



## **Aproveitamento de resíduo da indústria de laticínios para a produção de etanol utilizando células imobilizadas em Lentikats®**

**Sabrina Gabardo<sup>1</sup>, Rosane Rech<sup>2</sup>, Marco Antônio Záchia Ayub<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>UFSCar/ Universidade Federal de São Carlos (sabinagabardo@gmail.com)

<sup>2</sup> UFRGS/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (rrech.rosane@gmail.com, mazayub@ufrgs.br)

### **Resumo**

O aproveitamento de resíduos agroindustriais associado à tecnologia de processos fermentativos tem incentivado o desenvolvimento de novas estratégias de geração de energia visando o concomitante tratamento do resíduo com a obtenção de compostos de interesse, tais como o etanol. O permeado de soro de queijo, um subproduto da indústria de laticínios, constitui-se como um substrato rico em nutrientes e de grande potencial para a produção de etanol. Diante da necessidade de melhorias em processos fermentativos, a tecnologia de imobilização celular pode contribuir positivamente para bioprocessos mais eficazes e vantajosos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a bioconversão de permeado de soro de queijo a etanol utilizando *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 imobilizada em Lentikats®. Os cultivos ocorreram em frascos Duran a partir de diferentes concentrações de permeado de soro de queijo (60-180 g L<sup>-1</sup>), na temperatura de 30 °C, sob branda agitação. Altos fatores de conversão e produtividades volumétricas foram obtidos, variando de 0,44 g g<sup>-1</sup> a 0,53 g g<sup>-1</sup>, e de 1,03 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 1,72 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, sendo que a maior conversão foi obtida para a menor concentração de permeado de soro de queijo, enquanto a maior produtividade volumétrica foi obtida para a maior concentração de permeado. Altas concentrações de etanol foram observadas, chegando a um máximo de 62,0 g L<sup>-1</sup>.

Palavras-chave: Aproveitamento de resíduos. Etanol. Imobilização celular.

Área Temática: Águas Residuárias

## **Use of dairy industry waste for ethanol production using Lentikats® immobilized cells**

### **Abstract**

*The use of agroindustrial residues associated with the technology of fermentative processes has been stimulated the development of new strategies of energy generation aiming at concomitant to its treatment, the obtention of compounds of interest, such as ethanol. Cheese whey permeate is an industrial by-product, which is a rich substrate in nutrients and good potential for the production of ethanol. The need for improvements in fermentation processes and cell immobilization technology can positively contribute to more effective and advantageous bioprocesses. In this context, the aim of this work was to evaluate the bioconversion of cheese whey permeate into ethanol by *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, immobilized in Lentikats®. The cultivations were conducted in Duran flasks from different concentrations of cheese whey permeate (60-180 g L<sup>-1</sup>), at a temperature of 30 °C, under gentle stirring. High conversion factors and volumetric productivity were obtained, ranging from 0.44 g g<sup>-1</sup> to 0.53 g g<sup>-1</sup>, and from 1.03 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> to 1.72 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, being that the higher*



*conversion was obtained from the lower concentration of the whey permeate medium, while the higher volumetric productivity was obtained for the higher permeate concentration. High concentrations of ethanol were observed, reaching a maximum of 62.0 g L<sup>-1</sup>.*

*Key words: Use of waste. Ethanol. Cell immobilization.*

*Theme Area: Wastewater*

## **1 Introdução**

O soro e o permeado de soro de queijo consistem nos principais resíduos da indústria de laticínios em decorrência da elevada carga orgânica e pelo grande volume em que são gerados. Além disso, podem levar a sérios problemas ambientais quando descartados inadequadamente em cursos hídricos. Contudo, apresentam grande potencial de aproveitamento em diversos processos biotecnológicos, uma vez que se constituem em substratos potenciais para a geração de diversos compostos de interesse, tais como o etanol (CHRISTENSEN et al., 2011; GABARDO et al., 2014). A produção mundial de soro de queijo é estimada em cerca de 160 milhões de toneladas anuais, sendo o Brasil um dos países que contribui com parcela significativa para essa geração (GUIMARÃES et al., 2010). Estudos que visam o aproveitamento de subprodutos industriais, considerados como resíduos, para a produção de etanol vêm sendo constantemente realizados devido ao mercado crescente e a potencial redução dos custos de produção associada a sua utilização. O soro e permeado de soro de queijo, além de não requererem tratamentos prévios à sua utilização, podem auxiliar na produção de etanol, uma vez que contribuem para a minimização de problemas de disposição pelas indústrias de laticínios, além de poder tornar a produção de etanol um processo menos oneroso.

A produção mundial de etanol foi de aproximadamente 85 bilhões de litros no ano de 2012, com contribuição de 90% advinda do continente americano. O Brasil situa-se como o segundo país maior produtor de etanol do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, o qual lidera essa produção (MAPA/ SPAE/DCCA, 2012; ICNA, 2013). Diante da perspectiva de crescimento da demanda mundial de etanol e pela necessidade da geração de fontes alternativas de energia, as quais repercutem em menores prejuízos ambientais do que aquelas provindas de fontes fósseis, tecnologias capazes de melhorar o desempenho e a eficiência de processos fermentativos ganham importância fundamental no Brasil e no mundo. Nesse contexto, a técnica de imobilização celular tem surgido como uma tecnologia alternativa que pode contribuir positivamente para o desenvolvimento de processos mais eficazes e vantajosos (GABARDO et al., 2012, 2014).

Diferentes técnicas de imobilização celular vem sendo amplamente estudadas, sendo a técnica de envolvimento em matrizes porosas a mais difundida. De forma geral, o envolvimento consiste em uma técnica simples, que confere alta retenção celular e proteção às células contra estresse ambiental (KOURKOUTAS et al., 2004; VERBELEN et al., 2006; CHRISTENSEN et al., 2011). Entretanto, estes suportes apresentam pouca resistência mecânica. Como resposta a este problema, o material-suporte de álcool polivinílico (PVA) tem surgido como uma opção viável, sendo um polímero atrativo visto ser de baixo custo, produzido em larga escala e atóxico (da CUNHA et al., 2009). O PVA-Lentikats, de formato lenticular, apresenta vantagens como boas propriedades difusivas e mecânicas (PARASCANDOLA et al., 2007; BEZBRADICA et al., 2007). Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de etanol utilizando como suporte de imobilização hidrogel de álcool polivinílico (Lentikats®).



## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Permeado de soro de queijo

O permeado de soro de queijo em pó foi fornecido pela Sooro (PR, Brasil). Para sua preservação, este permaneceu estocado em freezer a -16 °C.

### 2.2 Microrganismo

Para a realização dos experimentos foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, adquirida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (SP, Brasil).

### 2.3 Imobilização celular por envolvimento: Lentikats®

Uma colônia isolada de *K. marxianus* CCT 4086 foi transferida assepticamente para frascos cônicos de 2 L contendo 800 mL de meio YEP-Lactose, incubada em agitador rotacional (180 rpm, 30 °C, 15 h), até fase de crescimento exponencial. Em seguida, o meio de cultivo foi recolhido e centrifugado ( $3000 \times g$ , 15 min), e as células foram lavadas por duas vezes com água destilada estéril, novamente centrifugadas ( $3000 \times g$ , 15 min), e ressuspensas pela adição de 50 mL de água destilada estéril. A imobilização em álcool polivinílico foi realizada através do aquecimento de 200 mL do líquido Lentikats (Genialab, Braunschweig-Alemanha) a 95 °C, e posterior resfriamento em temperatura ambiente, até atingir 35 °C. Em seguida, foram adicionados 50 mL de suspensão celular previamente preparada, de modo a obter uma solução contendo  $0,02 \text{ g mL}^{-1}$  (biomassa seca/volume de solução). A mistura (PVA/células) foi gotejada em placas de petri de poliestireno estéril com o auxílio de uma seringa estéril (agulha 0,70 x 25 22 G 1), de forma a se obter gotículas no formato de “lentilhas”, com 3-4 mm de diâmetro. As placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar para gelificação, terminando o processo quando a evaporação reduziu a massa inicial em 72 %. Em seguida, essas “lentilhas” foram estabilizadas e reentumecidas em solução estabilizadora (Genialab), sob constante agitação. Após, estas foram lavadas por 3 vezes com água destilada estéril e adicionados em frascos Duran para o início da fermentação.

### 2.4 Fermentação em frascos Duran

A fermentação foi realizada em frascos Duran devido à flotação das “lentilhas” em teste prévio em biorreator. Após a imobilização, foram adicionados 40 mL do material suporte (“lentilhas”) em frasco Duran de 250 mL e um volume de 200 mL de permeado de soro de queijo em diferentes concentrações ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ,  $120 \text{ g L}^{-1}$ ,  $150 \text{ g L}^{-1}$  e  $180 \text{ g L}^{-1}$ ), pH 7,0. O experimento foi conduzido a 30 °C, com aquecimento através de incubadora rotacional, e a agitação realizada através de um agitador magnético.

### 2.5 Métodos analíticos

As amostras coletadas foram centrifugadas ( $3000 \times g$ , 15 min), e o sobrenadante foi filtrado em membranas de acetato de celulose ( $0,22 \mu\text{m}$ ) para posterior análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A biomassa foi lavada e novamente centrifugada ( $3000 \times g$ , 15 min) para leitura em espectrofotômetro a 600 nm, e correlacionada através de curva de calibração densidade óptica (600 nm) *versus* peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ). A lactose e o etanol foram analisados por CLAE (Shimadzu) utilizando detector de índice de refração (IR) e coluna Bio-Rad Aminex HPX 87H, a 45 °C, utilizando solução de ácido sulfúrico 5 mM ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 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 cinética de fermentação para o consumo de lactose, produção de etanol e biomassa suspensa está representada na Figura 1. Altas concentrações de permeado de soro de queijo aumentaram o tempo de consumo da lactose, a qual foi totalmente esgotada em 24 h, 30 h e 36 h para as concentrações de permeado de 60 g L<sup>-1</sup>, 120 g L<sup>-1</sup> e 150 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Isto se deve ao fato da levedura necessitar se adaptar às novas condições ambientais impostas, demandando uma maior quantidade de enzimas na fase lag de crescimento. Embora a cinética da produção de etanol a partir de permeado de soro de queijo 180 g L<sup>-1</sup> necessite de maior tempo de cultivo, é possível observar a capacidade de bioconversão pela levedura, mesmo em altas concentrações de lactose, em que para 36 h de cultivo 85 % foi metabolizada, alcançando uma concentração máxima de etanol de 62,0 g L<sup>-1</sup>. Comparado a um estudo prévio do grupo (GABARDO et al., 2014), a partir de permeado de soro de queijo de 60 g L<sup>-1</sup>, observa-se que a metabolização da lactose foi ligeiramente superior ao se utilizar *K. marxianus* CCT 4086 imobilizada em alginato de cálcio, em biorreator de leiteo fluidizado, em que a lactose foi totalmente esgotada para 12 h de cultivo, enquanto que neste trabalho, 89 % da lactose foi consumida para o mesmo período de tempo. Isso indica que melhorias na transferência de massa são necessárias e isso pode ser obtido através de sistemas com geometria mais eficientes e com maior controle do processo, como por exemplo, um biorreator de vaso cilíndrico com pás planas, ideal para imobilização em Lentikats®.

Neste trabalho, altos fatores de conversão e produtividades volumétricas foram obtidos, variando de 0,44 g g<sup>-1</sup> a 0,53 g g<sup>-1</sup>, e de 1,03 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 1,72 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Tabela 1), sendo que a maior conversão foi obtida para a menor concentração de meio permeado de soro de queijo (60 g L<sup>-1</sup>), enquanto a maior produtividade volumétrica foi obtida para a maior concentração de meio (180 g L<sup>-1</sup>). Maiores valores de eficiência de conversão foram obtidos no presente trabalho comparados aos obtidos por Wirawan et al. (2012), produzindo etanol a partir de materiais lignocelulósicos, em que alcançaram eficiência de 79,1% em e de 70,1%, para a condição de hidrólise seguida de fermentação e condição de fermentação e sacarificação simultâneas, respectivamente.

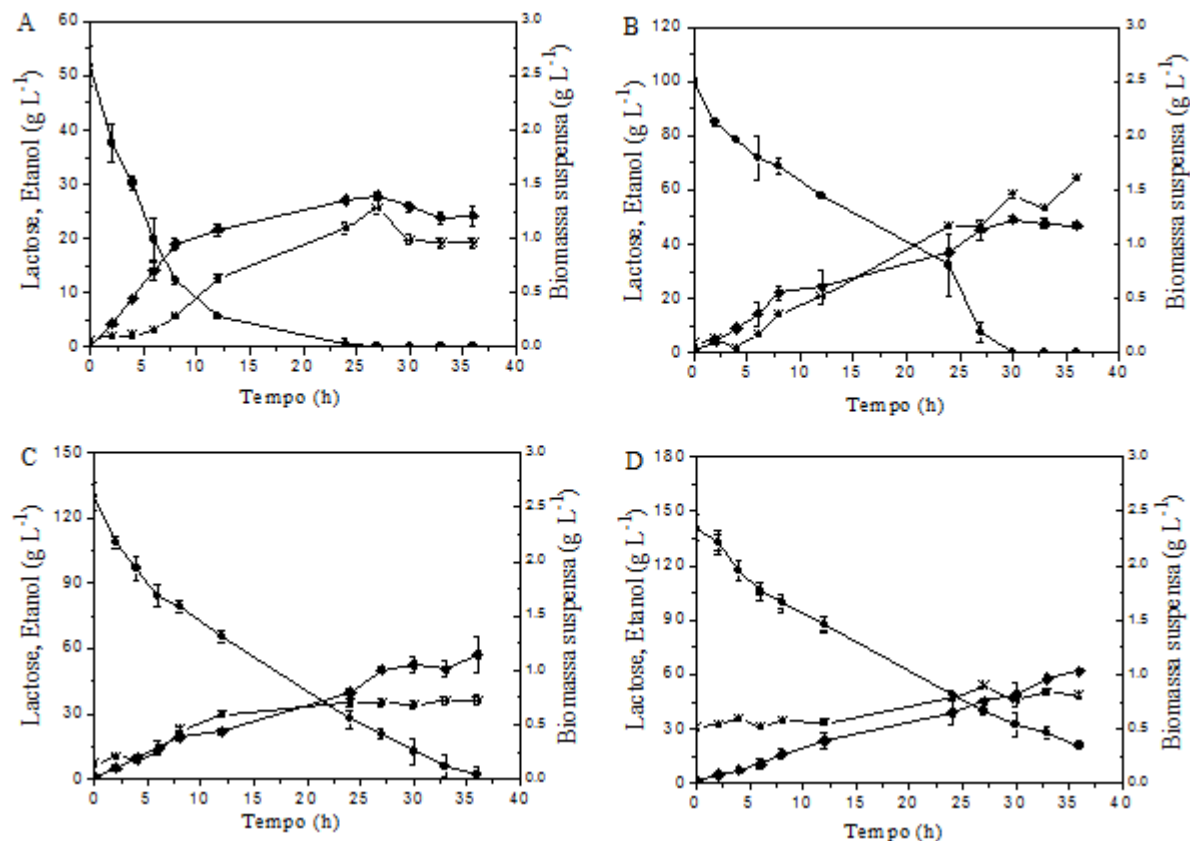
Tabela 1. Fator de conversão de substrato a etanol ( $Y_{P/S}$ ), eficiência de conversão ( $\eta$ ) e produtividade volumétrica de etanol ( $Q_P$ ) para as diferentes concentrações de permeado de soro de queijo.

Concentração de Permeado (g L <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	$\eta$ (%)	$Q_P$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
60	0,53	98,1	1,03
120	0,49	90,7	1,64
150	0,44	81,5	1,60
180	0,51	94,4	1,72

Maiores concentrações de permeado podem levar a maiores produtividades volumétricas devido a maiores concentrações de etanol obtidas no processo. Além disso, se verifica que a levedura tolera altas concentrações de etanol, produzindo um máximo de 62,0 g L<sup>-1</sup> para permeado 180 g L<sup>-1</sup>. É possível observar pela Figura 1D, que um maior tempo de fermentação é necessário (permeado 180 g L<sup>-1</sup>), e que portanto, os valores dos parâmetros cinéticos (Tabela 1), precisariam de ajustes. Com relação à biomassa suspensa, a baixa concentração (Figura 1) observada para as quatro concentrações de permeado testadas, demonstra que a imobilização celular foi eficaz, em que um pequeno escape de células para o meio externo foi observado. Este mesmo comportamento foi verificado no estudo de Bezbradica et al. (2007).



Figura 1. Perfil do consumo de lactose, produção de etanol e biomassa suspensa a partir de *K. marxianus* CCT 4086 imobilizada em Lentikats®, em cultivo em frasco agitado contendo permeado de soro de queijo como meio de cultivo, nas concentrações de 60 g L<sup>-1</sup> (a), 120 g L<sup>-1</sup> (b), 150 g L<sup>-1</sup> (c), e 180 g L<sup>-1</sup> (d), a 30 °C. Lactose (—●—), Etanol (—◆—), Biomassa (—\*—).



#### 4. Conclusões

A utilização do permeado de soro de queijo como fonte alternativa de carbono na produção de etanol, 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. Além do mais, o processo de imobilização celular em material-suporte de álcool polivinílico (Lentikats®) demonstra ser uma opção tecnológica promissora, que pode contribuir significativamente para melhorias no processo de produção de etanol, visto ser um material bastante resistente, permitindo a utilização de biorreatores do tipo vaso cilíndrico, além de permitir proteção às células quanto às alterações ambientais.

#### Referências

BEZBRADICA, D.; OBRADOVIC, B.; LESKOSK-CUKALOVIC, I.; BUGARSKI, B.; NEDOVIC, V. Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation. **Process Biochemistry**, v.42, P.1348–1351, 2007.

CHRISTENSEN, A. D.; KADAR, Z.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; THOMSEN, M. H. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p.283-289, 2011.





da CUNHA, M. A. A.; CONVERTI, A.; SANTOS, J.C., et al. PVA-Hydrogel Entrapped *Candida Guilliermondii* for Xylitol Production from Sugarcane Hemicellulose Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.157, p. 527-537, 2009.

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. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p.1194-1201, 2012.

GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v.69, 89-96, 2014.

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. **Biotechnology Advances**, v.28, p.375–384, 2010.

Instituto CNA. Portal de Inteligência Competitiva do Agro Brasileiro. Painel de Inteligência Competitiva. **Relatório de Inteligência: do bagaço ao posto**, 2013. Disponível em: <<http://www.icna.org.br/sites/default/files/relatorio/RELAT%C3%93RIO%20DO%20AGRO%20NEG%C3%93CIO%20-%20janeiro%20de%202013.pdf>>. Acessado em 02 de fevereiro de 2015.

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

MAPA/SPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- Secretaria de Produção e Agroenergia. **Anuário estatístico da Agroenergia**, 2012. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Desenvolvimento\\_Sustentavel/Agroenergia/anuario\\_agroenergia\\_web\\_2012.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/anuario_agroenergia_web_2012.pdf)>. Acessado em 03 de fevereiro de 2015.

PARASCANDOLA P, BRANDUARDI P, DE ALTERIIS E. PVA-gel (Lentikats) as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 38, p.184–189, 2006.

VERBELEN, P.J; SCHUTTER, D.P; DELVAUX, F.P; VERTREPEN, K.J. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1515-1525, 2006.

WIRAWAN, F.; CHENG, C, H.; KAO, W,C.; LEE, D,J.; CHANG, J.S. Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF processes using immobilized *Zymomonas mobilis*. **Applied Energy**, v. 100, p.19–26, 2012.