

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

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

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

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

E-mail para contato: sabrinagabardo@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

O aperfeiçoamento de processos fermentativos associados à crescente preocupação ambiental tem impulsionado pesquisas no sentido de desenvolver tecnologias alternativas de geração de energia (Canacki e Sanli, 2008). O aproveitamento de subprodutos industriais para a produção de etanol tem sido significativo nos últimos anos devido ao mercado crescente e a potencial redução dos custos de produção associada a sua utilização. O emprego de substratos alternativos e de baixo custo, tais como o permeado e o soro de queijo, além de auxiliar na produção de etanol, pode, ainda, minimizar problemas ambientais através de seu aproveitamento neste bioprocessos (Gabardo *et al.*, 2012).

O soro de queijo, subproduto da indústria de laticínios, se caracteriza por ser rico em nutrientes, contendo apreciáveis quantidades de lactose (45-50 g L⁻¹), proteínas (6-8 g L⁻¹), e sais minerais (8-10 % do extrato seco). Processos que valorizam o soro de queijo estão sendo

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

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

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Permeado e soro de queijo

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

2.2 Microrganismo e manutenção celular

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

2.3 Fermentação em frascos agitados

O pré-inóculo foi preparado através da transferência asséptica de uma colônia isolada para 50 mL de meio YEPD (extrato de levedura, 10 g L^{-1} ; peptona bacteriológica, 20 g L^{-1} e glicose, 20 g L^{-1} , pH 7,0) em frascos cônicos de 250 mL. A linhagem foi incubada em agitador rotacional, sob agitação orbital de 180 rpm, a uma temperatura de 30°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$), por 12 h. Os inóculos foram preparados através da padronização da concentração celular para densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) igual a 1. Os meios soro e permeado de soro foram previamente hidrolisados com β -galactosidase comercial utilizando um volume de enzima de $0,5 \text{ mL L}^{-1}$, a temperatura ambiente, em pH 7,0, por 8 h e sob branda agitação. O cultivo foi conduzido em frascos cônicos de 250 mL contendo 144 mL de meio de fermentação esterilizado (121°C , 15 min), pH 7,0 e 16 mL de inóculo, totalizando um volume de fermentação de 160 mL. Para evitar a precipitação das proteínas durante o processo de esterilização, o soro de queijo foi previamente hidrolisado com uma protease comercial a 55°C , pH 8,5 por 3 h. Os frascos cônicos contendo as culturas foram incubados em agitador orbital, a uma temperatura de 30°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$), sob agitação de 150 rpm por 48 h.

2.4 Métodos analíticos

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

sulfúrico 5mM (H_2SO_4) como fase móvel na vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, e $20 \mu\text{L}$ de volume de amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

A cinética do consumo dos monossacarídeos glicose e galactose e da produção de etanol em meio soro e permeado de soro de queijo pode ser observada na Figura 1. Um comportamento diauxico é observado para ambos os meios de cultivo, em que a glicose é consumida primeiramente à galactose. Este fato é característico de linhagens de *S. cerevisiae* e acontece devido à repressão catabólica dos genes *GAL* pela glicose (Guimaraes *et al.*, 2010). Além do mais, a galactose foi metabolizada mais lentamente do que a glicose, levando mais que o dobro do tempo para a sua exaustão. Isto pode ser explicado devido ao fato de que a bioconversão da galactose exige energia e etapas catabólicas adicionais, uma vez que a galactose deve primeiramente entrar na via Leloir, transformando-se em um intermediário glicolítico, para posteriormente entrar na via glicolítica e finalmente ser reduzida a etanol (Rubio-Teixeira, 2005; Timson, 2007). Além disso, a metabolização da galactose diferiu nos distintos meios. Uma explicação para isso é devido ao meio soro de queijo ser mais rico em nutrientes, contendo maiores quantidades de proteínas e sais minerais, favorecendo o crescimento celular e a produção de etanol. Neste mesmo sentido, a cinética de produção de etanol foi mais rápida em meio soro de queijo do que em permeado de soro de queijo nas primeiras 24 h, contudo para o período de 48 h, a produção de etanol foi maior em permeado de soro de queijo (19 g L^{-1}), o que refletiu em maiores produtividades volumétricas (Tabela 1). Isto se deve pela diferença inicial dos açúcares, em que no início do experimento a concentração de glicose e galactose ficou em 20 g L^{-1} ao passo que em permeado de soro a concentração inicial foi de 25 g L^{-1} . O fator de conversão de açúcares a etanol foi maior em meio soro de queijo, sugerindo uma maior adaptação em meio soro de queijo pela levedura.

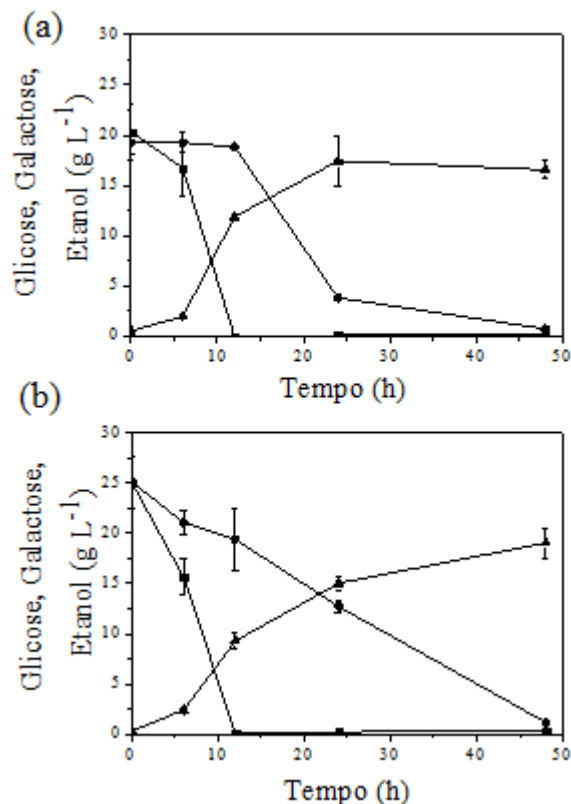


Figura 1. Cinética do consumo de glicose e galactose e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em meio soro de queijo (a) e em permeado de soro de queijo (b). Glicose (■), Galactose (●), Etanol (▲).

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

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

Os parâmetros cinéticos obtidos neste trabalho foram ligeiramente inferiores aos reportados em literatura, contudo, é válido enfatizar que estes últimos utilizaram *S. cerevisiae* geneticamente modificada, o que pode influenciar nas características fisiológicas e no metabolismo do carbono. Por exemplo, Silva *et al.* (2010) obtiveram uma produtividade volumétrica de 0,74 g L⁻¹ h⁻¹ e uma conversão teórica de 76 % partir de soro de queijo deproteinizado, utilizando *S. cerevisiae* recombinante, NCYC869-A3/T1-E, a uma temperatura de 30 °C e 150 rpm; além disso, alto fator

de conversão ($0,48 \text{ g g}^{-1}$) foi alcançado por *S. cerevisiae* geneticamente modificada (GRF167) a partir de meio sintético contendo 20 g L^{-1} de glicose e de galactose (Ramakrishnan e Hartley, 1993). Valores similares aos obtidos no presente trabalho foram observados por Domingues *et al.* (1999) ao utilizar *S. cerevisiae* geneticamente modificada (linhagem T1), chegando a uma produtividade volumétrica de $0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e uma eficiência de 60 % a partir de meio sintético contendo lactose como fonte de carbono.

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

4. REFERÊNCIAS

- BAI, F.W;ANDERSON, W.A; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.*, v. 14, p. 89-105, 2008
- BASSO, L. C.; de AMORIM, H. V.; de OLIVEIRA, A.J., et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 8, p.1155-1163, 2008.
- CANAKCI, M.; SANLI, H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J. Ind.Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, p. 431-441, 2008.
- DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biofuels. *Progress Energy Combustion Sci.*, v. 33, p. 1-18, 2007.
- DOMINGUES, L; TEIXEIRA, J.A; LIMA, N. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. *Appl. Microbiol.Biotechnol.*, v.51, p.621-626, 1999.
- DOMINGUES, L; LIMA, N; TEIXEIRA, J.A. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 72, p. 507-514, 2001.
- GABARDO, S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. *J. Chem. Technol.Biotechnol.*, v. 87, p.1194-1201, 2012.

- GUIMARÃES, P.M.R; TEIXEIRA, J.A; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Biotechnol. Adv.*, v.28, p. 375–384, 2010.
- MUSSATTO S. I.; DRAGONE G.; GUIMARAES P.M.R., et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol. Adv.*, v.28, p.817-830, 2010.
- RAMAKRISHNAN, S; HARTLEY, B.S. Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Appl. Environmental Microbiol.*, v. 59, p.4230-4235, 1993.
- RUBIO-TEXEIRA, M. A comparative analysis of the genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Yeast Research*, v. 5, p. 1115-1128, 2005.
- SILVA, A., GUIMARES, P.M.R., TEIXEIRA, J.A., DOMINGUES, L. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *J. Ind. Microbiol.Biotechnol.*, v. 37, p. 973-982, 2010.
- SISO M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technol.*, v. 57, p. 1-11, 1996.
- TIMSON, D. J. Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochem., Process Biotechnol. Molecular Biology. In: Global Sci. Books*, v.1, p.63-73, 2007.