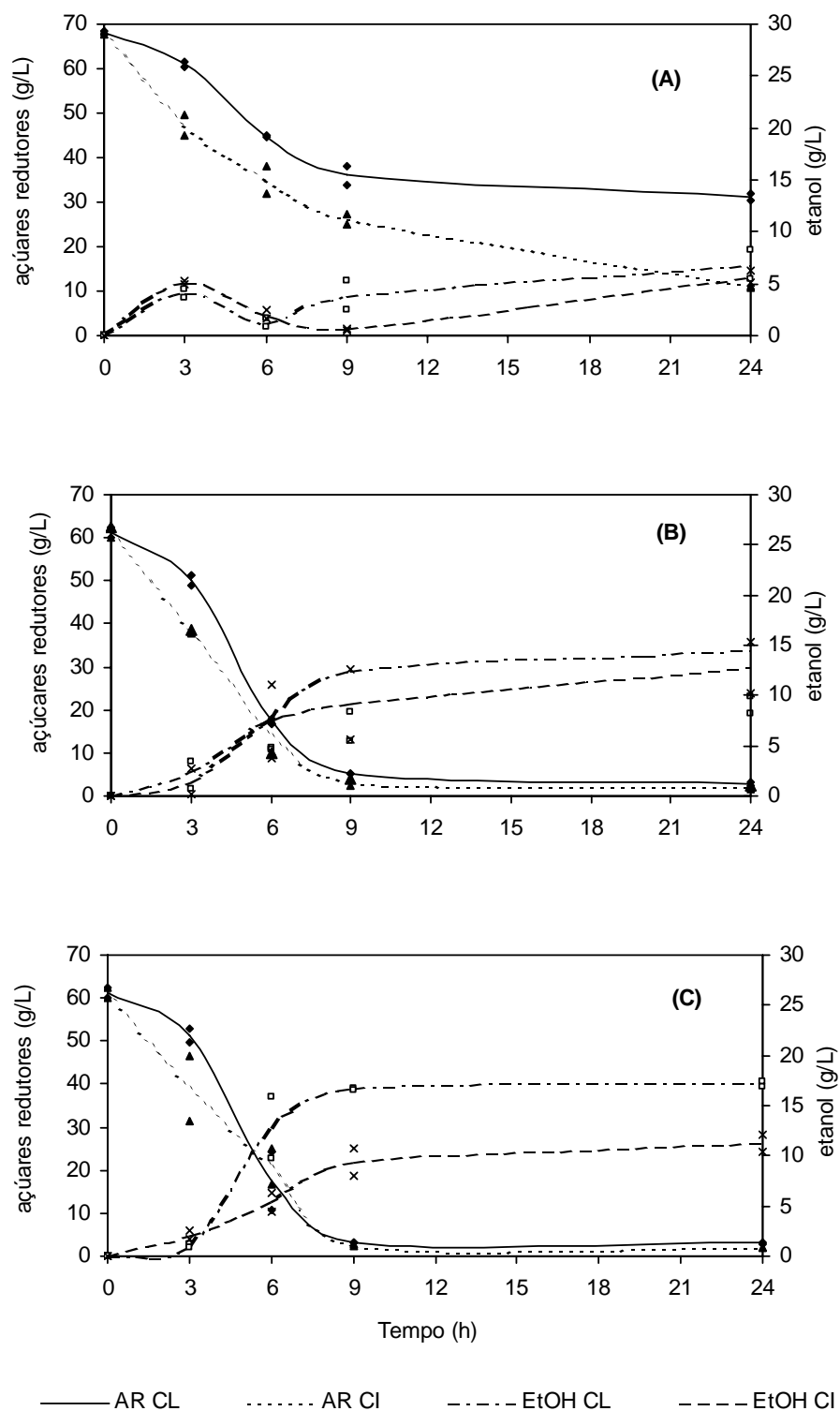
### 4.1 Cultivos em Batelada com Células de *Kluyveromyces marxianus*

Com a finalidade de escolha da temperatura adequada para os cultivos contínuos em biorreator foram realizados experimentos com células livres em suspensão e imobilizadas em Ca-alginato, usando soro de queijo 70 g.L<sup>-1</sup> como meio de cultivo. Os experimentos foram realizados em paralelo em incubadora agitadora rotacional em três diferentes temperaturas (30°C, 37°C e 45°C) escolhidas aleatoriamente dentro da faixa de crescimento ótimo para esta espécie de levedura relatado na literatura.

Os resultados mostrados na Figura 7 demonstram que, em todas as temperaturas testadas, o consumo da lactose alcançou o valor máximo depois de 9 h de cultivo para ambas as situações (células livres em suspensão e imobilizadas em Ca-alginato). Na temperatura de 45°C houve um consumo menor que nas demais temperaturas, uma vez que depois de 24h de cultivo a concentração de lactose quantificada foi de aproximadamente 31 g.L<sup>-1</sup> para células livres e 11 g.L<sup>-1</sup> para as imobilizadas, enquanto que nas demais temperaturas a concentração final foi inferior a 3 g.L<sup>-1</sup>, tanto para células livres



quanto imobilizadas. A partir da Figura 7 pode observar também que as células imobilizadas em alginato tiveram um desempenho melhor quanto ao consumo da lactose quando comparadas com as células livres para todas as temperaturas testadas, este resultado sugere que as células se adaptaram razoavelmente bem ao microambiente dentro da matriz-suporte.



**Figura 7:** consumo dos açúcares redutores (lactose) e produção de etanol por células de *Kluveromyces marxianus* CBS 6556 livres e immobilizadas em Ca-alginato, experimentos em shaker a 45°C (A), 37°C (B) e 30°C (C). AR CL (açúcares redutores célula livre); AR CI (açúcares redutores célula immobilizada); EtOH CL (etanol célula livre); EtOH CI (etanol célula immobilizada).

Quanto à produção de etanol, os cultivos realizados a 45°C demonstraram uma flutuação na concentração do produto, sugerindo que a alta temperatura poderia estar volatilizando o etanol e, portanto, mascarando o resultado final. Nas temperaturas de 37°C e 30°C depois de 24 h de cultivo, as células livres obtiveram maiores valores para a produção de etanol (14 g.L<sup>-1</sup> e 17 g.L<sup>-1</sup> respectivamente) quando comparadas com as células imobilizadas (12 g.L<sup>-1</sup> e 11 g.L<sup>-1</sup> respectivamente).

**Tabela 5:** conversão da lactose em etanol para 24 h de cultivos com células livres e imobilizadas a 30°C, 37°C e 45°C.

Temperatura (°C)	Células Imobilizadas		Células Livres	
	Y <sub>P/S</sub>	% do valor teórico	Y <sub>P/S</sub>	% do valor teórico
30	0,19	38	0,29	58
37	0,22	44	0,25	50
45	0,13	26	0,18	36

A Tabela 5 mostra a taxa de conversão da lactose a etanol (Y<sub>P/S</sub>) em 24 h de cultivo nas temperaturas testadas. Para efetuar as comparações com o valor teórico máximo de produção de etanol, o cálculo foi realizado usando os valores da produção de etanol obtido na fermentação considerando que a *Kluyveromyces marxianus* a cada 1 g de lactose gera 0,5 g.L<sup>-1</sup> de etanol (Lins e Leão, 2002) e que a concentração inicial de soro de queijo foi de aproximadamente 70 g.L<sup>-1</sup>.

Nos cultivos a 30<sup>0</sup>C e 37<sup>0</sup>C, as células imobilizadas consomem 95% da lactose ao final de 9 h de cultivo com uma conversão ( $Y_{P/S}$ ) de 0,15, enquanto que as livres em suspensão consomem aproximadamente a mesma quantidade de lactose com a taxa de conversão de 0,28 (30<sup>0</sup>C) e a 37<sup>0</sup>C o consumo de lactose decresce para 91% e  $Y_{P/S}$  0,22. Já a 45<sup>0</sup>C, ambas as taxas decaem drasticamente tanto para as células imobilizadas (consumo de 68% e a taxa de conversão de apenas 0,04) quando para as células livres (consumo de 47% e o  $Y_{P/S}$  0,12). Desta forma, a Tabela 5 demonstra que a conversão obtida é menor que a conversão teórica máxima, fato que pode ser explicado pela utilização do dissacarídeo em outras rotas metabólicas que não geram o etanol como produto final (Lins e Leão, 2002).

Stokker e Marison (1993) obtiveram o máximo de bioconversão em soro de queijo usando *Kluyveromyces marxianus* imobilizada a 30<sup>0</sup>C, com taxas de 30/35% (do valor teórico), resultados semelhantes são obtidos nos experimentos em batelada (após as 24h de fermentação) nos quais a bioconversão foi 38% do valor teórico, na temperatura de 30<sup>0</sup>C.

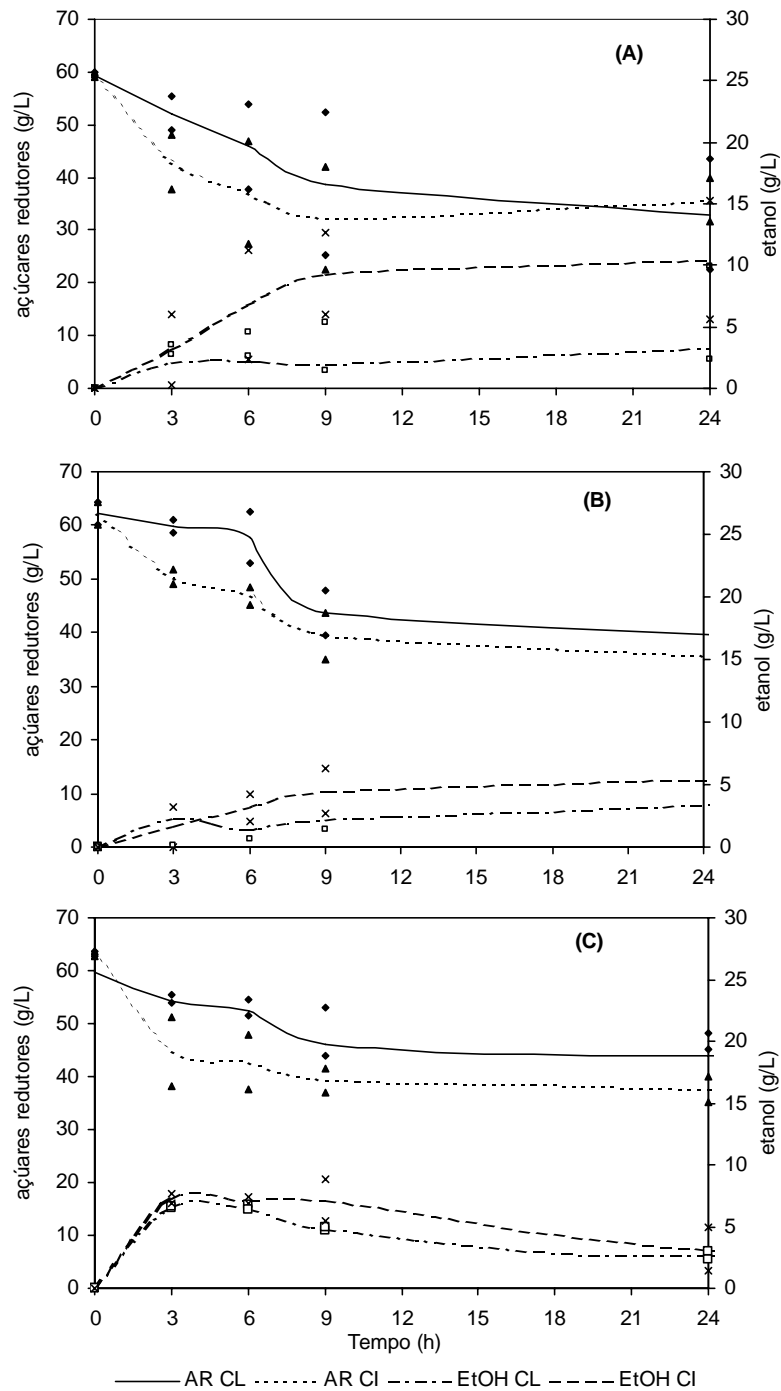
Lins e Leão (2002) que testaram a levedura em leite com células livres e imobilizadas em Ca-alginato. Os autores mostraram que a levedura foi capaz de consumir mais de 99% da lactose no leite em condições anaeróbias com uma taxa de conversão de 80% do valor teórico da literatura, usando cultivos em batelada a 30<sup>0</sup>C.

Baseado nos dados obtidos pelos experimentos realizados pode-se observar que a quantidade de etanol produzido ao final do cultivo é semelhante nas temperaturas de 30<sup>0</sup>C e 37<sup>0</sup>C, contudo a temperatura de 30<sup>0</sup>C foi escolhida

para os demais experimentos, usando diferentes tipos de biorreatores com células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, pelo fato de provavelmente ocorrer menor evaporação do álcool na temperatura menor.

#### **4.2 Cultivos em Batelada com Células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

Com a mesma finalidade dos experimentos realizados com *Kluyveromyces marxianus*, ou seja, a escolha de uma temperatura adequada para os demais cultivos em biorreator, foram realizados experimentos em batelada com células livres em suspensão e imobilizadas em Ca-alginato. Os experimentos foram realizados em paralelo em incubadora agitadora rotacional em três diferentes temperaturas (25<sup>0</sup>C, 30<sup>0</sup>C e 37<sup>0</sup>C) escolhidas aleatoriamente dentro da faixa de crescimento ótimo para esta espécie de levedura relatado na literatura.



**Figura 8:** consumo dos açúcares redutores e produção de etanol por células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante BLR 014 livres e immobilizadas em Ca-alginato, experimentos em shaker a 37°C (A), 30°C (B) e 25°C (C). AR CL (açúcares redutores célula livre); AR CI (açúcares redutores célula immobilizada); EtOH CL (etanol célula livre); EtOH CI (etanol célula immobilizada).

Os resultados mostrados na Figura 8 demonstram que em todas as temperaturas testadas o consumo da lactose alcançou o valor máximo depois de 9 h de cultivo para ambas as situações (células livres em suspensão e imobilizadas em Ca-alginato), Por outro lado, o consumo foi menor que o realizado pelas células de *Kluyveromyces marxianus*. Esse resultado já era esperado, por se tratar de uma levedura recombinante com baixa formação de biomassa (quando comparada com a *K. marxianus*) e os experimentos realizados por Rech (2003) conseqüentemente relataram se tratar de uma levedura com baixa produtividade quanto ao etanol e baixo consumo da lactose.

Nas temperaturas de 25<sup>0</sup>C e 30<sup>0</sup>C houve menor consumo quando comparado com a temperatura de 37<sup>0</sup>C, uma vez que depois de 24h de fermentação a concentração de lactose quantificada foi de aproximadamente 44 g.L<sup>-1</sup> para células livres e 37 g.L<sup>-1</sup> para a imobilizada a 25<sup>0</sup>C e de aproximadamente 43 g.L<sup>-1</sup> para células livres e 39 g.L<sup>-1</sup> para a imobilizada a 30<sup>0</sup>C. A partir da Figura 8 pode observar, portanto, resultados melhores na temperatura de 37<sup>0</sup>C onde os valores finais de lactose foram de 32 g.L<sup>-1</sup> e 35 g.L<sup>-1</sup> para as células livres e imobilizadas respectivamente. Outro aspecto que vale ressaltar foi o fato de as células imobilizadas em alginato apresentarem um desempenho melhor quanto o consumo da lactose quando comparadas com as células livres para todas as temperaturas testadas, este resultado sugere que as células se adaptaram razoavelmente bem ao microambiente dentro da matriz-suporte.

A produção de etanol foi menor que a obtida com as células de *Kluyveromyces marxianus*, fato já esperado baseado nos estudos anteriores realizados por Rech (2003). Nas temperaturas de 25<sup>o</sup>C, depois de 24h de cultivo foi obtido para as células livres aproximadamente 2 g.L<sup>-1</sup> e para as células imobilizadas 3 g.L<sup>-1</sup> e, na temperatura de 30<sup>o</sup>C os valores foram duas vezes maiores (2 g.L<sup>-1</sup> e 4 g.L<sup>-1</sup>). Assim como para o consumo da lactose, os melhores valores para a produção de etanol foram os obtidos a 37<sup>o</sup>C, que corresponderam a 7 g.L<sup>-1</sup> e 10 g.L<sup>-1</sup> para células livres e imobilizadas respectivamente, valores semelhantes aos obtidos com células de *Kluyveromyces marxianus* imobilizadas na mesma temperatura. Já as células livres de *Kluyveromyces marxianus* produziram aproximadamente duas vezes mais que as de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

**Tabela 6:** conversão da lactose em etanol para 24 h de cultivos com células livres e imobilizadas a 25<sup>o</sup>C, 30<sup>o</sup>C e 37<sup>o</sup>C.

Temperatura ( <sup>o</sup> C)	Células Imobilizadas		Células Livres	
	Y <sub>P/S</sub>	% do valor teórico	Y <sub>P/S</sub>	% do valor teórico
25	0,12	9	0,17	8
30	0,21	16	0,20	20
37	0,39	30	0,29	21

A Tabela 6 mostra a taxa de conversão da lactose a etanol (Y<sub>P/S</sub>) em 24 h de cultivo nas temperaturas testadas. Para efetuar as comparações com o valor teórico de produção de etanol, o cálculo foi realizado usando os valores

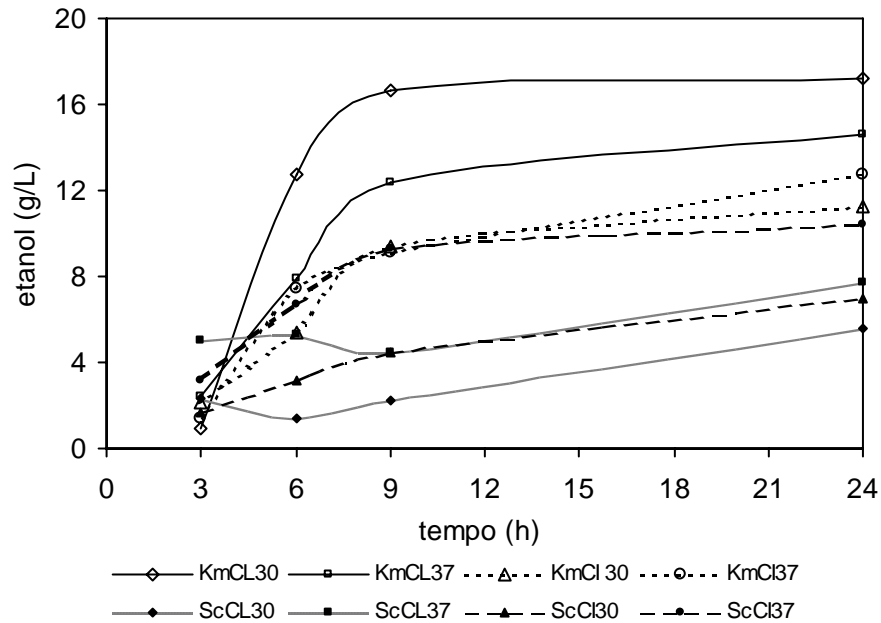


da produção de etanol obtido na fermentação considerando que *Saccharomyces cerevisiae* a cada 1 mol de lactose gera 4 mol de etanol (Domingues, 1999) e que a concentração inicial de soro de queijo foi de aproximadamente 70 g.L<sup>-1</sup>.

Nos cultivos a 25<sup>0</sup>C, as células imobilizadas consomem 38% da lactose ao final de 9 h de cultivo com  $Y_{P/S}$  de 0,30, enquanto que as livres em suspensão consomem aproximadamente 22%, mas a taxa de conversão é de 0,35. Nas fermentações a 30<sup>0</sup>C, as células imobilizadas tem o comportamento semelhante (consomem 36% da lactose ao final de 9 h de cultivo e a taxa é de 0,19), no entanto o consumo das células livres aumenta sensivelmente para 30% e a conversão cai para 0,12. Já a 37<sup>0</sup>C, ambas as taxas de consumo da lactose aumentam drasticamente tanto para as células imobilizadas (consome 45% e  $Y_{P/S}$  de 0,35) quando para as células livres (consome 35% e  $Y_{P/S}$  de 0,21). Desta forma, a mesma figura, demonstra que o consumo da lactose foi sempre maior que a conversão do açúcar ao produto da fermentação alcoólica (etanol), exceto para as células livres a 25<sup>0</sup>C.

Baseado nos resultados obtidos nos experimentos em batelada com as células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, fica claro que, a temperatura a ser usada nos experimentos em biorreator é a de 37<sup>0</sup>C, na qual os valores foram os que mais se aproximaram dos valores obtidos para a *Kluyveromyces marxianus*.

A Figura 9 mostra uma comparação entre os valores de etanol obtidos para as duas cepas de levedura livres e imobilizados em Ca-alginato nas temperaturas de 30<sup>0</sup> e 37<sup>0</sup> C.



**Figura 9:** Comparação da produção de etanol com células livres (CL) e imobilizadas (CI) de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 (Km) e *Saccharomyces cerevisiae* recombinante BLR 014 (Sc) a 30°C e 37°C.

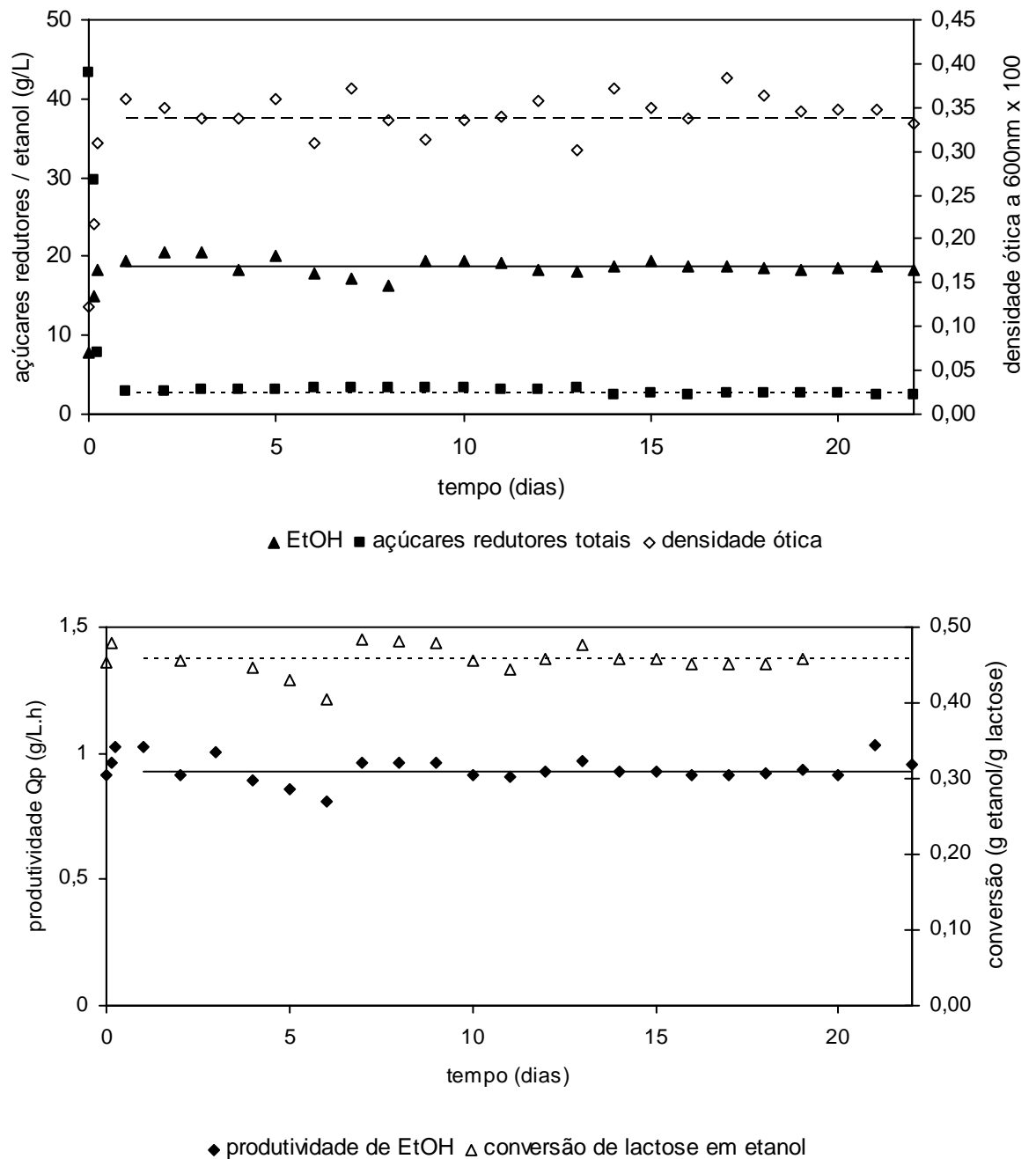
Vieira et al. (1989) estudaram a produção de etanol em batelada em meio contendo glicose por células livres e imobilizadas de *Saccharomyces bayanus* em K-carragena e observaram que a produtividade foi maior para as células imobilizadas, como o ocorrido com as células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. Os autores atribuíram esse aumento não apenas a imobilização, mas também a suplementação do meio com compostos presentes nos suportes de imobilização. Muitos outros autores, como Rosa et al. (1987) que trabalhou com *Kluyveromyces marxianus*, tem associado essa melhora com o aumento da tolerância ao etanol pelas células de leveduras pela suplementação da composição do meio. Em adição, a utilização de técnicas de imobilização implica na introdução de diferentes compostos no meio de fermentação, portanto, a melhora na fermentação alcoólica com células

imobilizadas se deve não apenas pelas vantagens da técnica, mas a maior parte dos efeitos positivos pode ser simplesmente devido à composição do meio ser mais favorável na presença do suporte, principalmente aqueles que contenham íons  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$  (Nabais, 1988).

### **4.3 Cultivos em Biorreator Contínuo de Mistura Completa (CSTR) com Células de *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

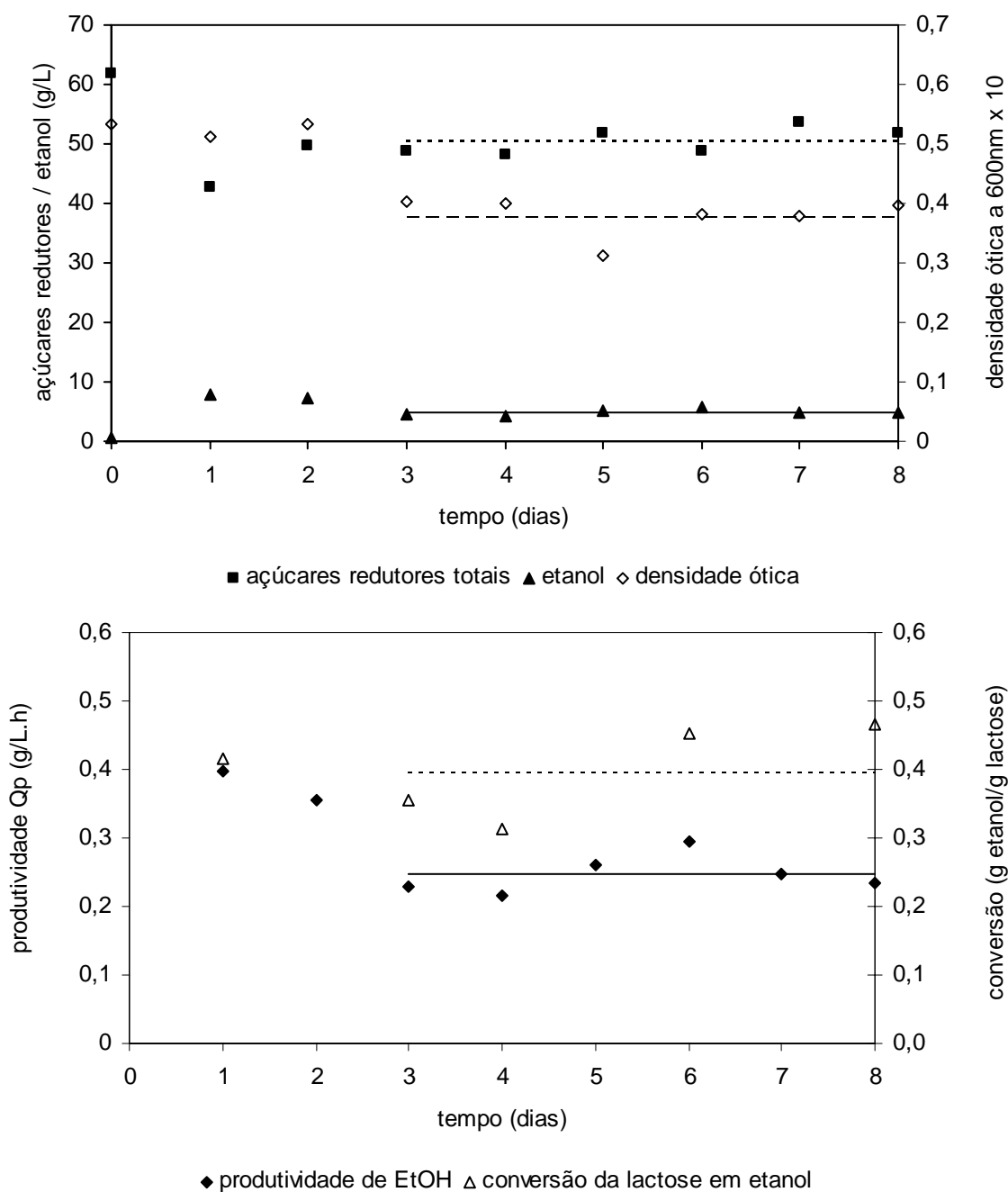
#### **4.3.1 Teste de Estabilidade em Biorreator CSTR**

Os experimentos realizados em biorreator contínuo de mistura completa agitado mecanicamente com as células livres em suspensão tinham como objetivo verificar a estabilidade do sistema no decorrer de longos períodos de tempo e o aprimoramento da retirada de amostras para evitar riscos de contaminação. Neste conjunto de experimentos a temperatura foi controlada em estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  para a *Kluyveromyces marxianus* e  $37^{\circ}\text{C}$  para a *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, sendo a taxa de diluição de  $0,05\text{h}^{-1}$ .



**Figura 10:** consumo de açúcares redutores (lactose), produção de etanol, biomassa, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator mistura completa mecanicamente agitado com células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a 30°C.  $D= 0,05 \text{ h}^{-1}$ .

Os resultados mostrados na Figura 10 demonstram que o sistema atingiu a estabilidade e regime estacionário, pois não houve variação significativa nas variáveis de concentração (biomassa, lactose e etanol) depois das primeiras 24 h. O consumo de lactose foi de praticamente 93% nas primeiras 24 h e não sofreu variação ao longo de 22 dias de cultivo. A taxa de obtenção do produto em relação ao substrato foi em média de 0,45 e o valor de etanol no estado estacionário foi de aproximadamente  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . A biomassa, da mesma forma, se manteve aproximadamente constante, com a  $\text{DO}_{600}$  em torno de 0,3 a 0,4, demonstrando que a taxa de diluição de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  não acarreta em lavagem das células do biorreator.



**Figura 11:** consumo de açúcares redutores (lactose), produção de etanol, biomassa, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator mistura completa mecanicamente agitado com células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante BLR 014 a 37°C.  $D=0,05\text{ h}^{-1}$ .

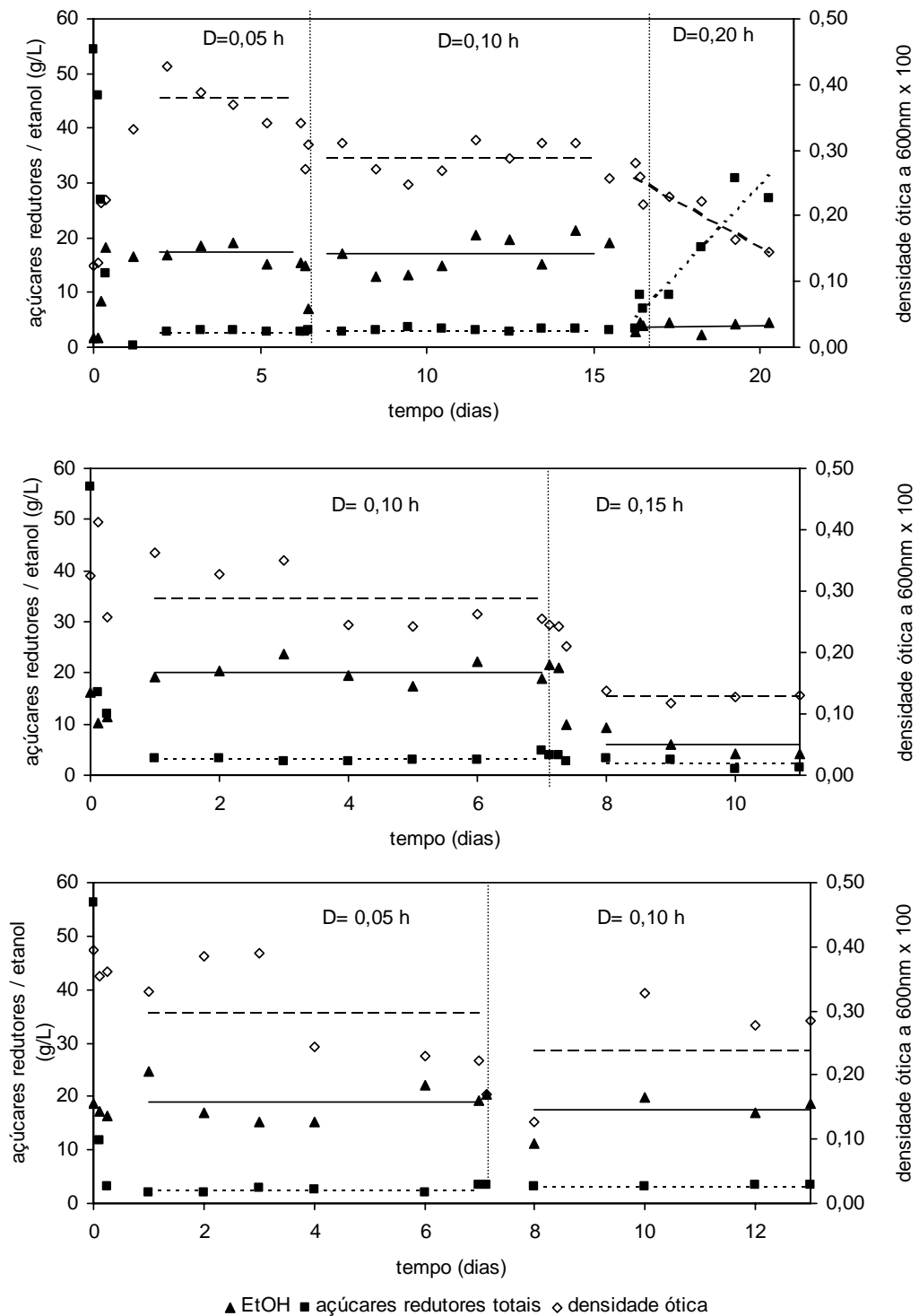
No experimento envolvendo as células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, os resultados mostrados na Figura 11 demonstram que o sistema adquiriu uma certa estabilidade em 72 h de cultivo, entretanto a biomassa sofreu variações uma vez que a  $DO_{600}$  variou de 0,5 a 0,3. O consumo médio de lactose no estado estacionário foi de aproximadamente 20%. O valor médio de etanol produzido foi de  $4,95 \text{ g.L}^{-1}$  e manteve a conversão de substrato em produto de 0,40, ou seja, 40% do substrato consumido foi convertido em etanol, o restante provavelmente foi utilizado pela célula em sua manutenção ou em outras rotas metabólicas.

Os resultados apresentados para a *Saccharomyces cerevisiae* recombinante sugerem que a uma taxa de diluição de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  não há a lavagem das células do biorreator, contudo a baixa produtividade inerente a esta cepa acarreta baixa concentração do produto ao final do cultivo. Os resultados de biomassa obtidos estão de acordo com os estudos de Domingues e co-autores (1999) que também apresentaram valores baixos de biomassa usando cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*, os autores sugerem que a lactose não é uma fonte de carbono adequada para a obtenção de altas densidades celulares, principalmente quando comparada com a glicose ou uma mistura de glicose e galactose (monossacarídeos constituintes da lactose). Rech (2003) em seu estudo de produção de  $\beta$ -galactosidase concluiu que a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante apesar de apresentar grande atividade específica quanto à enzima, o baixo rendimento celular obtido foi prejudicial ao processo quando se trata de produtividade.

### **4.3.2 Experimentos com Taxas de Diluição Variáveis em Biorreator CSTR com Células de *Kluyveromyces marxianus***

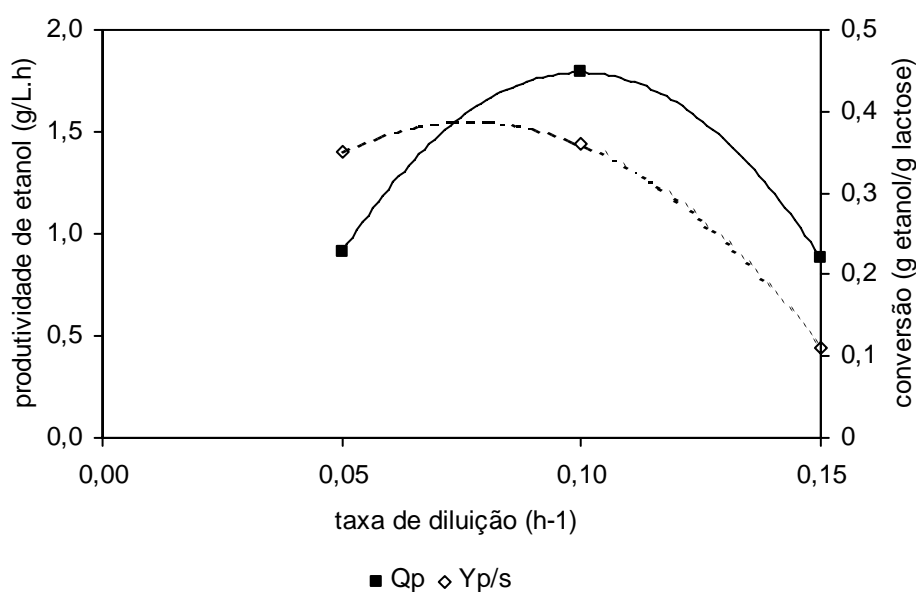
Os experimentos envolvendo biorreator de mistura completa mecanicamente agitado com células livres em suspensão de *Kluyveromyces marxianus* têm como finalidade estabelecer a produtividade em diferentes taxas de diluição para comparação com os cultivos com as células imobilizadas. O biorreator foi acondicionado em estufa para o controle da temperatura a 30°C e diferentes taxas de diluição foram aplicadas ao sistema (0,05 h<sup>-1</sup>, 0,10 h<sup>-1</sup>, 0,15 h<sup>-1</sup> e 0,20 h<sup>-1</sup>).





**Figura 12:** consumo de açúcares redutores (lactose), produção de etanol e biomassa em cultivo em biorreator contínuo mistura completa mecanicamente agitado com células livres de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a 30°C, com variação na taxa de diluição.

Os resultados quanto ao consumo de lactose, produção e etanol e biomassa por densidade ótica mostrados na Figura 12 sugerem que utilizando taxas de diluição de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  e  $0,10 \text{ h}^{-1}$  não houve alteração na estabilidade do sistema, apenas algumas flutuações devido à adaptação celular às modificações, entretanto na taxa de  $0,15 \text{ h}^{-1}$  pode se observar uma mudança fisiológica evidenciada pela diminuição da concentração de etanol, sem que tenha havido a lavagem das células, uma vez que a concentração de lactose não sofre alteração. O fenômeno de lavagem ficou demonstrado quando se impõem ao sistema uma taxa de diluição de  $0,20 \text{ h}^{-1}$ , pela queda na concentração de etanol e o aumento de lactose quantificada.

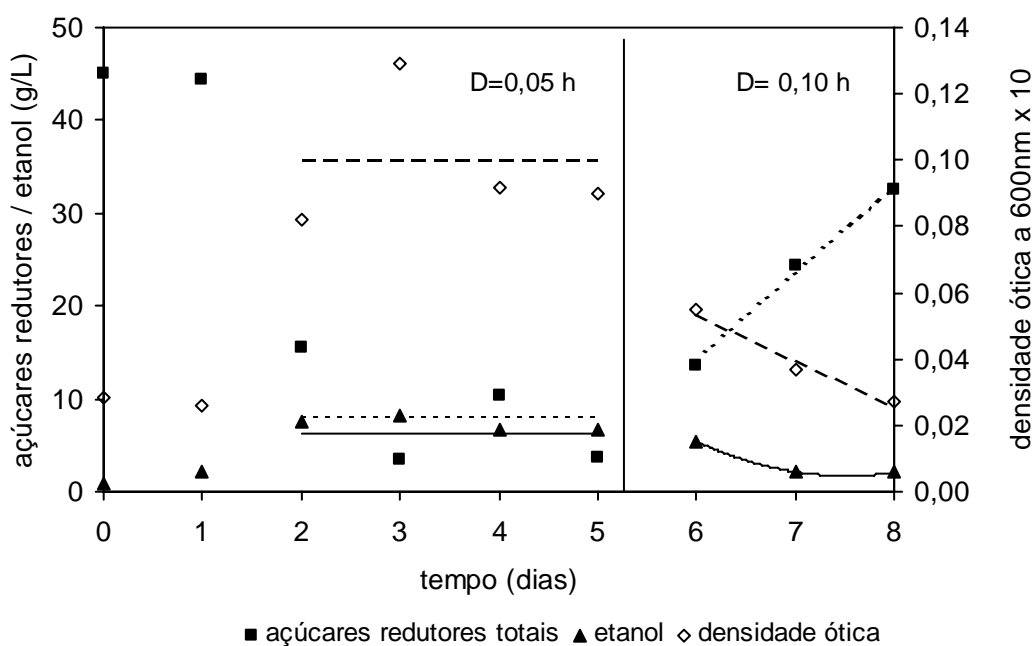


**Figura 13:** comparação entre a produtividade ( $Q_p$ ) e a conversão lactose em etanol ( $Y_{p/s}$ ) em diferentes taxas de diluição em biorreator CSTR com *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 livres em suspensão a  $30^\circ\text{C}$ .

A aplicação de modo de operação contínuo acarreta inúmeras vantagens práticas, segundo Gough e colaboradores (1998). Contudo a tecnologia de imobilização pode auxiliar no processo quanto à perda de produtividade conseqüente da saída de células do biorreator. Os autores afirmam que os biocatalisadores imobilizados podem atuar de maneira superior às células livres em suspensão no que diz respeito à produção de etanol. Na maioria dos sistemas contínuos com células imobilizadas em alginato, entretanto, existiu a necessidade de suplementação do meio com íons cálcio, de modo a preservar a integridade estrutural da matriz-suporte, particularmente quando usada por longos períodos (Nolan et al., 1994; Brady et al. 1997).

#### **4.3.3 Teste de Diferentes Taxas de Diluição em Biorreator CSTR com Células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

Os experimentos envolvendo biorreator de mistura completa mecanicamente agitado com células livres em suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante foram realizados para estabelecer a produtividade em diferentes taxas de diluição para comparação com os cultivos com as células imobilizadas. O biorreator foi acondicionado em estufa para o controle da temperatura a 37°C e diferentes taxas de diluição foram aplicadas ao sistema (0,05 h<sup>-1</sup> e 0,10 h<sup>-1</sup>).



**Figura 14:** consumo de açúcares redutores (lactose), produção de etanol e biomassa em cultivo em biorreator contínuo mistura completa mecanicamente agitado com células livres de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante BLR 014 a 37°C, com variação na taxa de diluição.

**Tabela 7:** produtividade ( $Q_p$ ) e a conversão lactose em etanol ( $Y_{P/S}$ ) na taxa de diluição 0,05 h<sup>-1</sup> em biorreator CSTR com *Saccharomyces cerevisiae* recombinante BLR 014 livres em suspensão a 37°C.

Tempo (dias)	$Q_p$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}$
2	0,38	0,26
3	0,40	0,19
4	0,33	0,19
5	0,33	0,16

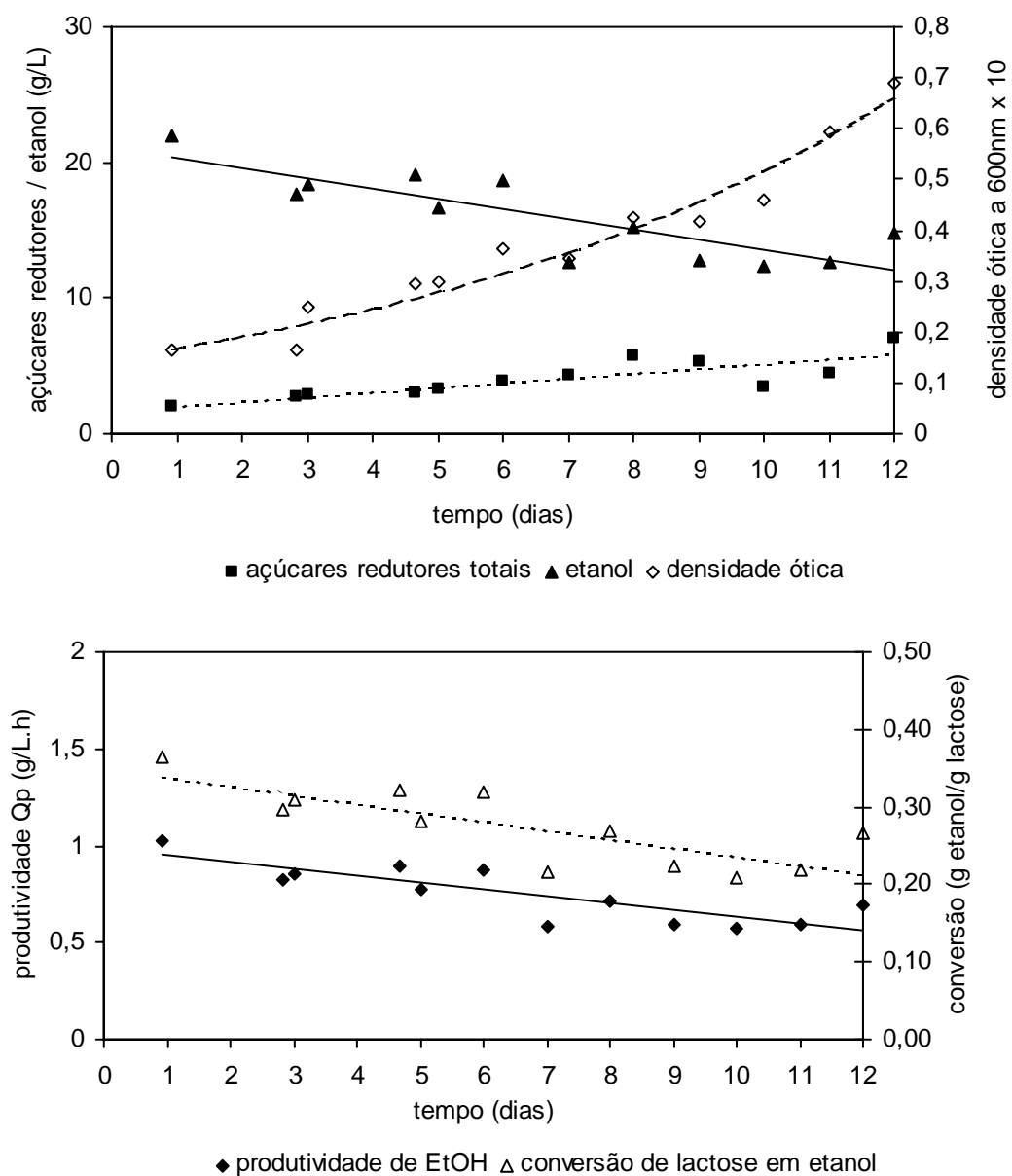
A partir dos resultados mostrados na Figura 14 e na Tabela 7 pode se concluir que a taxa de diluição máxima aplicada ao sistema com células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante na qual ocorreu a lavagem das células foi a  $0,10 \text{ h}^{-1}$ , praticamente a metade da taxa máxima aplicada a *Kluyveromyces marxianus*, fato que pode ser explicado pela menor velocidade de crescimento específico da cepa recombinante associado a sua baixa produção de biomassa. A produtividade na taxa de diluição de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  foi em média de  $0,40 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e a taxa de conversão de 0,20, valores menores que os da *Kluyveromyces marxianus* usando a mesma taxa ( $0,91 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e 0,35, respectivamente).

Goksungur e Zorlu (2001) realizaram experimentos contínuos com tanque agitado usando a *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em Calginato e mosto de beterraba como meio de cultivo. A imobilização preveniu a lavagem das células do biorreator e proporcionou a utilização da taxa de diluição de  $0,22 \text{ h}^{-1}$  com uma produtividade de  $8,67 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Comparando com os experimentos contínuos com as células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante livres, no qual foi aplicada metade da taxa de diluição descrita pelos autores ( $0,10 \text{ h}^{-1}$ ) as células são lavadas do biorreator. Os valores de produtividade e conversão usando taxa de diluição de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  (Tabela 7) apresentaram valores bem menores que os obtidos nos experimentos de Goksungur e Zorlu (2001), demonstrando que a imobilização pode otimizar os processos contínuos.

#### **4.4 Cultivos em Biorreator Contínuo de Fluxo Pistonado com Células Imobilizadas de *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* Recombinante**

##### **4.4.1 Teste de Diferentes Taxas de Diluição em Biorreator PFR com Células de *Kluyveromyces marxianus* em Soro de Queijo**

Os experimentos envolvendo biorreator contínuo de fluxo pistonado com células de *Kluyveromyces marxianus* imobilizadas em Ca-alginato têm como finalidade verificar taxas de diluição maiores que a estabelecida com células livres em suspensão, uma vez que o objetivo primordial da imobilização é a operação de biorreatores com taxas de diluição elevadas sem que haja a lavagem das células. O biorreator foi acondicionado em estufa para o controle da temperatura a 30°C e diferentes taxas de diluição foram aplicadas ao sistema (0,05 h<sup>-1</sup>, 0,10 h<sup>-1</sup> e 0,20 h<sup>-1</sup>).



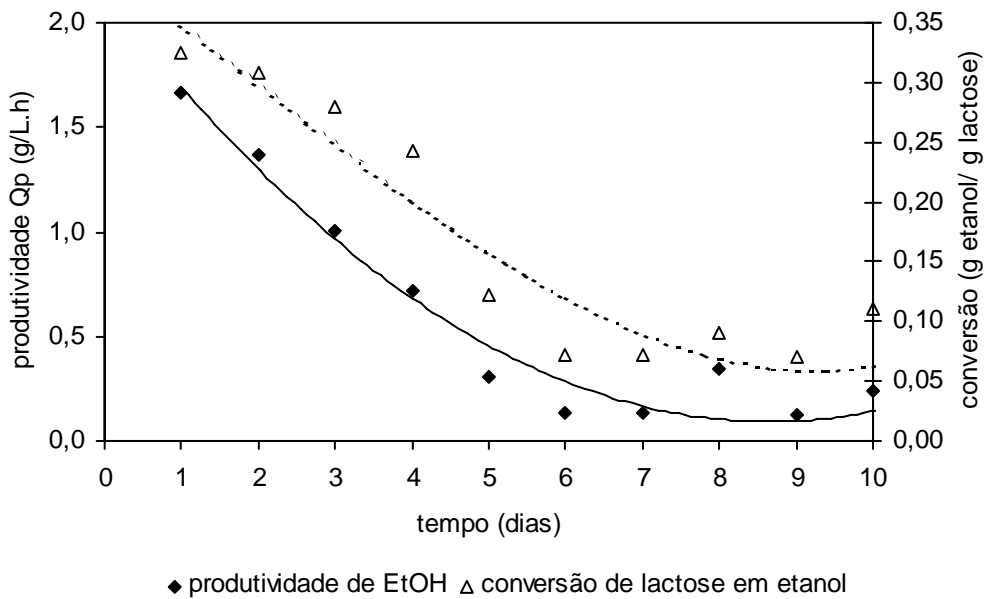
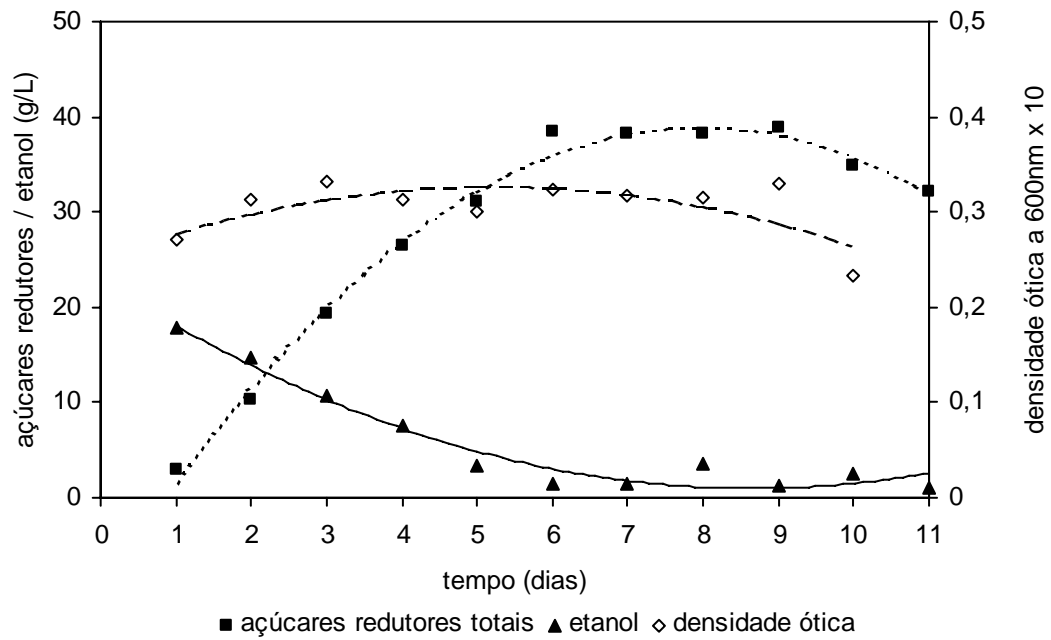
**Figura 15:** consumo de açúcares redutores (lactose), produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator de fluxo pistonado com células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a 30°C.  $D= 0,05 \text{ h}^{-1}$  e  $X_0= 0,04\text{g}$  de células por mL de alginato.

Os resultados demonstram que as células de *Kluyveromyces marxianus* consomem praticamente toda a lactose nas primeiras 24h (Figura 15). O valor máximo de etanol obtido foi de aproximadamente 22 g.L<sup>-1</sup> com uma taxa de conversão de 0,36. Os valores de Q<sub>p</sub>, Y<sub>P/S</sub> e a concentração de etanol produzido diminuem ao longo do tempo e a variação na quantidade de células liberadas das esferas de alginato ao meio externo impediu que o sistema alcançasse o estado estacionário.

A liberação de células ao meio circundante pode ser atribuída a diversas causas como, por exemplo: (1) as esferas de Ca-alginato não possuem resistência mecânica suficiente para manter as células no seu interior; (2) as células-filhas escapam pelos poros da matriz suporte sendo liberadas ao meio e (3) as esferas sofrem ruptura e liberam ao meio as células contidas no seu interior. A terceira hipótese, contudo, pode ser descartada, pois ao final das fermentações a integridade das esferas foi observada visualmente e pode-se concluir que não houve destruição das mesmas.

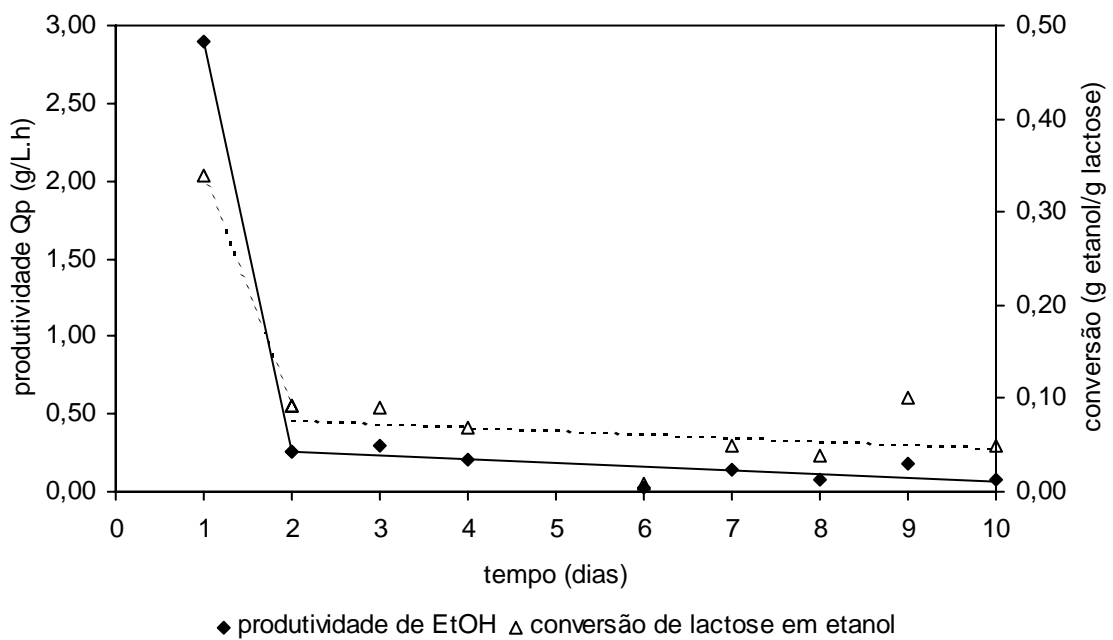
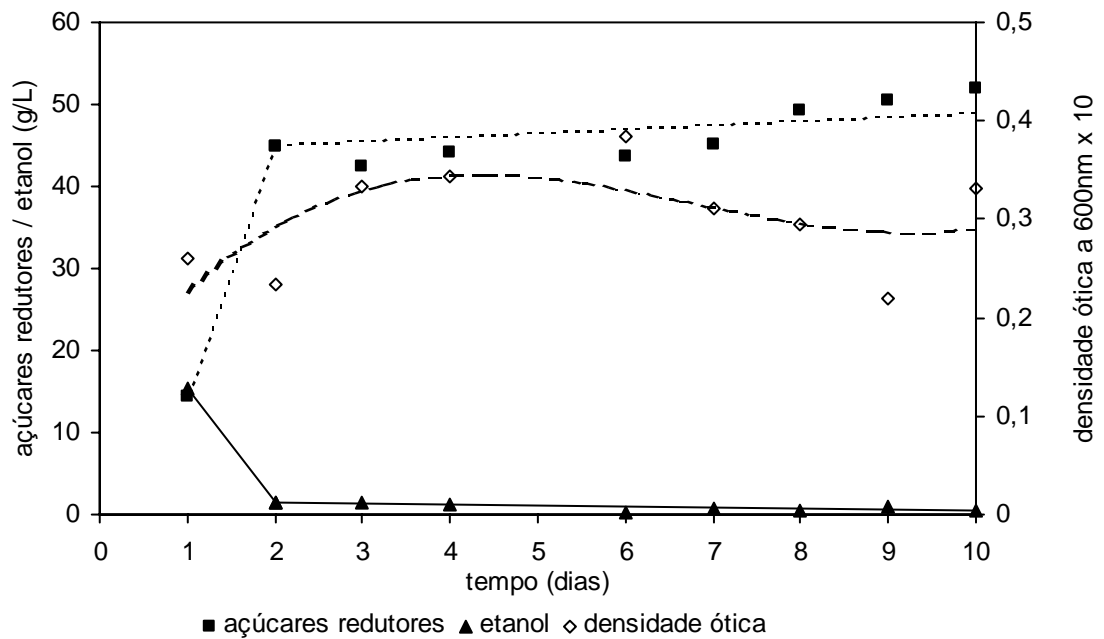
Nos experimentos em biorreator CSTR com células livres usando a mesma taxa de diluição o sistema entrou em estado estacionário, com a taxa de conversão média de 0,46 (92% do máximo teórico) maior que a taxa máxima obtida com o biorreator PFR com células imobilizadas em 24 h (0,36 ou 72% do máximo teórico). Considerando também os valores de produtividade a análise dos resultados demonstra que, nestas condições, o biorreator CSTR foi mais eficiente que o PFR, fato que pode ser atribuído à liberação de biomassa da matriz-suporte e conseqüentemente pelo estado estacionário não ter sido alcançado.





**Figura 16:** consumo de açúcares redutores (lactose), produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator de fluxo pistonado com células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a 30°C.  $D= 0,10 \text{ h}^{-1}$  e  $X_0= 0,04\text{g}$  de células por mL de alginato.

Os resultados apresentados na Figura 16 demonstram que as células de *Kluyveromyces marxianus* consomem praticamente toda a lactose nas primeiras 24h (95% da lactose consumida) a uma taxa de diluição de 0,10 h<sup>-1</sup>, contudo gradativamente vai perdendo a capacidade de metabolizar a lactose, fato evidenciado pelo aumento da concentração do dissacarídeo no meio e a queda na concentração de etanol. A taxa de obtenção do produto em relação ao substrato alcançou 0,32 nas primeiras 24 h e o valor máximo de etanol obtido foi de aproximadamente 17 g.L<sup>-1</sup>, contudo esses valores foram decaindo ao longo do cultivo. Quanto à liberação de biomassa não houve uma variação significativa na quantidade de células liberadas das esferas de alginato ao meio externo no decorrer do cultivo. A partir dos resultados, pode-se especular que tenha havido uma perda de produtividade decorrente da perda de viabilidade dentro das esferas, causada pelo acúmulo de componentes tóxicos ou que o alginato combinado com os componentes do soro de queijo tenham impacto negativo no metabolismo desta espécie de levedura. Farrel e colaboradores (1998) estudaram um pré-tratamento aplicado ao mosto concentrado para evitar a perda de produtividade causada pela presença de componentes tóxicos no meio de cultivo, uma vez que a presença destes componentes inibitórios afeta o crescimento e a funcionalidade do biocatalisador. Em adição, existe ainda a possibilidade da densidade celular imobilizada ser muito baixa acarretando em produtividades menores.

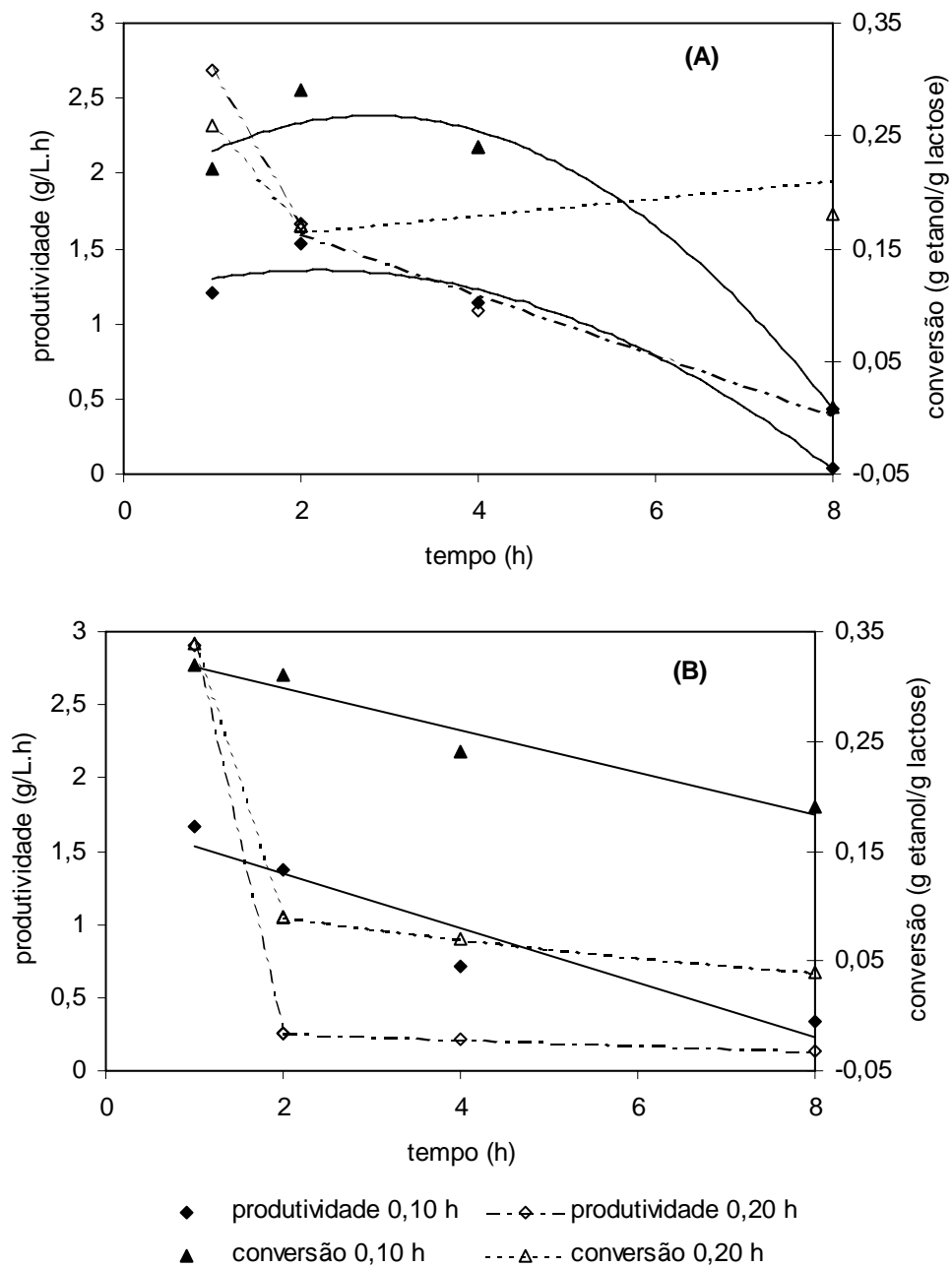


**Figura 17:** consumo de açúcares redutores (lactose), produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator de fluxo pistonado com células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a 30°C.  $D = 0,20 \text{ h}^{-1}$  e  $X_0 = 0,04 \text{ g}$  de células por mL de alginato.

Ao se impor ao sistema uma taxa de diluição de  $0,20 \text{ h}^{-1}$  (Figura 17), a qual ocorreu lavagem das células livres em biorreator CSTR, os resultados mostraram um perfil semelhante ao obtido com a taxa de  $0,10 \text{ h}^{-1}$  quanto à perda de produtividade, entretanto o consumo de lactose foi de apenas 31% e a quantidade de etanol obtida foi de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  com um valor de  $Y_{P/S}$  de 0,34 nas primeiras 24 h. Os valores decaíram drasticamente e no terceiro dia de cultivo a concentração de lactose e a produção de etanol são nulas.

Gough e Mchale (1998) estudaram a produção de etanol a partir de mosto concentrado com *Kluyveromyces marxianus* a  $45^{\circ}\text{C}$  imobilizadas em Ca-alginato usando biorreator de fluxo contínuo em coluna seus resultados demonstraram uma queda na concentração de etanol após 48 h de cultivo. Os autores atribuem a queda na produtividade a compostos tóxicos que afetam a funcionalidade ou prejudicam a viabilidade do biocatalisador.

Love et al. (1998) testaram a produção de etanol por células de *Kluyveromyces marxianus* a  $45^{\circ}\text{C}$  imobilizadas em Ca-alginato e rocha vulcânica pulverizada usando biorreator de fluxo contínuo em coluna e atribuíram a queda na eficiência do processo, quando utiliza taxas de diluição de  $0,15 \text{ h}^{-1}$ , à diminuição do tempo de residência no sistema e conseqüentemente um tempo de contato inadequado entre o substrato e o biocatalisador. Uma vez que, a difusão inadequada do substrato na matriz de imobilização tem efeitos evidentes na taxa de conversão.

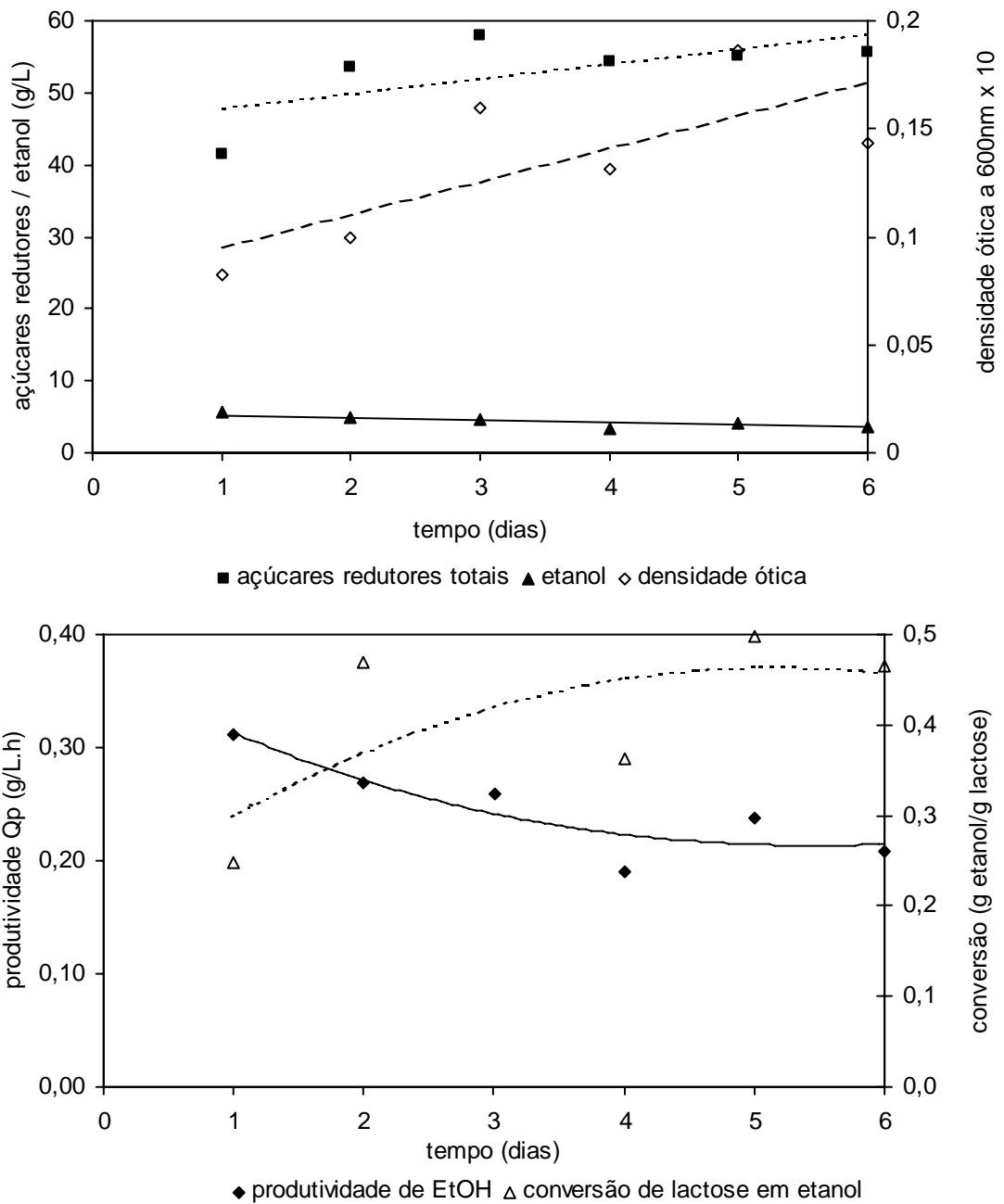


**Figura 18:** comparação entre a produtividade ( $Q_p$ ) e a conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) em diferentes taxas de diluição em biorreator PFR com *Kluveromyces marxianus* CBS 6556 immobilizadas em Ca-alginato a 30°C, com diferentes concentrações iniciais de células immobilizadas (A) 1g de células por mL de alginato; (B) 0,04g de células por mL de alginato.

Com o objetivo de verificar se os resultados de perda de produtividade foram decorrentes da baixa quantidade de células imobilizadas foram realizados experimentos com a concentração inicial de células de 1g por mL de alginato na imobilização (Figura 18). Os resultados mostram um perfil de perda de produtividade semelhante ao obtido com a concentração inicial de 0,04 g por mL de alginato demonstrando que a concentração inicial de células não foi à causa da queda na eficiência do processo.

#### **4.4.2 Teste de Diferentes Taxas de Diluição em Biorreator PFR com Células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante em Soro de Queijo**

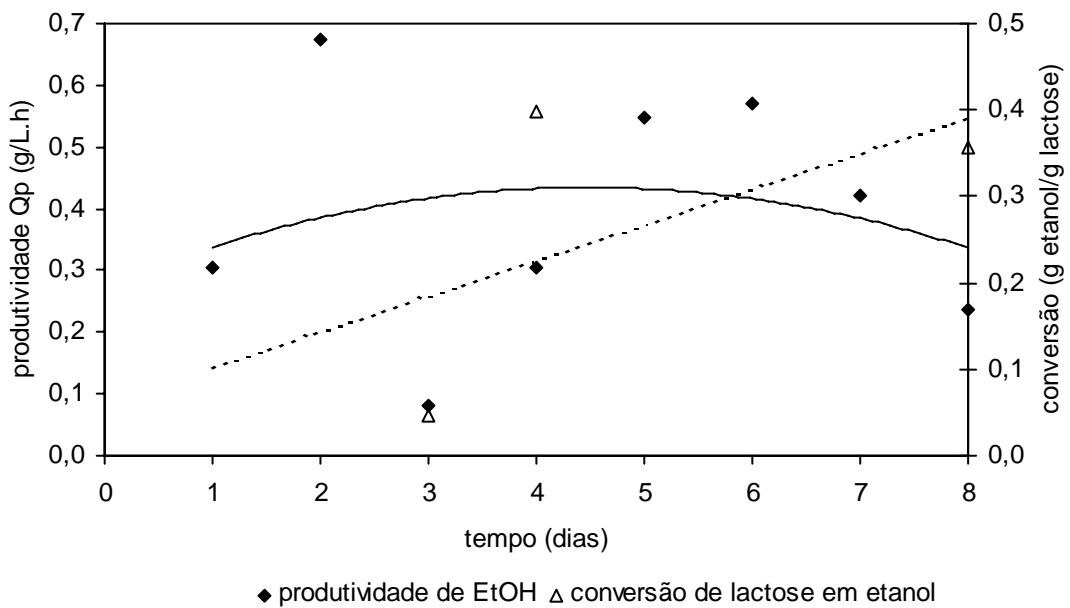
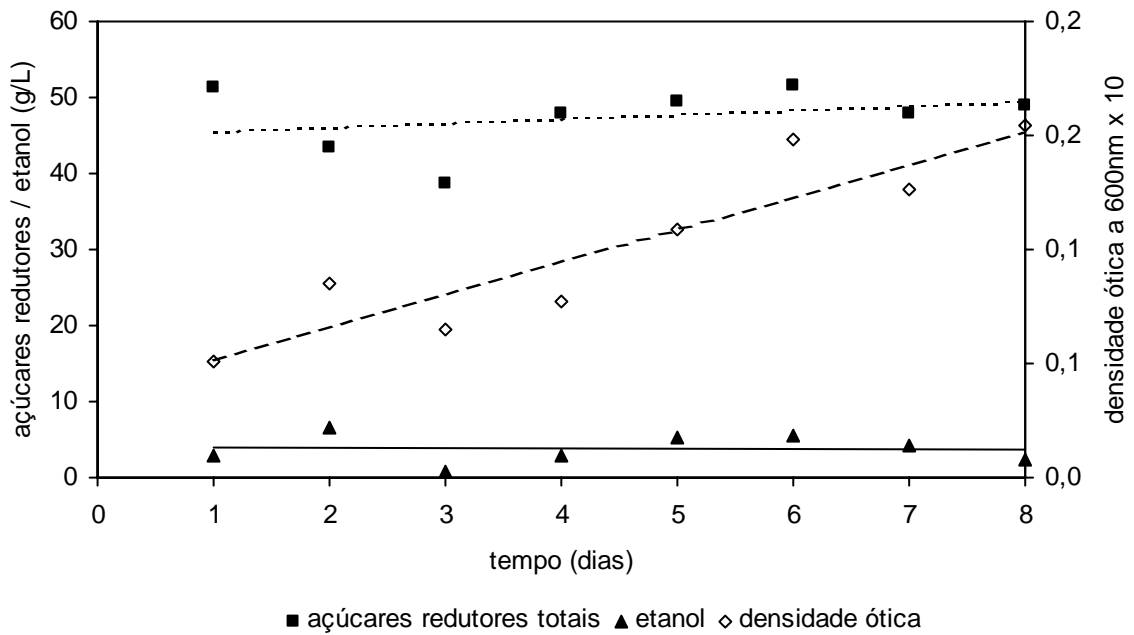
Os experimentos envolvendo biorreator contínuo de fluxo pistonado com células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante imobilizadas em Calginato têm como finalidade verificar taxas de diluição maiores que a estabelecida com células livres em suspensão, uma vez que o objetivo primordial da imobilização é a operação de biorreatores com taxas de diluição elevadas sem que haja a lavagem das células. O biorreator foi acondicionado em estufa para o controle da temperatura a 37°C e diferentes taxas de diluição foram aplicadas ao sistema (0,50 h<sup>-1</sup> e 0,10 h<sup>-1</sup>).



**Figura 19:** consumo de açúcares redutores (lactose), produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator de fluxo pistonado com células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante BLR 014 a 37°C.  $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$  e  $X_0 = 0,04 \text{ g}$  de células por mL de alginato.

No caso dos experimentos envolvendo células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante com a taxa de diluição de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  (Figura 19) se pode observar que o consumo da lactose foi bem menor quando comparado com a *K. marxianus*, sendo que foi consumido apenas 33% do dissacarídeo nas primeiras 24h e a concentração foi estabilizada nesse patamar ao longo do cultivo. A produção de etanol também permaneceu bastante baixa, em torno de  $5 \text{ g.L}^{-1}$ . O regime estacionário não foi alcançado, uma vez que houve variação na quantidade de células liberadas ao meio. As células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante liberaram uma quantidade bem menor de células ao meio externo ( $\text{DO}_{600}$  máxima de 0,18) quando comparada com a *K. marxianus* ( $\text{DO}_{600}$  máxima de 0,7), fato que pode ser explicado pela baixa produção de biomassa apresentada por esta cepa recombinante.





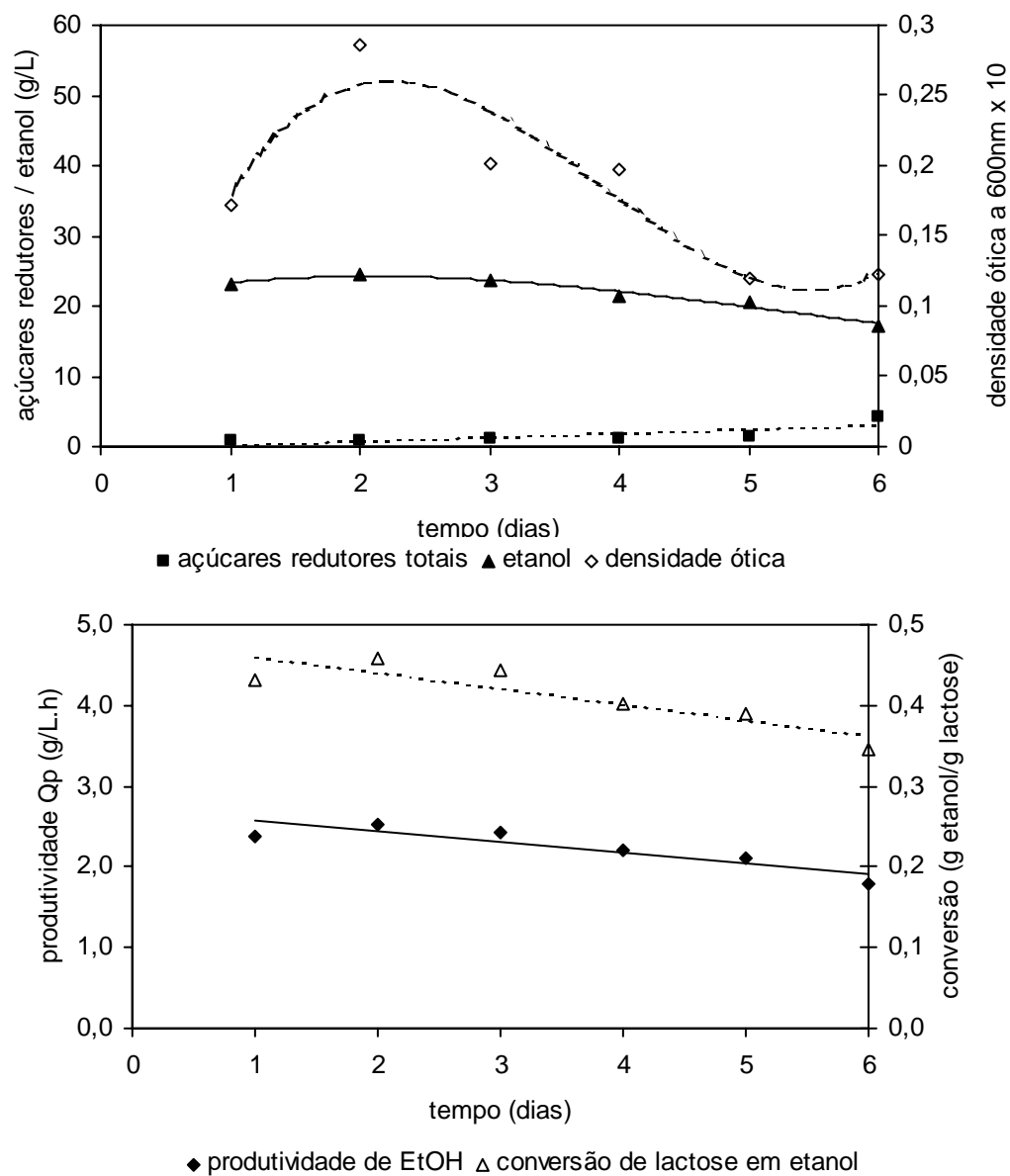
**Figura 20:** consumo de açúcares redutores (lactose), produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator de fluxo pistonado com células de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante BLR 014 a 37°C.  $D= 0,10 \text{ h}^{-1}$  e  $X_0= 0,04\text{g}$  de células por mL de alginato.

A Figura 20 mostra resultados da taxa de diluição de  $0,10 \text{ h}^{-1}$  no qual fica demonstrado que o sistema teve um aumento de biomassa liberada ao meio e não houve quase consumo de lactose apenas 22% nas primeiras 48 h, com a produção de aproximadamente  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol. No decorrer do cultivo, o sistema quase não produz etanol. Os dados obtidos com a cepa recombinante demonstram claramente a mesma não é uma boa produtora de etanol, fato favorecido provavelmente, em grande parte, por sua baixa produção de biomassa (Rech, 2003) e pelos processos baseados em cepas recombinantes, de um modo geral apresentarem uma produtividade modesta (Domingues, 1999).

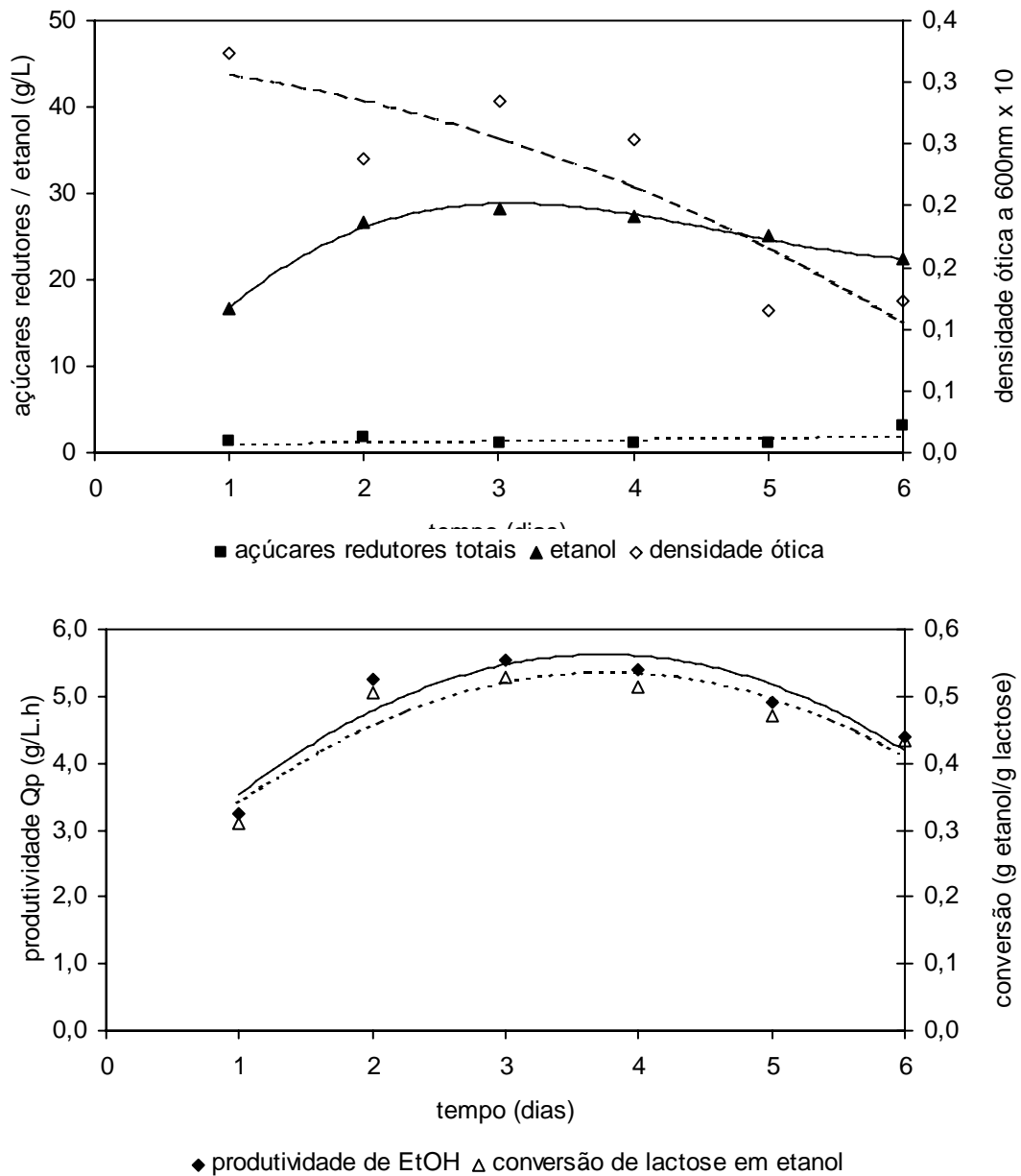
Os resultados apresentados nas duas taxas de diluição (produtividade de  $0,25 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $0,39 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente) são, contudo, uma grande melhora quando comparado com valores que outros autores obtiveram usando *Saccharomyces cerevisiae* metabolicamente modificadas em sistemas em batelada, tais como produtividade de  $0,1-0,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (Porro et al, 1992);  $0,1-0,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (Ramakrishna, 1993).

#### **4.5 Cultivos em Biorreator Contínuo de Fluxo Pistonado com Células Imobilizadas *Saccharomyces cerevisiae* Comercial e *Kluyveromyces marxianus* com Meio Complexo**

O conjunto de experimentos usando biorreator contínuo de fluxo pistonado com células imobilizadas em Ca-alginato de uma cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* KI tendo como meio de alimentação o YEPD, um meio complexo de crescimento para leveduras tinha como finalidade demonstrar se a perda de produtividade que ocorreu a taxas de diluição de  $0,10\text{ h}^{-1}$  e  $0,20\text{ h}^{-1}$  nas demais cepas testadas foram causadas pela técnica de imobilização por envolvimento ou por toxicidade apresentada pelo Ca-alginato.



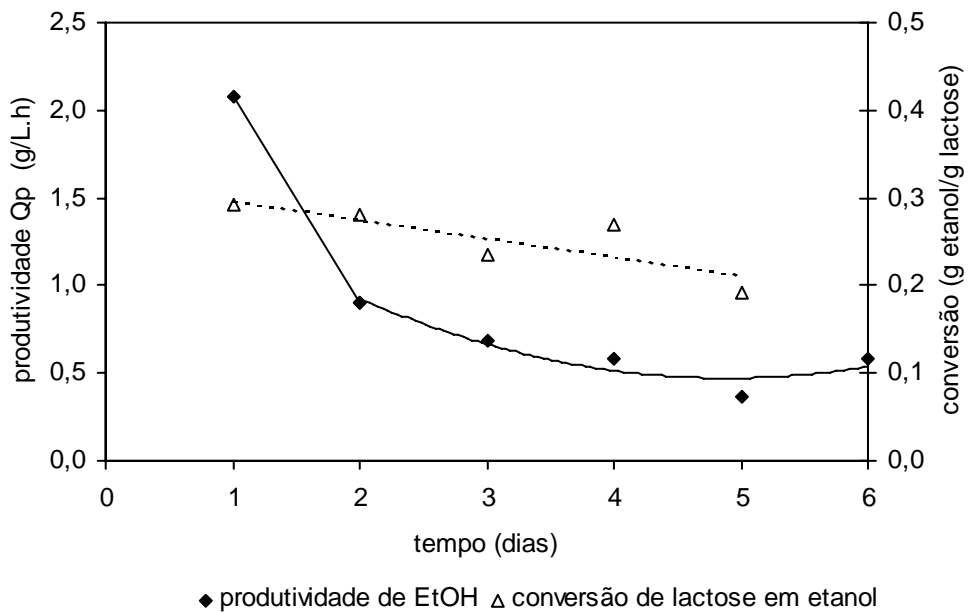
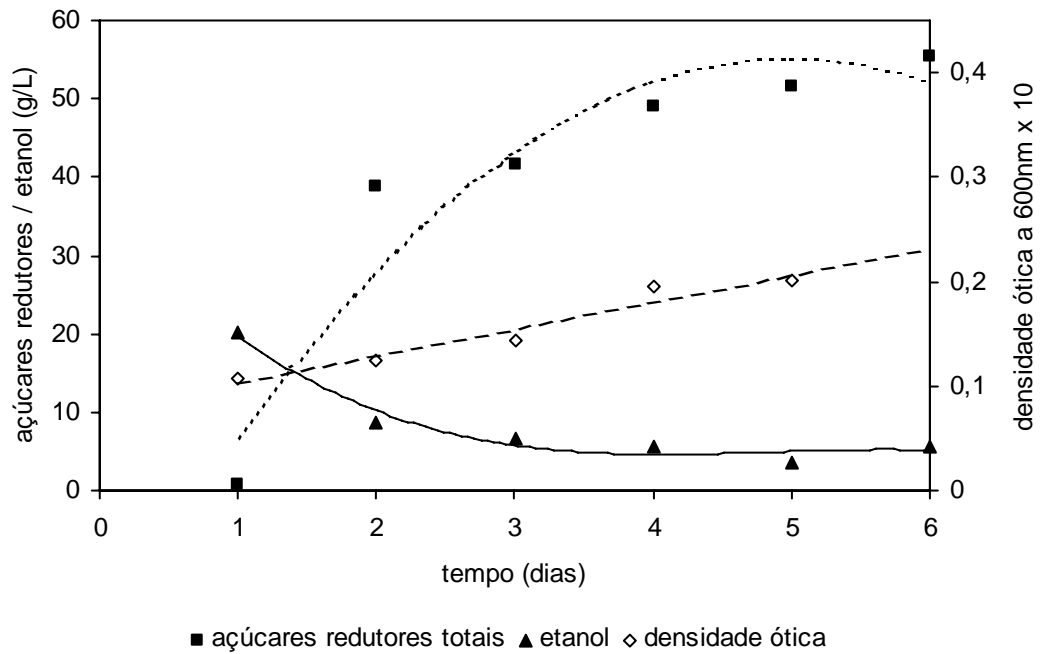
**Figura 21:** consumo de açúcares redutores (glicose), produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator contínuo de fluxo pistonado com células de *Saccharomyces cerevisiae* comercial KI imobilizadas em Ca-alginato a 37°C.  $D=0,10\text{ h}^{-1}$   $X_0=0,04$  g de células por mL de alginato.



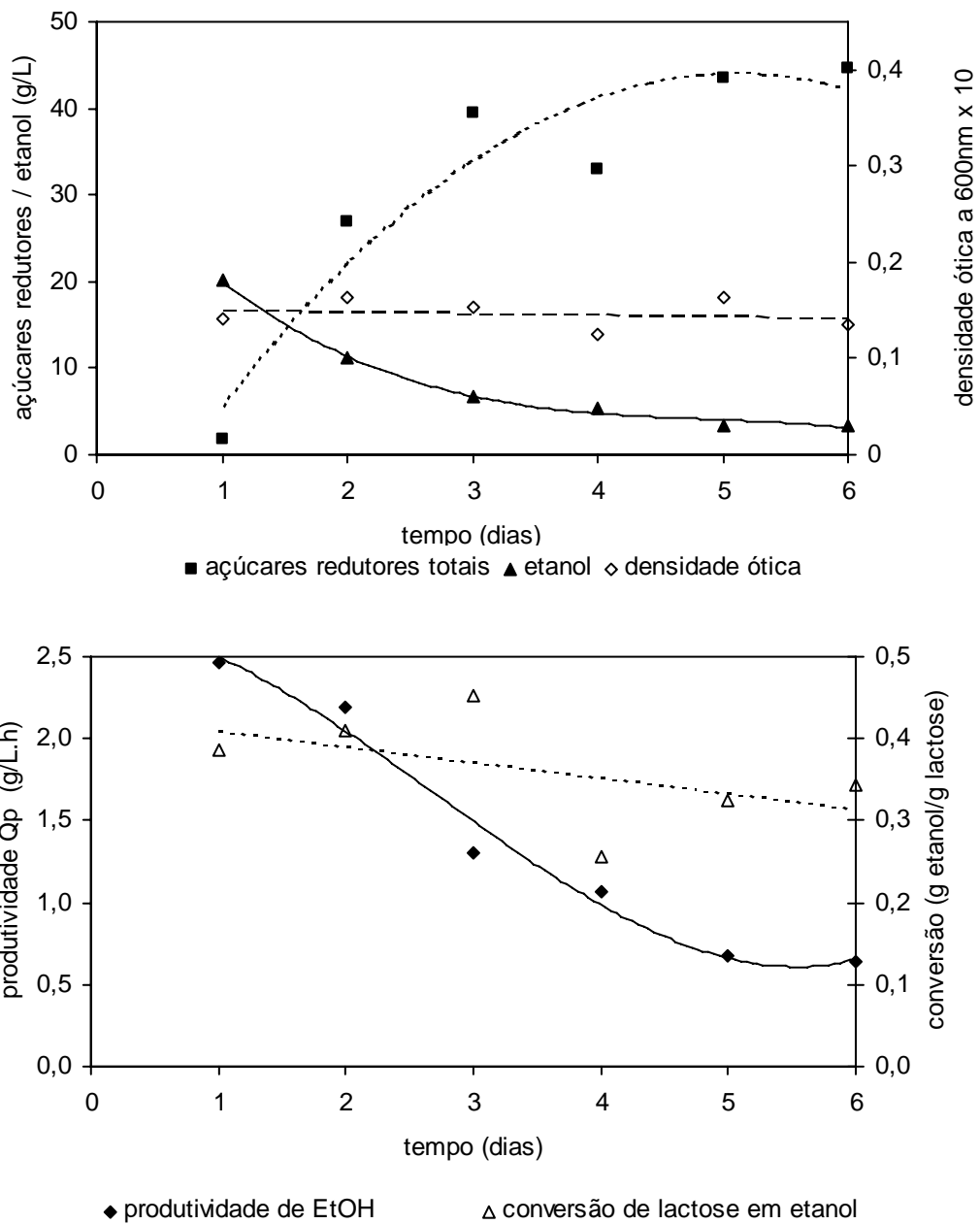
**Figura 22:** consumo de açúcares redutores (glicose), produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator contínuo de fluxo pistonado com células de *Saccharomyces cerevisiae* comercial KI immobilizadas em Ca-alginato a 37°C.  $D=0,20\text{ h}^{-1}$   $X_0=0,04$  g de células por mL de alginato.

Nas Figuras 21 e 22 fica demonstrado que a cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* KI consumiu praticamente todo o açúcar, no caso glicose, presente no meio (aproximadamente 97% para ambas as taxas de diluição aplicadas ao sistema). A produção de etanol atingiu o máximo e se manteve constante em 48 h com 24 g.L<sup>-1</sup> na taxa de 0,10 h<sup>-1</sup> e 26 g.L<sup>-1</sup> na taxa de 0,20 h<sup>-1</sup>, com uma taxa de conversão de substrato em produto de 0,41 e 0,47, respectivamente. Contudo ocorreu uma pequena diminuição de produtividade e na taxa de conversão ao longo do cultivo, que comparado com a *Saccharomyces cerevisiae* recombinante foi bastante pequena, uma vez que esta produziu 0,39 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de etanol. Assim, baseado nos resultados com a cepa comercial, pode se especular que a imobilização por si não afeta o consumo da lactose e produção de etanol a ponto de causar a perda de produtividade evidenciada pela cepa recombinante.

Os dados apresentados são semelhantes aos obtidos por Goksungur e Zorlu (2001) que produziram etanol em mosto de beterraba com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em Ca-alginato em biorreator de leito empacotado e taxa de diluição mantida a 0,22 h<sup>-1</sup>, os autores mantiveram o sistema constante por 25 dias sem perda da capacidade original de fermentação.



**Figura 23:** consumo de açúcares redutores (glicose), produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator contínuo de fluxo pistonado com células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 imobilizadas em Ca-alginato a 30°C. D= 0,10 h<sup>-1</sup>. X<sub>0</sub>= 0,04 g de células por mL de alginato.



**Figura 24:** consumo de açúcares redutores (glicose), produção de etanol, biomassa liberada, produtividade e taxa de conversão em cultivo em biorreator contínuo de fluxo pistonado com células de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 imobilizadas em Ca-alginato a 30<sup>0</sup>C. D= 0,20 h<sup>-1</sup>. X<sub>0</sub>= 0,04 g de células por mL de alginato.



Os experimentos realizados com as células de levedura *Kluyveromyces marxianus* imobilizadas usando o meio complexo YEPD (Figura 23 e 24) demonstram o mesmo perfil apresentado pela mesma em soro de queijo hidrolisado. Os resultados sugerem que a perda de produtividade apresentada pela levedura imobilizada não é consequência de prováveis componentes tóxicos presentes no soro hidrolisado. Em vista disso, uma alternativa para explicar o fenômeno seria a velocidade de crescimento alta que acarretaria problemas como transferência de massa e heterogeneidade na distribuição das células dentro das esferas (causada pela superpopulação) (Zangh e Franco, 2002).

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O emprego de técnicas de imobilização e a configuração do biorreator, tanto o modo de operação quanto o modelo utilizado, são fatores impactantes na produtividade das fermentações alcoólicas usando células de levedura. Outro fator bastante importante a ser considerado é a escolha da cepa utilizada no processo, uma vez que a imobilização pode ter efeitos distintos dependendo do metabolismo e das características de crescimento do microrganismo.

Pela análise dos dados obtidos pelos experimentos em biorreator de fluxo pistonado usando ambas células de levedura imobilizadas em alginato de cálcio pode se observar queda na produtividade quando taxas de diluição maiores que  $0,05 \text{ h}^{-1}$  são aplicadas ao sistema, inviabilizando a utilização deste na produção de etanol, uma vez que taxas menores que  $0,05 \text{ h}^{-1}$  apresentam uma vazão demasiado baixa e sendo comparada com cultivos em batelada. Portanto, os experimentos em PFR não alcançaram o objetivo primordial do emprego de técnicas de imobilização que é a aplicação de altas taxas de diluição.

Baseado nos experimentos com cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* Kl e a *K. marxianus* CBS 6556 em meio complexo, a perda de produtividade apresentada pelas células imobilizadas não pode ser atribuída ao meio de cultivo nem a técnica de imobilização. Uma hipótese para explicar os resultados seria as características de crescimento e metabolismos das cepas em questão: *K. marxianus* apresenta altas velocidades de crescimento que podem afetar a transferência de massa e distribuição dentro da matriz-suporte;

já a *Saccharomyces cerevisiae* recombinante apresenta baixa produção de biomassa e conseqüentemente produtividade baixa.

Desta forma como perspectivas pode se citar a realização de estudos que acompanhem o desenvolvimento da biomassa dentro esferas de alginato ao longo do cultivo, pela dissolução destas e determinação da viabilidade das células. Além do emprego de outros modos de operação ao sistema imobilizado, como por exemplo, batelada alimentada ou batelada repetida (seqüencial).

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ALTHERTUM, F.; IGRAM, L.; CONWAY, T. Produção de etanol a partir do hidrolisado do bagaço de cana de açúcar empregando *Escherichia coli* recombinante. <http://www.fapesp.br/energia.htm>. Revista Isto é. P. 62, outubro de 1995.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**, Ed. Edgard Blucher Ltda, vol. 3, São Paulo, 2001.
- BAJPAI, P.; MARGARITIS, A. ethanol inhibition kinetics of *Kluyveromyces marxianus* growth on Jerusalem Artichoke juice. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 44, p. 1325-1329, 1982.
- BAKKEN, A. P.; HILL, C. G.; AMUNDSON, C. H. Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized beta-galactosidase in a spiral flow reactor. **Biotechnol. Bioeng.** v. 33, p.1249-1257, 1989.
- BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R.; SINGH, D.; McHALE, A. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations. Part I: Yeasts in general. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. V.14, p. 809-821, 1998.
- BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. the isolation of thermotolerant fermentative yeast capable of growth at 52<sup>0</sup>C and ethanol production at

48°C e 50°C. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. V.8, p. 259-263, 1992.

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

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. oligossacharides extracted from cell walls of *Kluyveromyces marxianus* grow on whey. **Biotechnol. Technol.** V. 12 (3), p. 229-233, 1998.

BELLAVER, L. H.; CARVALHO, N.M.; NETO, J. <sup>a</sup>; GOMBERT, <sup>a</sup> K. Ethanol formation and enzyme activity around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 expose to glucose or lactose excess. **FEMS Yeasts Research**. V. 4, p. 691-698, 2004.

BERRY, D.R.; RUSSEL, I.; STEWART, G.G. **Yeast Biotechnology**. Londres, Unwin, 1987. p. 160-199.

BRADY, D.; NIGAM, P.; MARCHANT, R.; McHALE, A. P. Production of ethanol at 45°C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. **Bioprocess Engineering**. V. 16, p.101-104, 1997.

- BRAVO, P; GONZALES, G. Continuous ethano fermentation by immobilized yeasts cell in a fluidized-bed reactor. **J.Chem. Technol. Biotechnol.** V. 52, p. 127-134, 1991.
- CARRARA, C. R.; RUBIOLO, A C. Determination of kinetics parameters for free and immobilized. **Process Biochem.** V. 31, p. 243-248, 1996.
- CARRARA, C. R.; RUBIOLO, A C.a methods for evaluating hydrolysis of lactose in a fixed bed reactor with beta-galactose immobilized in chitosan. **Chem. Eng. J.** V. 65, p. 96-98, 1997.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontinua. Cap. 9 in W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; A AQUARONE, E.; BORZANI, **Engenharia Bioquímica (Biotecnologia Industrial)**, Ed. Edgard Blucher Ltda, vol. 2, São Paulo, 2001.
- CASTILO, J.F. Lactose metabolism by yeasts, **Yeast Biotechnology and Biocatalysis**, Nova Iorque,p.297-320, 1990.
- CHAPPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. Carbohydrate Analysis; A Practical Approach. 2<sup>nd</sup> ED. IRL, 1994).

CHIBATA, I; TOSA, T.; SATO, T. **Methods Enzymology**.v. 44, p. 739-745, 1986.

COMPAGNO, C.; PORRO, D.; SMERALDI, C.; RANZI, B. M. Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V. 43, p. 822-825, 1995.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering.** V. 72, n. 5, p. 507-514, 2001.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação continua. Cap. 12 in W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; A AQUARONE, E.; BORZANI. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, Ed. Edgard Blucher Ltda, vol. 2, São Paulo, 2001.

FARREL, E. A.; BUSTARD; GOUGH, S.; M.; McMULLAN, G.; SINGH, P.; SINGH, D.; McHALE, A. P. Production of ethanol from molasses at 45<sup>0</sup>C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth in molasses pre-treated with Amberlite and non-living biomass. **Bioprocess engineering.** V. 196, p.217-219, 1998.

FRIEND, A. B.; SHAHANI, K. M. Whey fermentation. **New Zeland Journal Dairy Sci. Technol.** V. 14, p. 143-155, 1979.

FURLAN, S.A.; CARVALHO-JONAS, M.F.; MERKLE, R.; BÉRTOLI, G.B.; JONAS, R. Aplicação do sistema *Microtiter Reader* na seleção de

microrganismos produtores de beta-galactosidase. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, p.1261-1268, 1995.

GALVÃO DE SOUZA, C.; LEDINGHAM, W. M.; MORAIS, M.A. Utilization of cheese whey as an alternative growth medium for recombinant strains of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**. V. 23, p. 1413-1416, 2001.

GEKAS, V.; LOPES-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**. V. 20, p. 2-12, 1985.

GERBSCH, N.; BUCHHOLTS, R. New process and atual trends in biotechnology. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 16, p. 259-269, 1995.

GOKSUNGUR, Y.; ZORLU, N. Production of ethanol from beet molasses by Ca-alginate immobilized yeasts cells in a packed-bed bioreactor. **Turk Journal Biology**. V. 25, p. 265-275, 2001.

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

GOUGH, S.; BRADY, D.; NIGAM, P.; MARCHANT, R.; McHALE, A. P. Production of ethanol from molasses at 45<sup>0</sup>C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Bioprocess engineering**. V. 16, p.389-392, 1997.



- GOUGH, S.; BARROM, N.; ZUBOV, A. L.; LOZINSKY, V. I.; McHALE, A. P. Production of ethanol from molasses at 45<sup>0</sup>C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate gels and poly(vinyl alcohol)cryogel. **Bioprocess engineering**. V. 19, p.87-90, 1998.
- GOUGH, S; McHALE, A. P. Continuous ethanol production from molasses at 45<sup>0</sup>C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3in a continuous-flow bioreactor. **Bioprocess engineering**. V. 19, p.33-36, 1998.
- GROBOILOT, A.; BOADI, D.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**. V. 14 (2), p. 75-107, 1994.
- GUIMARÃES, W. V. Fermentation of sweet whey by ethanologenic. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 40, p. 41-45, 1999.
- HACK, C.J.; BANAT, I. M; MARCHANT, R.; SINGH, D.Ethanol production at BY A STRAIN OF *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperatures in various bioreator configurations. In: Proceedings of Conference on Fermentation Physiology; Pub. Institution of Chemical Engineers . p. 7-9, 1994.
- HOBMAN, P. G. Review of process and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum. **Journal Dairy Sci**. v. 67, p. 2630-2635, 1984.

- HUGHES, D. B.; TUDROSZEN, N. J.; MOYE, C. J. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**. V. 6, p. 1-6, 1984.
- JEONG, Y. S.; VIETH, W. R.; MATSUURA, T. Fermentation of lactose to ethanol with recombinant yeast in a immobilized yeast membrane bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 37, p. 587-590, 1991.
- JUNTER, G.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse. **Biotechnology advances**. V. 22, p. 633-658, 2004.
- JUNTER, G.; COQUET, L.; VILAIN, S.; JOUENNE, T. Immobilized cell physiology: current data and potentialities of proteomics. **Enzyme Microbial technology**. V. 31, p. 201-212, 2002a.
- JUNTER, G.; VILAIN, S.; JOUENNE, T. Biological treatment of water using immobilized-cell systems. *Chim Oggi*. V. 20 (6), p. 57-62, 2002.
- KATSBAUER, B.; NARODOSLAWSKY, M.; MOSER, A. Classification system for immobilization techniques. **Bioprocess Engineering**. V. 12, p. 173-179, 1995.

KLEINSTREUER, C. Analysis of biological reactors. *APUD* SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. Cap. 8 in W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; A AQUARONE, E.; BORZANI, **Engenharia Bioquímica (Biotecnologia Industrial)**, Ed. Edgard Blucher Ltda, vol. 2, São Paulo, 2001.

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

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

LINS, A. C.; ROCHA LEÃO, M. H. Removal of skim milk lactose using free and immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells. **World journal of Microbiology and Biotechnology** . V. 18, p. 187-192, 2002.

LOVE, G GOUGH, S.; BRADY, D.; NIGAM, P.; MARCHANT, R.; McHALE, A. P.; BARROM, N.; SINGH, D. Continuous ethanol fermentation at 45<sup>0</sup>C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate and kissiris. **Bioprocess engineering**. V. 18, p.187-189, 1998.

- MARQUES, T.; SERRA, G. estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos de Campinas**. V. 24, p. 532-535, 2004.
- MARTYNENCO, N. N.; GRACHEVA, I. M. Physiological e biochemical characteristics of immobilized champagne yeasts and their participation in champagne prosses: a Review. **Applied Biochemistry and microbiology**. V. 39, n. 5, 439-445, 2003.
- MAZID, M. A. Biocatalysts and immobilized enzyme/cell bioreactors. **Biotechnology**. V. 11, p. 690-695, 1993.
- MAWSON, A. J. Yeast biomass production from acid whey permeate. **Biotechnol. Letters**. V. 10, p. 503-508, 1988.
- MENDEZ, R.; BLASQUEZ, R.; LORENZO, F.; LEMA, J. M. Aerobic treatment of cheese whey: start-up and operation. **Water Sci. Technol**. V. 21, p. 1857-1860, 1989.
- MOULIN, G.; GALZY, P. Whey a potential substrate for biotechnology. **Biotechnol. Genet. Eng. Review**. V. 1, p. 347-374, 1984.

- MOSER, A. tubular bioreactors: case study of bioreactor performance for industrial production and scientific research. **Biotechnol. Bioeng.** v. 37, p.1054-1065, 1991.
- NABAIS, S. C.; CORREIA, I.; VIEGAS, C. A; NOVAIS, J. M. **Appl. Environ. Microbial.** V. 54, p.2439-2446, 1988.
- NOLAN, A. M.; BARRON, N.; BRADY, D.; MAcAREE, T.; SMITH, D.; McHALE, A. P.; McHALE, L. Ethanol production at 45°C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 following growth in glucose-containing media. **Biotechnology Letters.** V. 16, p. 849-853, 1994.
- OKABE, M.; KATOH, M.; FURUGOORI, F.; YOSHIDA, M.; MITSUI, S. Growth e fermentation characteristics of bottom brewer's yeast under mechanical stirring. **J. Ferment. Bioengineering.** V. 71, p.148-152, 1992.
- PONSANO, E.; CASTRO GOMES, R. fermentação do soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa para a redução de sua capacidade poluente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** V. 15 (1), p. 170-173, 1995.
- PORRO, D.; MARTEGANI, E.; RANZI, B.M.; ALBERGHINA, L. Lactose/whey utilization and ethanol utilization by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biotechnol. Bioeng.** v. 39, p. 799-805, 1992

PRADELLA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. Cap. 16 in W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; A AQUARONE, E.; BORZANI. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, Ed. Edgard Blucher Ltda, vol. 2, São Paulo, 2001.

QUEIROS, I. Levedura inteligente acelera a produção de álcool. **Jornal da Universidade de Campinas**, julho de 2003.

RAMAKRIHNNAN, S.; HARLEY, B. S. Fermentation of lactose by yeasts cells secreting recombinant fungal lactase. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 59, p. 4230-4235, 1993.

RECH, R.; CASSINI, C.; AYUB, M.A. utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of beta-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. V. 23, p. 91-96, 1999.

RECH, R. **Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por leveduras a partir de soro de queijo**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2003.

RICHTER, K.; NOTTELMAN, S. An Empiric steady state model of lactate production in continuous fermentation with total cell retention. **Eng. Life. Sci.** V. 4 (5), p. 426-432, 2004.

ROSA, M.F.; CORREIA, I.; NOVAIS, J. M. **Biotechnology Letters.** v. 9, p. 441-444, 1987.

ROUKAS, T. Continuous ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a paked-bed bioreactor. **J.Chem. Technol. Biotechnol.** V. 59, p. 387-393, 1994.

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

SANTOS, A.; VALLE, M.; GIANNINI, R. Adição de compostos nitrogenados a gasolina e a experiencia do PROALCOOL. **Economia e Energia.** V. 34, 2002.

SAUCEDO, j. E.; AUDRAS B.; ANDRAS J.; BASINET J.; BARBOTIN, N. **FEMS Microbiology.Review.** v.14, p. 93, 1994.

SERP, D.; CANTANA, E.; HEIZEN, C.; STOCKAR, U.; MARISON, W. Characterization of an encapsulation device for production of monodisperse

- alginate beads for cell immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 70 (1), p. 41-53, 2000.
- SHUKLA, T. Beta-galactosidase technology; a solution of lactose problem. **CRC Crit,Rev. Food Technol.** P. 325-356, Janeiro de 1975.
- SILVEIRA W. B.; PASSOS, F. J.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen level. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 46, p. 141-209, 2005.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. Cap. 8 in W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, **Engenharia Bioquímica (Biotecnologia Industrial)**, Ed. Edgard Blucher Ltda, vol. 2, São Paulo, 2001.
- SCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**. V. 10, p. 631-637, 2000.
- SOGOYAN, K. R. Biochemical features of application of immobilized in production of sparkling wine by bottle fermentation, **Cand. Sc. (Tech) Dissetion**, Yalta, 1998.



SOUZA JUNIOR, C. G.; LEDINGHAM W. M.; MORAIS JUNIOR, M. A.;  
Utilization of cheese whey as an alternative grow medium for recombinant  
strains of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**. V. 24, p.  
1413-1416, 2001.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG, J. C. Control of  
packed column fouling in the continuous fermentation and stripping of  
ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 51, p. 33-39, 1996.

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

VIEIRA, A. M.; CORREIA, I.; NOVAIS, J. M.; CABRAL, J. Could the  
improvements in the alcoholic fermentations of high glucose concentrations  
by yeasts immobilization be explained by media supplementation.  
**Biotechnology Letters**. V. 11 (2), p. 137-140, 1989.

VIRKAJARVI, I.; VAHKONEN, T.; STOGRADS, E. Control of microbial  
contamination in continuous primary fermentation by immobilized yeasts (  
2001). *APUD* KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.;  
MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilizations technologies and  
supports materials suitable in alcohol beverages production: review. **Food  
Microbiology**. V. 21, p. 377-397, 2004.

- VON STOCKER, U; MARISON, I. W. Unconventional utilization of whey in Switzerland. **Bioprocess Engineering**. P. 342-392, 1993.
- ZAFAR, S.; MOHAMMAD, O.; MOHAMMED, S.; HUSAIN, S. Batch Kinetics and modeling of ethanolic fermentation of whey. **International Journal of Food Science and Technology**. V.40, p. 597-604, 2005.
- ZHANG, W.; FRANCO, C. Characterizing the heterogeneity of an immobilized cell gel matrix. **Eng. Life Sci.** v. 2, p. 409-414, 2002.
- ZHOU, Q. Z.; CHEN, X. D.; LI, X. Kinetics of lactose hydrolysis by beta-galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton fabric. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 81, n. 2, p. 127-133, 2002.
- WATSON, K. temperature relations in yeasts. **The Yeasts**. V. 2, p. 41-69, 1987.
- YANG, S.; TANG, I.; ZHU, H. a novel fermentation process for calcium magnesium acetate production from cheese whey. **Applied Biochemistry biotechnology**. V. 34/35, p.569-583, 1992.
- YVES, V. Le lactoserum. Matiere premiere noble pour les industries alimentaires humaines et animales. **Revue Laitiere Française**. V. 372,p. 27-39, 1979.

## **7. APÊNDICE**

### **7.1. Curva Padrão de Cromatografia**