



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL
PÓS GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

ANDRÉIA DE FÁTIMA SILVA BARBOSA

**USO DE *YARROWIA LIPOLYTICA*, PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA,
UTILIZANDO SORO DE LEITE COMO FONTE DE CARBONO**

**LARANJEIRAS DO SUL
2020**

ANDRÉIA DE FÁTIMA SILVA BARBOSA

**USO DE *YARROWIA LIPOLYTICA*, PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA,
UTILIZANDO SORO DE LEITE COMO FONTE DE CARBONO.**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr.
Thiago Bitencourt

**LARANJEIRAS DO SUL
2020**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Barbosa, Andréia de Fátima Silva
Uso de *Yarrowia Lipolytica* para a produção de biomassa
utilizando soro de leite como fonte de carbono / Andréia
de Fátima Silva Barbosa. -- 2020.
55 f.

Orientador: Professor Doutor Thiago Bergler
Bitencourt

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR, 2020.

1. 1. Leveduras. 2. Biotransformação. 3. Soro de
leite. 4. I. Bitencourt, Thiago Bergler, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ANDREIA DE FÁTIMA SILVA BARBOSA

**USO DE *Yarrowia lipolytica* PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA
UTILIZANDO SORO DE LEITE COMO FONTE DE CARBONO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto sensu*, da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, para obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

28/02/2020

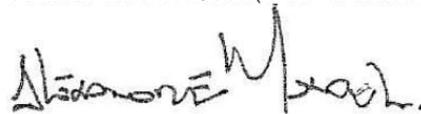
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Thiago Bergler Bitencourt (UFFS – presidente/orientador)



Prof. Dr. Ernesto Quast (UFFS – 1º membro)



Prof. Dr. Alexandre Manoel dos Santos (UFFS – 2º membro)

Prof.^a Dra. Leda Battestin Quast (UFFS – suplente)

AGRADECIMENTOS

A Deus,

A minha família, Pai, Mãe, Sogra, Sogro e cunhadas que sempre me apoiaram e compreenderam meus momentos de ausência.

Ao meu marido Douglas, que sempre me entendeu e apoiou em todos os momentos.

Meu agradecimento especial ao meu professor orientador Thiago Bergler Bitencourt, pela orientação, compreensão, amizade, incentivo, e aprendizado.

Aos membros da banca Prof. Dr. Ernesto Quast e Prof. Dr. Alexandre Manoel dos Santos pela disponibilidade da participação e contribuições feitas ao trabalho.

A toda equipe dos laboratórios e professores da UFFS – Laranjeiras do Sul que sempre estiveram dispostos a auxiliar e incentivar, em especial à Fernanda Arpini Souza.

As minhas colegas Milena Rossoni e Karina Leite de Nez, pela amizade, ajuda, e abrigo.

RESUMO

O soro de leite é o principal resíduo produzido pela indústria de laticínios durante a fabricação de queijos. O qual como matéria-prima, pode conferir à tecnologia alimentar novas potencialidades devido às propriedades funcionais e nutricionais. Mesmo tendo amplo potencial de aproveitamento, o soro ainda é considerado como um efluente. É importante o desenvolvimento de alternativas para viabilizar o aproveitamento desse resíduo agroindustrial, porque ao mesmo tempo em que a transformação do soro em novos produtos diminui o desperdício, pode proporcionar ganhos às indústrias de laticínios. Diante disto, durante a realização do presente estudo foi empregado o método de secagem por liofilização para desidratar o soro e o transformá-lo em soro em pó para facilitar sua estocagem e armazenagem. Posteriormente foi utilizado como fonte de carbono para bioconversão por fermentação submersa com cinco cepas diferentes de microrganismos do grupo das leveduras *Yarrowia lipolytica*, com meio mineral suplementado composto de 1% uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), 0,1% de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e 0,05% de sulfato de magnésio. O processo de fermentação foi realizado em incubadora com agitação de aproximadamente 80 rpm em intervalo de tempo pré-determinado em 9 dias á 30°C. A avaliação dos resultados realizados durante cada etapa do processo de bioconversão indicam que a levedura *Y. lipolytica* QU29 apresentou melhor desempenho para o aumento do teor proteico do soro de leite após o bioprocessamento, indicando ainda que pode ser utilizado como fonte carbono para a fermentação, tanto as amostras de soro congelado fresco ou liofilizadas, armazenadas por um ano e que mesmo após a estocagem esse resíduo ainda apresenta potencial para uso.

Palavras-chave: Laticínios, soro de leite, biomassa, bioconversão.

ABSTRACT

Whey is the main residue produced by the dairy industry during cheese making. Which as a raw material, can give food technology new potential due to its functional and nutritional properties. Despite having ample potential for use, the serum is still considered an effluent. It is important to develop alternatives to make the use of this agroindustrial waste feasible, because at the same time that the transformation of the serum into new products reduces waste, it can provide gains to the dairy industries. In view of this, during the conduct of this study, the freeze-drying method was used to dehydrate the serum and transform it into powdered serum to facilitate its storage and storage. It was subsequently used as a carbon source for bioconversion by submerged fermentation with five different strains of microorganisms from the *Yarrowia lipolytica* yeast group, with supplemented mineral medium composed of 1% urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), 0.1% monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) and 0.05% magnesium sulfate. The fermentation process was carried out in an incubator with agitation of approximately 80 rpm at a predetermined time interval of 9 days at 30 ° C. The evaluation of the results carried out during each stage of the bioconversion process indicates that the yeast *Y. lipolytica* QU29 presented a better performance for increasing the whey protein content after the bioprocess, also indicating that it can be used as a carbon source for fermentation, both samples of fresh frozen or lyophilized serum, stored for one year and that even after storage this residue still has potential for use.

Key-words: Dairy products, whey, biomass, bioconversion.

LISTA DE ABREVIATURAS

GYP – Glucose - Yeast Extract - Peptone

PA – para análise

UFC / mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teor proteico para o soro de leite pelo método de Kjeldahl (%).31

Tabela 2. Teor Proteico encontrado na biomassa produzida por cinco diferentes cepas de leveduras utilizando soro fresco liofilizado como fonte de carbono (%).33

Tabela 3: Teor Proteico total e teor proteico solúvel encontrado na biomassa produzida pelas duas cepas de leveduras que apresentaram menor diminuição no teor proteico após a bioconversão, utilizando como fonte de carbono o soro armazenado congelado e liofilizado após um ano de estocagem (%).35

Tabela 4: Teor de lipídico obtido utilizando duas diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* em 9 dias de fermentação (%).37

Tabela 5: Teores de cinzas encontrados para as biomassas produzidas após a bioconversão comparadas com os valores obtidas para o soro armazenado congelado e liofilizado após um ano de estocagem (%).39

Tabela 6: Consumo de açúcares redutores encontrados para as biomassas produzidas após a bioconversão comparadas com os valores obtidas para o soro armazenado congelado e liofilizado após um ano de estocagem (%).41

LISTA DE FIGURAS

Gráfico 1: Curva analítica obtida pela correlação da absorbância em 575nm em função da concentração de glicose obtidos pelo método DNS.....41

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	OBJETIVOS.....	12
2.1.	<i>OBJETIVO GERAL.....</i>	<i>12</i>
2.2.	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</i>	<i>12</i>
3.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1.	<i>SORO DE LEITE.....</i>	<i>123</i>
3.3.	<i>LEVEDURAS FERMENTATIVAS.....</i>	<i>14</i>
3.4.	<i>BIOCONVERSÃO.....</i>	<i>17</i>
3.5.	<i>LIPÍDIOS MICROBIANOS.....</i>	<i>18</i>
3.6.	<i>PROTEÍNAS HETERÓLOGAS.....</i>	<i>19</i>
3.7.	<i>TIPOS DE SECAGEM DO SORO.....</i>	<i>21</i>
3.8.	<i>TIPOS DE FERMENTAÇÃO.....</i>	<i>22</i>
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1.	<i>MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....</i>	<i>25</i>
4.2.	<i>COLETA DAS AMOSTRAS DE SORO DE LEITE E USO COMO FONTE DE CARBONO.....</i>	<i>25</i>
4.3.	<i>CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE E DO SORO EM PÓ.....</i>	<i>25</i>
4.4.	<i>DESIDRATAÇÃO DO SORO POR LIOFILIZAÇÃO.....</i>	<i>26</i>
4.5.	<i>PREPARO DO INÓCULO.....</i>	<i>26</i>
4.6.	<i>MEIO DE SUPLEMENTAÇÃO.....</i>	<i>26</i>
4.7.	<i>PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E PROTEÍNAS MICROBIANAS.....</i>	<i>27</i>
4.8.	<i>DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS (BLIGH-DYER).....</i>	<i>27</i>
4.9.	<i>DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS INSOLÚVEIS (KJELDAHL).....</i>	<i>28</i>
4.10.	<i>DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS (BRADFORD).....</i>	<i>28</i>
4.11.	<i>DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DNS.....</i>	<i>29</i>
4.12.	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</i>	<i>30</i>
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1.	<i>CARACTERIZAÇÃO DO SORO.....</i>	<i>30</i>
5.2.	<i>AVALIAÇÃO DAS DIFERENÇAS DOS TEORES PROTEICOS ENCONTRADOS NA BIOMASSA PRODUZIDA APÓS A BIOCONVERSÃO, POR CINCO DIFERENTES CEPAS DE LEVEDURA YARROWIA LIPOLITYCA.</i>	<i>33</i>
5.3.	<i>PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS MICROBIANOS.....</i>	<i>37</i>
5.4.	<i>AVALIAÇÃO DO TEOR DE CINZAS.....</i>	<i>39</i>
5.5.	<i>AVALIAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES.....</i>	<i>41</i>
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da produção de queijo ao longo dos anos e um controle rigoroso da disposição dos efluentes, a produção do soro atualmente é um dos problemas mais críticos para a indústria de laticínios (BALDASSO, 2008).

O soro de leite é um coproduto da indústria de laticínios sendo formada pela porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação de queijo ou da caseína. Apresenta-se como um líquido opaco e de cor amarelo-esverdeada. O soro é visto industrialmente como um efluente, o qual, quando indevidamente tratado, gera um sério problema ambiental devido à sua elevada carga orgânica. Estes fatores tornam importante o desenvolvimento de alternativas para um adequado aproveitamento do soro de leite. Isto se deve ao fato de que ao mesmo tempo em que a transformação do soro em produtos diversos diminui o desperdício de matéria nutritiva, ainda permite o desenvolvimento de novos produtos e proporciona aumento de lucratividade nas indústrias de laticínios (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2010).

O processo de industrialização do soro, em geral, requer a utilização de instalações industriais com um determinado grau de complexidade, o que demanda um investimento financeiro considerável. Assim, é necessário que haja um volume mínimo de matéria-prima e um destino lucrativo desse soro, que justifique o investimento. Entretanto, grande parte do soro de leite gerado no Brasil e em especial, no Estado do Paraná tem origem nas operações de pequenas e médias queijarias, nas quais se torna difícil o investimento em tecnologia necessária para o beneficiamento deste coproduto (IMADURA, 2008).

Em decorrência dos elevados gastos gerados durante o processo de industrialização do soro e pensando no beneficiamento dos pequenos laticínios que pouco podem investir financeiramente nesse beneficiamento é que se deve buscar alternativas viáveis e baratas para diminuir os problemas ambientais e ainda gerar renda com o soro de leite, com o menor investimento possível por parte dos donos das pequenas queijarias. Uma técnica que vem crescendo como fonte de industrialização de coprodutos derivados das indústrias é a bioconversão (IMADURA, 2008).

A bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos tem recebido grande atenção e com isso, consiste no uso da fermentação para o aproveitamento de resíduos sólidos visando à síntese de diversos compostos de alto valor agregado e de grande interesse industrial. O uso da fermentação para transformação dos resíduos

possui vantagens como baixo custo do processo, facilidade da aplicação de microrganismos, melhoria da digestibilidade, melhoria do valor nutricional.(DANTAS; AQUINO, 2010).

Microrganismos têm a habilidade de utilizar material orgânico com pouco conteúdo proteico e transformá-lo em alimento rico em proteínas por meio da bioconversão. A levedura *Yarrowia lipolytica* possui capacidade de utilizar substratos hidrofóbicos, para a produção de biomassa microbiana, é capaz de produzir metabólitos importantes e possui uma intensa atividade secretora, o que justifica o seu enorme interesse industrial. A fermentação utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados na indústria de laticínios, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como, agregar valor a essa matéria-prima, por meio da produção de substâncias de interesse econômico (BELO, 2013).

A produção de biomassa de leveduras como fonte de proteínas tem grande potencial econômico, principalmente considerando-se que pode substituir as tradicionais fontes de proteína de origem animal, que apresentam maior custo (SANTOS, 2009)

A produção de biomassa proteica já obtém sucesso em relação a razões econômicas, políticas e psicológicas, mas espera-se que a produção de biomassa como fonte de proteínas seja capaz de diminuir cada vez mais a demanda mundial de proteína (MORAES, 2002).

Microalgas, bactérias, leveduras e fungos têm sido extensivamente estudados, apresentando algumas vantagens como: o conteúdo em proteína dos microrganismos é geralmente mais elevado do que o da maioria das outras fontes de proteína, a produção de microrganismos como fonte de proteína pode ser obtida em uma grande variedade de substratos, inclusive resíduos industriais, o que torna viável sua produção em diferentes regiões, a produção de proteína microbiana pode ser executada independentemente de condições climáticas, exigindo pequena disponibilidade de água e de espaço e baixo custo de produção.

Devido às suas composições nutricionais e o alto custo para os seus adequados tratamentos se considerados como efluentes, é necessário o desenvolvimento de técnicas que permitam a criação de produtos alimentícios de valor comercial, utilizando-os como matéria-prima. É importante o desenvolvimento de tecnologias para o adequado aproveitamento dos soros nas indústrias, pois, ao mesmo tempo que ocorre a transformação dos soros em produtos, pode-se promover ganhos às indústrias através do desenvolvimento de novos produtos ou a agregação do soro aos produtos já existentes (BALD et al., 2014)

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Medir o aumento de teor proteico da biomassa obtida após o processo de bioconversão utilizando cinco cepas de *Yarrowia lipolytica*, em ambiente laboratorial controlado, usando soro de leite como fonte de carbono.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Especificar os componentes presentes no soro de leite e seu desempenho em sua utilização como fonte de carbono;
- Aplicar métodos de tratamento como o de liofilização, associados a fermentação por bioconversão.
- Apresentar as variações de diferentes cepas de *Yarrowia lipolytica*, associados ao aumento de teor proteico, obtidos com a bioconversão.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Soro de Leite.

De acordo com a legislação internacional entende-se como soro de leite o produto lácteo líquido obtido durante o processamento do queijo, da caseína ou produtos similares, mediante a separação da coalhada, após coagulação do leite e/ ou produtos derivados do leite e entende-se por soro em pó o produto obtido por desidratação do soro ou do soro ácido apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados (FAO-CODEX ALIMENTARIUS, 2005). O soro lácteo, também conhecido como soro de leite, soro de queijo ou lacto-soro, é um subproduto da indústria de laticínios, representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação convencional de queijos ou da caseína. É um líquido quase opaco e de cor amarelo-esverdeado, que contém aproximadamente metade dos sólidos do leite. O soro é proveniente das operações de corte, agitação, aquecimento, enformagem e prensagem da produção de queijo. Há dois tipos básicos de soro: o doce e o ácido, que

variam de acordo com o tipo de queijo produzido (MILLER et al., 2000).

O tipo predominante é o soro doce, que é derivado da manufatura de queijos amadurecidos duros, semi-duros ou macios (Cheddar, Suíço, Provolone, Mussarela, etc.). A desestabilização das micelas de caseína é realizada por via enzimática em pH maior do que 5,6. O pH do soro doce é ligeiramente menor do que o do leite fresco, varia de 5,9 a 6,6. (MILLER et al., 2000).

Na produção de soro ácido a precipitação das caseínas é realizada pela acidificação não acima de pH 5,1. Na coagulação ácida, o pH abaixa devido à conversão da lactose em ácido lático por fermentação microbiana, ou por adição direta de ácidos minerais ou orgânicos. O soro resultante deste processo é designado de soro ácido com um pH de 4,3 a 5,1. O soro ácido provém principalmente da fabricação de queijos tipo Cottage e da fabricação de caseína comercial. (MILLER et al 2000)

3.2 Principais componentes do soro de leite

O soro de leite apresenta grande importância, tanto em função do elevado volume produzido, quanto à sua rica composição nutricional. Na produção de 1 kg de queijo tem-se uma produção média de 9 litros de soro. Esse contém mais da metade dos sólidos presentes no leite original, incluindo grande parte da lactose, proteínas do soro (20% da proteína total), sais minerais e vitaminas solúveis (ATRA et al., 2005). Sua composição depende da composição química do leite que varia de acordo com a alimentação, reprodução, diferença individual de cada animal e do clima (BALDASSO et al., 2011).

Os sais minerais encontrados no soro de leite são fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos, carbonatos, bicarbonato de sódio, potássio, cálcio e magnésio. Na indústria de alimentos, o soro de leite ou seus ingredientes podem ser agregados a produtos fortificados, aumentando o teor de nutrientes minerais do produto final (BALDASSO, 2008).

Quando a caseína é retirada do leite por algum método de precipitação, em solução resta um grupo de proteínas que são chamadas proteínas do soro, proteínas solúveis, soro proteínas ou caseínas. Essa quantidade de proteínas encontradas no soro varia entre 0,7 a 1,2% da sua composição média a que equivale cerca de 20 a 25% do total de proteínas encontradas no leite. As proteínas solúveis do soro de leite possuem um excelente perfil de aminoácidos, caracterizando como proteínas de alto valor biológico. Segundo os autores, cada 100g de concentrado proteico de soro de leite possui em

média 414 kcal, 80g de proteínas, 7 g de gordura e 8 g de carboidrato. (HARAGUCHIL, ABREU e PAULA, 2006).

A proteína do soro do leite contém quase todos os aminoácidos essenciais acima das recomendações da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/WHO), exceto pelos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), que atendem às recomendações para todas as idades (SGARBIERI, 2004).

É estabelecido pela legislação ambiental a proibição do descarte de soro, de forma direta ou indireta, nos cursos de água. Segundo a lei federal nº 9605 de 13 de fevereiro de 1998 (BRASIL, 1998), os laticínios devem, obrigatoriamente, tratar seus efluentes industriais antes do descarte final.

Devido à elevada quantidade de substâncias orgânicas presentes no soro, representadas principalmente pela lactose (aproximadamente 70% de sólidos totais) e pelas proteínas (aproximadamente 20% de sólidos totais), apresenta uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 30 a 50 g/L e uma demanda química de oxigênio (DQO) de 50 a 80 g/L (SOUZA; BEZERRA; BEZERRA, 2005; BALD et al., 2014).

3.3 Soro de Leite como substrato para fermentação

A utilização do soro como meio de cultura tem sido estudada há bastante tempo. Sua composição e seu alto teor em lactose, açúcar fermentescível, fazem do soro líquido ou concentrado um substrato de fermentação bastante interessante. Acrescenta-se a estes fatores o fato que o soro pode ser disponível em grande quantidade a custo relativamente baixo. A utilização do soro na fabricação de produtos por fermentação depende, em geral, da disponibilidade de um microrganismo seguro para converter a lactose na substância desejada e da viabilidade do custo da produção (MINAS AMBIENTE, 1998).

3.4 Leveduras fermentativas

3.4.1 Potencial biotecnológico em levedura

Ao longo do tempo tem se observado o crescimento do uso de leveduras em

“aplicações biotecnológicas”. Como exemplos desta aplicação destacam-se desde os mais primitivos processos fermentativos para produção de bebidas alcoólicas e crescimento de pães, até os processos atuais de produção de biofármacos. Por esse motivo, as leveduras podem ser relacionadas entre os organismos mais utilizados pelo homem há mais tempo. Estima-se que desde 2000-6000 AC os sumérios já detinham o conhecimento “biotecnológico” para produção de cerveja e os egípcios para produção de pães fermentados (WALKER, 1998).

A produção de biomassa de leveduras como fonte de proteínas tem se mostrado com elevado potencial econômico, principalmente considerando-se que pode substituir as tradicionais fontes de proteína utilizadas em rações animais, que apresentam um custo mais elevado. Tal biomassa caracteriza-se por poder apresentar elevado teor proteico, sendo mencionado, por exemplo, para *Candida utilis*, até 59,8% de proteína em relação ao peso seco utilizando-se glicose como fonte de carbono, além de conter aminoácidos essenciais e vitaminas (GÉLINAS e BARRETTE, 2007).

4. *Yarrowia* sp.: Aspectos gerais

O gênero *Yarrowia* compreende um grupo de fungos leveduriformes encontrados em diversos ecossistemas, tais como rios e solos, e em casos especiais, em seres humanos e em animais. As espécies desse gênero compreendem organismos eucariotos, não fotossintéticos, constituídos por organelas citoplasmáticas, parede celular e membrana plasmática rica em esteróis principalmente ergosterol (ANDRADE, 2010).

Geralmente são dimórficas, podendo aparecer microscopicamente na forma de leveduras apresentando células alongadas ou ovaladas, medindo em média 3 a 7 µm de largura e 3 a 14 µm de comprimento, na forma de micélio apresentando pseudohifas ou hifas verdadeiras. Além disso formam colônias úmidas, cremosas de aspecto liso, ou rugoso e coloração branco-amarelada (KURTZMAN e FELL, 2000).

Esta levedura é bastante diferente dos modelos celulares mais estudados como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* que são consideradas leveduras “convencionais”, em relação à fisiologia, genética e biologia molecular e, portanto, pertence ao grupo das leveduras “não-convencionais”, sendo a espécie mais estudada desse grupo (BARTH e GAILLARDIN, 1997). Por não ser considerada patogênica, a levedura já foi utilizada em aplicações industriais como

na produção de ácido cítrico (Silva, 2010), lipases (Amaral, 2007) e proteínas (Machado Junior, 2010).

4.1 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um microrganismo aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomycetes, subclasse Hemiascomycetes, esta levedura pode ser isolada de substratos ricos em proteínas e lipídios, como produtos das indústrias de laticínios, rios e solos. Como não é considerada patogênica, já foi utilizada em aplicações industriais consideradas pela American Food and Drug Administration (FDA) como GRAS (Generally Regarded As Safe).

Nos anos 1990, vários grupos iniciaram estudos sobre o processo de dimorfismo da levedura *Yarrowia lipolytica* uma vez que é capaz de crescer na forma de células alongadas e hifas bastante alongadas dependendo das condições de crescimento, acredita-se que o dimorfismo funciona como um mecanismo de defesa celular contra condições adversas, tais como temperatura e alterações nutricionais, embora existam vários mecanismos envolvidos na regulação do dimorfismo, a limitação do nitrogênio parece ser um dos sinais mais importantes envolvidos no processo (BELO, 2013).

Conforme apresentado por Lima (2014), a complexidade e multiplicidade de genes permite que a *Y. lipolytica* utilize uma grande variedade de substratos incluindo alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares, principalmente glicose, podendo acumular lipídeos em níveis superiores a 50% da massa seca da célula. *Y. lipolytica* pode ser considerada uma levedura oleaginosa. A acumulação lipídica provavelmente é reforçada pelas muitas saliências na superfície da célula, facilitando a absorção de substratos hidrofóbicos a partir do meio. Em comparação, *S. cerevisiae* que não é uma levedura oleaginosa e acumula quantidades moderadas de lipídeos inferiores a 15% da sua biomassa, *Y. lipolytica* armazena principalmente triacilgliceróis (TAGs) > 90%. Esta levedura também é capaz de acumular quantidades significativas de ácido graxo livre no interior da célula.

O interesse por *Yarrowia lipolytica* cresceu em meados dos anos 1960, devido à sua capacidade de utilizar substratos hidrofóbicos, especialmente alcanos como fonte de carbono para a produção de proteína microbiana (SCP – *Single Cell Protein*) bem como os metabólitos do ciclo dos intermediários como os ácidos cítrico e-cetoglutarico

(SILVA, 2010). Além disso, é capaz de produzir metabólitos importantes e possui uma intensa atividade secretora, o que justifica o seu enorme interesse industrial no âmbito do conceito de biorrefinaria. O número de grupos de pesquisas que utilizam a cepa *Y. lipolytica* como modelo de levedura está aumentando rapidamente devido ao desenvolvimento de ferramentas genéticas e moleculares.

As características únicas de *Y lipolytica*, acompanhada da disponibilidade de ferramentas genéticas eficientes para esta espécie, têm estimulado o interesse no uso desta levedura, como modelo para a produção de bio-óleo, com grande potencial para aplicações biotecnológicas (LIMA, 2014). Várias tecnologias, incluindo configurações de fermentação, já foram utilizadas para a produção de óleos pelas cepas de *Y. lipolytica* cultivadas em diversos substratos agroindustriais, subprodutos ou resíduos (PAPANIKOLAOU et al., 2002).

As leveduras são constituídas de proteínas, carboidratos, matéria graxa, sais minerais e contêm vitaminas, cujas proporções variam com a cepa e com o meio ambiente. A variação das condições de nutrição, da natureza do substrato, da reação do meio, ocorrência de aeração, lavagens e outros fatores, influenciam a composição do microrganismo (LIMA e SATO, 2001).

Seu estudo também tem atraído grande interesse na área biotecnológica por possuir a capacidade de excretar diversos metabólitos em grande quantidade como, por exemplo, ácidos orgânicos e proteínas extracelulares, sendo muito usada para superexpressão e secreção de proteínas específicas. Algumas pesquisas observaram que a levedura *Yarrowia lipolytica* se encontrava comumente distribuída em ambientes marinhos e que ela representava um importante papel na degradação de óleos, sendo importante em processos biotecnológicos (SANTOS, 2009).

4.2 Bioconversão

O cultivo e consumo de microrganismos é recente na dieta brasileira, contudo, o seu uso pode melhorar os aspectos nutricionais, sensoriais e funcionais após a bioconversão de resíduos agrícolas, tornando-os possíveis fontes de alimentos. Esta afirmação fica evidenciada pelo número crescente de pesquisas e processos que se utilizam de microrganismos, principalmente fungos na indústria química e de alimentos como obtenção de xaropes de glicose e maltose, alimentos como o molho de soja, além dos conhecidos cogumelos (MORALES, 2016).

Com a utilização de tecnologias que possam promover uma biotransformação que beneficia a biodisponibilidade de nutrientes e o uso de fungos reconhecidamente comestíveis, bem como ensaios e métodos que avaliem o potencial do uso de resíduos e coprodutos da agroindústria, podem proporcionar o melhor aproveitamento destes e, conseqüentemente, aumentar a disponibilidade de alimentos com valores nutricionais adequados (MORALES, 2016).

Através da bioconversão, os resíduos alcançam concentrações nutricionais que, podem ser transformados em suplemento nutricional, sendo uma alternativa para alimentação humana. Desta forma, a produção de ração animal via crescimento microbiano pode vir a ser uma solução para os problemas de deficiência alimentar existentes atualmente (ARAÚJO et al., 2009).

4.3 Lipídios microbianos

Vários autores têm estudado a síntese de lipídios por via microbiana, grande parte deles voltados para a possibilidade de obter alternativa para a carência de alimentos e outra, para a produção de energia. Como supridores de lipídios, os microrganismos oferecem algumas vantagens potenciais em relação aos animais e vegetais: grande rapidez de geração, menor área de produção, para uma mesma massa de material graxo e melhor controle da produção e do produto.

Tratando-se de alimentação, a ingestão de ácidos graxos insaturados deve ser considerada pois, são essenciais dado ao fato de não serem sintetizados pelo organismo, necessitando assim, terem sua demanda metabólica suprida pela ingestão de alimentos. Os principais grupos recomendados nas dietas alimentares são os ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados (que apresentam duplas ligações na cadeia carbônica), que apresentam características antioxidantes e auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares (MORALES, 2016).

Nos microrganismos, os lipídeos são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. Os lipídios microbianos denominados “Single-cell-oil” (SCO) tem sido considerados uma alternativa interessante, pois são similares em termos da composição em ácidos graxos de óleo vegetais e animais e possuem a vantagem de serem produzidos a partir de substratos de baixo custo como glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel, resíduos de gordura animal rica em estearina e óleos vegetais como o

milho, *Y. lipolytica* possui também disponibilidade de ferramentas genéticas sofisticadas e a análise completa do genoma, o que fez com que esta levedura se tornasse um sistema versátil e seguro para a expressão e eficiente secreção de proteínas heterólogas de grande interesse industrial (BELO, 2013).

Dependendo das condições ambientais, as células de levedura são capazes de mobilizar ácidos graxos livres ou triacilgliceróis e ésteres de esteróis em corpos lipídicos, que consistem num núcleo hidrofóbico formado a partir de lipídeos neutros e rodeado por uma monocamada de fosfolipídios com algumas proteínas incorporadas (BEOPOULOS; CHARDOT; NICAUD, 2009)

Os lipídios podem estar combinados na natureza com outros compostos, como proteínas aminoácidos ou polissacarídeos. Os ácidos graxos podem compreender até 88% da fração lipídica, e, os compostos com dezesseis e dezoito carbonos são mais abundantes. Os ácidos graxos insaturados predominam sobre os ácidos graxos saturados (RUEGGE, 2001).

Os processos de síntese de lipídios por microrganismos tornam-se bastante interessantes, já que são capazes de sintetizar unicamente um ácido graxo insaturado ou em concomitância com outro ácido graxo insaturado em menor quantidade e que esses ácidos graxos são utilizados como suplemento alimentar (COX e NELSON, 2011).

4.4 Proteínas Heterólogas

O crescimento da taxa populacional mundial tem demandado aumento da produção de alimentos em países em desenvolvimento. Esta situação tem criado uma demanda pela formulação de fontes alternativas e inovadoras de alimentos proteicos. Proteínas de organismos unicelulares são proteínas extraídas a partir de cultivos de biomassa microbiana, e pode ser utilizada para suprimento de proteína de um alimento básico por substituição de fontes de alto custo para diminuir o efeito da escassez de proteínas (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

A proteína microbiana apresenta considerável digestibilidade, podendo ser utilizada como fonte adicional de proteína a ser incorporada na dieta. O consumo de proteínas está relacionado às necessidades de ingestão de aminoácidos essenciais (AAE). Esses nutrientes exercem papel determinante na eficiência do metabolismo do organismo, estando diretamente ligados à construção de proteínas, regulação de

processos celulares, precursores de moléculas, entre outros. Os Chamados aminoácidos essenciais, não podem ser sintetizados pelos organismos e, conseqüentemente, devem ser supridos mediante dieta adequada (MORALES, 2016).

Para a produção de biomassa microbiana, os aspectos que devem ser observados dizem respeito à seleção do microrganismo, o qual pode ser obtido por isolamento ou aquisição junto a coleções de cultura, aos substratos nutricionalmente importantes para o desenvolvimento desses microrganismos e aos processos que serão utilizados na produção e recuperação de biomassa (MORAES, 2002).

Leveduras certificadas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) podem ser usadas na alimentação humana e animal, sob diversas formas e para diversas finalidades. As leveduras são reconhecidas mundialmente como excelentes fontes de proteínas, vitaminas do complexo B, minerais essenciais e fibra dietética. (SANTOS, 2009).

O microrganismo ideal para a produção de proteína de organismos unicelulares deve possuir uma série de características tecnológicas, entre elas: alta taxa de crescimento específico e rendimento de biomassa, alta afinidade pelo substrato, poucas necessidades nutricionais, habilidade em desenvolver alta densidade celular, capacidade para modificações genéticas, composição balanceada de proteínas e lipídios e baixo teor de ácidos nucléicos, boa digestibilidade e atoxicidade (ROEPCKE, 2007).

Diversos estudos, em nível nacional e internacional, têm sido conduzidos para viabilizar a utilização de subprodutos agroindustriais na alimentação animal. A procura por alimentos não convencionais tem aumentado principalmente devido aos frequentes aumentos nos preços dos grãos e fontes proteicas vegetais. Dentre os produtos que podem substituir os suplementos proteicos convencionais na alimentação animal destacam-se os microrganismos (algas, bactérias, bolores e leveduras), considerados fonte de proteína unicelular. O interesse na utilização desses microrganismos na alimentação animal deve-se, entre outros motivos, à sua alta velocidade de crescimento, à possibilidade de cultivo em substratos diversos e de baixo custo, e ao seu elevado teor proteico (ROEPCKE, 2007).

Microrganismos têm a habilidade para utilizar material orgânico com pouco conteúdo proteico e transformá-lo em alimento rico em proteínas, e isto tem sido explorado pela indústria de alimentos (SANTOS, 2009).

Vários resíduos agroindustriais têm sido utilizados para produção de proteína oriunda de microrganismos para alimentação de aves e ruminantes (RAJOKA *et al.*,

2006). Dentre os substratos que são comumente utilizados para produção de biomassa, se destacam melaços, resíduos e excedentes de frutas, soros de indústrias de laticínios e hidrocarbonetos de petróleo. A bioconversão de resíduos agrícolas e industriais para produção de alimentos ricos em proteínas possui ainda como vantagem o fato de o produto ter baixo custo (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000). Espécies de fungos são cultivadas em diferentes substratos, geralmente resíduos de baixo custo, com suplementação de carbono e nitrogênio para o crescimento.

Na área da produção de proteínas, as leveduras oferecem uma série de vantagens como sistemas de expressão para proteínas complexas. São organismos unicelulares, e mantêm a vantagem sobre as bactérias por serem maiores e possuem facilidade de manipulação e capacidade de crescimento (MADZAK; GAILLARDIN; BECKERICH, 2004). Os perfis de fermentação das leveduras são estabelecidos e estes organismos são capazes de crescer rapidamente em meios simples com densidade celular elevada a um custo inferior ao de qualquer outro sistema de fermentação (DOMÍNGUEZ *et al.*, 1998).

A levedura *Yarrowia lipolytica* é uma das leveduras “não-convencionais” mais extensivamente estudadas, as quais são comumente utilizadas como modelo para estudo de secreção de proteínas, dimorfismo, degradação de substratos hidrofóbicos e em outras diversas áreas (FICKERS *et al.*, 2005). Conforme descrito por Beopoulos, Chardot e Nicaud (2009), a capacidade inerente desta levedura para secretar uma variedade de proteínas através da translocação cotranslacional oferece vantagens adicionais como a baixa glicosilação, alta eficiência de secreção, boa produtividade e reprodutibilidade de desempenho.

Yarrowia lipolytica se distingue das demais leveduras pela capacidade para excretar naturalmente várias proteínas no meio de cultura como, lipases, fosfatases e esterases (MADZAK; GAILLARDIN; BECKERICH, 2004).

4.5 Tipos de secagem de soro.

A industrialização do soro de leite pode ser realizada de diversas maneiras tais como filtração, centrifugação, evaporação, secagem, ultrafiltração, osmose inversa, tratamento térmico, fermentação, desmineralização, cristalização etc. A secagem consiste na remoção de parte da água do produto, permitindo armazenamento e conservação por mais tempo. Essa técnica reduz os custos logísticos, e frequentemente é a mais utilizada para desidratação de produtos lácteos. Também é considerada a

operação mais importante para conservação de lácteos pois possibilita a produção de leite ou soro em pó a partir do leite ou soro, com perdas nutricionais mínimas (SCHUCK, 2002).

4.5.1 Secagem por liofilização.

Liofilização é um processo de secagem em que o meio de suspensão do alimento é cristalizado a baixas temperaturas e, posteriormente, passa por um processo de sublimação, ou seja, mudança de fase do estado sólido diretamente para fase de vapor. O principal objetivo da secagem por liofilização é a fabricação de um produto estável durante o armazenamento e que é inalterado após a reconstituição com água, embora isso também dependa da embalagem e condições de armazenamento (REY; MAY, 2010; OETJEN; HASELEY, 2004).

4.9 Tipos de fermentação.

As fermentações podem ser classificadas conforme a quantidade de água presente no meio, e são classificadas como fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES). A produção de biomassa microbiana pode ser realizada tanto em processo submerso como em estado sólido (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

4.9.1 Fermentação em estado Sólido (FES)

O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou ainda fermentação em meio semi-sólido aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT *et. Al.*, 1998).

Segundo Pinto *et al.* (2005), a FES apresenta as seguintes características:

- A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas.

- O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais.
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais.
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.

A fermentação em estado sólido (FES) vem se destacando quanto à eficiência na bioconversão de resíduos ou co-produtos agroindustriais voltados para a alimentação humana e animal. Os fatores estão relacionados ao baixo custo de processo e instalações para o desenvolvimento da FES e facilidade da aplicação de microrganismos, na modificação do substrato e também das características proporcionadas pelo processo como, melhora da digestibilidade, melhor valor nutricional, detoxificação, entre outros (MORALES, 2016).

4.9.2 Fermentação Submersa (FS)

Quando comparado com o método de cultivo em estado sólido, apresenta as vantagens de possuir mais fácil controle, necessita menos mão de obra para operação, melhor controle do processo, a superfície celular do agente fica inteiramente exposta ao meio, facilitando as trocas (absorção e excreção), a esterilização de um meio líquido é mais fácil, pode ser transformado em cultivo contínuo. A finalidade da agitação em cultivos submersos é a de suprir oxigênio e manter em contato com as células em crescimento, além de facilitar as trocas metabólicas entre as células e o meio (REGULY, 2000).

a. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Materiais e equipamentos utilizados.

Após o processo de liofilização do resíduo, o soro em pó obtido foi mantido dentro do congelador e utilizado para a bioconversão, a biomassa obtida foi congelada e submetida ao processo de liofilização (Liotop L101). Foram realizadas análises de proteínas e lipídios totais, Cinzas, açúcares redutores (DNS) tanto no resíduo *in natura* e liofilizado, quanto na biomassa produzida e liofilizada das diferentes linhagens.

As leveduras (QU123, QU69, QU36, QU31, e QU29), utilizadas foram gentilmente cedidas pela professora Patricia Valente, docente do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Todos os reagentes utilizados no experimento possuem grau PA. As análises serão realizadas em triplicata e o resultado apresentado foi a média aritmética entre os valores obtidos, juntamente com seus desvios-padrão.

5.2 Coleta das amostras de soro de leite e uso como fonte de carbono.

As amostras de soro de leite pasteurizado *in natura* foram coletadas no Laticínio Szurra localizado no município de Candói-PR provenientes do processamento do queijo coalho e mussarela, através de precipitação ácida. O soro líquido foi armazenado em recipiente fechado e mantidas sob refrigeração e transportado até o laboratório de química geral localizado na Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Laranjeiras do Sul- PR, onde foi mantido congelado. As amostras de soro em pó industrializado foram cedidas pela empresa HE laticínios localizada no município de Coronel Vivida-PR.

5.3 Caracterização de soro de leite e do soro de leite em pó.

Na caracterização destes materiais, inicialmente foram realizadas análises físico-químicas para a determinação da sua composição centesimal. Para tal caracterização, as seguintes análises foram realizadas: cinzas (AOAC, 1005; Method 16196); lipídios totais (BLIGH e DYER, 1959); proteínas (AOAC, 1005; Method 38012) e açúcares

redutores pelo método DNS (MILLER, 1959).

5.4 Desidratação do soro por liofilização.

A liofilização foi realizada por liofilizador de bancada, posteriormente foi realizado o congelamento das amostras em superfreezer.

5.5 Preparo do inóculo

Em balão de fundo chato foi preparado ágar GYP (glicose 2% (Alphatec), peptona 1% (Himedia®), extrato de levedura 0,5% (Himedia®), ágar 2% (Alphatec) e água destilada e levado ao micro-ondas para garantir total dissolução dos reagentes. Placas de Petri foram colocadas em capela de fluxo laminar por 20 minutos para completa esterilização. A mistura (GYP) foi autoclavada a 121°C por 15 min e então vertida nas placas no interior da capela de fluxo laminar previamente esterilizada. Após a distribuição do ágar GYP as placas foram envolvidas em plástico filme PVC e incubadas em estufa (Ethik Technology, 4410-5NDRE) a 35°C durante 48 horas, para verificar possível contaminação no processo de preparo, transcorrido esse período não houve crescimento de microrganismos, então as placas foram armazenadas em refrigerador.

O isolamento da levedura foi realizado por esgotamento e incubado em estufa (Ethik Technology, 4410-5NDRE) a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação, com o auxílio de uma alça de platina foram retiradas algumas colônias e colocadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de solução salina estéril a 0,9%, homogeneizadas em agitador tipo vórtex (Marconi, MA-162) realizada leitura da densidade óptica a 500 nm e padronizada a suspensão a fim de se obter absorvância de 0,104, que conforme estudo previamente realizado corresponde a 2×10^6 UFC/ml.

5.6 Meio de suplementação

O meio de suplementação utilizado nas fermentações foi o seguinte: NaNO_3 (1%) (Dinâmica®), KH_2PO_4 (0,1%) (Impex) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05%)

(Alphatec), os nutrientes utilizados serão de acordo com Santos *et al.*, (2013) com modificações. Será realizado ajuste inicial para pH 7,0 e adicionado 5% de resíduo como fonte de carbono.

5.7 Produção de lipídios e proteínas microbianas

Foram utilizados frascos de erlenmeyer de 125 ml onde se adicionará 50 ml do meio de suplementação e 5% de fonte de carbono, os frascos serão autoclavados a 121 °C por 15 min. Após o resfriamento dos frascos será adicionado assepticamente 1ml da suspensão contendo 2×10^6 UFC/ml das células de *Y. lipolytica* QU31, QU123, QU69, QU36, QU29.

As fermentações foram conduzidas para banho Dubnoff (Nova Instruments NI 1232) com agitação 150 rpm, temperatura de 30°C, durante 9 dias. As fermentações serão realizadas em triplicata.

5.8 Determinação de lipídios (bligh-dyer)

A análise do teor de lipídios totais foi realizada através da metodologia descrita por Bligh-Dyer (1959) com modificações. Esta metodologia pode ser utilizada em alimentos secos ou que possuam alto teor de gordura e devido ao uso de solventes apolares ocorre a extração de todas as classes de lipídios. Para a análise foram utilizados 1,0 g de amostra que foi adicionada de clorofórmio e álcool metílico e submetida a agitação durante trinta e cinco minutos em agitador magnético, após esse período foi adicionada solução de sulfato de sódio 1,5% para que ocorresse a separação das fases. Foram coletados 15 mL da fase inferior que foi adicionada em tubo de ensaio onde foi adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro para retirar os possíveis traços de água que poderiam estar presentes na amostra. Na última etapa foram coletados 5 mL da solução do tubo de ensaio e colocados em béquer previamente seco e tarado, o solvente presente na amostra foi evaporado em estufa com circulação de ar do modelo (TE-394/2) por 30 min e posteriormente o béquer foi pesado para se calcular o teor de lipídios da amostra através da diferença da massa do béquer. A equação utilizada para determinar a quantidade de lipídios presente na amostra está apresentada na Equação (1) a seguir.

$$L = (M1 - M2) * F * 100 / M3 \quad (1)$$

Onde M1: Massa do béquer mais amostra

M2: Massa do béquer previamente seco

M3: Massa da amostra

L: Teor de lipídios (%)

F: Fator da escala

5.9 Determinação de proteínas insolúveis (kjeldahl)

Para determinação do teor de proteínas totais foi utilizada metodologia descrita por Kjeldahl, conforme procedimento AOAC (1990) com modificações. Esta análise quantifica o nitrogênio presente na amostra que é posteriormente convertido em proteínas através de um fator de correção, neste caso, 6,25 que corresponde a alimentos em geral. Foram utilizados 0,5g da amostra que foi digerida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) durante aproximadamente seis horas, após a digestão as amostras foram destiladas em destilador de nitrogênio (Tecnal TE-0363) e o destilado recolhido em erlenmeyer contendo 25mL de solução de ácido bórico 4%. A última etapa da análise consistiu em titular o destilado com solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L

O conteúdo em proteína bruta do alimento será determinado através do seu conteúdo em nitrogênio, embora o nitrogênio possa ser proveniente de outros componentes (e não somente das proteínas) como ácidos nucleicos, prótidos, aminoácidos, sais de amônio, nitratos, bases púricas, etc. A determinação do nitrogênio total nos fornece uma informação muito reduzida do valor de proteínas de um alimento. Conhecendo-se a proporção de uma proteína em particular, multiplica-se o valor do nitrogênio pelo seu fator e, desta forma, estima-se o conteúdo em proteína. Para estimar o conteúdo em proteínas será utilizado o fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,25 que é o indicado para alimentos em geral.

b. Determinação de proteínas solúveis (bradford)

Para proteínas foi utilizado método descrito por Bradford (1976) que se baseia na interação entre o corante BG-250 e proteínas que contém aminoácidos de

cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provocam o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma iônica, que absorve luz a 595 nm.

Preparar curva padrão de albumina nas concentrações de 0; 0,02; 0,05; 0,012; 0,025; 0,5; 0,75; e 1 mg/ml.

Quantificação da concentração de proteína: pipetar 10 μ L da amostra na microplaca, adicionar 250 μ L do reativo de Bradford, aguardar 5 minutos mantendo a placa protegida da luz, realizar a leitura da absorbância a 595nm e espectrofotômetro de microplacas. Os resultados foram expressos em equivalente de albumina de soro bovina (mg BSA / mL).

5.11. Determinação de açúcares redutores pelo método DNS

A reação com DNS é indicada para açúcares redutores e baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5nitrosalicílico resultando em um complexo de coloração acastanhada. É utilizado em solução o sal de Rochelle (tartarato de potássio e sódio tetra hidratado) para proteger o reagente da oxidação pelo oxigênio dissolvido em solução. Também deve ser adicionado o hidróxido de sódio que é o redutor da ação da glicose.

O composto obtido obedece à lei de Lambert-Beer, podendo ser observada a relação entre absorbância e concentração na amostra. Para a análise deve-se fazer as diluições da glicose para construção da curva padrão. A curva foi construída com glicose nas concentrações g. L-1 que se iniciou em 5 g de glicose em 100 mL de água, sendo realizadas 5 diluições em balões volumétricos de 100mL até chegar em uma concentração de 0,156 g/mL. Para a determinação dos açúcares redutores utilizou-se a metodologia descrita por Wang (2016).

Para a biomassa e para e para o soro liofilizado foi necessário obter um extrato aquoso da amostra, então, diluiu-se 1,0 mg de amostra em 1 mL de água destilada. Em tubos de ensaio foram adicionados 780 μ L de água destilada, 200 μ L de solução de ácido dinitrosalicílico 1% (DNS) e 10 μ L de amostra. Em seguida os tubos de ensaio foram incubados a 100 °C por 5 minutos. Por fim, 200 μ L desta solução foram transferidos para microplacas e submetidos à leitura em 575 nm em espectrofotômetro (Termo Scientific, Uniscience Multiskan GO). Os resultados foram expressos em g 100 g-1 de biomassa e soro. Para o cálculo de açúcares foi necessário fazer a construção da

curva padrão de glicose. Utilizando as concentrações pela absorvância foi possível plotar o gráfico e a partir deste montar a Equação (2).

$$Abs = 17,92 * [G] \quad (2)$$

Onde:

[G] : Concentração de glicose (%)

Abs: Média da absorvância das amostra

5.12 Análise estatística.

Os dados obtidos, para cada avaliação, foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) e teste de média Tukey verificando se há diferença entre as amostras com nível de significância de 5 % ($p \leq 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização do soro

De modo geral, o soro de leite é considerado como um rejeito da indústria de laticínios e não como uma matéria-prima, e isso dificulta bastante o aproveitamento deste coproduto. A partir dessa observação, decorre o aproveitamento inadequado que o soro recebe na maioria dos locais onde é produzido, sendo que grande parte acaba sendo armazenada de forma inadequada até que se realize o seu descarte e que geralmente é feito de forma em locais inapropriados.

Dentre os principais obstáculos encontrados em relação ao aproveitamento do soro, podemos destacar que:

- A maioria das queijarias é de pequeno e médio porte, o que dificulta financeiramente a implantação de uma política de aproveitamento ou tratamento;
- Outro fator é que nestas pequenas queijarias, a geração de soro é relativamente pequena não compensando assim um investimento no tratamento desse soro, quem dirá na compra de máquinas para processamento desse rejeito;

- Dificuldades em coleta e manipulação e também grandes distâncias, que dificulta o rápido escoamento deste produto.

Com o intuito de agregar valor ao soro de leite produzido em pequenos laticínios, que é considerado um rejeito no município de Candói- PR primeiramente avaliou-se o teor de proteína encontrado no soro de leite fresco líquido e no soro de leite fresco liofilizado. Posteriormente as amostras de soro foram armazenadas congeladas, e após um ano se realizou as análises novamente para as duas amostras de soro, e também foi realizada uma nova liofilização com o soro que foi armazenado congelado sem ter sido desidratado. E os dados obtidas nas análises para teor de proteínas podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: % Teor proteico para o soro de leite pelo método de Kjeldahl

Soro de leite	% teor proteico*
Soro de leite fresco líquido	4,11 a \pm 0,3
Soro de leite liofilizado fresco	52,2 a \pm 1,0
Soro de leite armazenado congelado por um ano e liofilizado	51,3 a \pm 1,0

* O valor de proteínas presente no soro de leite industrializado é de 13,6 a \pm 0,3

*Os resultados apresentados correspondem à média aritmética \pm o intervalo de confiança (IC) a 95%.

*O intervalo de confiança foi calculado pelas colunas e as letras iguais significa que não houve diferença estatística.

Fonte: A autora

O soro na sua forma líquida apresenta um teor em água que varia entre 91 e 95%. A quantidade de extrato seco do soro é reduzida e representa em média 7% do peso total. Este extrato, no entanto, é bastante rico em sua composição (PAOLUCCI, 1991).

Segundo Carvalho (2013). o soro de queijo é constituído basicamente de água (93,94%); lactose (4,5-5,0%); proteínas (0,8-1,0%); gorduras (0,3-0,5%); sais minerais (0,6-1,0%).

O soro líquido fresco que foi coletado no laticínio no mesmo dia de produção do queijo e que não passou por nenhum processo apresentou o valor mais alto de teor proteico de 4,11%. O soro fresco que foi imediatamente liofilizado apresentou 52,2% de teor proteico. O intuito da avaliação não é utilizar soro fresco recém obtido e sim buscar

uma alternativa para o soro que possa ficar armazenado por um longo período de tempo. A partir disso se estabeleceu que as amostras de soro seriam armazenadas já liofilizadas e congeladas e outras amostras seriam mantidas congeladas sem terem passado pelo processo de liofilização durante o período de um ano e após esse período seria repetida a análise de proteínas.

Após um ano de armazenagem no congelador as amostras foram submetidas as análises para determinação do teor de proteínas, sendo que o soro fresco armazenado congelado apresentou o teor proteico de 51,3%, demonstrando que sua variação no teor de proteínas teve pouca variação comparado com o soro fresco liofilizado e que mesmo com um longo período e armazenagem se caracteriza adequado para utilização como fonte de carbono por ter ficado durante bastante tempo armazenado e ainda estar apto para ser liofilizado e ainda assim não apresentar diminuição significativa no valor proteico. Conclui-se que este foi o que mais apresentou diminuição no valor de proteínas, contudo esse valor não o torna inviável para o processo de liofilização e muito menos para a bioconversão utilizando a *Yarrowia lipolytica*, porque a proposta é buscar alternativa de uso para o soro armazenado durante intervalos de tempos relativamente altos e que muitas vezes precisam ficar armazenado por um longo período de tempo. Assim sendo, optou-se para os experimentos posteriores, o soro que ficou armazenado congelado por um ano já liofilizado.

Vale ressaltar que a mesma análise foi realizada para uma amostra de soro liofilizada industrialmente, essa amostra foi doada para a pesquisa pela empresa HE laticínios e a técnica responsável da instituição relatou que a empresa faz a coleta na região do sudoeste do Paraná, durante um mês percorrem as propriedades e pequenas queijarias fazendo essa coleta e armazenam o soro e posteriormente o levam para um segunda empresa localizada no estado do Rio Grande do Sul para que lá seja realizado o processo de liofilização sendo que, após o processamento o soro em pó parcialmente desmineralizado é vendido para empresas da área de alimentos, esse soro apresentou teor proteico de 13,6%.

As proteínas do soro do leite apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem um certo grau de estabilidade estrutural. As frações, ou peptídeos do soro, são constituídas de: beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glicomacropéptídeos (GMP). Essas frações podem variar em tamanho, peso molecular e função, fornecendo às proteínas do soro características especiais. Presentes em todos os

tipos de leite, a proteína do leite bovino contém cerca de 80% de caseína e 20% de proteínas do soro, percentual que pode variar em função da raça do gado, da ração fornecida e do país de origem (PAOLUCCI, 1991).

As quantidades de proteínas, sais minerais, ácidos graxos, lactose e ácido láctico são bastante variáveis no soro de leite derivado da fabricação de queijos, sendo afetada pelo tipo de queijo fabricado e pelo tratamento térmico, dentre outros fatores (PONSANO et. al., 1992).

Vários fatores influenciam na composição e, portanto, no valor nutricional do soro. São eles: a qualidade e característica do leite que varia em relação a raça animal, ao tipo de alimentação que o animal é submetido, a variação climática que os animais são expostos durante o período de lactação, e ao tipo de queijo produzido, eventuais tratamentos térmicos do leite ou do soro. Aditivos e fermentos, tempo de ruptura do coágulo, valor final de acidez, desnate, adição de água, tempo de fábrica de queijo, higiene e condições de transporte do soro (BERTOL & SANTOS FILHO, 1996).

Visto que para um processo fermentativo ocorrer com sucesso é necessário haver pelo menos uma fonte de carbono para os microrganismos utilizarem como substratos nesse caso o coproduto da fabricação de queijos, o soro de leite pode ser considerada uma fonte viável e de baixo custo para a realização na bioconversão com leveduras.

6.2 Avaliação das diferenças dos teores proteicos encontrados na biomassa produzida após a bioconversão, por cinco diferentes cepas de levedura *yarrowia lipolytica*.

Neste estudo foram determinados os teores de proteínas presentes na biomassa liofilizada pelo método de Kjeldahl, resultante da bioconversão com cinco diferentes cepas de leveduras, sendo elas a QU123, QU69, QU36, QU31 e QU29, com a utilização do soro fresco liofilizado como fonte de carbono. Com o intuito de avaliar o rendimento em relação a produção de proteínas pelas linhagens e posteriormente selecionar as duas cepas com melhor desempenho para a etapa seguinte de bioconversão. E os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Teor Proteico (%) encontrado na biomassa produzida por cinco diferentes cepas de leveduras utilizando soro fresco liofilizado como fonte de carbono.

Cepas e soro fresco liofilizado	Proteína na fonte de carbono *
QU123	33,9 ^d ± 1,5

QU69	15,1 ^c ± 1
QU36	53,1 ^a ± 5
QU31	58,2 ^a ± 1
QU29	72,2 ^b ± 3
SORO	52,2 ^a ± 1

* A quantidade de proteína presente na matéria seca do soro equivale a $6,79 \pm 0,04$

*Os resultados apresentados correspondem à média aritmética ± o intervalo de confiança (IC) a 95%.

*O intervalo de confiança foi calculado pelas colunas e as letras iguais significa que não houve diferença estatística, b, c e d, significa que houve diferença com relação a.

Fonte: A autora

A produção de proteína pelas diferentes linhagens se mostrou eficaz se comparada com a quantidade de proteína presente no soro de leite fresco liofilizado (cerca de 52,2%), o que se pode observar é que algumas linhagens apresentaram aumento no teor de proteínas, e a utilização de outras linhagens apresentou diminuição nos teores.

Quanto à redução do valor proteico pelas linhagens, podemos observar que a cepa que demonstrou maiores resultados foi a QU69 onde obteve-se uma diminuição para 37,1% no teor de proteínas, portanto pode se afirmar que esta linhagem de levedura apresentou dificuldades para se reproduzir no meio fermentativo.

Murari et al., (2011) em seu estudo observaram em relação ao consumo de proteínas do soro de leite pela *Kluyvermyces marxianus* 229, que a mesma inicialmente apresentava-se em uma concentração de 7,5 g/L e, após 48 horas de fermentação, esta foi reduzida para 0,40 g/L, o que representou um consumo final de 94,60%. O consumo de proteínas em relação ao consumo de lactose foi aproximadamente 17% menor, porém, mesmo assim a linhagem testada apresentou resultado satisfatório em relação ao consumo de tal nutriente, que também é utilizado pela levedura como componente essencial de sua estrutura e manutenção celular, embora o microrganismo utilizado por Murari seja diferente das linhagens de leveduras utilizadas nesse trabalho pode-se comparar o consumo de proteínas que a linhagem QU69 apresentou. A fermentação com *Kluyvermyces marxianus* 229 durou apenas 48 horas e apresentou baixa expressiva no teor de proteínas sendo assim a fermentação com *Yarrowia* que durou 9 dias demonstrou similaridade comportamental.

No trabalho realizado por Murari et al. (2011) ao fermentarem o soro de leite *in natura* em diferentes condições experimentais, para produção de biomassa, com uma

linhagem diferente de levedura utilizada no presente trabalho, obtiveram um consumo máximo de proteínas de 79,66%, após 24 horas de fermentação.

Um dos primeiros trabalhos sobre fermentação do soro de queijo foi realizado por Rogosa et al. (1947), utilizaram diversas leveduras lacto-fermentativas e as fermentações mais rápidas ocorreram a 37°C, com a levedura *Torula cremoris*, fornecendo um rendimento 90,73%.

Berstein et al. (1977) utilizaram a *Saccharomyces marxianus* primeiramente em sistema aeróbico do soro de leite para a produção de biomassa, em seguida, sob condições anaeróbicas, o sistema foi utilizado para a produção de álcool. No final do processo, as células, as proteínas do soro e todos resíduos provenientes da fermentação foram secos por aspersão, fornecendo componentes para uso em ração animal.

A maioria dos trabalhos pioneiros sobre produção de etanol a partir de soro de queijo originou-se da produção de vinho e cerveja (CHEN & ZALL,1982; POSANO, 1992).

Ponsano (1992) também produziu etanol a partir do soro, utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus*. Durante a produção foram acompanhados os teores de etanol, lactose e conteúdo celular.

O que se observa na literatura é que grande parte dos microrganismos utilizados para fermentação foram submetidos de 12 a 48 horas ao processo, um tempo relativamente curto se comparado ao tempo de 9 dias proposto no trabalho, pois, se entre 12 e 48 horas de fermentação as células se mantêm em fase estacionária com posteriormente declínio. Possivelmente na fase de crescimento, as células consomem a fonte de carbono dissolvida no meio (principalmente lactose) ocorrendo à formação de ácidos orgânicos. Conseqüente o início da fase estacionária, presume-se que os microrganismos utilizem-se destes ácidos para manutenção do metabolismo celular, e que com a diminuição desses compostos as leveduras acabem por seguir outros mecanismos metabólicos para manter a instabilidade e a manutenção do sistema ao invés de produzir proteínas elas acabam utilizando as mesmas como fonte energética para manter outros processos metabólicos .

O uso da linhagem de QU36, QU31 e QU29 na fermentação de soro apresentou os maiores valores de proteínas (53,1%, 58,8% e 72,2%, respectivamente) se comparados com as demais linhagens. Pode-se verificar, portanto, que a QU36 e QU31 se comportaram de forma bastante similar, em decorrência dessa avaliação as cepas selecionadas para os próximos experimentos foram as cepas QU31 e QU29. Para essas

duas linhagens, a bioconversão foi realizada tendo como fonte de carbono o soro armazenado congelado e liofilizado após um ano de estocagem, e os resultados podem ser observados na tabela 3:

Tabela 3: Teor Proteico (%) total e teor proteico solúvel encontrado na biomassa produzida pelas duas cepas de leveduras que apresentaram menor diminuição no teor proteico após a bioconversão, utilizando como fonte de carbono o soro armazenado congelado e liofilizado após um ano de estocagem.

Cepas e soro armazenado	Teor de proteínas totais (%) Método de Kjeldahl *	Teor de proteínas solúveis (%) Método de Bradford *
QU31	59,1 ± 0,5	13,4 ± 0,01
QU29	61,2 ± 1,4	11,6 ± 0,01
SORO	51,3 ± 3,7	17,8 ± 0,21

* A quantidade de proteína presente na matéria seca do soro equivale a 4,11 ± 0,3

*Os resultados apresentados correspondem à média aritmética ± o intervalo de confiança (IC) a 95%.

Fonte: A autora

Após um ano de armazenagem o soro apresentou pouca variação no teor de proteínas foi de 52,2% para 51,3% e o resultado encontrado na biomassa liofilizada das duas cepas também apresentou resultados muito semelhantes aos obtidos na primeira fermentação, onde na segunda fermentação a linhagem QU31 obteve uma aumento de 0,3% de teor proteico comparada com o valor da primeira fermentação e a QU29 antes com 72,2% e agora com 61,2% tendo uma variação de 11% no valor proteico.

Vendruscolo et al., (2008), utilizaram bagaço de maçã como fonte de carbono para fermentação semi-sólida com *Gongronella butleri* CCT 4274 durante sete dias e obtiveram resultados de até 15,2% de proteínas solúveis utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio no meio suplementação.

Anapama et al., (2000) apresenta em seu trabalho a produção de biomassa e proteínas pelas leveduras e pela bactéria *C. glutamicum* em vinhaça. A maior produção de biomassa foi obtida por *R. mucilaginosa*, 7,05g/L. *C. lipolytica* e apresentou um conteúdo de proteína pouco acima de 5,0 g/L. Embora a produção de biomassa por *S. cerevisiae* tenha sido de apenas 4,55 g/L, a maior produção de proteína da biomassa foi atingida por esta levedura, 2,29 g/L, o que correspondeu a 50,35%. Esse resultado é comparável pois com os encontrados na literatura, e com os resultados obtidos no presente trabalho na qual os resultados da produção de biomassa por leveduras se

encontram entre 50-70%.

Junior (2010), em seu estudo usando a *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 cultivada em meio a base de glicerina residual e em biorreator de bancada, com agitação de 20 rpm atingindo 19,14 g/L de biomassa, chegou a valores de 13,55% de proteína. Pode-se observar que os resultados obtidos foram superiores aos encontrados por este autor, vale ressaltar que há diferença tanto das cepas quanto dos meios utilizados, sendo que o autor não usou nenhum resíduo como fonte de carbono e fez uso da agitação e tempo de fermentação diferenciado do utilizado nesse trabalho.

Gao e Shi (2013) e Mattanna et al., (2014), indicam que leveduras possuem maior facilidade em assimilar fontes orgânicas de nitrogênio. Por se tratar de fonte de nitrogênio de origem orgânica, a uréia obteve maior facilidade em ser utilizada como substrato para crescimento das células de *Y. lipolytica* QU69 e sendo o sulfato de amônio e o nitrato de sódio fontes inorgânicas o micro-organismo enfrentou dificuldades em assimilá-los o que resultou em menor produção de proteínas.

Vendruscolo et al., (2008) utilizaram bagaço de maçã como fonte de carbono e *Gongronella butleri* CCT 4274 como bioconversor, obtiveram ganhos menores quando utilizado sulfato de amônio, seguido pelo nitrato de sódio e a maior concentração de proteínas foi quando utilizada ureia como fonte de nitrogênio. Os autores alcançaram valores finais de 19,63%, que corresponde a um incremento de 230% em relação ao teor (%) inicial

Vandenbergh et al., (2000) utilizaram bagaço de mandioca como fonte de carbono para bioconversão com *A. niger* para produção de ácido cítrico e observaram que houve enriquecimento proteico, sendo o teor inicial de era de 13,1% e ao final de 120 horas de cultivo houve incremento para 23,1%, esses resultados foram obtidos em um tempo bem menor de cultivo que o tempo utilizado nesse trabalho, fato que se relaciona com a quantidade de substratos disponíveis para a manutenção das vias metabólicas das leveduras.

6.3 Produção de lipídios microbianos

A biomassa produzida foi analisada quanto ao teor de lipídios e os resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Teor de lipídico (%) obtido utilizando duas diferentes linhagens de

Yarrowia lipolytica em 9 dias de fermentação

Cepas e soro armazenado	Teor lipídico (%)*
QU31	8,2 ± 1,4
QU29	6,2 ± 0,3
SORO	5,2 ± 2,1

*Os resultados apresentados correspondem à média aritmética ± o intervalo de confiança (IC) a 95%.

Fonte: A autora

Nos microrganismos, os lipídeos são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. A composição, qualidade e quantidade de lipídeos variam de espécie para espécie de acordo com condições de cultivo, disponibilidade de nutrientes e com estágio de crescimento (RATLEDGE, 2005).

Graças a sua capacidade em acumular lipídios a *Yarrowia lipolytica* é considerada uma das leveduras capazes de assimilar glicerol, dentre outros substratos (mais de 20% da sua biomassa seca é convertida em lipídios). Estas leveduras, portanto, são classificadas como organismos oleaginosos (AZAMBUJA, 2016).

Quando analisadas individualmente cada linhagem podemos observar que, utilizando a QU31, observou-se uma produção de lipídios se comparada com a quantidade presente no soro e obteve-se um aumento na quantidade de lipídios já presentes na fonte de carbono.

Para os valores obtidos com a linhagem QU29, pode-se observar que esta apresentou menor valor de teor lipídico se comparados com a outra linhagem e este valor ainda é superior ao valor encontrado no soro.

O acúmulo de lipídios pode ser realizado por dois caminhos: através da presença de precursores na síntese de ácidos graxos; ou através da absorção de óleos, ácidos graxos e triacilgliceróis do meio de cultura. A levedura *Yarrowia lipolytica* é facilmente encontrada em ambiente rico em substratos hidrofóbicos e com isso desenvolveu um mecanismo eficiente para uso destes substratos que consiste no acúmulo de frações de lipídeos, principalmente sob a forma de triacilgliceróis ou estéril ésteres (BEOPOULOS et al., 2009).

Segundo Bacciotti, (2015) a produção de lipídios na *Yarrowia lipolytica* se deve ao fato desta acumular lipídios como uma forma de reserva energética. Neste estudo foi abordada a produção de partículas lipídicas por microscopia da *Y.lipolytica* w29, onde

esta por sua vez chegou a produzir 0,75 partícula lipídica/célula.

Em estudo com *Yarrowia lipolytica*, Papanikolaou et al. (2002) obtiveram uma produtividade de 0,12g lipídeo/h, no crescimento em resíduo glicerinoso em um sistema contínuo. Os pesquisadores observaram que a inativação da ATP-citrato liase, mesmo em excesso de fonte de carbono diminuiu o nível de acúmulo de lipídio. Os fungos pluricelulares e leveduras são os organismos mais promissores oferecendo possibilidade de produção econômica produzindo ácidos graxos simples.

Azambuja, (2016) estudando a fisiologia e a capacidade de acúmulo de lipídios de diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides* em meio contendo glicerol testando como diferentes fontes glicose e glicerol encontrou um melhor rendimento para a linhagem *Y. lipolytica* CCT 5443 apresentando os melhores valores de 0,054 gramas de lipídeos por grama de substrato.

Kurbanoglu et al. (2002) relata em seu trabalho que as leveduras *C. lipolytica* e *R. mucilaginosa* que apresentaram as maiores produções de lipídios, acima de 20% e 18%, respectivamente, seguidas por *S. cerevisiae* que apresentou uma produção lipídica em torno de 11%. Essas leveduras produziram quantidades similares de lipídios tanto em melão quanto em vinhaça. No meio de melão, o conteúdo lipídico da biomassa da bactéria *C. glutamicum* duplicou, atingindo 15,87%. Esse valor é superior ao descrito para outras bactérias como *B. subtilis*, *B. cereus* e *E. coli*, 8 a 8,5%

Segundo Ageitos et al., (2011), microrganismos oleaginosos tem seu estado metabólico induzível por elevada razão carbono/nitrogênio. Após a fase exponencial de crescimento, o nitrogênio se torna limitante e durante a fase estacionária, direciona o fluxo de carbono para o metabolismo de lipídios, e o acumula em gotas. Em seu estudo foi utilizado o isolado QU31, identificado como *Yarrowia lipolytica*, e pode ser cultivada em substratos como resíduos industriais para a geração de óleo com valor agregado. O óleo pode ser aplicado na indústria de biodiesel, este gerado por transesterificação entre triacilglicerídeos e um álcool por um catalisador. Foi descrito por Thliveros (2014) a lise celular por solvente (metanólise), com liberação do óleo microbiano e a reação de transesterificação simultâneas, demonstrando um processo ágil para a síntese de biodiesel a partir de óleo microbiano.

6.3 Avaliação do teor de cinzas

Avaliação de cinzas em um alimento é representada pela análise do resíduo

inorgânico que permanece no alimento após a queima da matéria orgânica.

A biomassa produzida foi analisada quanto ao teor de cinzas e os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: % Teores de cinzas encontrados para as biomassas produzidas após a biocobertura comparadas com os valores obtidas para o soro armazenado congelado e liofilizado após um ano de estocagem.

Cepas e soro armazenado	Teor de cinzas (%)*
QU31	4,8 ± 0,3
QU29	7,2 ± 2,1
SORO	8,3 ± 0,4

* Os resultados são apresentados como média da diferença ± desvio padrão.

Fonte: a autora.

Quando observadas as duas linhagens podemos visualizar que a QU29 apresentou o maior valor para o teor de cinzas (7,2%) enquanto a biomassa produzida pela linhagem QU31 apresentou menor valor (4,87%) ambos os valores estão abaixo se comparadas ao valor obtido para o soro armazenado congelado e liofilizado após um ano de estocagem.

Segundo BRASIL (2000) os produtos devem apresentar uma umidade de no máximo de 3,5% (m/m). A Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (TACO, 2006), diz que esses produtos possuem 3,1% de umidade. Já a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo (TBCAUSP, 2008), estabelece um limite máximo para umidade de 3,0%. Então, as amostras se mostraram acima do especificado. Segundo a TACO (2006) os produtos possuem 8,2% de cinzas. Já a TBCAUSP (2008) diz que esses produtos podem ter no máximo 4,9% (m/m) de cinzas.

Para CECCHI (2003), a variação de cinzas nesses alimentos pode ocorrer de 0,7% a 6%, a cinza obtida após o processo não será necessariamente a composição mineral inicial, visto que compostos podem volatilizar e ser perdidos, tais como, óxidos e sulfatos. A composição da cinza vai depender das características do alimento.

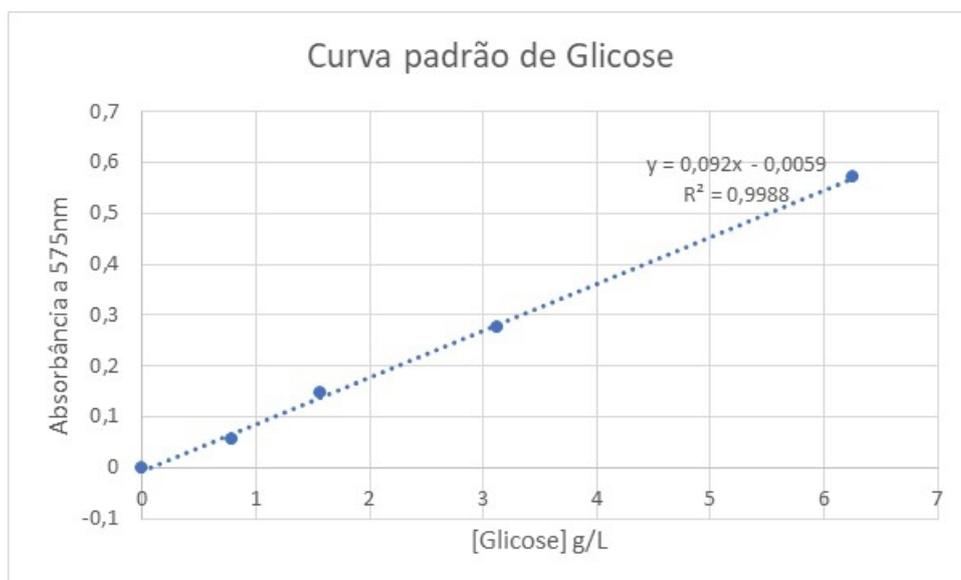
O teor de cinzas não diferiu significativamente entre os soros dos queijos analisados, ficando em torno de 0,57 g/100g. Outros trabalhos encontraram valores semelhantes para soro de queijo prato com 0,51 g de cinzas/100g (BALD et al. 2014) e

para soro de queijo mussarela com 0,52 g de cinzas/100 (BALD et al. 2014) e de 0,47 g de cinzas/100g (TEIXEIRA; FONSECA, 2008). Com o intuito de fornecer melhor detalhamento neste parâmetro, o ideal seria fazer determinações dos teores de minerais, para se diferenciar as devidas concentrações destes entre os soros.

4.4 Avaliação de açúcares redutores

A análise de açúcares redutores teve por objetivo avaliar o consumo de açúcares pela levedura para posteriormente avaliar a afinidade da fonte de carbono com o microrganismo envolvido. O Gráfico (1) a seguir apresenta a curva analítica construída utilizada para determinar a equação.

Gráfico 1: Curva analítica obtida pela correlação da absorbância em 575nm em função da concentração de glicose obtidos pelo método DNS.



Fonte: A autora

Sendo plotado a partir da curva padrão de glicose e da leitura de absorbância da mesma em 575nm, pode-se calcular a concentração de açúcares redutores e o consumo de açúcar de cada cepa. Os valores calculados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6: Teores e consumo de açúcares redutores (%) encontrados para as biomassas

produzidas após a bioconversão comparadas com os valores obtidas para o soro armazenado congelado e liofilizado após um ano de estocagem.

Cepas e soro armazenado	Teor de açúcares redutores totais (%) Método DNS*	Percentual (%) de Consumo de açúcares.
QU31	0,7 ± 0,08	43,75
QU29	0,7 ± 0,08	43,75
SORO	1,6 ± 0,02	----

Para o soro armazenado congelado liofilizado após um ano obteve-se um valor de 1,35% ± 0,07

Fonte: a autora

O teor de açúcares redutores residuais da fermentação pelas leveduras das duas diferentes variou de forma similar, sendo que, apresentaram menores concentrações que comparadas as quantidades presentes na amostra e no soro de leite armazenado e liofilizado, sem diferença estatística entre si a nível de 95% de significância.

As diferenças encontradas para o valor obtido na análise de açúcares, quanto nos valores obtidos de proteína podem ser atribuídas à facilidade de degradação dos carboidratos contidos no soro. Açúcares são incorporados diretamente na via glicolítica do metabolismo da levedura. Assim sendo devido ao fato de o soro não apresentar uma quantidade expressiva de carboidratos as leveduras fizeram uso do suplemento nas primeiras horas de fermentação o que explica a baixa produção de proteínas.

Tal comportamento, com tendência a não elevar em grande quantidade o teor de proteína no tempo de fermentação à medida que se aumenta a proporção de inóculo de levedura, visto que as leveduras aumentaram seu número em função de ter açúcares para usar como fonte de energia e quando o número de leveduras excedeu a quantia ideal para o meio suplementado, as leveduras começaram a mudar a forma de metabolizar e isso induz a se admitir que o tempo necessário para completa degradação dos carboidratos presentes no soro, pode ter sido até inferior a 24 horas.

A esse respeito, Worgan (1973) afirma em seu estudo que o tempo médio para a proteína dobrar, no meio de cultivo com suficiente substrato e sob condições favoráveis, é de cerca de cinco horas em sistema de fermentação por batelada. Com base nessa informação, Worgan conclui em seu estudo e nos resultados obtidos no teor inicial de proteína no pedúnculo de caju que é de se esperar que em aproximadamente oito horas a

concentração proteica desejada seja atingido.

Nicolau (2014), relata em seu estudo que as leveduras sintetizam e acumulam solutos compatíveis com o metabolismo e crescimento celular mesmo em elevadas concentrações de açúcares com a finalidade de estabelecer o equilíbrio osmótico com o meio envolvente, acumulando por exemplo, sacarose e polióis (ex. arabitol, glicerol, manitol) dados que demandam com a quantidade insuficiente de açúcares presentes no soro para suprir a demanda de um período extenso de fermentação como o proposto no presente estudo.

Malbasa *et al*, 2008 afirma em seu estudo que, os microrganismos apresentam em sua rota metabólica um açúcar preferencial. Essa variação pode ser explicada pelo fato de que durante a fermentação os microrganismos podem produzir enzimas que irão hidrolisar os açúcares, disponibilizando-os para o metabolismo próprio. As leveduras utilizam os açúcares de forma complementar, elas hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, produzindo etanol.

Mendes, (2003) apresentou um consumo de lactose 96,3%, a pós fermentação do soro de leite em diferentes concentrações de lactose para produção de etanol, pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 14424. Esse resultado não pode ser comparado com o obtido no presente estudo pois aqui não foi feita a determinação da quantidade de lactose presente no soro de leite e nem o quanto apresentou a biomassa. Porém pode-se cogitar que tal informação pode estar relacionada, com dados da literatura que mostram que a lactose presente no meio é direcionada para produção de energia, manutenção celular e atividades vitais da levedura testadas em outros estudos.

5. CONCLUSÃO

A fermentação se mostrou uma ferramenta eficiente na bioconversão de resíduos. Conclui-se que com este trabalho utilizando resíduo agroindustrial soro de leite, pode ser considerado uma alternativa viável em agregar valor a essa matéria-prima através da produção de substâncias de interesse econômico, e demonstrando que com a bioconversão ocorre o aumento das concentrações nutricionais para que futuramente essa biomassa produzida possa ser utilizada como suplemento nutricional e possível solução para diminuir o desperdício e poder gerar renda de a partir de um produto que é descartado e que pode ajudar em diversas áreas como contribuição para a diminuição de resíduos gerados pelas indústrias de laticínios.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda que a pesquisa demonstre fatores positivos em relação ao uso do soro de leite, torna-se importante o desenvolvimento de alternativas com mais melhorias no bioprocessamento para um adequado aproveitamento do soro de leite pois com as análises realizadas.

Mesmo que o microrganismo apresente bom desempenho na produção de proteínas, o processo de fermentação precisa ser ajustado em tempo e temperatura para efetivar melhores resultados.

7. REFERÊNCIAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17>. Acesso em: 14 ja. 2020.

AGEITOS, J. M. et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol* v.90 1219-1227, 2011

AMARAL, Priscilla Filomena Fonseca. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. 2007. 243 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

ANDRADE, R.F.S. Produção, caracterização e aplicação de biossurfatante de *C. lipolytica* e *C. glabrata* utilizando resíduo industrial como substrato alternativo. Dissertação de mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, 2010.

ANUPAMA, M., RAVINDRA, P. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*, New York, v.18, n.6, p.459-479, 2000.

BARTH, G. e GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiol. Rev. Amsterdam*. v. 19, n. 4, p. 219-237, 1997.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed. Washington, 1995.

ARAÚJO, L. F. et al. Enriquecimento proteico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. *João Pessoa: Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v.3, n.3, p. 47-53, set., 2009.

ATRA, R. et al. Investigation of ultra and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*, v. 67, n. 3, p. 325-332, 2005.

AUED-PIMENTEL, S et al. Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia gasosa. Rev Inst Adolfo Lutz, 64(2):167-172, 2005.

AZAMBUJA, S.P.H. Fisiologia e capacidade de acúmulo de lipídeos de diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides* em meio contendo glicerol, Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2016

BACCIOTTI, F. Fisiologia e formação de partículas lipídicas durante o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. 2015. 119f. Dissertação (Mestrado) –Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

BALD, J. A. et al. Características físico-químicas de soros de queijo e ricota produzidos no Vale do Taquari, RS. Revista Jovens Pesquisadores, Santa Cruz do Sul, v. 4, n. 1, p. 90-99, 2014.

BALDASSO, C. Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas. 2008. 163 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Porto Alegre, 2008.

BARRETT, D. M.; SOMOGYI, L. P.; RAMASWAMY, H. S. Processing fruits: science and technology. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2005. 841p.

BÁRTHOLO, G. F. Perdas e qualidade preocupam. Inf. Agropec., Belo Horizonte, v. 17, n. 179, p. 3, 1994.

BERNSTEIN, S., TZENG, C. H & SISSON, D. (1977). The commercial fermentation of cheese whey for the production of protein and alcohol. Biotechnology and bioengineering symposium, n. 7, p. 1-9.

BERTOL, T. M. & SANTOS FILHO, J. I., (1996), Soro de leite integral na

alimentação de suínos. Suinocultura dinâmica. Periódico Técnico- Informativo elaborado pelo Departamento técnico Rhodia – Merieux.

BEOPOULOS, Athanasios; CHARDOT, Thierry; NICAUD, Jean-marc. Yarrowia lipolytica: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation.

BIOCHIME, [s.l.], v. 91, n. 6, p.692-696, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.02.004>.

BLUCHER Ltda., p. 421-446, 2001.

BLIGH, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method os total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol, v. 37, n8, p. 911-917, 1959.

BRASIL - INSTRUÇÃO NORMATIVA N.º 36, DE 31 DE OUTUBRO DE 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cadeia produtiva da agroenergia / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura; Buainain, A. M. e Batalha, M. O. (coordenadores), Brasília: IICA:MAPA/SPA, 112 p. 2007.

CARVALHO, K. D. Utilização de soro de leite doce na fabricação de sorvete de massa. 2012. 195 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável e Qualidade de Vida) - Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino – FAE, São João da Boa Vista, 2013.

CHRISTOPHE, G.et al. Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food. Brazilian Archives Of Biology And Technology, [s.l.], v. 55, n. 1, p.29-46, fev. 2012. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132012000100004>.

CORTEZ, N. M. S. Diagnóstico da produção do soro de queijo no estado do Rio de Janeiro. 2013. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal

Fluminense, Niterói, 2013.

CECCHI, H.M.- Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2ªEd. rev. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2003.

CHEN, H. C.; ZALL, R. R., (1982), Continuous fermentation of whey into alcohol using an attached film expanded bed reactor. *Process Biochemistry*, Vol. 17, n.1, p.20-25.

FEROLLA, F. S. Composição bromatológica e fracionamento de carboidratos e proteínas de aveia-preta e triticales sob corte e pastejo. *R. Bras. Zootec.* 2008, vol.37, n.2, pp. 197-204

DANTAS, Érica Mara; AQUINO, Luciana Cristina Lins de. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para obtenção de lipase. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande - PB, v. 12, n. 1, p.81-87, 2010.

DOMÍNGUEZ, Ángel et al. Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *Internatl Microbiol*, Salamanca - Espanha, v. 1, p.131-142, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005

IMADURA, J.K.N.; MADRONA, G.S. Reaproveitamento de soro de queijo na fabricação de pão de queijo. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v. 1, n.3, p. 381-390, set./dez. 2008.

FAAIJ, A. P. C., 2004, Bio-energy in Europe: changing technology choices. *Energy Policy* 34 (2006) 322-342.

FAO. Codex Alimentarius, Banco de dados estatísticos. Disponível em <<http://www.fao.org/statistics/en/>>. Acesso em 12 Jul. 2018.

GAO, M.; SHI, Z. Process Control and Optimization for Heterologous Protein Production by Methylophilic *Pichia pastoris*. *Chinese Journal Of Chemical*

Engineering, [s.l.], v. 21, n. 2, p.216-226, fev. 2013. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s1004-9541\(13\)60461-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1004-9541(13)60461-9).

GÉLINAS, P.; BARRETTE, J. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. *Bioresource Technology*, v. 98, 1138-1143, 200

GIRALDO-ZUÑIGA, A. D. Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de queijo. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 59, n. 340, p. 53-66, 2004.

GUIMARÃES, P. M. R., TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 3, p. 375- 384, 2010.

HOSKINS, B.; LYONS, M. Improving bioethanol yield: the use of solid-state fermentation products grown on DDGS. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 115, n. 1, p. 64-70, 2009.

HARAGUCHIL, F. K.; ABREU, W. C., PAULA, H. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de Nutrição. Campinas*, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

KURBANOGU, E. B., ALGUR, O. F. Single-cell protein production from ram horn hydrolysate by bacteria. *Bioresource Technology, Essex*, v.85, n.2, p.125-129, 20

ISABEL BELO (Portugal). Sociedade Portuguesa de Ciotechnology. *Yarrowia lipolytica: uma fábrica celular no contexto de biorrefinaria. Biorrefinarias e Biotecnologia Industrial, Braga*, p.21-23, abr. 2013. Quadrimestral.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. Blackwell Scientific Publications, 7th Edition; Method 2.301; Report of IUPAC Working Group WG 2/87; 1987.

LIMA, Jamille Coelho Ribeiro de. Produção de bioprodutos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 a partir de glicerol bruto. 2014. 142 f. Tese (Doutorado) - Curso de

Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

MATTANNA , P. et al. Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. *Revista Brasileira de Biociências: Brazilian Journal of Biosciences*, Porto Alegre, v.12, n 2 p.121-126, abr./jun. 2014

MALBAŠA, R.; LONČAR, E.; DJURIĆ, M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, Serbia, v. 106, n. 3, p. 1039–1045, 2008

MACHADO JUNIOR, Francisco Roberto da Silva. Conversão por via biotecnológica de glicerina residual em biomassa de leveduras como fonte de proteína e lipídios. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2010.

MADZAK, Catherine; GAILLARDIN, Claude; BECKERICH, Jean-marie. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal Of Biotechnology*, [s.l.], v. 109, n. 1-2, p.63-81, abr. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.027>

MCFARLAND, J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* 49:1176-1178.

MENDES, F. B.; ARAÚJO, H. Produção de etanol a partir do soro de queijo utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* e diferentes concentrações de lactose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 2003, Seropédica. Anais eletrônicos. Seropédica, 2003. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/Edicao%202006_1/C/fabricio.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2020.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, US, v. 31, n. 3, p. 426- 428, Mar. 1959.

MINAS AMBIENTE / CETEC (1998), Pesquisa tecnológica para controle ambiental em pequenos e médios laticínios de Minas Gerais. Belo Horizonte: Minas Ambiente / Cetec, v.2.

MULLER, A.; DAUFIN,G.;CHAUFER, B. Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -Lactalbumin from acid casein whey. J. Membr. Sci., v.153, p.9–21,1999.

MUJUMDAR, A.S. Handbook of Industrial Drying. 3 Ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006

MURARI, C. S. et al. Emprego do soro de leite bovino e bubalino para produção de biomassa pela levedura *Kluyveromyces marxianus*. 229. Revista Analytica, São Paulo, v.9, n. 51, p.48-64, 2011.

MORAES, I.O. Produção de microrganismos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI MORALES, Eduardo Marin. Bioconversão mediante fermentação em estado sólido e bagaço e folhas de mandioca por fungos visando melhoria da qualidade nutricional. 2016. 124 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro - SP, 2017.

NELSON, D.L. COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a Ed., pg 805-810, cap 2, 2011.

PAOLUCCI, A. A .P., (1991), Formulação de um meio de cultura a base de soro de queijo para produção de *Lactococcus lactis* sp Lactis. Tese de Mestrado, p.6, UFV, Viçosa, MG

PAGNO, C. H., BALDASSO, C., TESSARO, I. C., FLORES, S. H., JONG, E. V., Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. Alimentos e Nutrição, v. 20, n. 2, p. 231-239, 2009.

PAPANIKOLAOU, S. AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single stage continuous culture. *Biores Technol.* Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 43-49, 2002.

PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra et al. *Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais*. 102. ed. Fortaleza -ce: Embrapa, 2005. 5 p.

POLI, J. S. et al. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 161, p.320-326, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.083>.

PONSANO, E. H. G., (1992), *Produção de etanol por Kluyveromyces fragilis: Estudo em soro de leite visando seu aproveitamento e a diminuição de sua capacidade poluente*. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. & CASTRO GOMES, R. J. H., (1992), *Soro de leite –Obtenção, características e aproveitamento: revisão*. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, Vol. 13, n.1, p.92-96

RATLEDGE, C. Single cell oils for the 21st century. In: COHEN, R. (Ed.). *raw glycerol waters*. *Landbauforschung Völkenrode*. Berlin. v. 55, n. 4, p. 261–267, 2005.

RAIMBAULT, M., Soccol, C.R. and Chuzel, G. (1998). *International training course on solid state fermentation*. Document ORSTOM, Montpellier France , n°1 ; pp. 204

RAJOKA, M. I.; KHAN, S. H.; JABBAR, M. A.; AWAN, M. S.; HASHMI, A. S. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1934-1941, 2006.

REVISTA. *Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 212-226, mai/jun, 2014

Revista Laticínios. Disponível em:

<<http://revistalaticinios.com.br/noticias/fazermelhor/aspectos-da-avaliacao-de-conformidade-dos-produtos-lacteos-em-relacaoas-exigencias-do-mercado-globalizado>>. Acesso em: 17 jul. 2018.

REGULY, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos: produção de enzimas e engenharia das fermentações. Pelotas: Editora Universitária, 2000. 218 p.

ROGOSA, M., BROWN, H. H. & WHITTIER, E. O., (1947). Ethyl alcohol from whey.

Journal of Dairy Science, Vol. 30, n.4, p. 263-269

ROEPCKE, C. B. S. Desenvolvimento de Bioprocessos para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2007.

ROSA, M. F., et al. VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS

SANTOS et al., Detecção de lipase por cepa de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*. In: CONICBIO / CONBIO / SIMCBIO, 2013, Recife - PE. Resumos Expandidos. Recife, 2013. v. 2, p. 1 - 11.

SANTOS, Elisane Odrisolla dos. Aproveitamento de Glicerol gerado na síntese de biodiesel para produção de biomassa de leveduras. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, 2009.

SCHMIDELL, W.;LIMA, U.A. Biotecnologia Industrial. V. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., p. 421-446, 2001.

SCHUCK, P. Spray drying of dairy products: state of the art. Le Lait, v. 82, n. 4, p. 375-382, 2002.

SCHUCK, P. Understanding the factors affecting spray-dried dairy powder properties and behavior. In: CORREDIG, M. Dairy-derived ingredients. 1 ed. Boca Raton: CRC, 2009. Cap. 2, p. 24-50.

SILVA, Luana Vieira da. Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono. 2010. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, Danilo José da. Resíduos na Indústria de Laticínios. (2011). Disponível em: <<http://www.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/saibaMais/saibaMais2.pdf>>. Acesso em: 18 Jul. 2018.

SILVA, K.; BOLINI, H.M.A.; ANTUNES, A.J. Soro de leite bovino em sorvete. Alimentos e Nutrição, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 187-196, 2004.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. Revista de Nutrição, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

TACO-Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos – 2ª Edição – Campinas-SP, 2006.

TBCAUSP-Tabela Brasileira de composição dos Alimentos-USP – São Paulo, 2008.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

THILVEROS, P et al. Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. Bioresour Technol v. 157,181–187, 2014.

VENDRUSCOLO, F. et al. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dieta para alevinos. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, p.487493, nov. 2008.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã: Enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.14, n.1, p.38-42, 200

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. *Food Science and Technology*. 2 ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006

WORKMAN, M.; HOLT, P.; THYKAER, J. Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express*, v. 3, n. 58, p. 1-9, 2001

WORGAN, I.T. Protein production by microorganisms from carbohydrate substrates. In: JONES, J.G.W. (Ed.). *The biological efficiency of protein production*. Cambridge: Univ. Press, 1973. p.339-371,

