

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

CAROLINA AZEVEDO BRAZ

Aplicações biotecnológicas do soro de queijo: produção de células íntegras com atividade lipolítica e geração de biogás

Lorena

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

CAROLINA AZEVEDO BRAZ

Aplicações biotecnológicas do soro de queijo: produção de células íntegras com atividade lipolítica e geração de biogás

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Desenvolvimento de Produtos e Processos

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Versão Original

Lorena

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Braz, Carolina Azevedo

Aplicações biotecnológicas do soro de queijo:
produção de células integras com atividade lipolítica e
geração de biogás / Carolina Azevedo Braz; orientador
Heizir Ferreira de Castro - Versão Original. -
Lorena, 2019.
93 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química na Área de
Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
2019

1. Soro de queijo. 2. Biogás. 3. Mucor
circinelloides. 4. Células integras. 5. Lipase. I.
Título. II. de Castro, Heizir Ferreira, orient.

RESUMO

BRAZ, C. A. **Aplicações biotecnológicas do soro de queijo: produção de células íntegras com atividade lipolítica e geração de biogás**. 2019. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

O soro resultante da produção de queijo, por possuir alta carga orgânica e composição rica em lactose, proteínas, lipídios e minerais, apresenta potencial para uma série de aplicações mais nobres e ambientalmente favoráveis do que o seu despejo como rejeito. Dentre as aplicações possíveis do soro, encontram-se a sua utilização direta como substrato para produção de enzimas e, de forma indireta, na geração de energia, como, por exemplo, na produção de biogás por digestão anaeróbia. Neste último caso, a presença de lipídios pode limitar o processo. Portanto, destaca-se a importância das lipases na atuação da etapa de hidrólise da digestão anaeróbia, contribuindo para o processo de geração de energia. Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a aplicação do soro de queijo na produção de lipases ligadas ao micélio e na geração de biogás. Para tal propósito, foram avaliados os fungos filamentosos *Penicillium janthinellum* CCT3162, *Penicillium italicum* AT4421 e *Mucor circinelloides* URM 4182, conhecidos por serem bons produtores de lipase ligada ao micélio. O estudo foi iniciado pela determinação das condições otimizadas da hidrólise do lipídio presente no soro, avaliando o efeito da linhagem fúngica, do carregamento de lipase (na forma de células íntegras), pH do meio e temperatura, por meio de planejamento experimental utilizando o método de Taguchi, com matriz L9 saturada. O fungo *M. circinelloides* foi selecionado como a fonte mais eficiente da enzima lipase, empregando soro de queijo como meio de cultivo. A suplementação do soro foi também avaliada, mas os aditivos utilizados (azeite de oliva, peptona e sais) não proporcionaram aumento significativo na atividade hidrolítica da lipase. A principal lipase gerada foi produzida a partir do meio de cultivo composto por soro de queijo integral, sem nenhum aditivo, por um período de incubação de 120 h. Algumas propriedades da lipase obtida foram pH ótimo de 7,5, temperatura ótima no intervalo de 40 a 60 °C e tempo de meia-vida com a relação à estocagem de 26,8 dias. Foram também analisados os parâmetros cinéticos da lipase quanto ao K_m (115,74 mmol L⁻¹) e V_{max} (186,92 μ mol g⁻¹ min⁻¹). O desempenho da lipase foi verificado na hidrólise do soro de queijo, apresentando preferência pela clivagem de ácidos graxos de menor cadeia carbônica ($\leq C 16:0$), com potencial de aplicação em operações sucessivas. Finalmente, os tratamentos prévio e simultâneo à digestão anaeróbia do soro de queijo se mostraram opções promissoras para a valorização do soro de queijo, apresentando redução na fase *lag* de até 43,7% e aumento na produção de metano em 8 vezes (137,6 mL g⁻¹ STV) e 9 vezes (158,9 mL g⁻¹ STV) nos tratamentos prévio e simultâneo, respectivamente.

Palavras-chave: Soro de queijo. Biogás. *Mucor circinelloides*. Células íntegras. Lipase.

ABSTRACT

BRAZ, C. A. **Biotechnological applications of cheese whey: production of whole-cells with lipolytic activity and biogas generation.** 2019. 93 p. Dissertation (Master of Science), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The whey generated from cheese production has high organic load due to its high content of lactose, proteins, lipids, and minerals, making it suitable for more valuable and environmental friendly applications comparing to its disposal as waste. Among many possibilities, cheese whey can be used as a raw material for enzymes and biogas production. In the latter case, the presence of lipids might constrain the anaerobic digestion. Hence, enzymatic treatments can be applied to improve this process, especially in the hydrolysis stage. In this context, the present work aims to evaluate the application of cheese whey in the production of mycelium-bounded lipases and in the formation of biogas. For this purpose, whole-cells of the filamentous fungi *Penicillium janthinellum* CCT3162, *Penicillium italicum* AT4421 and *Mucor circinelloides* URM 4182 with high hydrolytic activities were studied. The study began with the assessment of the best parameters for cheese whey hydrolysis, analyzing the fungal strain, lipase loading (in whole-cells form), pH, and temperature, using Taguchi's design of experiments method, with a saturated L9 orthogonal array. *M. circinelloides* was selected for lipase production using cheese whey as a growth medium. Although some of the media were supplemented (with olive oil, peptone, and salts), the increase in hydrolytic activity observed was not high enough to justify its addition. The most outstanding growth medium was the whole cheese whey, with no supplementation at 120 h of incubation. The lipase produced displayed the optimum hydrolytic activity, optimum pH at 7.5, optimum temperature within 40 to 60 °C and storage half-life of 26.8 days. The kinetic parameters values for the lipase were 115.74 mmol L⁻¹ for Km and 186.92 μmol g⁻¹ min⁻¹ for Vmax. The selected lipase was applied in the hydrolysis of cheese whey, being prone to cleavage lower molecular weight fatty acids (below C 16:0), with potential of application in successive operations. Finally, the previous and simultaneous treatments for the anaerobic digestion of the whey were promising options for the cheese whey valorization. The reaction's lag phase was reduced up to 43.7% and the biogas production were increased eightfold (137.6 mL g⁻¹ STV) in the pretreatment and ninefold (158.9 mL g⁻¹ STV) in the simultaneous treatment.

Key words: Cheese whey. Biogas. *Mucor circinelloides*. Whole-cells. Lipase.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, que me ofereceu suporte em todos os aspectos para que eu estivesse aqui, além de contribuir imensamente com sua amizade, energia e inspiração. Aos meus irmãos pelo companheirismo durante toda a minha jornada.

À Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro pela orientação. Muito obrigada por sua dedicação, apoio, paciência e pela oportunidade de desenvolver este estudo.

Ao meu namorado, Luis Miguel, carinhosamente presente nos altos e baixos desta jornada. À sua família, Pablo, Guida, Diana e Ana Carolina, que se tornaram uma extensão da minha própria.

Aos meus colegas do laboratório de biocatálise pelas discussões sobre os mais variados temas, por me guiarem e me ensinarem tanto. Cristiano, Ana Karine, Heitor, Dani, Rodney, Cíntia, Mateus, Renata e Annie foram amigos excepcionais dentro e fora do laboratório.

Aos meus companheiros de república: Luis, Aline, Hemerson, Stanley, Carlos, Bárbara, Pedrão e Vítor. Obrigada por todo auxílio e companheirismo em forma de conversas e churrascos.

Ao Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha pela orientação e ajuda na aquisição do soro de queijo. Ao Prof. Dr. Hélcio José Izário Filho, por disponibilizar o seu laboratório para análises e ao Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira (UNIFAL) na montagem do aparato experimental.

A todos os meus amigos da faculdade, especialmente aos da equipe de softbol e da entidade Flor de Lis por tornarem a minha experiência nestes últimos anos mais enriquecedora.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante o período de realização deste mestrado.

Aos professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena que contribuíram direta ou indiretamente para esta experiência de desenvolvimento profissional e pessoal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Produção de leite no Brasil por região entre 1974 e 2017	19
Figura 3.2 - Árvore de commodities do setor de produtos lácteos	20
Figura 3.3 - Dados sobre a produção de queijos no Brasil em 2017	21
Figura 3.4 - Aplicação do soro de queijo por métodos físico-químicos e biotecnológicos com ênfase nos processos de produção de enzimas e biogás	23
Figura 3.5 - Principais etapas envolvidas no processo de digestão anaeróbica ..	25
Figura 3.6 - Exemplos de reações catalisadas por lipases	31
Figura 4.1 - Esquema do sistema utilizado para os testes de atividade metanogênica específica	45
Figura 5.1 - Gráfico da média dos efeitos dos fatores utilizados no planejamento em 24 h da reação de hidrólise catalisada	57
Figura 5.2 - Hidrólise do soro de queijo por células íntegras de <i>M. circinelloides</i> com 350 U de lipase, pH _{inicial} 9,0, 37 °C.	58
Figura 5.3 - Gráfico de Pareto da atividade da lipase proveniente do cultivo de <i>M. circinelloides</i>	61
Figura 5.4 - Atividade hidrolítica das lipases ligadas ao micélio de <i>M. circinelloides</i> produzidas a partir do cultivo em meios com azeite de oliva (lipase A) e soro de queijo (lipase B)	62
Figura 5.5 - Influência do pH na atividade lipolítica das lipases ligadas ao micélio de <i>M. circinelloides</i> obtida em cultivo de meio A e meio B	63
Figura 5.6 - Influência da concentração do substrato na atuação das lipases ligadas ao micélio de <i>M. circinelloides</i> cultivadas em meios contendo azeite de oliva (A) e soro de queijo (B)	66
Figura 5.7 - Atividade hidrolítica das lipases produzida a partir do meio de controle (lipase A) e do soro de queijo (lipase B) por 12 dias sob refrigeração.....	67
Figura 5.8 - Atividade residual e tempo de meia vida das lipases A (cultivada com azeite de oliva) e B (cultivada com soro de queijo)	68
Figura 5.9 - Hidrólise do soro de queijo (A) e do óleo de palma (B) por lipase ligada ao micélio de <i>Mucor circinelloides</i>	69

Figura 5.10 - Perfil de ácidos graxos do soro de queijo e do óleo de palma antes e depois da hidrólise enzimática	70
Figura 5.11 - Hidrólise do soro de queijo em bateladas consecutivas com reciclo do biocatalisador.....	71
Figura 5.12 - Estabilidade operacional da lipase ligada ao micélio em reações de hidrólise do soro de queijo	71
Figura 5.13 - Aparato experimental na análise da atividade metanogênica específica.....	72
Figura 5.14 - Medição indireta do volume de gás metano produzido na digestão anaeróbia.....	73
Figura A. 1 - Crescimento de bactérias pela inoculação de diferentes soros em ágar batata dextrose (48 h)	85
Figura A. 2 - Gráficos de linearização dos parâmetros cinéticos para as lipases produzidas com meio contendo azeite de oliva (A) e meio com soro de queijo (B)	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Classificação dos dez maiores países produtores de leite no mundo em 2017	18
Tabela 3.2 - Condições ótimas para o metabolismo anaeróbio	26
Tabela 3.3 - Composição química e potencial de produção de metano de resíduos alimentícios	27
Tabela 3.4 - Estudos sobre o emprego de lipases em pré-tratamento de efluentes ricos em lipídios	33
Tabela 4.1 - Variáveis e níveis codificados e decodificados usados no planejamento experimental	39
Tabela 4.2 - Matriz ortogonal L9 de Taguchi	40
Tabela 4.3 - ANOVA para a análise de fatores genéricos	40
Tabela 4.4 - Composição dos meios de cultivo do fungo selecionado	41
Tabela 5.1 - Caracterização de amostras de soro de queijo	52
Tabela 5.2 - Principais cátions e ânions da amostra de soro de queijo filtrado	53
Tabela 5.3 - Atividade hidrolítica das lipases obtidas a partir do cultivo dos fungos selecionados	55
Tabela 5.4 - Planejamento experimental com variáveis independentes e dependentes	56
Tabela 5.5 - ANOVA para a variação da concentração de AGL(Var_{AGL}) na hidrólise do soro de queijo em 24 h.....	57
Tabela 5.6 - Produção de lipase do fungo <i>M. circinelloides</i> empregando diferentes meios de cultivo	60
Tabela 5.7 - Resultados do cultivo de <i>M. circinelloides</i> ao longo de sete dias nos meios A e B.....	61
Tabela 5.8 - Faixas de valores de pH para lipases de <i>M. circinelloides</i> cultivadas em diferentes meios de cultura	64
Tabela 5.9 - Faixas de temperatura de atuação das lipases de <i>M. circinelloides</i> cultivadas em diferentes meios	65
Tabela 5.10 - Constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima de reação (V_{max}) das lipases de <i>M. circinelloides</i> determinadas de acordo com o sistema gráfico de Lineweaver-Burk	66

Tabela 5.11 - Principais características das lipases do fungo <i>M. circinelloides</i> produzidas em azeite de oliva (lipase A) e soro de queijo (lipase B)	68
Tabela 5.12 - Parâmetros modificados do modelo de Gompertz dos ensaios de digestão anaeróbia do soro de queijo	74
Tabela A. 1 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 1 da matriz L9 de Taguchi)	87
Tabela A. 2 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 2 da matriz L9 de Taguchi)	87
Tabela A. 3 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 3 da matriz L9 de Taguchi)	88
Tabela A. 4 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 4 da matriz L9 de Taguchi)	88
Tabela A. 5 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 5 da matriz L9 de Taguchi)	89
Tabela A. 6 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 6 da matriz L9 de Taguchi)	89
Tabela A. 7 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 7 da matriz L9 de Taguchi)	90
Tabela A. 8 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 8 da matriz L9 de Taguchi)	90
Tabela A. 9 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 9 da matriz L9 de Taguchi)	91
Tabela A. 10 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento confirmatório da matriz L9 de Taguchi)	91
Tabela A. 11 - Volume deslocado acumulado nos ensaios de digestão anaeróbia do soro de queijo	93

LISTA DE SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AME	Atividade metanogênica específica
ANOVA	Análise de variância
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
GL	Graus de liberdade
PDA	Ágar dextrose de batata
SMQ	Soma média quadrática
SQ	Soma dos quadrados dos fatores
ST	Sólidos totais
STF	Sólidos totais fixos
STV	Sólidos totais voláteis
TCO	Taxa de carga orgânica
TKN	Nitrogênio total (método Kjeldahl)
TRH	Tempo de retenção hidráulica
Var_{AGL}	Variação da concentração de ácidos graxos livres

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Indústria de produtos lácteos.....	18
3.1.1	Produção de queijo e formação do soro de queijo	20
3.1.2	Soro de queijo e suas aplicações	21
3.2	Digestão anaeróbia para geração de biogás	24
3.2.1	Pré-tratamentos como etapa preliminar a digestão anaeróbia.....	28
3.3	Enzimas	29
3.3.1	Lipases.....	31
3.3.2	Fungos como produtores de lipases ligadas ao micélio.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	Materiais.....	36
4.1.1	Microrganismos	36
4.1.2	Substratos	36
4.1.3	Reagentes	37
4.2	Metodologia experimental.....	37
4.2.1	Cultivo submerso de fungos do gênero <i>Penicillium</i> e <i>Mucor</i> com lipase ligada ao micélio.....	37
4.2.2	Seleção das condições otimizadas para a reação de hidrólise do soro de queijo.....	38
4.2.3	Valorização do soro de queijo na produção de lipase ligada ao micélio por cultivo submerso do fungo selecionado	41
4.2.4	Determinação das propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase ligada ao micélio.....	42
4.2.5	Hidrólise de lipídios pelas células íntegras de <i>M. circinelloides</i> com atividade lipolítica	43
4.2.6	Estabilidade operacional da lipase ligada ao micélio do fungo <i>M. circinelloides</i>	44
4.2.7	Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia do soro de queijo	44
4.3	Métodos de análise	46
4.3.1	Determinação do pH.....	46

4.3.2	Quantificação da concentração óleos e gorduras	46
4.3.3	Quantificação do teor de ácidos graxos livres e índice de acidez	47
4.3.4	Quantificação do teor de sólidos totais, sólidos totais fixos e sólidos totais voláteis	47
4.3.5	Determinação do índice de saponificação	48
4.3.6	Análise da composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa	49
4.3.7	Quantificação da demanda química de oxigênio (DQO)	49
4.3.8	Análise da composição em cátions e ânions	50
4.3.9	Determinação da atividade hidrolítica da lipase	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Caracterização físico-química do soro de queijo	52
5.2	Seleção da linhagem de fungo produtora de lipase e estabelecimento das condições de hidrólise	54
5.2.1	Ensaio para a confirmação dos parâmetros da hidrólise	58
5.3	Produção de lipase ligada ao micélio do fungo <i>M. circinelloides</i> com atividade hidrolítica	59
5.3.1	Avaliação da composição do meio de cultivo para produção de lipase ligada ao micélio do fungo <i>M. circinelloides</i>	59
5.3.2	Estabelecimento do tempo de cultivo ótimo de <i>M. circinelloides</i> para a produção da lipase ligada ao micélio	61
5.4	Determinação das propriedades bioquímicas e cinéticas das lipases	63
5.4.1	Determinação do pH ótimo da atuação das lipases	63
5.4.2	Determinação da temperatura ótima de atuação das lipases	64
5.4.3	Parâmetros cinéticos das lipases de <i>M. circinelloides</i>	65
5.4.4	Estabilidade das lipases ligadas ao micélio à estocagem	67
5.5	Aplicações biotecnológicas do soro de queijo empregando lipase ligada ao micélio produzida com soro integral	68
5.5.1	Hidrólise de substratos lipídicos	68
5.5.1.1	Estabilidade operacional da lipase ligada ao micélio do fungo <i>M. circinelloides</i>	70
5.5.2	Potencial de biodegradabilidade do soro de queijo por digestão anaeróbia... ..	72
6	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

APÊNDICE A: Avaliação da flora microbiana do soro de queijo.....	85
APÊNDICE B: Seleção das melhores condições de hidrólise pelo método de Taguchi.....	87
APÊNDICE C: Modelo de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da lipase de <i>M. circinelloides</i>	92
APÊNDICE D: Potencial de geração de biogás quantificado pela atividade metanogênica específica	93

1 INTRODUÇÃO

O soro de queijo, apesar de apresentar elevado valor nutricional, possui substancial potencial de poluição quando considerado como rejeito, com demanda bioquímica de oxigênio (DBO) cerca de 175 vezes maior que efluentes domésticos. Deste modo, os governos e as agências reguladoras passaram a restringir ou proibir o descarte do soro não tratado. A pressão popular também contribuiu para que a indústria de produtos lácteos repensasse a gestão do elevado e crescente volume de produção de soro de queijo (SMITHERS, 2008).

O volume de produção deste subproduto também é preocupante, uma vez que 90% do leite usado na produção de queijo é retido na fração do soro de queijo. Somente no Brasil em 2017, foram produzidos 9 bilhões de litros de soro (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2018). Metade da produção de soro é tratada e transformada em outros produtos, seja na sua forma líquida, em pó, de lactose isolada, dos subprodutos da remoção de lactose, ou na proteína concentrada de soro de queijo (SISO, 1996; PANESAR *et al.*, 2007).

Um dos possíveis destinos para o soro de queijo é o seu tratamento biológico com agregação de valor, incluindo produção de biogás, enzimas, etanol, ácidos orgânicos, entre outros (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). A produção de biogás por digestão anaeróbia é uma tecnologia de custo relativamente baixo, além de produzir energia é benéfica por minimizar a poluição dos resíduos gerados e degradar vários tipos de resíduos orgânicos. A digestão anaeróbia pode ser dividida em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (JHA; SCHMIDT, 2017), entre as quais a hidrólise dos lipídios é considerada a etapa limitante do processo. Desta forma, podem ser utilizados pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos com a finalidade de reduzir o tempo da hidrólise, e aumentar, conseqüentemente, a cinética de produção de metano e produtividade do biogás (ZHANG; HU; LEE, 2016). O pré-tratamento biológico ou enzimático apresenta vantagens, tais como especificidade deste tipo de catalisador, que permite controlar a formação dos produtos, levando ao aumento dos rendimentos pela ausência de subprodutos, além de utilizar condições moderadas de operação, com redução do custo em termos de energia e de equipamentos, tornando este processo atrativo sob o ponto de vista ambiental. Entre as principais enzimas utilizadas no pré-tratamento enzimático, destacam-se as lipases, que apresentam

desempenho comprovado no pré-tratamento de resíduos com altos teores de lipídios para digestão anaeróbica de diversos setores de processamento de alimentos (MENG *et al.*, 2017). Apesar das inúmeras vantagens sobre os processos físico-químicos convencionais, a aplicação desta tecnologia em larga escala ainda está intimamente ligada ao custo de implantação e de operação, tendo em vista que o uso de enzimas comerciais para este fim ainda se faz inviável em algumas escalas industriais, em função do alto custo de produção de enzimas extracelulares por fermentação submersa, que exige processos de extração e purificação também onerosos (LI; ZONG, 2010).

Nesse aspecto, o emprego de células íntegras com elevada atividade de lipase ligada ao micélio, é uma tecnologia atrativa, pois permite a aplicação direta do biocatalisador no tratamento de resíduos, sem a necessidade de extração e purificação prévia da enzima (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017). No que se refere ao estado da arte, ainda são escassos os relatos referentes ao emprego de células íntegras contendo elevada atividade lipolítica auxiliando processos de digestão anaeróbia. Recentemente, Alves *et al.* (2019) reportaram resultados promissores na degradação de lipídios contidos em efluentes gerados em indústrias de produtos lácteos usando lipase ligada ao micélio do fungo *Penicillium citrinium*. Tais resultados motivaram o desenvolvimento do presente estudo, tendo em vista que o grupo de pesquisa do Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena apresenta vasta experiência na obtenção de lipases ligadas ao micélio a partir de fungos filamentosos para mediar reações de modificação de óleos e gorduras (ANDRADE *et al.*, 2014; MAROTTI *et al.*, 2017).

Desta forma, para execução do presente estudo foram selecionados três fungos filamentosos, *Penicillium italicum* AT4421, *Penicillium janthinellum* CCT3162 e *Mucor circinelloides* URM 4182, previamente reconhecidos como bons produtores de lipase ligada ao micélio, para a hidrólise catalisada do soro de queijo visando sua posterior utilização na geração de metano. A fonte de lipase mais promissora foi também cultivada em soro de queijo visando reduzir custos de produção da enzima, sendo ainda determinadas as propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase obtida em meio de cultivo de baixo custo.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar opções de valorização do soro de queijo. Para tanto, o soro de queijo foi utilizado como meio de cultivo para obtenção de lipase ligada ao micélio e como substrato para produção de biogás por digestão anaeróbia. Para a execução deste projeto foram empregados fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium* e *Mucor* e as seguintes atividades foram realizadas:

- ✓ Coleta e caracterização físico-química de soro de queijo quanto aos parâmetros de interesse do projeto;
- ✓ Obtenção das preparações de lipases ligadas ao micélio por meio do cultivo de linhagens selecionadas dos fungos dos gêneros *Penicillium* e *Mucor*;
- ✓ Determinação das condições otimizadas da hidrólise enzimática dos lipídios presentes no soro quanto aos principais parâmetros (linhagem do fungo, carregamento enzimático, temperatura e pH), visando maximizar o grau de hidrólise dos lipídios;
- ✓ Avaliação do soro de queijo como substrato para o cultivo do fungo selecionado e caracterização da lipase gerada;
- ✓ Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia do soro de queijo tratado com a lipase ligada ao micélio do fungo selecionado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Indústria de produtos lácteos

A indústria de produtos lácteos tem importância mundial por sua contribuição essencial na nutrição humana e seu impacto econômico. As melhorias no campo da ciência veterinária promoveram aumento contínuo na produção de leite por cabeça de gado, levando à ampliação substancial na oferta e demanda de leite e produtos lácteos em muitos países (ADULKAR; RATHOD, 2014). Segundo estimativas, é esperado que até 2024, haja um aumento de cerca de 36% em relação a produção de 2014, alcançando um excedente de 710 milhões de toneladas equivalente em leite líquido (TETRA PAK DAIRY INDEX, 2014). O Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo, conforme observado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Classificação dos dez maiores países produtores de leite no mundo em 2017

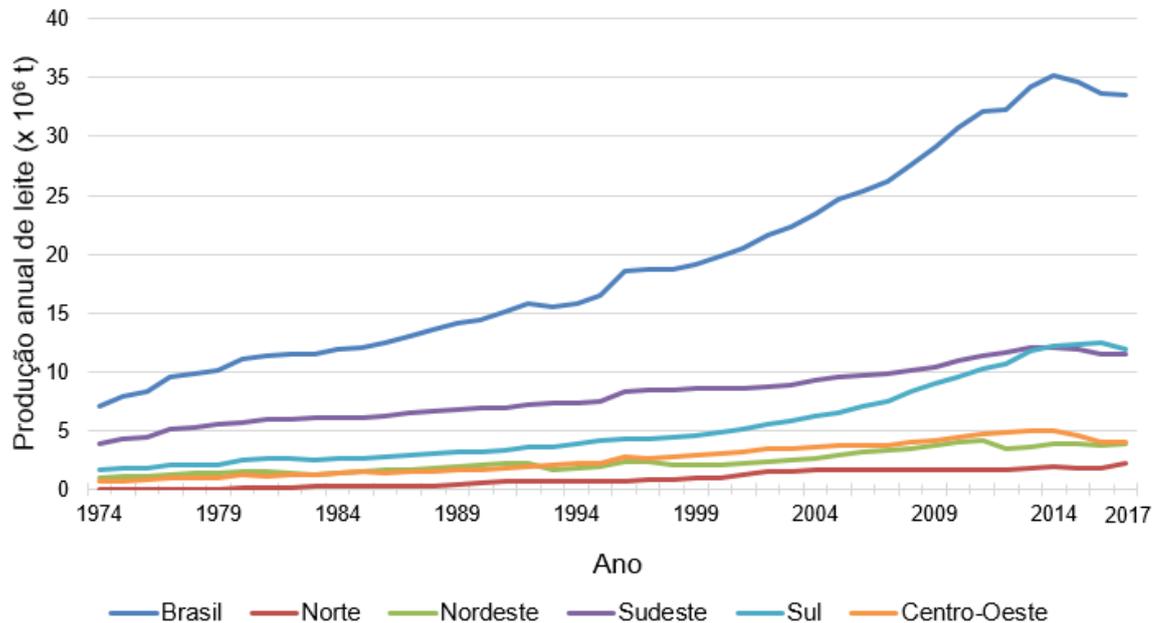
Classificação	País	Produção (10 ⁶ t)	Produtividade por animal (t / ano)
1º	Índia	176,27	1,27
2º	EUA	97,76	10,18
3º	Paquistão	44,29	1,23
4º	China	34,87	0,58
5º	Brasil	33,74	1,56
6º	Alemanha	32,69	7,71
7º	Rússia	31,18	2,69
8º	Nova Zelândia	21,37	4,24
9º	Turquia	20,70	0,73
10º	Holanda	14,54	7,23

Fonte: adaptado de FAO (2018).

Atualmente, o Brasil tem uma produção superior a 33 bilhões de litros de leite por ano. A produção do país e das regiões pode ser observada na Figura 3.1, com destaque para a produção da região sudeste (especialmente Minas Gerais), tradicional produtora de leite, bem como para região sul que vêm ganhando espaço

na pecuária leiteira pela produtividade do seu rebanho, alcançando 3.048 litros de leite por animal contra 1.781 da região sudeste em 2017 (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2018).

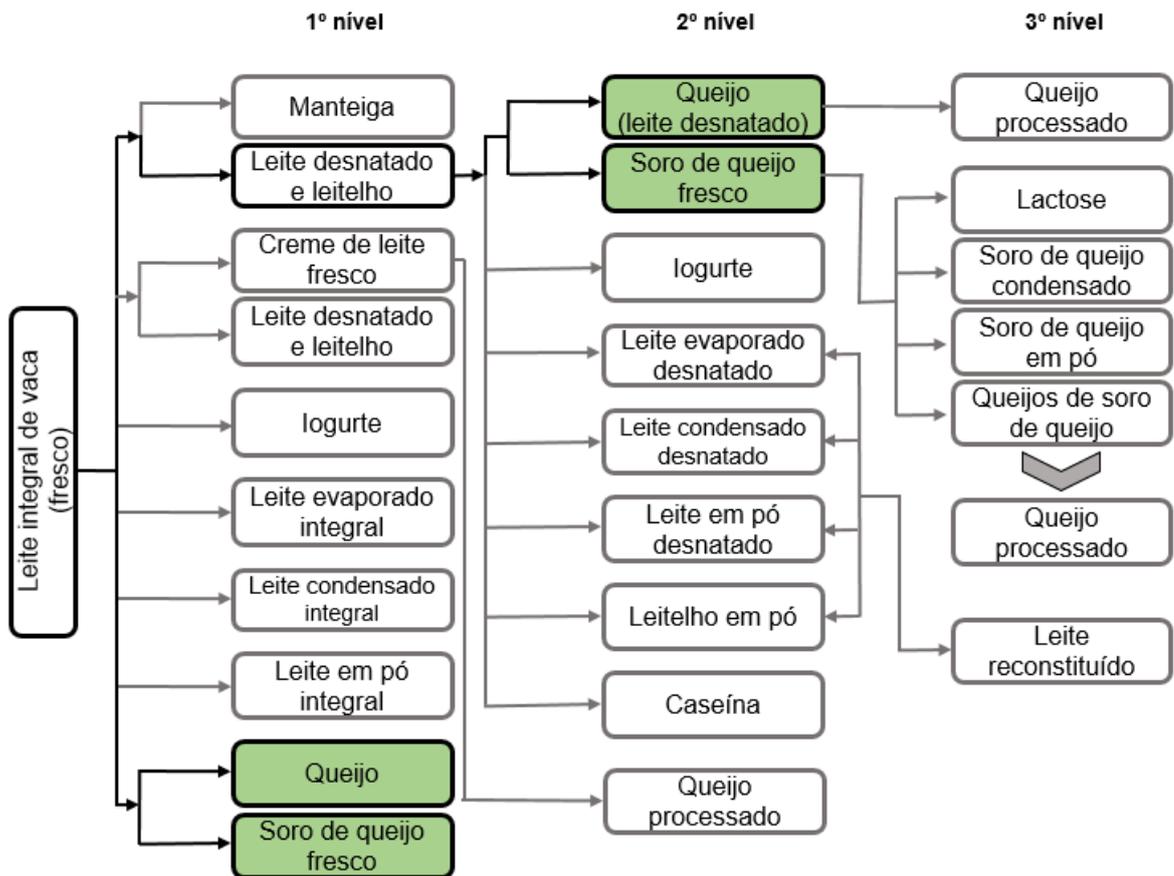
Figura 3.1 - Produção de leite no Brasil por região entre 1974 e 2017



Fonte: adaptado de IBGE (2018).

Inicialmente, os produtos lácteos eram produzidos somente com intuito de conservar as propriedades nutritivas do leite coletado em épocas de abundância. Além disso, esses produtos são mais fáceis de serem transportados, possuem maior tempo de prateleira que o leite líquido, e também são alternativas para diversificação de dietas, podendo ser customizados, conforme a demanda (FAO, 2013). A Figura 3.2 ilustra a árvore de *commodities* lácteos partindo do leite de vaca, mostrando, até o terceiro nível de seus derivados (FAO, 2013). Produtos lácteos incluem manteigas, produtos concentrados (como leite evaporado e leite condensado), produtos fermentados (iogurte, leite fermentado, quefir, coalhada, queijos, etc.), entre outros (FAO, 2013). Neste estudo, o queijo será destacado devido a sua conexão com o objeto deste estudo, o soro de queijo.

Figura 3.2 - Árvore de commodities do setor de produtos lácteos



Fonte: adaptado de FAO (2013).

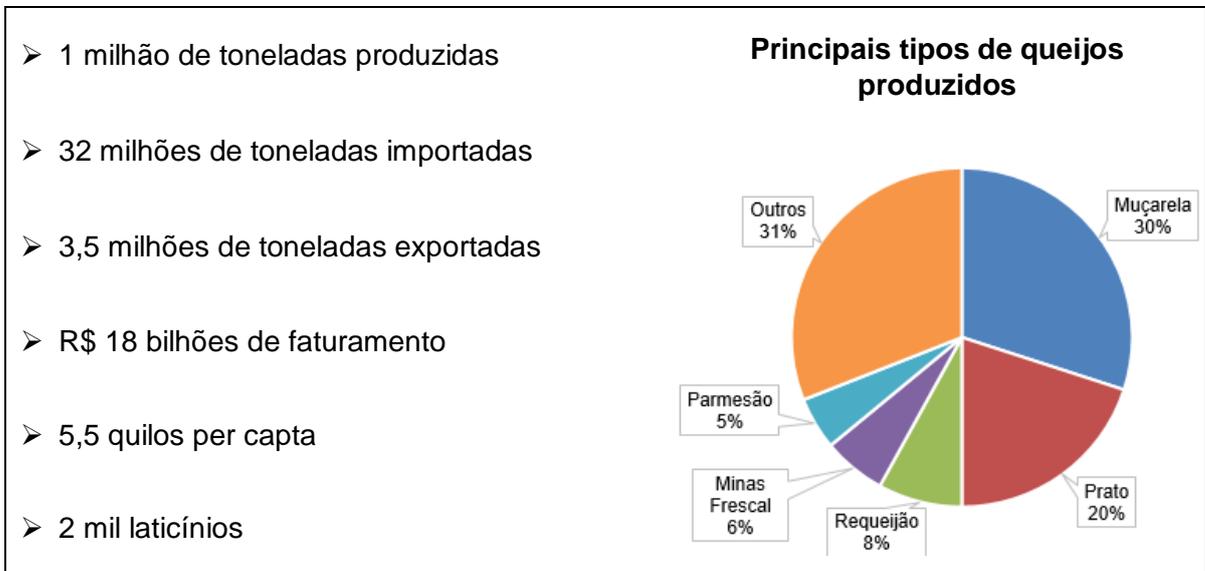
3.1.1 Produção de queijo e formação do soro de queijo

Os queijos são um grupo de derivados lácteos fabricados pela fermentação do leite, que possuem uma grande variedade de formas, sabores e aromas. O processo de produção de queijos consiste na coagulação do leite, separando-o em uma dispersão coloidal (caseína e fosfato de cálcio) com uma emulsão (gordura do leite) e uma fase solúvel contendo lactose e minerais, que é retirada na forma de soro, correspondendo cerca a de 90% do volume de leite utilizado. A concepção inicial da produção de queijos era conservar os principais nutrientes do leite, mas sua evolução os levaram ao patamar de iguarias culinárias com qualidades específicas, além de serem altamente nutritivos. Sugere-se que há mais de 500 variedades de queijos (FOX; MCSWEENEY, 2017; MASOTTI *et al.*, 2017).

A Figura 3.3 apresenta alguns dados da produção de queijos em 2017, no Brasil, destacando que para cada três litros de leite, um litro é destinado a produção de 70 tipos de queijos. Em 2017, foram gerados um milhão de toneladas destes

produtos, sendo previsto um crescimento de 4% em 2018 (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2018).

Figura 3.3 - Dados sobre a produção de queijos no Brasil em 2017



Fonte: adaptado de Embrapa Gado de Leite (2018).

3.1.2 Soro de queijo e suas aplicações

O líquido gerado durante a produção de queijo (ou da caseína) é denominado soro de queijo. De acordo com o tipo de queijo e as enzimas utilizadas na produção, o soro de queijo gerado pode ser classificado em doce ou ácido (BOŽANIĆ; BARUKČIĆ; LISAK, 2014). Suas características variam de acordo com o tipo do leite (vaca, cabra, etc.), alimentação do animal, método de processamento utilizado, época do ano e estágio da lactação (GANJU; GOGATE, 2017), mas geralmente é composto por água, lactose (45 a 50 g L⁻¹), proteínas solúveis (6 a 8 g L⁻¹), lipídios (4 a 5 g L⁻¹) e sais minerais (8 a 10% dos sólidos). Possui elevada carga orgânica (da ordem de 68 a 94 g L⁻¹ de DQO ou demanda química de oxigênio) e entre 45 e 65 g de sólidos voláteis por quilo de soro (ESCALANTE *et al.*, 2018).

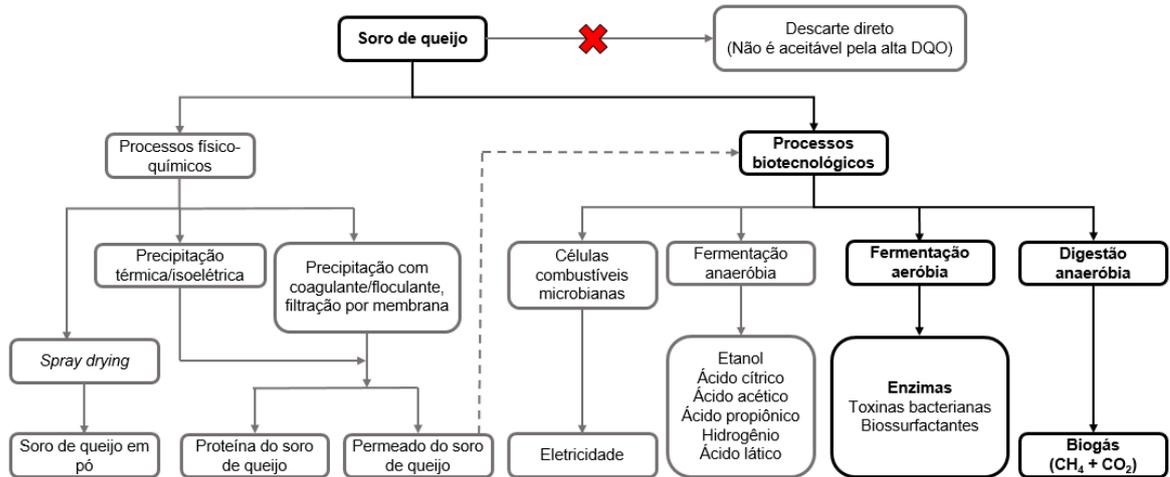
O soro de queijo corresponde de 85 a 95% do volume de leite utilizado na produção de queijo e contém cerca de 55% dos nutrientes presentes no leite. Metade da produção de soro de queijo é tratada e transformada em outros produtos, seja na sua forma líquida, em pó, de lactose isolada, dos subprodutos da remoção de lactose, ou na proteína concentrada de soro de queijo (SISO, 1996;

PANESAR *et al.*, 2007). O elevado potencial de poluição do soro, com DBO cerca de 175 vezes maior que o de efluentes domésticos, ocasionou restrições ou proibições de descarte de soro não tratado pelas agências reguladoras. A pressão popular também contribuiu para que a indústria de produtos lácteos repensasse a gestão do elevado e crescente volume de produção de soro de queijo (SMITHERS, 2008).

O soro de queijo pode ser aplicado diretamente, seja na complementação alimentar ou como fertilizante para a agricultura, embora seu uso seja restrito pela elevada quantidade de lactose e minerais. O gerenciamento dos resíduos provenientes da produção de queijo pode ser direcionado ao desenvolvimento de tecnologias de valorização (recuperação de compostos como lactose e proteínas), aos tratamentos biológicos, acarretando a obtenção de produtos de maior valor agregado (ácidos orgânicos, etanol, hidrogênio, biogás, etc.) ou aos processos físico-químicos (coagulação/floculação, ozonização, Fenton, entre outros), visando a redução da carga orgânica (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

Algumas aplicações físico-químicas e biotecnológicas do soro de queijo são descritas por Prazeres, Carvalho e Rivas (2012) e estão ilustradas na Figura 3.4. O soro de queijo pode passar pelo processo de secagem, com o intuito de preservar suas características por mais tempo. Na produção do soro de queijo em pó, o processo de remoção de água mais utilizado é o *spray drying* (DA SILVA *et al.*, 2018). Assim, o soro de queijo em pó pode ser transportado com maior facilidade e, em pequenas quantidades, empregado na formulação de produtos como sorvetes, pães, doces, molhos e produtos lácteos (CHATZIPASCHALI; STAMATIS, 2012). Pequenas plantas de produção de queijo, isto é, aquelas que processam até 100 toneladas de leite diariamente, dificilmente conseguem justificar o investimento em equipamentos de remoção de água (PETERS, 2005), o que abre o caminho para tecnologias de menor custo.

Figura 3.4 - Aplicação do soro de queijo por métodos físico-químicos e biotecnológicos com ênfase nos processos de produção de enzimas e biogás



Fonte: adaptado de Yadav *et al.* (2015).

O soro de queijo e seus derivados também são empregados como substratos na produção de enzimas. A enzima mais produzida a partir do soro de queijo é a lactase, mas podem ser produzidas outras enzimas como amilases e proteases (TAVARES; MALCATA, 2015).

Ademais, vários processos biotecnológicos podem ser aplicados, incluindo a fermentação aeróbia e anaeróbia de células de combustível microbianas. Ácidos orgânicos como o ácido acético, propanóico, láctico e cítrico podem ser produzidos por meio da fermentação anaeróbia do soro de queijo. Esses ácidos são matérias-primas de produtos que variam desde bioplásticos até herbicidas. Fontes de energia como o etanol, biogás e hidrogênio podem ser também produzidas a partir do soro de queijo e de seus subprodutos, com baixo dano ambiental, ampliando sua competitividade frente a combustíveis como a gasolina (YADAV *et al.*, 2015).

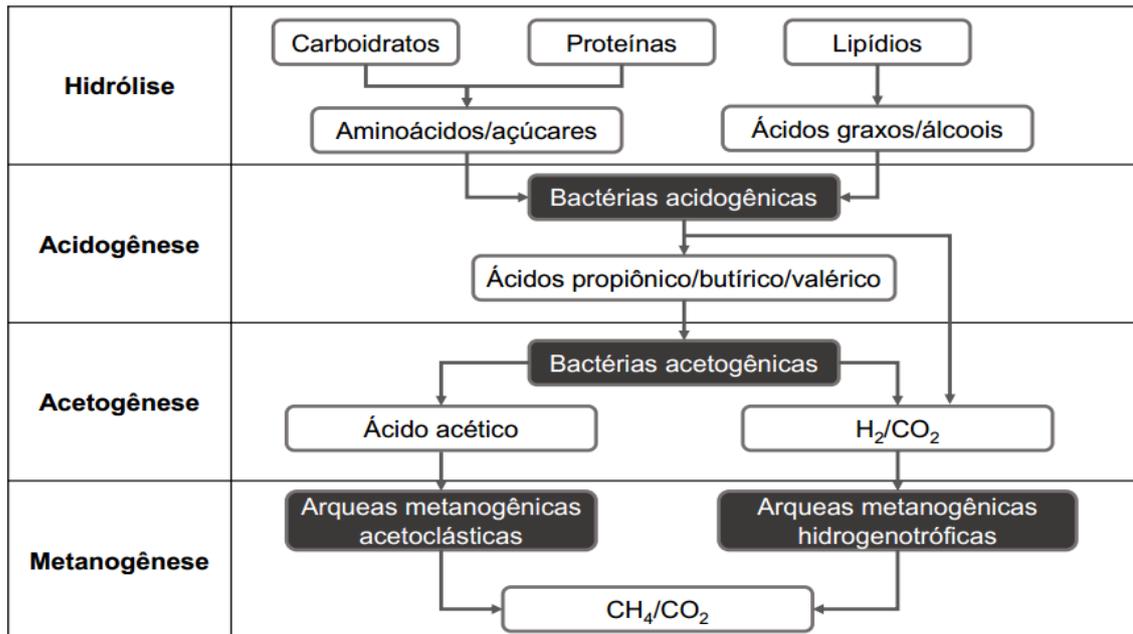
O biogás compete com combustíveis derivados do petróleo em termos de desempenho e custo, mas possui benefícios como a redução da emissão de gases de efeito estufa. Entretanto, são necessários investimentos para apoiar a pesquisa e desenvolvimento na área das energias renováveis, ampliando a sua competitividade frente às energias de fontes não renováveis (TAVARES; MALCATA, 2015). Neste estudo será dada ênfase na geração de biogás por digestão anaeróbia e na produção de lipases ligadas ao micélio por cultivo submerso de fungos filamentosos.

3.2 Digestão anaeróbia para geração de biogás

A digestão anaeróbia é o processo de decomposição microbiana da matéria orgânica em ambiente isento de oxigênio, gerando biogás (composto principalmente por CH₄, CO₂ e outros gases em pequenas quantidades) e matéria não digerida estabilizada (digestato). Esse processo ocorre de forma espontânea em aterros, pântanos e no estômago de ruminantes (NIZAMI, 2012). A digestão anaeróbia tem potencial de ser aplicada a vários tipos de substâncias biodegradáveis, como resíduos orgânicos municipais, industriais, da agricultura e de processamento alimentício (GIROTTI; ALIBARDI; COSSU, 2015). Além de produzir gás metano (que pode ser convertido em energia), também se estuda o potencial da digestão anaeróbia na produção biológica de hidrogênio, combustível de alto interesse industrial (GUO *et al.*, 2010). O digestato, que é a matéria não digerida, pode ser usado como fertilizante ou na produção de biocarvão (INYANG *et al.*, 2010).

Essa tecnologia está presente majoritariamente nos Estados Unidos e Europa, por sua alta capacidade de estabilização dos resíduos orgânicos, mas o maior número de digestores está situado na Ásia pela dificuldade de obtenção de energia de baixo custo nesse país. O uso de biodigestores normalmente está associado a regulamentações ou incentivos governamentais (VASCO-CORREA *et al.*, 2018).

A digestão anaeróbia é um processo complexo que consiste principalmente em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, conforme mostrado na Figura 3.5. Na hidrólise, os fungos ou bactérias decompõem as macromoléculas de proteínas, carboidratos e gorduras em monômeros com açúcares, ácidos graxos de cadeia longa e aminoácidos. A hidrólise é considerada a etapa limitante no processo de digestão anaeróbia pela formação de subprodutos tóxicos (compostos heterocíclicos complexos) ou ácidos graxos voláteis indesejáveis (REN *et al.*, 2018). Na acidogênese, ocorre a transformação dos açúcares e outros monômeros orgânicos obtidos na hidrólise em ácidos orgânicos, álcoois, dióxido de carbono, hidrogênio e amônia por bactérias fermentativas. Na acetogênese acontece a conversão dos ácidos graxos voláteis e ácidos dicarboxílicos em acetato e a última etapa consiste em transformar esses produtos em gás metano (KHANAL, 2009).

Figura 3.5 - Principais etapas envolvidas no processo de digestão anaeróbica

Fonte: adaptado de Streitwieser (2017).

Apesar da digestão anaeróbica ser um processo consolidado e que permite trabalhar com vários de substratos, alguns parâmetros devem ser observados e controlados com cuidado, como relação carbono/nitrogênio, produção de ácidos graxos voláteis, variação de pH, concentração de nutrientes na operação estável de reatores (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014). Algumas das condições ótimas para a manutenção de processos de digestão anaeróbia estão descritas na Tabela 3.2. A temperatura é um dos parâmetros mais importantes na digestão porque, além de influenciar na atividade das enzimas, também afeta a produtividade de metano e a qualidade do digestato. Desta forma, normalmente se utilizam condições mesofílicas (30 a 40 °C) ou termofílicas (50 a 60 °C) (ZHANG *et al.*, 2014). Condições termofílicas poderiam proporcionar taxas mais elevadas de metabolismo e produção de biogás, bem como maior degradação de substâncias patogênicas (SASSI *et al.*, 2018). Algumas das vantagens de se trabalhar em condições mesofílicas incluem a obtenção de um sistema termicamente robusto e resistente a materiais tóxicos e inibidores (XIAO *et al.*, 2018), maior população microbiana beneficiando a degradação de mais tipos de matéria orgânica, a solubilização de efluentes pode ser mais alta que nos sistemas termofílicos, além

de temperaturas mais amenas necessitarem menor investimento energético (KIM, M.S.; KIM, D.H.; YUN, 2017).

Tabela 3.2 - Condições ótimas para o metabolismo anaeróbio

Parâmetros	Condições ótimas
Temperatura	Faixa mesofílica (35 a 40 °C) Faixa termofílica(50 a 65 °C)
pH	6,3 a 7,8
Razão Carbono/Nitrogênio	25 a 30
Ácidos graxos voláteis	2000 a 3000 mg L ⁻¹
Taxa de carga orgânica (TCO) e concentração de nutrientes	Varia de acordo com o substrato e inóculo.

Fonte: adaptado de Kondusamy e Kalamdhad (2014).

As deficiências no uso de biodigestores se dão principalmente pela falta de conhecimento do seu funcionamento, sendo uma das desvantagens desse processo a sensibilidade com relação à presença de componentes inibidores se comparado aos processos aeróbios. Os microrganismos atuantes na etapa metanogênica costumam ser mais vulneráveis à presença de substâncias inibidoras que as espécies responsáveis pelas outras etapas (JHA; SCHMIDT, 2017).

A complexidade decorrente da vasta gama de microrganismos na digestão anaeróbia torna necessário o uso de condições que sejam adequadas para todas as etapas da digestão. Esses microrganismos podem ser sensíveis a parâmetros como pH, temperatura, presença de íons minerais (especialmente metais pesados), detergentes e amônia livre em elevadas concentrações, entre outros (ABBASI, T.; TAUSEEF; ABBASI, S.A., 2012; AMHA *et al.*, 2018).

Composição e produção de metano para diversos tipos de águas residuárias de indústrias alimentícias são apresentados na Tabela 3.3. Teoricamente os resíduos ricos em lipídios possuem elevado potencial para produção de metano, de até 1,01 m³/kgSTV, o que é muito maior que o valor para carboidratos (por exemplo 0,37 m³/kgSTV de glicose) e proteínas (0,74 m³/kgSTV). Entretanto, os carboidratos são rapidamente hidrolisados, enquanto os lipídios têm baixa velocidade de conversão (XU *et al.*, 2017).

Tabela 3.3 - Composição química e potencial de produção de metano de resíduos alimentícios

Tipo	ST %	STV/ST (%)	Razão C/N	pH	Carboidratos (% dos ST)	Proteínas (% dos ST)	Lipídios (% dos TS)	Metano (m³/kgSTV_{adicionado})
Resíduos de frutas e vegetais	7,4–17,9	83,4–95,3	15,2–18,9	3,7–4,2	–	10,5–17,8	0,8–5,2	0,16–0,35
Efluentes de matadouro	2,0–28,3	82,7–93,6	3–6	–	0–27,7	2,0–38,9	1–40,5	0,20–0,50
Efluentes de cervejaria	23,0–29,2	87,6–97	18,8–54,9	6,9	–	23,0–32,0	5,7–10,6	0,22–0,31
Efluentes de ração animal	86–93	74,6–94,5	10–25	–	–	6,0–34,5	1,0–30,8	0,15–0,50
Óleos e gorduras	1,3–3,2	86,0–93,9	22,1	4,2–4,8	0,8	10,2	75,4–100	0,4–1,1
Resíduos domésticos e de restaurantes	4,0–41,5	88,7–95,1	11,4–36,4	3,3–5,7	3,3–59,0	1,4–22,8	4,0–41,5	0,46–0,53
Efluentes de produtos lácteos	0,1–7	–	11,4–13,6	6–11	3–43,8	1,4–33,5	0,1–11,6	0,1–0,85
Soro de queijo	91,3	79,5	-	6,9	60,2	16,0	9,5	0,41

Legenda: ST (sólidos totais); STV (sólidos voláteis).

Fonte: adaptado de Escalante-Hernández *et al.* (2017) e Xu *et al.* (2017).

3.2.1 Pré-tratamentos como etapa preliminar a digestão anaeróbia

Nas últimas décadas, o tratamento anaeróbio empregando reatores tem se tornado mais atrativo em relação aos processos aeróbios tradicionais, devido à produção de biogás, menor geração de biomassa, menor área requerida e menor demanda energética. Entretanto, a grande quantidade de lipídios prejudica o tratamento anaeróbio devido à flotação de camadas de espuma na superfície dos reatores, levando ao entupimento e à geração de odores desagradáveis (MENDES; PEREIRA; DE CASTRO, 2006).

Considerando que a hidrólise normalmente é a etapa limitante da digestão anaeróbia, é possível agregar uma etapa anterior ao tratamento anaeróbio, que consiste em usar métodos físicos, químicos e/ou biológicos com a finalidade de reduzir o tempo da hidrólise e aumentar a produção de metano e produtividade do biogás (ZHANG; HU; LEE, 2016). Os pré-tratamentos podem ser físicos (mecânicos e térmicos), químicos ou biológicos.

O pré-tratamento mecânico, por exemplo, pode reduzir o tamanho das partículas aumentando a biodegradabilidade (por maior superfície de contato) e romper as células dos microrganismos para liberar o acesso das enzimas intracelulares, reduzindo assim o tempo de hidrólise e, portanto, o tempo total de reação (RUFFINO *et al.*, 2015). O pré-tratamento térmico tem como objetivo, dentre outras finalidades, favorecer a solubilidade de carboidratos e proteínas, aumentando a degradabilidade do substrato e, conseqüentemente, a produtividade de biogás (BOUGRIER; DELGENÈS; CARRÈRE, 2008).

Pré-tratamentos químicos utilizam reagentes que aumentam a disponibilidade da matéria orgânica para as reações enzimáticas, entretanto, alguns compostos solubilizados podem induzir a formação de subprodutos potencialmente tóxicos na etapa de metanogênese (CARRERE *et al.*, 2016). A maior parte dos reagentes utilizados são ácidos, bases e oxidantes. Ácidos e bases se mostram eficientes na solubilização da matéria orgânica e são vantajosos pela simplicidade de operação e equipamentos simples, alta conversão em metano e baixo custo comparado com outros pré-tratamentos químicos (PAUDEL *et al.*, 2017). Normalmente são utilizados ácidos clorídrico, sulfúrico, fosfórico e nítrico e hidróxidos de sódio, potássio, cálcio, magnésio e cal (ZHEN *et al.*, 2017). Pré-

tratamentos oxidativos podem envolver a utilização de oxigênio a altas temperaturas e pressões (cerca de 260 °C e 10 MPa). Entretanto, o odor, a corrosão e o alto consumo de energia restringem o uso dessas práticas. Alternativamente, podem ser aplicados oxidantes como ozônio e peróxidos (HARRIS; MCCABE, 2015). Apesar dos pré-tratamentos químicos levarem ao aumento da produção de biogás, envolvem o risco de contaminação química e de formação de compostos recalcitrantes, além do custo dos reagentes (CARRERE *et al.*, 2016).

Os pré-tratamentos enzimáticos utilizam enzimas, que são catalisadores altamente seletivos e trabalham em condições brandas de temperatura e pressão (pressão atmosférica e temperaturas de 30 a 70 °C) (DE CASTRO *et al.*, 2004). Esses pré-tratamentos são ambientalmente amigáveis, requerem pouco consumo energético, não apresentam problemas de corrosão e geram poucos subprodutos (CÓRDOVA *et al.*, 2018). Neste estudo foi avaliado o tratamento enzimático do soro de queijo, visando degradar a gordura presente, como etapa prévia ou simultânea da digestão anaeróbica.

3.3 Enzimas

Enzimas são catalisadores altamente específicos, essenciais para o suporte da vida. Usualmente requerem condições brandas de temperatura e pH e são alternativas para catalisadores químicos perigosos, por sua natureza biodegradável e não tóxica. No entanto, enzimas são moléculas de estrutura complexa, com difícil e custosa produção e purificação, o que pode desencorajar o seu uso (SINGH *et al.*, 2016). A atividade enzimática é a habilidade da enzima em catalisar reações químicas e é totalmente dependente da sua estrutura molecular. A perda de atividade da enzima devido a fatores externos é chamada de desnaturação e acontece quando a enzima é submetida a condições adversas de temperatura, pH, solventes, presença de metais pesados, agentes complexantes, entre outros (ILLANES, 2008).

Enzimas são utilizadas industrialmente para a produção de detergentes e produtos têxteis, nas indústrias de papel e celulose, em sínteses orgânicas, no tratamento de efluentes, na produção de biocombustíveis, etc. O mercado global

de enzimas foi estimado em 4,2 bilhões de dólares em 2014, podendo alcançar 6,2 bilhões de dólares até 2020 (SINGH *et al.*, 2016). As enzimas podem ser divididas em seis classes:

1. Oxidorredutases: enzimas que catalisam reações de oxidação/redução envolvendo a transferência de elétrons, átomos de hidrogênio ou oxigênio. Requerem coenzimas e normalmente são intracelulares.
2. Transferases: catalisam a transferência do grupo funcional de um doador para um acceptor adequado. Também requerem coenzima e são intracelulares.
3. Hidrolases: atuam como catalisadores em reações de hidrólise, ou seja, rompimento de ligações químicas sob a ação da água. A maior parte das enzimas com importância tecnológica pertence a esse grupo. A maior parte das hidrolases não requer a presença de coenzimas, muitas são extracelulares e robustas o suficiente para resistirem a condições severas. Sob condições específicas as hidrolases podem catalisar reações reversas de formação de ligações químicas com eliminação de água.
4. Liases: enzimas que catalisam reações não hidrolítica e não oxidativas de rompimento de ligações químicas. Também podem atuar na reação reversa (síntese).
5. Isomerases: catalisam reações de conversão do substrato em isômero, ou seja, substância com o mesmo número e tipo de átomos. A maior parte das isomerases é intracelular e algumas delas requerem cofatores, mas não coenzimas.
6. Ligases: enzimas que catalisam reações de ligação covalente entre duas moléculas. São moléculas mais complexas que requerem coenzimas e são intracelulares

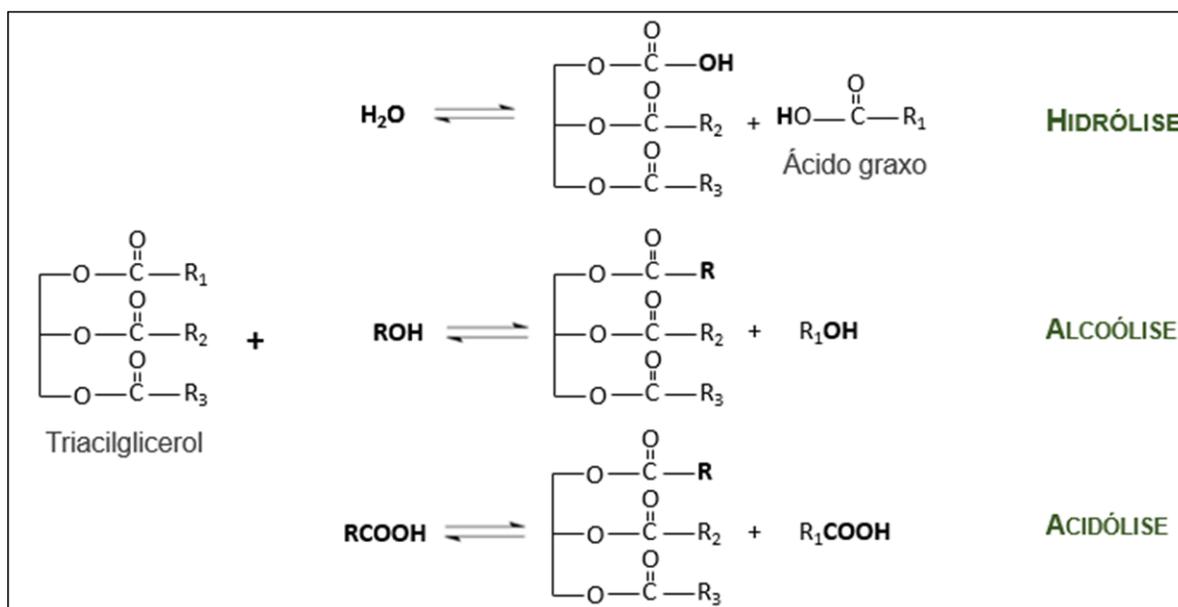
Entre as seis classes de enzimas, as hidrolases possuem maior relevância tecnológica, ocupando quase 75% do mercado de enzimas industriais, por serem robustas, possuírem mecanismo cinético relativamente simples, não requererem coenzimas e por muitas delas serem extracelulares, facilitando o seu uso em processos que requerem enzimas purificadas. Carbohidrases, proteases e lipases pertencem ao grupo das hidrolases e dominam o mercado de enzimas, sendo

responsáveis por mais de 70% de todo faturamento (LI *et al.*, 2012). As enzimas empregadas neste estudo são as lipases, que serão discutidas no item 3.3.1.

3.3.1 Lipases

Lipases (glicerol éster hidrolases – EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam preferencialmente a hidrólise de triacilgliceróis na interface óleo/água. Estas enzimas podem ser encontradas em vários organismos unicelulares e multicelulares, como em bactérias (45%), fungos (21%), animais (18%), plantas (11%) e algas (3%) (SETH *et al.*, 2014). As lipases têm capacidade de atuar em múltiplos tipos de reação, como na hidrólise, na acidólise e na alcoólise, ilustradas na Figura 3.6. Especialmente as lipases produzidas por microrganismos, têm alto interesse industrial por sua facilidade de produção (GUPTA *et al.*, 2015). Podem ter propriedades distintas dependendo da sua origem, com massa molecular entre 19 e 75 kDa, apresentar atividade desde à temperatura ambiente até 70 °C e em pH variando de 4,0 a 9,0 (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017).

Figura 3.6 - Exemplos de reações catalisadas por lipases



Fonte: adaptado de Kapoor e Gupta (2012).

As lipases podem possuir regio, quimio e estereoespecificidade com relação ao substrato. A regioespecificidade (relacionada a posição) é a capacidade da lipase de distinguir entre posições de ácidos graxos dentro de triacilgliceróis; a

quimioespecificidade, é uma característica de lipases que possuem preferência por ácidos graxos com composições químicas específicas; e a estereoespecificidade é a habilidade das lipases diferenciarem enantiômeros em uma mistura racêmica (KAPOOR; GUPTA, 2012; CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017).

Reações catalisadas por lipases possuem diversas aplicações, entre quais podem ser destacadas na confecção de biossensores, formulação de detergentes, síntese de emulsificantes e biodiesel; remoção da gordura do couro, síntese de produtos de interesse das indústrias farmacêutica, alimentícia, de cosméticos e no tratamento de resíduos; entre outros (SARMAH *et al.*, 2018). No tratamento de resíduos, as lipases podem ser empregadas no pré-tratamento de águas residuárias geradas no processamento de alimentos com alto teor de lipídios para posterior digestão anaeróbica (MENG *et al.*, 2017). Alguns exemplos são mostrados na Tabela 3.4. Entretanto, a aplicação desta tecnologia em larga escala ainda está intimamente ligada ao seu custo de implantação e de operação, já que o uso de enzimas comerciais para esse fim vem mostrando-se inviável às indústrias. A produção de enzimas extracelulares por fermentação submersa exige processos de extração e purificação de enzimas que também são custosos (LI; ZONG, 2010).

No tratamento de resíduos, o uso de preparações enzimáticas de baixo custo é vital (MENDES; PEREIRA; DE CASTRO, 2006). A matéria-prima pode representar até 75% do custo total de produção, o que pode despertar o interesse em resíduos agroindustriais e alimentícios (BON *et al.*, 2008). Outras opções seriam o uso de lipases cultivadas em meio semissólido (LEAL *et al.*, 2006), ou utilização de células íntegras com elevada atividade lipolítica, que comparadas com as enzimas purificadas ou imobilizadas, apresentam custos reduzidos e possuem maior estabilidade pela proteção oferecida pelas substâncias residuais da parede celular (WACHTMEISTER; ROTHER, 2016).

Tabela 3.4 - Estudos sobre o emprego de lipases em pré-tratamento de efluentes ricos em lipídios

Lipase (fonte)	Forma	Efluente	Resultado	Referência
<i>Candida rugosa</i>	Enzima purificada comercial	Laticínios	Redução de 73,5% na DQO	ADULKAR; RATHOD (2014)
<i>Rhizopus microsporus</i>	Sólido fermentado	Laticínios	DBO/DQO = 0,12	ALBERTON <i>et al.</i> (2010)
<i>Candida rugosa</i>	Enzima purificada comercial	Gordura de leite	Produção de 1,3 mL h ⁻¹ de biogás	DOMINGUES <i>et al.</i> (2015)
<i>Penicillium restrictum</i>	Sólido fermentado	Laticínios	Redução de 90% na DQO	LEAL <i>et al.</i> (2006)
Pâncreas de porco	Enzima purificada comercial	Laticínios	Redução de 72,8% na DQO	MENDES; PEREIRA; DE CASTRO (2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Enzima purificada comercial	Leite desnatado	Redução de 90% na DQO	MOBARAK-QAMSARI <i>et al.</i> (2012)
<i>Penicillium sp.</i>	Sólido fermentado	Leite desnatado	Redução de 90% na DQO	ROSA <i>et al.</i> (2009)
<i>Penicillium citrinum</i>	Células íntegras	Laticínios	Produção metano de 78,2 mL h ⁻¹	ALVES <i>et al.</i> (2019)

Em que DQO é a demanda química de oxigênio e DBO é a demanda bioquímica de oxigênio.

Fonte: Própria autora.

A maior parte das aplicações industriais não requer enzimas altamente purificadas. Entretanto, no caso das aplicações medicinais, analíticas e de pesquisa, as enzimas, em geral, devem ser extremamente puras, o que aumenta o custo de produção (BON *et al.*, 2008). O emprego de células íntegras torna desnecessário o rompimento das células e da purificação de enzimas, reduzindo drasticamente os custos de produção, ao passo que os componentes residuais da parede celular podem proteger a enzima de condições danosas, permitindo que a enzima atue em condições diferentes da sua operação natural (WACHTMEISTER; ROTHER, 2016).

3.3.2 Fungos como produtores de lipases ligadas ao micélio

As lipases provenientes de fungos podem ser extracelulares ou intracelulares, dependendo da relação carbono/nitrogênio no meio de cultivo e são as lipases mais exploradas dentre as lipases microbianas por características como estabilidade térmica, em solventes orgânicos e a variação de pH, alta

especificidade pelo substrato e custo de extração relativamente reduzido. Entretanto, muitas aplicações industriais dessas lipases são ainda limitadas pelo seu alto custo de produção e baixa produtividade. A produção de lipases extracelulares requer etapas posteriores de separação, purificação e imobilização em suporte, por meio de processos complexos e de custo elevado. Ao utilizar células íntegras, por outro lado, as enzimas permanecem aderidas no interior das células, o que faz com que o preparo deste tipo de biocatalisador seja mais simplificado. A estrutura celular age como matriz natural capaz de proteger as enzimas da ação de possíveis efeitos negativos de agentes externos, promovendo efeito análogo ao empregado por matrizes comuns utilizadas na imobilização de enzimas (ROMERO; BAIGORI; PERA, 2007).

A literatura reporta que a produção células íntegras com elevada atividade lipolítica podem ser obtidas a partir de diferentes espécies do gênero *Rhizopus* sp. (KYEONG; YEOM, 2014; ARAYA *et al.*, 2015), *Mucor* sp. (ANDRADE *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2015), *Geotrichum* sp. (LOO *et al.*, 2014), *Aspergillus* sp. (SOLARTE *et al.*, 2014; GULDHE *et al.*, 2016) e *Penicillium* sp. (DHEEMAN *et al.*, 2011; MAROTTI *et al.*, 2017) para aplicação em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. Com relação ao tratamento de resíduos com alto teor de lipídios, ainda são escassos os relatos referentes ao emprego de células íntegras contendo elevada atividade lipolítica auxiliando processos de digestão anaeróbia. Recentemente, Alves *et al.* (2019) reportaram resultados promissores na degradação de lipídios contidos em efluentes gerados em indústrias de produtos lácteos usando lipase ligada ao micélio do fungo *Penicillium citrinum*.

Para a realização do presente estudo foram avaliados fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium* e *Mucor*. Os fungos filamentosos do gênero *Penicillium* são adaptáveis, oportunistas (apenas patogênico para organismos com imunologia comprometida) e saprófitos (que se alimenta de matéria orgânica em decomposição). São a causa comum no apodrecimento de frutas e vegetais, podem ser utilizados na produção de queijos (*P. roqueforti* e *P. camembertii*, por exemplo) e são famosos pela produção do primeiro antibiótico, a penicilina (LI; ZONG, 2010). Marotti *et al.* (2017) identificaram o potencial das espécies *P. purpurogenum*, *P. italicum* e *P. janthinellum* como produtores de lipase ligada ao micélio com elevada atividade catalítica. A espécie *P. purpurogenum* apresentou especificidade elevada

para o ácido láurico e as espécies *P. italicum* e *P. janthinellum* apresentaram preferência pela hidrólise do ácido oleico.

Os fungos da espécie *Mucor* também são majoritariamente saprófitos, mas algumas espécies foram descritas como endófitas (que habitam em organismos vivos sem aparentemente causar doenças) e outras espécies como patógenos humanos e animais, especialmente por sua resistência térmica (MORIN-SARDIN *et al.*, 2017). Algumas espécies do gênero *Mucor*, como o *M. circinelloides*, são dimórficas e dependendo das condições de crescimento, pode alternar entre a morfologia de fungo filamentosos e de levedura (SNYDER; CHUREY; WOROBO, 2016). Os fungos desse gênero são ruderais, com excelente capacidade reprodutiva, curta expectativa de vida, o que facilita a exploração de meios complexos e desequilibrados, mas ricos em nutrientes. As condições ótimas de crescimento das espécies *Mucor* abrangem altos teores de umidade (entre 90 e 95%), pH de 5,0 a 6,0 e temperaturas de 20 a 25 °C, apesar de espécies como o *M. circinelloides*, *M. indicus* ou *M. ramosissimus* serem termotolerantes (MORIN-SARDIN *et al.*, 2017). Carvalho *et al.* (2015) identificaram a preferência da lipase ligada ao micélio de *M. circinelloides* pela clivagem de ácidos graxos de cadeia curta (como o ácido láurico), assim como a acentuada regioespecificidade desta espécie.

Desta forma, para execução do presente estudo foram selecionados três fungos filamentosos – *Penicillium italicum*, *Penicillium janthinellum* e *Mucor circinelloides* – reconhecidos como bons produtores de lipase ligada ao micélio para efetuar a hidrólise do soro de queijo visando sua posterior utilização na geração de metano.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Microrganismos

As linhagens dos fungos empregadas neste estudo foram *Penicillium italicum* AT4421, *Penicillium janthinellum* CCT3162 e *Mucor circinelloides f. griseocyanus* URM 4182 previamente identificados como potenciais fontes produtoras de lipase ligada ao micélio (CARVALHO *et al.*, 2015; MAROTTI *et al.*, 2017). A linhagem *M. circinelloides* URM 4182 foi adquirida da Micoteca URM do Departamento de Micologia (CCB/UFPE) da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, PE) e as espécies de *Penicillium* foram isoladas pelo Dr. James J. Muchovej, do departamento de Fitopatologia, em diferentes *habitats* no campus da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG) e identificadas/catalogadas no Banco de Culturas do Laboratório de Processos Biotecnológicos e Purificação de Macromoléculas da Universidade Federal de São João del Rei, Campus Centro Oeste (Divinópolis, MG).

No processo de digestão anaeróbia foi utilizado lodo anaeróbio proveniente da digestão anaeróbia mesófila de vinhaça, gentilmente fornecido pela Usina Iracema do grupo São Martinho. O lodo foi armazenado à temperatura ambiente e em ambiente isento de luz.

4.1.2 Substratos

As principais fontes de lipídios utilizadas neste estudo foram o soro de queijo, o azeite de oliva (na quantificação da atividade hidrolítica) e o óleo de palma (na avaliação da etapa de hidrólise). O soro de queijo utilizando neste estudo foi gentilmente fornecido por produtor local de queijo Minas. Cerca de 30 L de soro de queijo foram coletados, distribuídos em garrafas pet lavadas e armazenados em freezer a -20 °C. O azeite de oliva, da Carbonell®, foi adquirido no comércio local. O óleo de palma foi doado pela Agropalma (Belém, PA) e foi armazenado à temperatura ambiente, em local protegido da iluminação solar para evitar a sua degradação. O óleo de palma é composto majoritariamente por ácido palmítico (46,8%) e ácido oleico (37,6%), contendo também ácido linoleico (10,5%), ácido

esteárico (3,8%), ácido mirístico (1,2%) e ácido láurico (0,1%) (CARVALHO *et al.*, 2013).

4.1.3 Reagentes

Neste estudo, reagentes químicos de diversos fornecedores foram empregados, incluindo: álcool isopropílico, goma arábica, ácido clorídrico, heptano e hexano da Cromoline[®]; ácido sulfúrico, álcool etílico, álcool metílico, éter etílico, fosfato monopotássico e hidróxido de sódio da Synth[®]; cloreto de sódio, nitrato de sódio, sulfato de magnésio e sulfato de mercúrio da Vetec[®]; hidróxido de potássio da Cinética[®]; fenolftaleína da Dinâmica[®], dicromato de potássio da F. Maia[®], trifluoreto de boro da Fluka[®]; peptona de soja da Himedia[®]; acetona da Neon[®] e terra de diatomácea da Reagen[®].

4.2 Metodologia experimental

4.2.1 Cultivo submerso de fungos do gênero *Penicillium* e *Mucor* com lipase ligada ao micélio

Para a produção das lipases, foram avaliadas três linhagens de fungos previamente identificadas como potenciais fontes produtoras de lipase ligada ao micélio: *Penicillium italicum* AT4421, *Penicillium janthinellum* CCT3162 e *Mucor circinelloides* URM 4182 (CARVALHO *et al.*, 2015; MAROTTI *et al.*, 2017).

O meio de cultivo foi proposto por Andrade *et al.* (2012), sendo composto por 70 g L⁻¹ de peptona, 1 g L⁻¹ de NaNO₃, 1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O e 30 g L⁻¹ de azeite de oliva. O meio, isento de azeite, foi autoclavado (121 °C por 15 min) e o azeite de oliva foi adicionado posteriormente sob condições assépticas.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio reacional inoculado com suspensão de 1x10⁶ esporos de cada uma das linhagens dos fungos selecionados. A determinação da concentração de esporos foi realizada por meio de contagem das células em câmara de Neubauer. Para tal procedimento, a suspensão de esporos de cada fungo foi obtida a partir da raspagem das células do meio de manutenção PDA (ágar dextrose de batata) com auxílio de uma alça de inoculação descartável seguida da transferência para 10 mL de água esterilizada. A partir da suspensão formada foram retiradas alíquotas para

carregamento da câmara para o procedimento de contagem em microscópio binocular da Spencer®.

Os frascos Erlenmeyer foram incubados a 30° C por um período máximo de 72 h, sob agitação orbital em incubadora refrigerada MA-830 (Marconi®) a 180 rpm. Ao final do cultivo, a biomassa formada foi separada do meio por filtração à vácuo, lavada com água e acetona e quantificada quanto à umidade (em analisador de umidade MOC63u da Shimadzu®) e atividade hidrolítica (conforme item 4.3.9). Posteriormente, os micélios foram refrigerados a 4 °C até o momento de sua utilização.

4.2.2 Seleção das condições otimizadas para a reação de hidrólise do soro de queijo

A seleção das condições experimentais otimizadas para a reação de hidrólise do conteúdo lipídico do soro de queijo foi realizada por meio de um planejamento de experimentos utilizando a metodologia de Taguchi.

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em reator de vidro encamisado de 100 mL, contendo 70 mL de meio reacional, sob agitação mecânica a 600 rpm. As reações de hidrólise foram catalisadas com lipases ligadas ao micélio dos fungos *P. janthinellum*, *P. italicum* ou *M. circinelloides*, produzidas, conforme descrito no item 4.2.1. Além da linhagem fúngica utilizada na hidrólise, foram avaliados os efeitos dos diferentes níveis de atividades enzimáticas (entre 70 e 350 U), do controle de temperatura (no intervalo de 30 a 37 °C) e do ajuste de pH do meio reacional (entre 7,0 e 9,0). Os fatores analisados estão sumarizados na Tabela 4.1.

O pH foi ajustado com NaOH 1,0 mol L⁻¹ à temperatura ambiente antes da adição dos micélios. O pH não foi contabilizado após a adição da lipase para não inserir outro parâmetro na análise, uma vez que cada meio necessitaria de quantidades diferentes de base.

A variação da concentração em ácidos graxos livres (Var_{AGL}) foi adotada como variável resposta. A Var_{AGL} corresponde à diferença da concentração apresentada no fim de cada reação de hidrólise em relação ao seu respectivo controle (meio isento de enzima). Para o acompanhamento das reações, foram

coletadas amostras em 0, 4, 8, 12 e 24 h, sendo avaliado no planejamento de experimentos somente o tempo final de reação.

Tabela 4.1 - Variáveis e níveis codificados e decodificados usados no planejamento experimental

Variável codificada	Variável decodificada	Nível 1	Nível 2	Nível 3
A	Espécie de fungo utilizado	<i>Penicilium janthinellum</i>	<i>Penicilium italicum</i>	<i>Mucor circinelloides</i>
B	Atividade hidrolítica (U)	70	210	350
C	pH _{inicial}	7,0	8,0	9,0
D	Temperatura (°C)	30	35	37

Fonte: Própria autora.

O pH do meio reacional foi acompanhado ao longo da reação utilizando *pH tester HI98103 Cheker® da Hanna Instruments* e as amostras foram quantificadas quanto à concentração de ácidos graxos livres (AGL), de acordo com a Equação 4.1, adaptada de Marotti *et al.* (2017).

$$\text{AGL (mmol L}^{-1}\text{)} = \frac{V \times C_{\text{KOH}} \times d \times 10^3}{m} \quad \text{Equação 4.1}$$

Em que:

V é o volume (mL), de KOH gasto na titulação;

C_{KOH} é a concentração (mol L⁻¹) de KOH utilizado na titulação;

d é a densidade do meio (considera-se 1,0 g mL⁻¹);

m é a massa (g) de amostra coletada.

O método de Taguchi foi utilizado no planejamento dos experimentos de seleção das condições ótimas da hidrólise do soro de queijo. Esse método consiste em definir a combinação das condições dos experimentos utilizando matrizes ortogonais pré-definidas, permitindo que os efeitos de vários fatores sobre uma resposta desejada possam ser estudados com quantidade reduzida de ensaios (WANG; WAN, 2009). As condições experimentais foram determinadas conforme o método de Taguchi empregando a matriz ortogonal L9, apresentada na Tabela 4.2

. Esta matriz permite a avaliação de até quatro fatores com três níveis, e foi utilizada neste estudo de forma saturada, ou seja, todos os fatores e níveis permitidos foram utilizados.

Tabela 4.2 - Matriz ortogonal L9 de Taguchi

Experimento	Variáveis independentes codificadas			
	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Fonte: adaptado de Freitas *et al.* (2013).

Na avaliação da influência dos fatores, foi empregada a análise de variância (ANOVA), técnica estatística que permite atestar a diferença estatística entre as médias dos efeitos dos fatores estudados (MONTGOMERY, 2001). Os parâmetros analisados na ANOVA foram calculados como representado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - ANOVA para a análise de fatores genéricos

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	F
Fator _i	$SQ_i = n \sum_{i=1}^a (\bar{y}_i - \hat{y})^2$	$GL_i = a - 1$	$MQ_i = \frac{SQ_i}{GL_i}$	$F_i = \frac{MQ_i}{MQ_E}$
Erro	$SQ_E = SQ_T - \sum SQ_i$	$GL_E = N - a$	$MQ_E = \frac{SQ_E}{GL_E}$	-
Total	$SQ_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (\bar{y}_i - \hat{y})^2$	$GL_T = N - 1$	-	-

Em que \bar{y}_i é a média das respostas de um fator, \hat{y} é a média de todas as respostas, n é o número de réplicas, a é o número de níveis de um fator e N é o número total de observações ($N = n a$).

Fonte: adaptado de Montgomery (2012).

4.2.3 Valorização do soro de queijo na produção de lipase ligada ao micélio por cultivo submerso do fungo selecionado

Os fungos filamentosos possuem elevada capacidade de acumular biomassa em cultivo submerso em meios contendo diferentes fontes de carbono, particularmente em meios contendo lipídios, como, por exemplo, óleos vegetais (CARVALHO *et al.*, 2019). Portanto, nesta etapa o soro de queijo foi avaliado como meio de cultura para produção de lipases ligadas ao micélio, e foi também verificada a necessidade de suplementação de nutrientes.

O meio de cultivo controle (meio A) utilizado neste estudo foi baseado no meio descrito por Andrade *et al.* (2012), sendo composto por 70,0 g L⁻¹ de peptona, 1,0 g L⁻¹ de NaNO₃, 1,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O e 30,0 g L⁻¹ de azeite de oliva. O meio, isento de azeite, foi autoclavado (121 °C por 15 min) e o azeite de oliva foi adicionado posteriormente sob condições assépticas. Além do cultivo no meio de controle (meio A), o fungo selecionado foi cultivado no soro de queijo integral (meio B) e em meios combinados intermediários (meios C, D e E), descritos na Tabela 4.4. Os meios de cultivo contendo soro de queijo integral ou suplementado também foram submetidos à esterilização na autoclave antes da inoculação com o fungo selecionado no item 4.2.2. Os cultivos de cada meio foram efetuados em triplicata.

Tabela 4.4 - Composição dos meios de cultivo do fungo selecionado

Composição	Meios (concentrações em g L ⁻¹)				
	A ^a (Controle)	B	C	D	E
Soro de queijo	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente
Azeite de oliva	30,0	-	-	23,0	23,0
Peptona	70,0	-	70,0	-	70,0
NaNO ₃	1,0	-	1,0	-	1,0
KH ₂ PO ₄	1,0	-	1,0	-	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	-	0,5	-	0,5

^a (ANDRADE *et al.*, 2012).

Fonte: Própria autora.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio reacional inoculado com suspensão de 1×10^6 esporos. A determinação da concentração de esporos foi realizada por meio de contagem das células em câmara de Neubauer. Para tal procedimento, uma suspensão de esporos de cada fungo foi obtida a partir da raspagem das células do meio de manutenção PDA com auxílio de uma alça de inoculação descartável seguida da transferência para 10 mL de água esterilizada. A partir da suspensão formada foram retiradas alíquotas para carregamento da câmara para o procedimento de contagem. Os frascos Erlenmeyer foram incubados a 30°C por um período máximo de 168 h, sob agitação orbital em incubadora refrigerada MA-830 (Marconi^{MR}) a 180 rpm. Ao final do cultivo, a biomassa formada foi separada do meio por filtração à vácuo, lavada com água e acetona e quantificada quanto à umidade (em analisador de umidade MOC63u da Shimadzu[®]) e à atividade hidrolítica, conforme o item 4.3.9. Posteriormente, a biomassa foi refrigerada a 4°C até o momento de sua utilização.

4.2.4 Determinação das propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase ligada ao micélio

As propriedades bioquímicas da lipase ligada ao micélio obtida conforme item 4.2.3 foram determinadas em termos de pH ótimo de atuação considerando o intervalo de 5,5 a 8,0 (com tampão fosfato de sódio $0,1\text{ mol L}^{-1}$) e temperatura (20 a 60°C).

Em seguida, foi avaliada a influência da concentração de substrato, entre 5 e 50% m/m (correspondendo a 186 a 1860 mmol de ácido graxo por litro), sobre a atividade hidrolítica das lipases. Foram empregados neste ensaio as melhores condições de pH e temperatura identificadas previamente. A constante cinética de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) foram calculadas utilizando o software Origin Pro 8, com modelo proposto por Lineweaver-Burk, representado na Equação 4.2.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Equação 4.2

Em que:

V é a taxa de reação ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$);

K_m é a constante de Michaelis-Menten (mmol L^{-1});

V_{\max} é a velocidade máxima da reação ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$);

[S] é a concentração de substrato (mmol L^{-1}).

Também foi avaliada a estabilidade à estocagem da lipase. Nessa análise, a biomassa foi refrigerada a 4 °C e sua atividade hidrolítica residual determinada no intervalo de 12 dias.

4.2.5 Hidrólise de lipídios pelas células íntegras de *M. circinelloides* com atividade lipolítica

A hidrólise de lipídios foi realizada em reator de vidro encamisado de 60 mL, contendo 50 mL de meio reacional, como substratos lipídicos modelos: o soro de queijo e o óleo de palma. Na hidrólise do óleo de palma, o meio reacional foi composto por uma emulsão contendo: 12,5 g de óleo de palma, 37,5 g de solução de goma arábica 3% (m/m) de goma arábica com relação ao volume de água deionizada adicionado. Na hidrólise do soro de queijo, o soro foi utilizado em sua forma integral.

A hidrólise foi catalisada com a lipase obtida no cultivo do fungo selecionado, com adição de massa de micélios correspondente a 100 U de atividade hidrolítica. Foi empregada agitação mecânica a 600 rpm e temperatura 40 °C. O ajuste do meio reacional em pH 7,5 foi realizado com NaOH 1,0 mol L⁻¹ à temperatura ambiente após a adição dos micélios. Amostras foram coletadas em 0, 4, 8, 10, 12 e 24 h e quantificadas quanto à concentração de AGL, conforme a Equação 4.1 do item 4.2.2. Ao final da reação, o material lipídios dos hidrolisados foram extraídos para a determinação de sua composição em ácidos graxos conforme o item 4.3.6.

4.2.6 Estabilidade operacional da lipase ligada ao micélio do fungo *M. circinelloides*

A estabilidade operacional da lipase ligada ao micélio do fungo *M. circinelloides* cultivado em soro de queijo foi avaliada realizando cinco ciclos consecutivos de 12 h de reação de hidrólise. No reator de vidro encamisado de 60 mL, foram adicionados 50 mL de soro de queijo e massa de micélios com 100 U de atividade hidrolítica (2,2 g de micélio úmido com 113,61 U g⁻¹ de atividade e 40% de massa seca). No término de cada hidrólise, os micélios aderidos à pá de agitação foram mantidos e o meio hidrolisado foi substituído por um substrato não hidrolisado. Foi empregada agitação mecânica a 600 rpm e temperatura 40 °C. O ajuste do meio reacional em pH 7,5 foi realizado com NaOH 1,0 mol L⁻¹ à temperatura ambiente após a adição dos micélios. Amostras foram coletadas em 0 e 12 h e quantificadas quanto à concentração de AGL, conforme a Equação 4.1 do item 4.2.2. Ao final das cinco reações de hidrólise, a biomassa foi removida e quantificada, além da atividade hidrolítica, a quantidade de massa do biocatalisador recuperada (base seca).

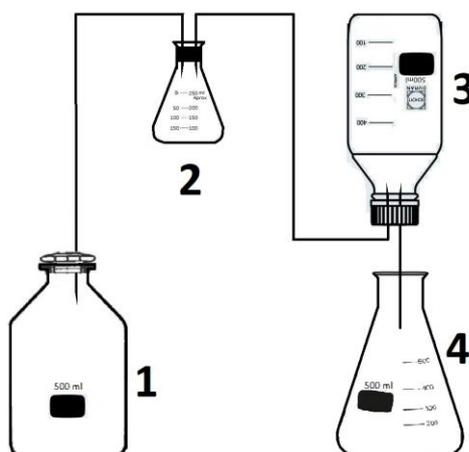
4.2.7 Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia do soro de queijo

A biodegradabilidade anaeróbia do soro de queijo foi avaliada a partir do teste de atividade metanogênica específica (AME), em regime de batelada. Para tal propósito, foram realizados seis ensaios, sendo o meio reacional composto por 250 mL de substrato e 50 mL de lodo anaeróbio (inóculo), acondicionados em frasco tipo Soro de 500 mL (reator), sob agitação orbital de 150 rpm e 35 °C. Três substratos (em duplicata) foram avaliados: soro de queijo *in natura*, soro de queijo previamente hidrolisado (com remoção dos micélios utilizados no pré-tratamento) e soro de queijo com micélios (avaliando o tratamento enzimático simultâneo à digestão). Nos dois últimos casos (tratamento enzimático prévio e simultâneo), foi utilizada quantidade de micélio suficiente para fornecer 1 U de atividade de lipase por grama de substrato. O oxigênio do meio reacional foi purgado pelo borbulhamento de nitrogênio à mistura durante 5 min. O ajuste do pH para 7,5 foi realizado por meio da adição de solução 1,0 mol L⁻¹ de NaOH.

O sistema reacional esquematizado pode ser visualizado na Figura 4.1. O reator foi conectado ao frasco tipo Duran[®] invertido contendo solução de NaOH 5%

(m/v), o qual tem a função de reagir com o CO₂ do biogás. A medição de gás metano e traços de outros gases produzidos foi efetuada de forma indireta pelo deslocamento da solução de NaOH para o frasco Erlenmeyer e a quantificação realizada por meio da medição do volume recolhido com auxílio de proveta graduada.

Figura 4.1 - Esquema do sistema utilizado para os testes de atividade metanogênica específica



Legenda: 1-Frasco reator tipo Soro; 2-Frasco Erlenmeyer de segurança; 3-Frasco Duran® com solução de NaOH; 4-Frasco Erlenmeyer para coleta da solução.

Fonte: Própria autora.

Os resultados obtidos nos testes de biodegradabilidade foram ajustados de acordo com a equação de Gompertz modificada (ALVES *et al.*, 2019) e analisados no programa Minitab 18. Para cada condição avaliada, foram obtidos os seguintes parâmetros: taxa de produção máxima de metano, produção máxima de metano e tempo da fase de adaptação (fase *lag*). Os parâmetros foram calculados de acordo com a Equação 4.3.

$$H = P \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \times e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Equação 4.3}$$

Em que:

H é o volume de metano gerado (mL) em função do tempo t (h);

P é a produção máxima de metano no ensaio (mL);

R_m é a taxa de produção máxima de metano (mL h⁻¹);

λ é o tempo da fase *lag* da produção de metano (d).

4.3 Métodos de análise

As análises físico-químicas foram realizadas segundo as normas recomendadas pelos métodos oficiais do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). Foram avaliados os seguintes parâmetros: pH, óleos e gorduras (O&G), índice de acidez, ácidos graxos livres, índice de saponificação, sólidos totais, sólidos totais voláteis, sólidos totais fixos e DQO. Foram ainda analisados os cátions e ânions mais relevantes contidos no soro de queijo.

4.3.1 Determinação do pH

O pH foi medido em pHmetro de bancada Spencer SP3611 a 25 °C.

4.3.2 Quantificação da concentração óleos e gorduras

Para extração dos sólidos contendo a gordura da amostra de soro de queijo, cerca de 100 a 200 mL da amostra foram acidificados com ácido clorídrico 37% (v/v) até pH igual ou inferior a 2,0. Em seguida, essa solução foi aquecida entre 60 e 70 °C, foram adicionados cerca de 3 g de terra de diatomácea e o meio foi mantido nesse intervalo de temperatura por 15 min. Ao final, a solução foi submetida ao resfriamento em banho de gelo para posterior filtração a vácuo em filtro quantitativo. O material retido foi envolvido em forma de cartucho, seco em estufa a 100 °C por 1 h e mantido no dessecador por pelo menos 1 h. Os lipídios foram então extraídos do material retido no cartucho em extração por Soxhlet utilizando o determinador de gordura TE-044 da Tecnal[®]. A concentração de óleos e gorduras foi determinada de acordo com a Equação 4.4.

$$\text{Óleos e gorduras (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(m_{\text{inicial}} - m_{\text{após extração}}) \times 10^6}{V} \quad \text{Equação 4.4}$$

Em que m é a massa do frasco (g) medida durante o procedimento e V é o volume (mL) de amostra adicionada no início da análise.

4.3.3 Quantificação do teor de ácidos graxos livres e índice de acidez

O teor de AGL e o índice de acidez do soro de queijo foram determinados por meio da metodologia descrita por Moretto e Fett (1998). Neste procedimento, foram misturados 2,0 g de amostra e 25 mL de solução neutralizada de éter etílico e álcool etílico em proporção 2:1 (v/v) em frasco Erlenmeyer de 125 mL. A mistura foi titulada por solução padrão de hidróxido de potássio 0,01 mol L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador. A porcentagem de ácidos graxos livres e o índice de acidez foram determinados, conforme Equações 4.5 e 4.6.

$$\% \text{ AGL} = \frac{(V_a - V_b) \times MM_{\text{ácido graxo}} \times C_{\text{KOH}} \times 0,1}{m} \quad \text{Equação 4.5}$$

$$\text{Índice de acidez (mgKOH g}^{-1}\text{)} = \frac{(V_a - V_b) \times MM_{\text{KOH}} \times C_{\text{KOH}}}{m} \quad \text{Equação 4.6}$$

Em que:

V_a é o volume (mL) de KOH na titulação da amostra;

V_b é o volume (mL) de KOH gasto na titulação do branco;

$MM_{\text{ácido graxo}}$ é a massa molar dos ácidos graxos presentes no soro (foi utilizada média ponderada dos ácidos graxos identificados, que foi de 260,2 g mol⁻¹);

MM_{KOH} é a massa molar do hidróxido de potássio (56,1 g mol⁻¹);

C_{KOH} é a concentração (mol L⁻¹) de hidróxido de potássio;

m é a massa (g) de amostra coletada.

4.3.4 Quantificação do teor de sólidos totais, sólidos totais fixos e sólidos totais voláteis

Para a determinação do teor de sólidos totais do soro de queijo, a amostra (entre 20 e 100 mL) foi colocada em cadinho de porcelana previamente seco (em mufla por 1 h) e tarado. A água contida na amostra foi evaporada em estufa a 100 °C por 1 h e na sequência, o cadinho foi levado ao dessecador por 1 h e pesado. O tratamento térmico foi repetido até obtenção de massa constante dos sólidos. O valor de sólidos totais foi determinado conforme a Equação 4.7.

Para obter o teor de sólidos totais fixos, ou seja, a fração não orgânica da amostra, a amostra previamente desidratada em estufa foi calcinada em mufla a 550 °C. O valor foi calculado de acordo com a Equação 4.8. O teor de sólidos totais voláteis foi obtido pela subtração dos sólidos totais pelos sólidos totais fixos.

$$\text{Sólidos totais (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(m_{\text{após estufa}} - m_{\text{cadinho}}) \times 10^6}{V(\text{mL})} \quad \text{Equação 4.7}$$

$$\text{Sólidos totais fixos (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(m_{\text{após mufla}} - m_{\text{cadinho}}) \times 10^6}{V(\text{mL})} \quad \text{Equação 4.8}$$

Em que m é a massa (g) medida durante o procedimento e V é o volume (mL) de amostra adicionada no início da análise.

4.3.5 Determinação do índice de saponificação

Por definição, o índice de saponificação (IS) é a massa (mg) de hidróxido de potássio necessária para saponificar um grama de óleo ou gordura. O IS do soro de queijo foi determinado conforme metodologia de Moretto e Fett (1998). Para este procedimento, foram adicionados 2,0 g de amostra e 20 mL de solução alcoólica de KOH 4% (m/v) em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Esse frasco foi acoplado ao condensador de refluxo e aquecido brandamente por 30 minutos. Em seguida, após breve resfriamento, a amostra foi titulada com HCl utilizando fenolftaleína como indicador, até o desaparecimento da coloração rósea. O mesmo procedimento foi realizado para o controle (substituindo amostra por água deionizada). O IS foi então determinado por meio da Equação 4.9.

$$\text{IS (mgKOH g}^{-1}\text{)} = \frac{(V_b - V_a) \times \text{MM}_{\text{base}} \times C_{\text{HCl}}}{m_{\text{amostra}}} \quad \text{Equação 4.9}$$

Em que:

V_a é o volume (mL) de HCl na titulação da amostra;

V_b é o volume (mL) de HCl gasto na titulação do branco;

C_{HCl} é a concentração de ácido clorídrico (0,5 mol L⁻¹);

MM_{base} é a massa molar do KOH (56,1 g mol⁻¹);

m é a massa (g) de amostra.

4.3.6 Análise da composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa

A composição em ácidos graxos foi quantificada por meio da determinação dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). Para este procedimento, foi necessária extração prévia da matéria lipídica das amostras derivadas do leite, pois substâncias como proteínas poderiam provocar interferência. A extração foi realizada conforme método descrito por Nourooz-Zadeh e Appelqvist (1988), consistindo da adição de 50 mL de isopropanol e hexano (proporção de 3:2, v/v) para um volume entre 10 a 20 mL da amostra. A mistura foi agitada manualmente e posteriormente centrifugada. Na fração superior recolhida foram adicionados 15 mL de solução 0,47 mol L⁻¹ de Na₂SO₄. Após agitação e separação de fases, a fase superior foi recolhida e submetida à evaporação no rotaevaporador a 50°C.

Os ácidos graxos foram quantificados pelo método oficial Ce 1-62 da *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 2004). A análise foi realizada em cromatógrafo Varian CP 3800 equipado com detector de ionização de chama (FID), coluna capilar TR FAME (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura), e auto injetor (CP 8410). Gás de hélio foi empregado como fase móvel com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e injeção de amostra de 1 µL. A temperatura do forno foi mantida a 50 °C durante 1 min, aumentada para 150 °C a 15 °C min⁻¹, seguido do aumento para 180 °C a 2 °C min⁻¹ e depois para 250 °C a 15 °C min⁻¹ e mantida durante 5 min. As temperaturas do detector e do injetor foram ajustadas a 250 e 200 °C, respectivamente. A identificação dos ésteres metílicos foi realizada comparando-se os tempos de retenção com padrões FAME (Sigma®) e a quantificação foi realizada por normalização de áreas calculadas pelo *software Galaxie Chromatography Data System*, versão 1.9.

4.3.7 Quantificação da demanda química de oxigênio (DQO)

A demanda química de oxigênio é medida pela quantidade de oxigênio da matéria, majoritariamente orgânica, que pode ser oxidada e quantificada, utilizando dicromato de potássio como agente oxidante. A análise consiste na digestão (em tubo de ensaio) da mistura contendo: 40 a 50 mg de sulfato de mercúrio, 3,0 mL de sulfato ácido de prata 0,67 % m/v, 2,0 mL de dicromato de potássio 1,0 Eq L⁻¹, 2,0 mL de amostra (previamente diluída, se necessário), a um intervalo de temperatura de 140 a 160 °C por 1,5 h. Após resfriamento, a DQO foi quantificada

por meio da medição da absorvância da amostra em espectrofotômetro manual Spencer® a 620 nm.

4.3.8 Análise da composição em cátions e ânions

Os principais cátions e ânions da amostra de soro de queijo foram determinados por cromatografia de íons utilizando o sistema *Metrohm 940 Professional IC Vario* equipado com a coluna *Metrohm A Supp 7* para ânions e coluna *C4* para cátions, com as suas respectivas colunas de proteção. Carbonato ($5,5 \text{ mmol L}^{-1}$) foi empregado como fase móvel para os ânions e para a análise de cátions foram utilizados ácido tartárico (600 mg L^{-1}) e ácido 2,6-piridinodicarboxílico (125 mg L^{-1}). As amostras foram injetadas pelo autoinjeter *858 Professional Sample Processor*. Os dados foram analisados pelo software *Metrohm®*.

4.3.9 Determinação da atividade hidrolítica da lipase

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de ácidos graxos livres por minuto, em condições de pH e temperatura pré-determinadas. A atividade hidrolítica do extrato bruto e da lipase foi determinada pelo método de hidrólise da emulsão do azeite de oliva (MAROTTI *et al.*, 2017). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 g de azeite de oliva com 90 g de solução de goma arábica 3% (m/m). A reação foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo a mistura reacional composta por 5 mL de emulsão, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0 e lipase ($0,5 \text{ g}$ do extrato enzimático bruto ou $0,1 \text{ g}$ de micélio). Os frascos foram incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min , em banho termostaticado com agitação (160 rpm). A reação foi paralisada com a adição de 10 mL de solução comercial de etanol neutralizado (mínimo 95% m/m). Os ácidos graxos livres foram titulados com solução de hidróxido de potássio 20 mmol L^{-1} na presença de fenolftaleína como indicador. A atividade foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (U g^{-1}) e foi calculada de acordo com a Equação 4.10.

$$\text{Atividade (U g}^{-1}\text{)} = \frac{(V_a - V_b) \times C_{\text{KOH}} \times 10^3}{t \times m} \quad \text{Equação 4.10}$$

Em que:

V_a é o volume (mL) de hidróxido de potássio gasto na titulação da amostra;

V_b é o volume (mL) de hidróxido de potássio gasto na titulação do branco;

C_{KOH} é a concentração (mol L^{-1}) de KOH;

t é o tempo (min) de reação;

m é a massa seca (g) de biomassa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do soro de queijo

No presente estudo utilizou-se soro de queijo obtido no beneficiamento artesanal de queijo tipo Minas. As características do soro de queijo podem variar de acordo com o tipo do leite (vaca, cabra, etc.), alimentação do animal, método de processamento utilizado, época do ano e estágio da lactação (GANJU; GOGATE, 2017). A caracterização do soro de queijo coletado foi realizada de acordo com técnicas descritas no item 4.3, e os principais resultados são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Caracterização de amostras de soro de queijo

Característica	Resultados
Sólidos Totais (mg L⁻¹)	93159 ± 2295
Sólidos Totais Voláteis (mg L⁻¹)	66432 ± 4053
Sólidos Totais Fixos (mg L⁻¹)	26727 ± 1758
Índice de Acidez	1,19 ± 0,38
Ácidos Graxos Livres (%)	0,60 ± 0,19
pH	6,53 ± 0,21
DQO (mg O₂ L⁻¹)	96710 ± 5185
Lipídios (mg L⁻¹)	7281 ± 332
Ácido Caprílico (%)	0,87 ± 0,00
Ácido Cáprico (%)	1,14 ± 0,03
Ácido Láurico (%)	8,67 ± 0,62
Ácido Mirístico (%)	9,39 ± 0,25
Ácido Palmítico (%)	29,79 ± 0,72
Ácido Estearico (%)	10,06 ± 0,61
Ácido Oleico (%)	36,89 ± 1,19
Ácido Linoleico (%)	3,19 ± 0,24

Fonte: Própria autora.

As características do soro de queijo em relação aos valores de DQO, sólidos voláteis e lipídios (96,710 g O₂ L⁻¹, 66,432 g L⁻¹ e 7,280 g L⁻¹, respectivamente) são discretamente superiores aos valores encontrados na literatura, entretanto, há

coerência entre os dados. Segundo Escalante *et al.* (2018), o soro de queijo possui valores de DQO normalmente entre 68 e 94 g O₂ L⁻¹, sólidos voláteis entre 45 e 65 g L⁻¹ e de 4 a 5 g L⁻¹ de lipídios. Os valores de índice de acidez, ácidos graxos livres e pH determinados no presente estudo foram similares aos descritos por Mendes (2004) para soro de queijo caseiro, sendo 1,33, 0,63% e 6,41 respectivamente.

Com relação aos ácidos graxos, nota-se na Tabela 5.1 a presença em maior proporção do ácido oleico e palmítico (36,89 e 29,79% respectivamente), seguido do esteárico (10,06%) e mirístico (9,39%). Esses valores são similares aos valores encontrados por Mendes (2004).

A composição mineral do soro de queijo também é um fator importante no crescimento de microrganismos. Elevados níveis de sais podem causar a desidratação das células microbianas pela pressão osmótica. Apesar dos cátions e ânions estarem associados, a toxicidade dos sais está relacionada principalmente à presença dos cátions. Os íons de metais leves como sódio, potássio, cálcio, magnésio são necessários para o crescimento microbiano, mas quantidades excessivas podem retardar a reação, assim como concentrações muito elevadas podem causar inibição moderada ou severa (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008). A Tabela 5.2 apresenta a composição de ânions e cátions solúveis do soro de queijo identificados neste estudo.

Tabela 5.2 - Principais cátions e ânions da amostra de soro de queijo filtrado

Cátions	Concentração (mg L⁻¹)	Ânions	Concentração (mg L⁻¹)
Cálcio	315	Fluoreto	56
Magnésio	58	Cloreto	3412
Potássio	748	Nitrito	19
Sódio	860	Nitrato	21
Ferro	50	Fosfato	136
Cádmio	33	Sulfato	85
Cobre	88		

Fonte: Própria autora.

Os cátions mais abundantes foram o sódio (860 mg L⁻¹) e o potássio (748 mg L⁻¹). Baixas concentrações de potássio (inferiores a 400 mg L⁻¹) beneficiam

a digestão anaeróbia nas faixas meso e termofílicas, enquanto concentrações mais elevadas (acima de 5000 mg L^{-1}) apresentam efeitos inibitórios mais acentuados na faixa termofílica. Em baixas concentrações (100 a 200 mg L^{-1}), o sódio é essencial para a metanogênese, podendo apresentar inibição moderada entre 3500 e 5500 mg L^{-1} , até inibição severa acima de 8000 mg L^{-1} (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008). As concentrações identificadas neste estudo são pouco propensas a causar inibição na digestão anaeróbia, podendo ser benéficas ao crescimento microbiano.

5.2 Seleção da linhagem de fungo produtora de lipase e estabelecimento das condições de hidrólise

A hidrólise dos compostos lipídicos é considerada a etapa limitante na reação de digestão anaeróbia. A hidrólise tem como um de seus objetivos, reduzir a carga de lipídios presentes no meio por meio da clivagem das moléculas de triacilgliceróis em compostos menores, especialmente ácidos graxos, o que facilita a ação das bactérias presente no lodo na digestão anaeróbia. Portanto, foram avaliados os efeitos de quatro fatores (linhagem do fungo produtor de lipase, carregamento de lipase na forma de células íntegras, pH inicial e temperatura) sobre a variação da concentração de ácidos graxos livres (Var_{AGL}) em 24 h de reação.

A Tabela 5.3 apresenta as características dos cultivos dos fungos *P. janthinellum*, *P. italicum* e *M. circinelloides* no meio controle (A), 70 g L^{-1} de peptona, 1 g L^{-1} de NaNO_3 , 1 g L^{-1} de KH_2PO_4 , $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 30 g L^{-1} de azeite de oliva. Os resultados são apresentados em termos de concentração de biomassa e atividade lipolítica no micélio e no filtrado.

Verifica-se que a atividade da lipase foi predominantemente ligada ao micélio (acima de 80% da lipase produzida) para todos os fungos filamentosos avaliados. Nota-se ainda maior destaque para o fungo *M. circinelloides*, o qual forneceu atividade de lipase ligada ao micélio superior ($268,2 \text{ U g}^{-1}$) em relação aos demais fungos (inferiores a 220 U g^{-1}).

Tabela 5.3 - Atividade hidrolítica das lipases obtidas a partir do cultivo dos fungos selecionados

Fungo	Produção de micélio seco (g L ⁻¹)	Atividade no micélio (U g ⁻¹)	Atividade no filtrado (U g ⁻¹)	F/M (%)
<i>P. janthinellum</i>	15,31 ± 5,30	218,6 ± 81,4	31,8	14,6
<i>P. italicum</i>	10,20 ± 1,53	146,6 ± 25,8	19,0	13,0
<i>M. circinelloides</i>	23,44 ± 4,01	268,2 ± 39,8	18,4	6,9

^aF/M se refere à porcentagem da atividade do filtrado (lipase extracelular) em relação à atividade do micélio (lipase intracelular).

Fonte: Própria autora.

A fim de determinar as condições ótimas de hidrólise do soro de queijo, além da linhagem do fungo, foram avaliados fatores como carregamento de lipase (entre 70 e 350 U), pH inicial (de 7,0 a 9,0) e temperatura (intervalo de 30 a 37°C). Foi utilizada uma matriz ortogonal L9 (planejamento experimental do tipo Taguchi), em que a Var_{AGL} em 24 h de reação foi adotada como variável dependente (resposta). É importante destacar que o soro de queijo possui flora microbiana rica (APÊNDICE A) que pode contribuir na formação de AGL durante os ensaios de hidrólise. Como foi feita a opção de utilizar soro não esterilizado, todos os experimentos foram efetuados em paralelo com ensaio controle, no intuito de avaliar somente a atuação das lipases ligadas ao micélio adicionadas ao soro de queijo. Desta forma, a Var_{AGL} se refere aos AGL produzidos pela ação das enzimas presentes no micélio, ou seja, o total de AGL subtraído dos AGL produzidos na reação controle. Os ensaios de hidrólise estão detalhados no APÊNDICE B.

A Tabela 5.4 sumariza as variáveis dependentes e as respostas obtidas em cada experimento. A média da Var_{AGL} dos experimentos propostos na matriz L9 de Taguchi foi de 26,08 mmol L⁻¹. Entre as condições avaliadas, a maior Var_{AGL} foi observada no experimento 7 (41,99 mmol L⁻¹) em que 70 unidades de atividade da lipase do fungo *M. circinelloides* foram adicionados ao meio, numa temperatura de 35°C e ajuste ao pH inicial 9,0. Essa combinação de condições correspondeu a um aumento de 61% na concentração de AGL em relação à média dos experimentos. O menor desempenho foi obtido pela atuação da lipase de *P. janthinellum* (ensaio

1, temperatura em 30°C e pH inicial 7,0) que forneceu concentração de AGL da ordem de 3,16 mmol L⁻¹, ou seja 88% menor que a média dos experimentos.

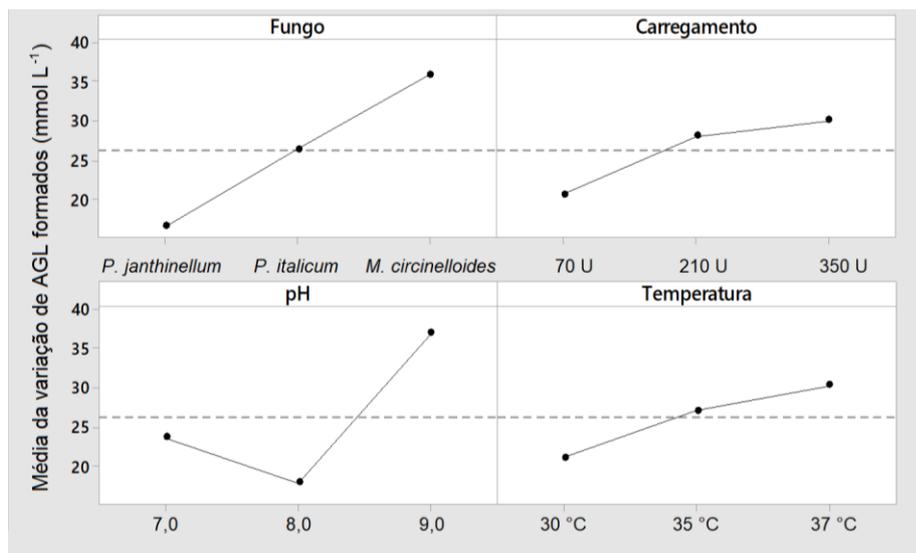
Tabela 5.4 - Planejamento experimental com variáveis independentes e dependentes

Exp.	Fungo	Variáveis independentes			Variável dependente
		Carregamento (U)	pH	Temperatura (°C)	Var _{AGL} em 24 h (mmol L ⁻¹)
1	<i>P. janthinellum</i>	70	7,0	30	3,16
2	<i>P. janthinellum</i>	210	8,0	35	10,93
3	<i>P. janthinellum</i>	350	9,0	37	35,09
4	<i>P. italicum</i>	70	8,0	37	16,50
5	<i>P. italicum</i>	210	9,0	30	33,93
6	<i>P. italicum</i>	350	7,0	35	28,64
7	<i>M. circinelloides</i>	70	9,0	35	41,99
8	<i>M. circinelloides</i>	210	7,0	37	39,31
9	<i>M. circinelloides</i>	350	8,0	30	26,42

Fonte: Própria autora.

A partir dos dados experimentais, foram gerados os gráficos dos efeitos dos fatores sobre a Var_{AGL}, utilizando o *software* Minitab 18 (Figura 5.1). O emprego da lipase do fungo *M. circinelloides* apresentou desempenho 37% superior à média dos fatores e a elevação do pH inicial para 9,0 elevou em 42% a Var_{AGL}. O carregamento de lipase ligada ao micélio e o ajuste de temperatura apresentaram menor influência sobre a Var_{AGL}, com aumento de 14% quando adicionadas 350 unidades de atividade hidrolítica das lipases e acréscimo de 16% no ajuste de temperatura em 37 °C. Provavelmente os carregamentos selecionados foram muito elevados se comparados com a carga lipídica presente no soro de queijo, promovendo hidrólise total do material lipídico presente no soro de queijo em 24 h. No caso do comportamento de temperatura, não foi observado influência significativa, provavelmente devido ao pequeno intervalo de temperatura (30 a 37 °C) testado. Entretanto, levando em consideração que a temperatura da digestão anaeróbia (considerando a faixa mesofílica) normalmente varia entre 30 e 40°C (ZHANG *et al.*, 2014), a análise de temperaturas extremas não seria relevante.

Figura 5.1 - Gráfico da média dos efeitos dos fatores utilizados no planejamento em 24 h da reação de hidrólise catalisada



Fonte: Própria autora.

A análise de variância (ANOVA) foi empregada para avaliar a influência estatística dos quatro fatores propostos no desempenho da hidrólise. A ANOVA obtida a partir dos resultados do planejamento de experimentos é apresentada na Tabela 5.5 e aponta o carregamento de lipase como o fator menos significativo (ao nível de 95% de confiança), e seus valores foram utilizados para compor o erro. Os fatores mais relevantes foram o pH e a linhagem do fungo, com os melhores resultados sendo obtidos com pH_{inicial} 9,0 e a lipase proveniente do fungo *M. circinelloides*.

Tabela 5.5 - ANOVA para a variação da concentração de AGL(Var_{AGL}) na hidrólise do soro de queijo em 24 h

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F
Linhagem do fungo	548,10	2	274,05	3,87
Carregamento	141,59	-	-	-
pH	593,71	2	296,85	4,19
Temperatura	141,85	2	70,93	1,00
Erro	141,59	2	70,80	-

Em que SQ é a soma quadrática, GL são os graus de liberdade, MQ é a média quadrática e F é a estatística F.

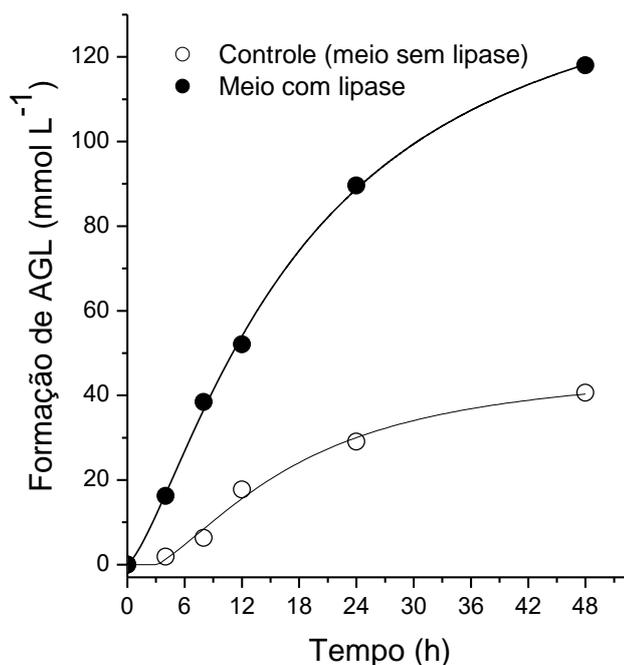
Fonte: Própria autora.

De acordo com as equações da Tabela 4.3 presentes no item 4.2.2, cada fator com três níveis necessita de dois graus de liberdade (GL). Como o método de Taguchi foi empregado de forma saturada, ou seja, utilizando todos os fatores permitidos, os quatro fatores possuem um total de 8 GL. Desta forma, os GL do erro corresponderiam a zero. Para o cálculo da média quadrática referente ao erro, utilizam-se então os valores da soma quadrática e do GL do fator de menor relevância (que foi o carregamento de lipase) para estimar a média quadrática do erro (SOUZA *et al.*, 2013).

5.2.1 Ensaios para a confirmação dos parâmetros da hidrólise

A Figura 5.2 representa os perfis de hidrólise do soro de queijo com base nos parâmetros selecionados a partir da análise do planejamento Taguchi (lipase ligada ao micélio de *M. circinelloides*, 350 U de atividade, pH_{inicial} 9,0 e 37 °C). No experimento confirmatório, a reação de hidrólise foi prolongada até 48 h, alcançando a produção de 77,37 mmol L⁻¹ de Var_{AGL}.

Figura 5.2 - Hidrólise do soro de queijo por células íntegras de *M. circinelloides* com 350 U de lipase, pH_{inicial} 9,0, 37 °C



Fonte: Própria autora.

Os resultados obtidos são similares aos descritos por Mendes (2004) referentes a hidrólise do soro de queijo com lipases comerciais, com formação de 35,22 a 71,37 mmol L⁻¹ de AGL na hidrólise de 100 g de soro de queijo utilizando 1x10⁶ U de lipase pancreatina livre LKM (Kin Master) com adição de 3 a 7% (m/v) de goma arábica, ajuste em pH 8,0, 40 °C e rotação a 1200 rpm.

Apesar do valor ótimo de pH inicial ideal ser 9,0, a adição da lipase provocou a redução de pH no início da reação de hidrólise, dependendo da quantidade e tipo de micélio adicionado. Após a adição dos micélios no meio reacional, houve queda no pH, portanto o pH real no início da hidrólise apresentou queda de 0,5, 0,9 e 1,0 com relação aos pHs de 7,0, 8,0 e 9,0, respectivamente (APÊNDICE B).

5.3 Produção de lipase ligada ao micélio do fungo *M. circinelloides* com atividade hidrolítica

Nesta etapa, o potencial do soro de queijo como meio de cultivo do fungo *M. circinelloides* foi avaliado, testando meios contendo apenas soro sem adição de nutrientes e meios suplementados com nutrientes adequados. Adicionalmente, o perfil de crescimento e de atividade hidrolítica da lipase ligada ao micélio foram avaliados nas composições que apresentaram melhor desempenho.

5.3.1 Avaliação da composição do meio de cultivo para produção de lipase ligada ao micélio do fungo *M. circinelloides*

Para este estudo, o meio de cultivo controle utilizado (meio A) foi proposto por Andrade *et al.* (2012), sendo composto por nutrientes (70 g L⁻¹ de peptona, 1 g L⁻¹ de NaNO₃, 1 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O) e azeite de oliva (30 g L⁻¹). Além do cultivo no meio de controle, o *M. circinelloides* foi cultivado no soro de queijo integral (meio B) e em meios combinados intermediários (meios C, D e E).

A Tabela 5.6 apresenta os resultados dos cultivos com *M. circinelloides* ao final de 72 h, variando dois fatores: a suplementação de lipídios (com azeite) nos meios compostos por soro de queijo, e a adição de nutrientes. Observa-se que o impacto causado pela adição de nutrientes foi negativo, uma vez que resultou na redução da atividade da lipase no micélio. Isso provavelmente ocorreu porque a adição de nutrientes induziu ao acréscimo na produção e excreção de lipases (em

cerca de três vezes se comparado com os meios de cultivo sem a adição de nutrientes). A adição de nutrientes promoveu elevado crescimento celular (58% maior que os meios sem a suplementação com azeite), mas não impactou diretamente a atividade hidrolítica do micélio.

Tabela 5.6 - Produção de lipase do fungo *M. circinelloides* empregando diferentes meios de cultivo

Meio	Fonte de carbono	Nutrientes	Produção de biomassa (g L ⁻¹)	Atividade no micélio (U g ⁻¹)	F/M ^a (%)
A (controle)	Azeite	Presente	10,0	253,89 ± 38,79	7,97
B	Soro	Ausente	11,9	118,96 ± 8,58	6,09
C	Soro	Presente	16,2	68,53 ± 16,53	27,98
D	Soro e azeite	Ausente	23,9	125,35 ± 27,91	5,78
E	Soro e azeite	Presente	20,6	89,84 ± 15,00	22,17

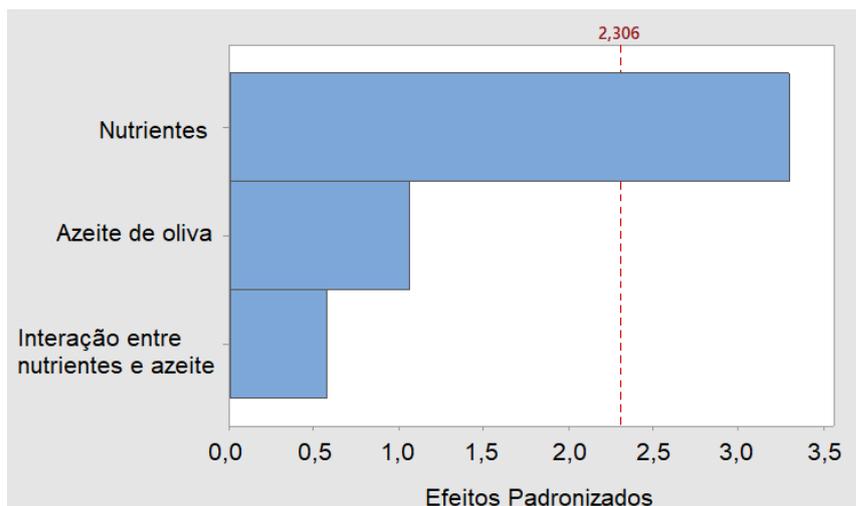
^aF/M se refere à porcentagem da atividade do filtrado (lipase extracelular) em relação à atividade da biomassa (lipase intracelular).

Fonte: Própria autora.

O diagrama de Pareto é uma ferramenta que permite priorizar as ocorrências de acordo com o nível de influência que elas possuem no processo, sendo utilizado neste estudo para analisar a influência da suplementação de azeite e da adição de nutrientes nos cultivos compostos majoritariamente por soro de queijo sobre a atividade de lipase ligada ao micélio. A Figura 5.3 representa o diagrama de Pareto traçado a partir dos dados da avaliação das composições dos cultivo (meios B, C, D e E) sobre a atividade do micélio. A linha vermelha com efeito padronizado de 2,306 indica o limite em que, acima desse valor, o fator é considerado significativo. O diagrama corrobora com os resultados observados na Tabela 5.6, indicando que a adição de nutrientes (B) foi o único fator relevante no ensaio.

Considerando que os nutrientes apresentaram efeito negativo e que a adição de azeite não foi relevante para o aumento da atividade hidrolítica nos micélios do soro de queijo, os cultivos para a produção de lipase ligada ao micélio do fungo *M. circinelloides* foram realizados em meio composto somente por soro de queijo puro (meio B).

Figura 5.3 - Gráfico de Pareto da atividade da lipase proveniente do cultivo de *M. circinelloides*



Fonte: Própria autora.

5.3.2 Estabelecimento do tempo de cultivo ótimo de *M. circinelloides* para a produção da lipase ligada ao micélio

Uma vez selecionado o meio mais adequado para a produção da lipase, foram realizados ensaios adicionais para determinar o tempo ótimo de cultivo, visando a máxima atividade de lipase, nas condições avaliadas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.7 e na Figura 5.4.

Tabela 5.7 - Resultados do cultivo de *M. circinelloides* ao longo de sete dias nos meios A e B

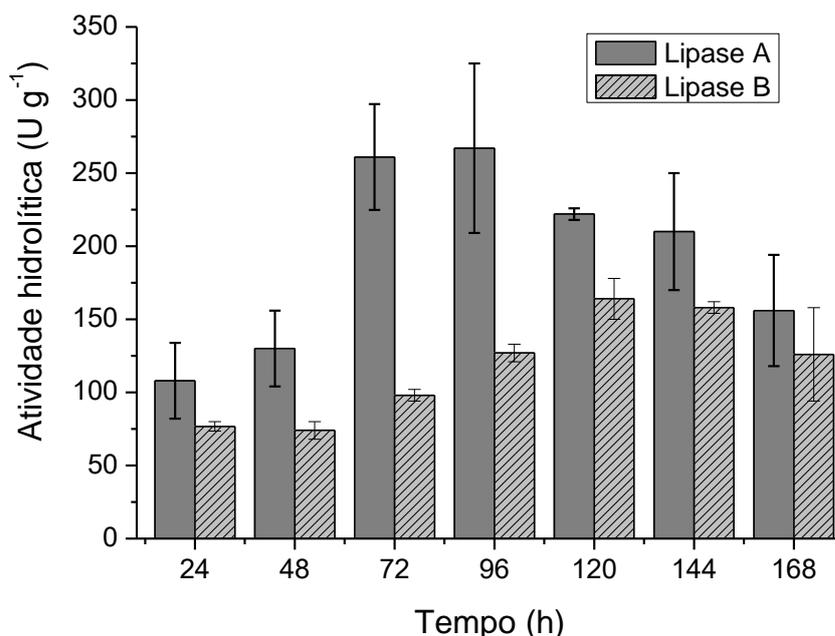
Tempo (h)	Meio A (controle)			Meio B		
	Produção de micélio (g L ⁻¹)	Atividade no micélio (U g ⁻¹)	F/M ^a (%)	Produção de micélio (g L ⁻¹)	Atividade no micélio (U g ⁻¹)	F/M ^a (%)
24	2,40	108,0	21,60	9,88	76,2	4,62
48	9,77	130,0	19,08	16,14	73,1	7,69
72	11,79	261,0	20,80	14,40	96,7	7,83
96	22,67	267,0	9,36	13,44	126,4	4,07
120	18,46	222,0	10,81	15,06	160,3	3,17
144	24,44	210,0	10,86	15,92	177,0	4,05
168	24,11	156,0	18,46	16,83	129,0	3,17

^aF/M se refere à porcentagem da atividade do filtrado (lipase extracelular) em relação à atividade do micélio (lipase intracelular).

Fonte: Própria autora.

Nota-se que a formação de biomassa em meio A (controle), alcançou o máximo em 96 h ($22,4 \text{ g L}^{-1}$, em média), enquanto o meio B a produção de biomassa permaneceu estagnada a partir de 48 h (com $13,9 \text{ g L}^{-1}$, em média). Ainda de acordo com a Tabela 5.7, observa-se que o meio A proporcionou maior atividade hidrolítica que o meio B (em média 16% e de 5%, respectivamente).

Figura 5.4 - Atividade hidrolítica das lipases ligadas ao micélio de *M. circinelloides* produzidas a partir do cultivo em meios com azeite de oliva (lipase A) e soro de queijo (lipase B)



Fonte: Própria autora.

A Figura 5.4 apresenta o perfil da atividade hidrolítica ao longo do cultivo. Enquanto no cultivo com o meio A foi alcançada a atividade máxima entre 72 e 96 h, no meio B os maiores valores de atividade hidrolítica foram registrados entre 120 e 144 h. O soro de queijo possui composição mais complexa que o meio padrão formulado para o cultivo de lipase ligada ao micélio, portanto, os microrganismos podem necessitar um maior tempo de adaptação até atingir o seu potencial máximo de produção de biomassa e atividade hidrolítica.

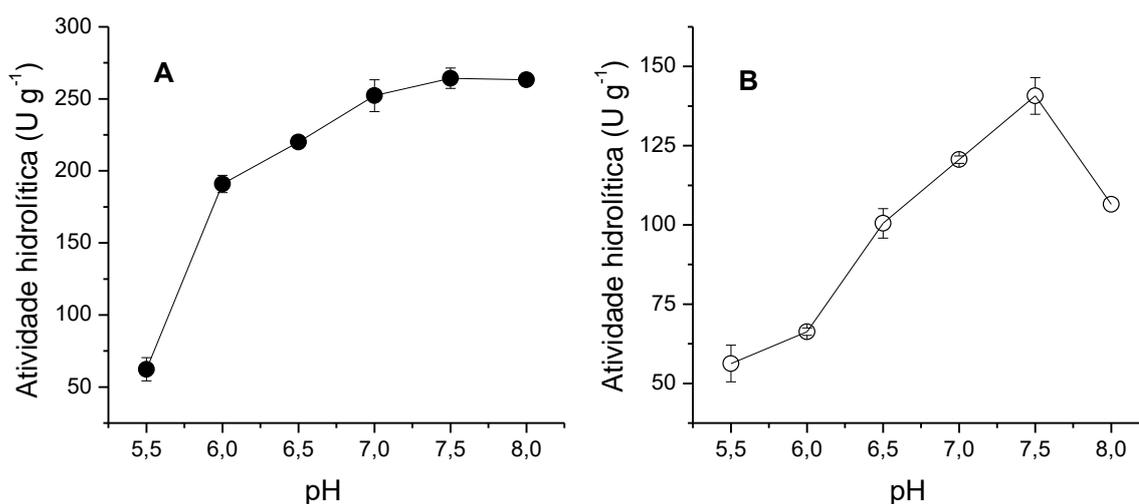
5.4 Determinação das propriedades bioquímicas e cinéticas das lipases

As propriedades bioquímicas e parâmetros cinéticos das lipases de *M. circinelloides* foram determinadas visando estabelecer as condições adequadas para aplicação na hidrólise do soro de queijo ou de outros substratos com teor significativo de lipídios. As lipases A e B foram obtidas a partir dos cultivos de *M. circinelloides* em azeite de oliva e soro de queijo após 72 e 120 h, respectivamente.

5.4.1 Determinação do pH ótimo da atuação das lipases

Lipases de diversas fontes apresentam diferentes valores de pH ótimo de atuação. Para investigar a influência do pH no desempenho catalítico das lipases de *M. circinelloides* na reação de hidrólise do azeite de oliva, variou-se o pH do meio de reação na faixa de 5,5 a 8,0, fixando a temperatura de incubação em 37 °C. A Figura 5.5 apresenta os perfis de atividade obtidos com a variação do pH do meio reacional.

Figura 5.5 - Influência do pH na atividade hidrolítica das lipases ligadas ao micélio de *M. circinelloides* obtida em cultivo de meio A e meio B



Fonte: Própria autora.

Com base nas condições estudadas, verifica-se que as lipases avaliadas apresentaram valores mais elevados de atividade em pH 7,5. A lipase de *M. circinelloides* obtida no cultivo contendo azeite de oliva (Figura 5.5 A) revelou habilidade de atuar com atividade satisfatória (> 250 U g⁻¹) numa faixa de pH

relativamente ampla (7,0 a 8,0), enquanto a lipase obtida em soro de queijo sofreu influência negativa com o aumento ou redução do pH em relação ao ótimo de atuação (Figura 5.5 B). O pH ótimo de atuação das lipases está sumarizado na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Faixas de valores de pH para lipases de *M. circinelloides* cultivadas em diferentes meios de cultura

Lipase	pH ótimo de atuação
A (controle)	7,0 a 8,0
B	7,5

Fonte: Própria autora.

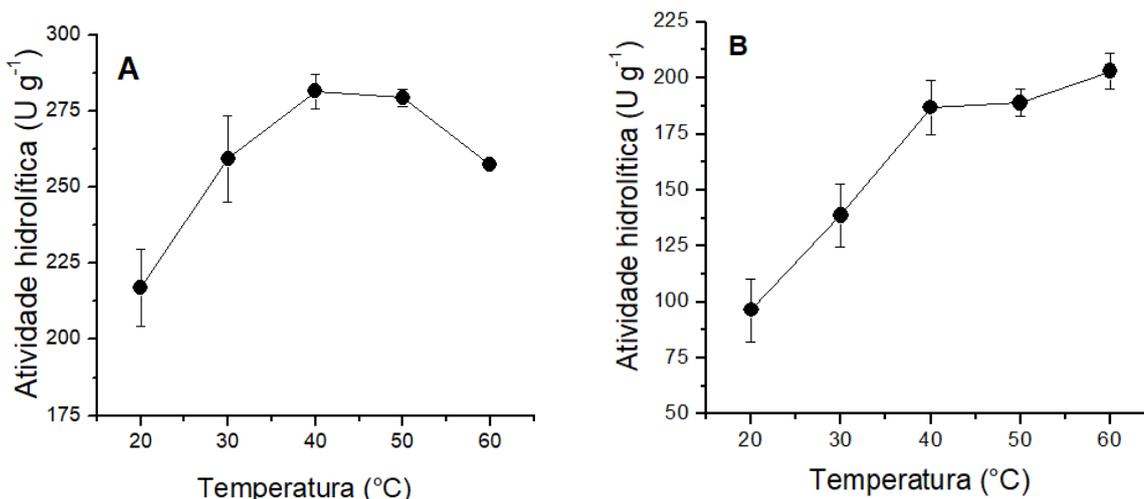
Esses resultados são similares aos reportados por Marotti *et al* (2017) referentes a determinação do valor de pH ótimo para atuação de lipases ligadas ao micélio de *P. italicum*, *P. janthinellum* e *P. purpurogenum*. Na faixa de variação de pH entre 4 a 8, os autores verificaram que o valor ótimo de atividade se encontrava entre 6 e 7,5, porém, com queda acentuada na atividade, alcançando um valor residual menor que 30%, quando empregado valores de pH mais ácidos ou básicos.

5.4.2 Determinação da temperatura ótima de atuação das lipases

Para a determinação da temperatura ótima de atuação da lipase selecionada, variou-se a temperatura de incubação entre 20 a 60 °C, empregando como substrato emulsão de azeite de oliva com solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, conforme metodologia descrita no item 4.3.9. Neste ensaio foi empregada solução tampão de pH 7,5, identificado como melhor pH para ambas as lipases. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.6 e sumarizados na Tabela 5.9.

Na Figura 5.6 A, verifica-se que a lipase de *M. circinelloides* obtida em meio contendo azeite de oliva apresentou o valor mais elevado de atividade lipolítica ($\cong 275 \text{ U g}^{-1}$) na faixa de temperatura entre 40 a 50 °C, enquanto a lipase cultivada em soro de queijo revelou atividade máxima ($\cong 190 \text{ U g}^{-1}$) em faixa ampliada de temperatura, isto é, entre 40 a 60 °C (Figura 5.6 B).

Figura 5.6 - Influência da temperatura na atividade hidrolítica das lipases ligadas ao micélio de *M. circinelloides* obtida em cultivo contendo azeite de oliva (A) e soro de queijo (B)



Fonte: Própria autora.

Tabela 5.9 - Faixas de temperatura de atuação das lipases de *M. circinelloides* cultivadas em diferentes meios

Lipase	Temperatura ótima de atuação
A (controle)	40 a 50 °C
B	40 a 60 °C

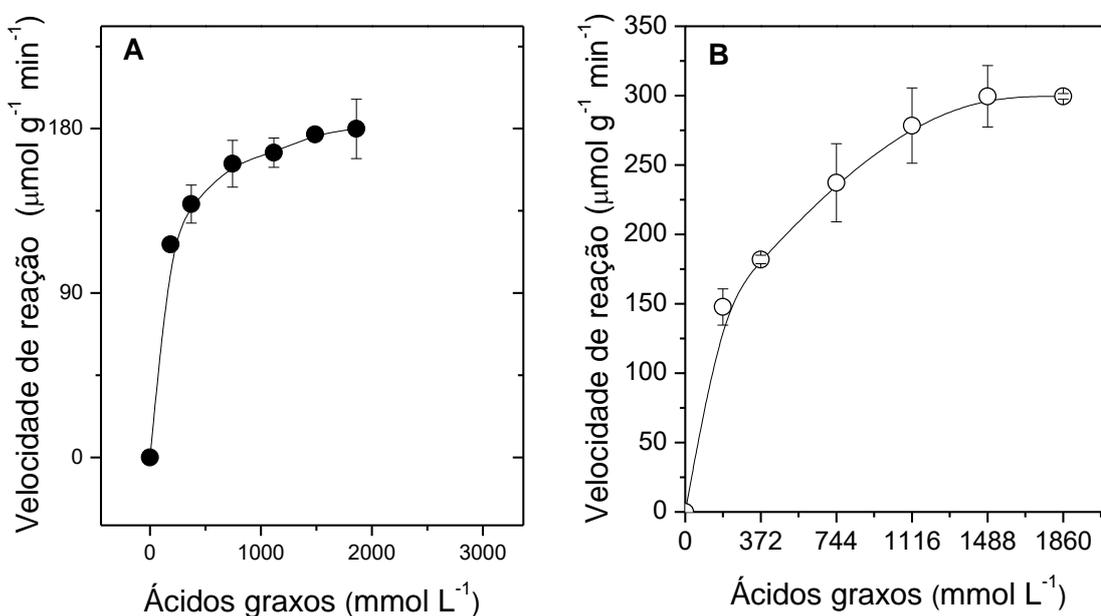
Fonte: Própria autora.

5.4.3 Parâmetros cinéticos das lipases de *M. circinelloides*

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de reação hidrolítica das lipases de *M. circinelloides* cultivadas em meio contendo diferentes fontes de carbono (azeite de oliva ou soro de queijo), variou-se a porcentagem do azeite na emulsão na faixa de 5 a 50% (v/v), correspondendo a concentrações em ácidos graxos entre 186 a 1860 mmol L⁻¹. Os ensaios foram conduzidos no valor de pH ótimo (7,5) para cada preparação de lipase, na temperatura de 40 °C, com adição de 0,1 g (seco) de massa micélio. A Figura 5.6 apresenta as curvas de saturação do substrato para as lipases, indicando que o aumento na concentração de ácido graxo no substrato de 186 para 1116 mmol L⁻¹ resultou em incrementos significativos nas velocidades de reação para ambas as preparações de lipase ensaiadas. Para concentrações de substrato superiores a 1488 mmol L⁻¹, a velocidade de formação dos produtos tornou-se essencialmente

independente da concentração do substrato, seguindo uma cinética do tipo Michaelis-Menten.

Figura 5.6 - Influência da concentração do substrato na atuação das lipases ligadas ao micélio de *M. circinelloides* cultivadas em meios contendo azeite de oliva (A) e soro de queijo (B)



Fonte: Própria autora.

Os dados obtidos foram linearizados utilizando o sistema gráfico de Lineweaver-Burk, conforme apresentado no APÊNDICE C, demonstrando assim ser uma cinética Michaeliana. Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram calculados com o auxílio do programa Origin Pro 8, e podem ser observados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima de reação (V_{max}) das lipases de *M. circinelloides* determinadas de acordo com o sistema gráfico de Lineweaver-Burk

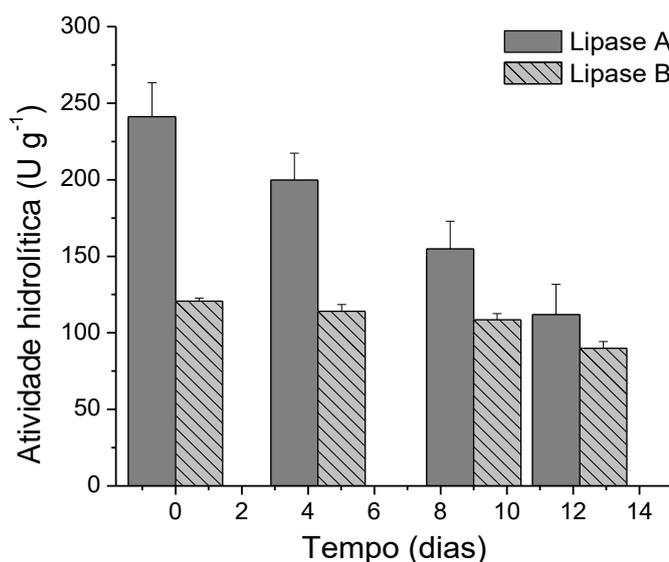
Lipase	K_m (mmol L ⁻¹)	V_{max} (µmol g ⁻¹ min ⁻¹)
A (controle)	248,72	308,64
B	115,74	186,92

Fonte: Própria autora.

5.4.4 Estabilidade das lipases ligadas ao micélio à estocagem

O ensaio de estabilidade a estocagem avaliou a capacidade das lipases manterem sua atividade hidrolítica após refrigeração (4 °C). As lipases foram armazenadas e quantificadas quanto à atividade hidrolítica de acordo com o item 4.3.9. Os micélios foram armazenado por 12 dias e os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.7.

Figura 5.7 - Atividade hidrolítica das lipases produzida a partir do meio de controle (lipase A) e do soro de queijo (lipase B) por 12 dias sob refrigeração

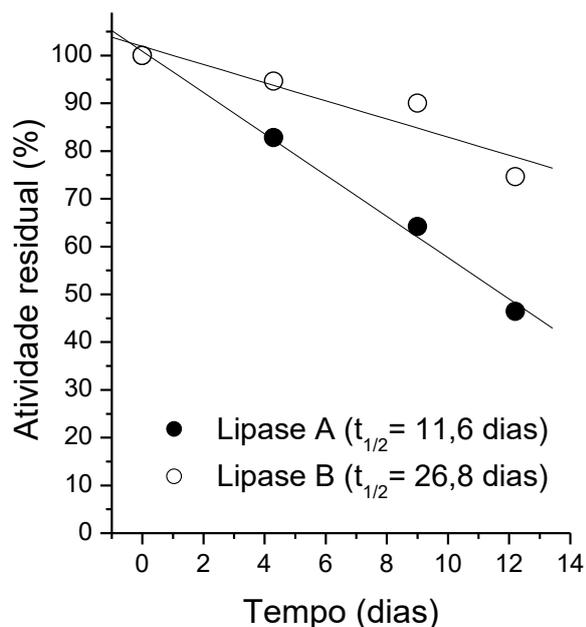


Fonte: Própria autora.

Nota-se que a lipase B apresenta menor perda de atividade hidrolítica ao longo do tempo. De acordo com a Figura 5.8, o tempo de meia-vida da lipase B foi de 26,8 dias, enquanto o tempo de meia-vida da lipase A foi de apenas 11,6 dias.

A lipase B, por ser obtida a partir de meio apresentando baixo custo como matéria-prima, foi escolhida para as aplicações biotecnológicas do soro de queijo previstas neste trabalho: hidrólise de lipídios e tratamento (prévio e simultâneo) no processo de digestão anaeróbia do soro de queijo. As aplicações foram avaliadas considerando as propriedades bioquímicas e cinéticas das lipases, sumarizadas na Tabela 5.11.

Figura 5.8 - Atividade residual e tempo de meia vida das lipases A (cultivada com azeite de oliva) e B (cultivada com soro de queijo)



Fonte: Própria autora.

Tabela 5.11 - Principais características das lipases do fungo *M. circinelloides* produzidas em azeite de oliva (lipase A) e soro de queijo (lipase B)

Parâmetro	Lipase A (controle)	Lipase B (soro de queijo)
pH	7,0 a 8,0	7,5
Temperatura (°C)	40 a 50	40 a 60
Km (mmol L ⁻¹)	248,72	115,74
V _{máx} (μmol g ⁻¹ min ⁻¹)	308,64	186,92
t _{1/2} de estocagem (d)	11,6	26,8

Fonte: Própria autora.

5.5 Aplicações biotecnológicas do soro de queijo empregando lipase ligada ao micélio produzida com soro integral

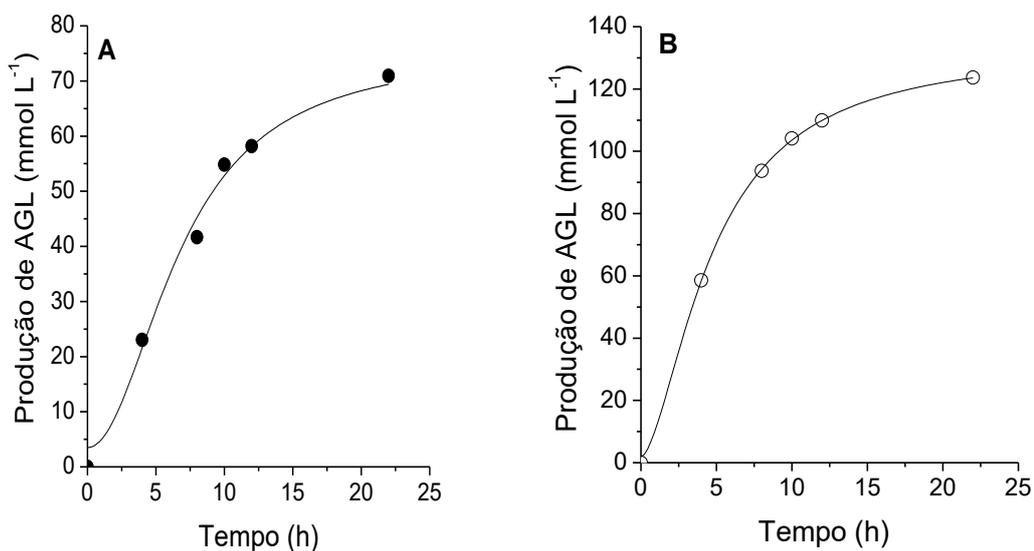
5.5.1 Hidrólise de substratos lipídicos

Tomando por base as propriedades bioquímicas e cinéticas das lipases descritas nas seções anteriores, foram realizados testes com o objetivo de verificar o desempenho da lipase de *M. circinelloides* cultivada em soro de queijo (lipase B)

em reações de hidrólise de óleos e gorduras. Foram avaliados dois substratos lipídicos: o soro de queijo e a emulsão de óleo de palma.

A avaliação foi realizada pela reação de hidrólise de 50 mL dos meios reacionais, com agitação mecânica de 600 rpm. A massa de micélios adicionada correspondeu a 150 unidades de atividade. Os resultados obtidos (Figura 5.9) mostram que hidrólise do soro de queijo apresentou resultados similares às melhores condições encontradas no planejamento de experimentos descrito no item 5.2 (22% maior que os experimentos que utilizaram o mesmo carregamento de lipase ligada ao micélio). Quanto à formação de ácidos graxos livres na hidrólise do óleo de palma (Figura 5.10 B), observa-se valor máximo de 120 mmol L^{-1} , que corresponde a um grau de hidrólise incompleto da ordem de 41,4%, provavelmente em função do baixo carregamento de atividade utilizado para o teor de lipídios presente na emulsão.

Figura 5.9 - Hidrólise do soro de queijo (A) e do óleo de palma (B) por lipase ligada ao micélio de *Mucor circinelloides*

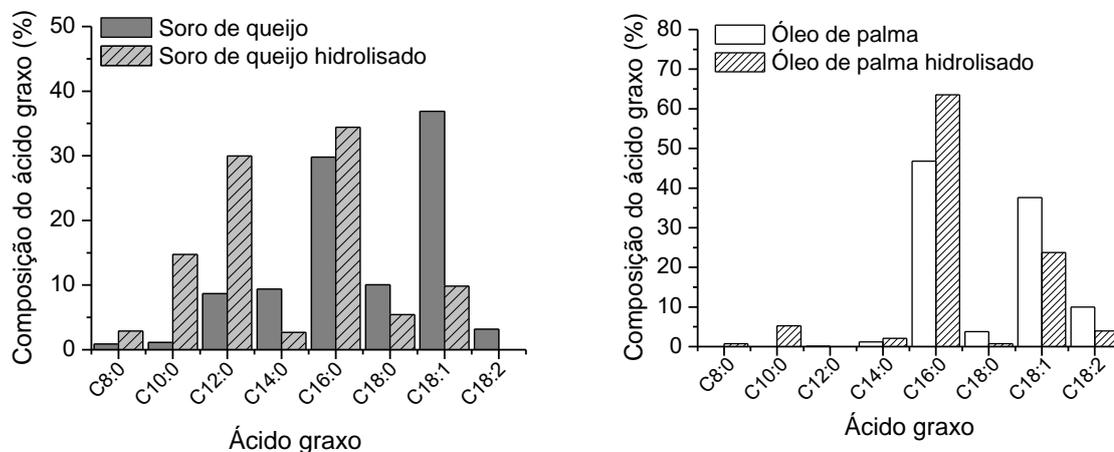


Fonte: Própria autora.

Os hidrolisados obtidos foram analisados quanto à sua composição em ácidos graxos e os resultados estão presentes na Figura 5.10. Observa-se que nas amostras obtidas a partir de ambos, soro de queijo e óleo de palma, os teores de ácidos graxos de baixa massa molecular (C16:0 ou menores) são mais elevados

que nas amostras não hidrolisadas. Isso indica a preferência da lipase de *M. circinelloides* cultivada em soro de queijo por ácidos graxos de cadeias menores.

Figura 5.10 - Perfil de ácidos graxos do soro de queijo e do óleo de palma antes e depois da hidrólise enzimática



Fonte: Própria autora.

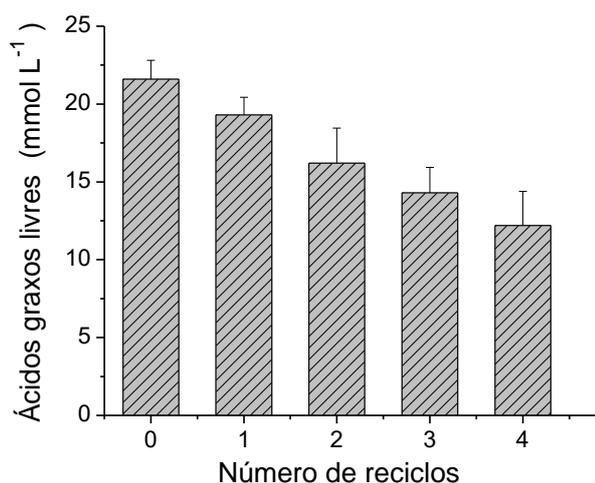
5.5.1.1 Estabilidade operacional da lipase ligada ao micélio do fungo *M. circinelloides*

A potencialidade de reutilização em ensaios sucessivos com reciclo do biocatalisador (lipase ligada ao micélio do fungo *M. circinelloides* cultivado em soro de queijo, lipase B) foi avaliada, conforme descrito no item 4.2.6.

A Figura 5.11 mostra o perfil de formação dos ácidos graxos formados ao longo de cinco reações de hidrólises sucessivas de 12 h cada. Verifica-se que a formação de ácidos graxos foi reduzida gradativamente em cada ciclo efetuado, sendo estimado tempo de meia-vida, ou seja, o tempo necessário para que o biocatalisador apresente metade da atividade hidrolítica, em 53,85 h, conforme mostrado na Figura 5.12.

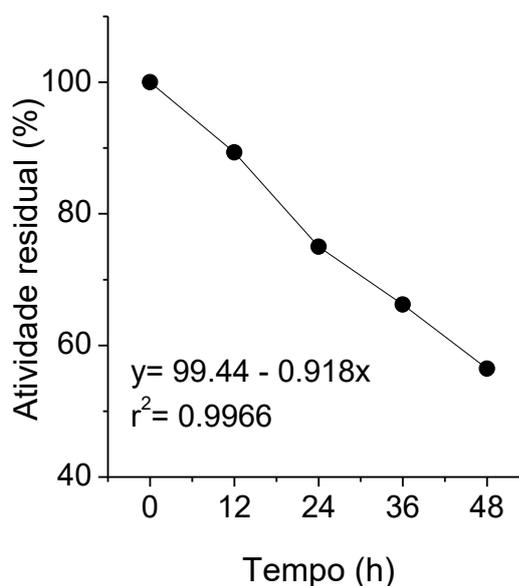
É importante destacar que a redução do desempenho do biocatalisador nas bateladas consecutivas foi devida não só a perda de atividade, como também da massa do biocatalisador em cada reciclo, conforme foi constatado pela análise do biocatalisador recuperado ao final do quarto reciclo.

Figura 5.11 - Hidrólise do soro de queijo em bateladas consecutivas com reciclo do biocatalisador



Fonte: Própria autora.

Figura 5.12 - Estabilidade operacional da lipase ligada ao micélio em reações de hidrólise do soro de queijo



Fonte: Própria autora.

Com relação à massa do biocatalisador ao final dos 4 ciclos efetuados foi constatada a perda de 30% da massa originalmente utilizada, o que correspondente a redução da massa de biocatalisador da ordem de 7,5% por ciclo. Quanto à

atividade hidrolítica, foi também verificada perda total de 36,7%, correspondendo à redução de 7,3% por ciclo.

Desta forma, é possível prever que a estabilidade do biocatalisador possa ser melhorada se for adotado um sistema de recuperação de biocatalisador mais eficiente que o usado no presente estudo, como por exemplo, reator de cesta, que garante total recuperação do biocatalisador entre os reciclos.

5.5.2 Potencial de biodegradabilidade do soro de queijo por digestão anaeróbia

O potencial de geração de biogás foi analisado por meio da AME (AQUINO *et al.*, 2007), que consistiu na digestão anaeróbia do soro de queijo durante 28 dias no sistema descrito e esquematizado no item 4.2.7 e ilustrado na Figura 5.13. Foram realizados três ensaios com duplicata, consistindo de 250 mL de substrato inoculados com 50 mL de lodo anaeróbio.

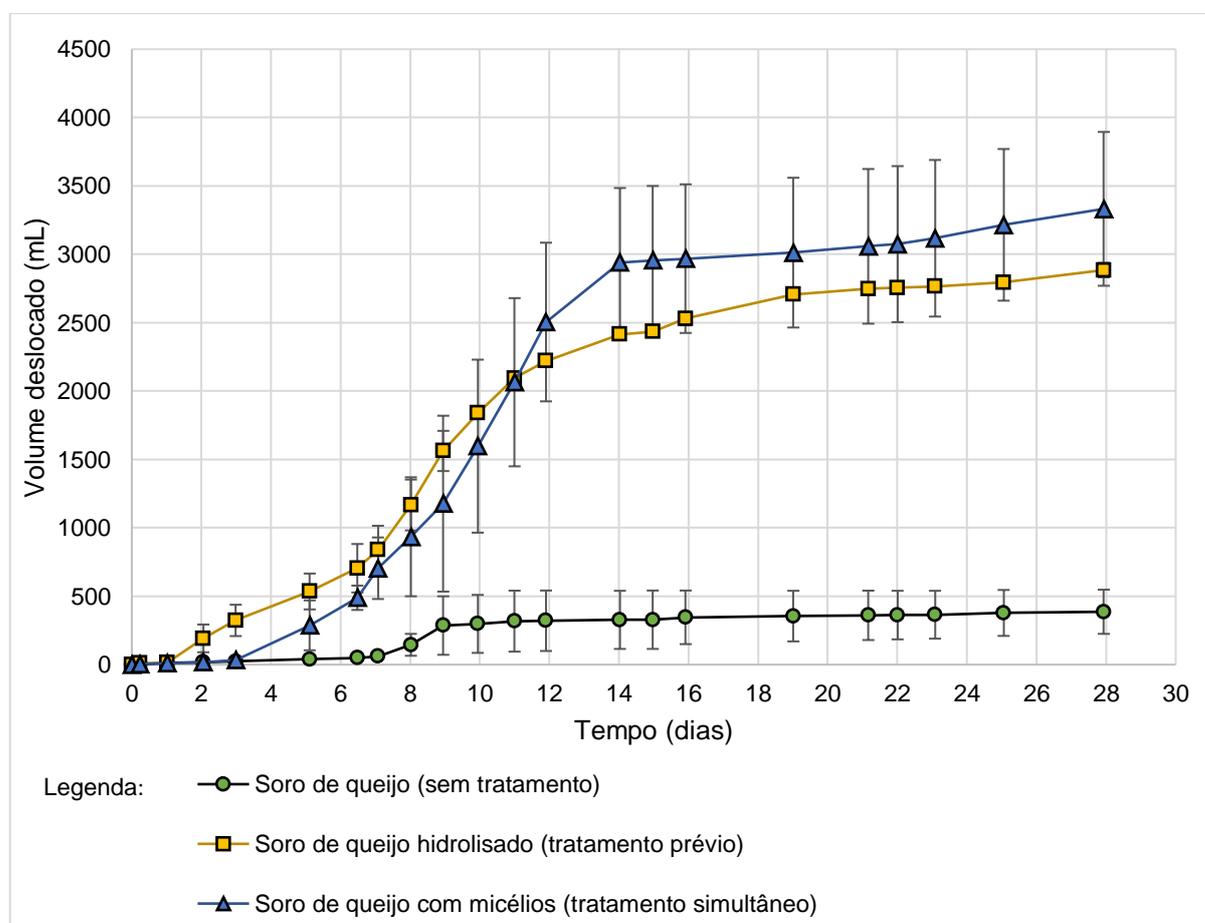
Figura 5.13 - Aparato experimental na análise da atividade metanogênica específica



Fonte: Própria autora.

Com base no fato de que a etapa de hidrólise de compostos lipídicos é limitante na digestão anaeróbia (KAFLE; CHEN, 2016), três substratos (em duplicata) foram avaliados: soro de queijo *in natura*, soro de queijo previamente hidrolisado (com remoção da lipase ligada ao micélio utilizada no pré-tratamento) e soro de queijo inoculado com lipase (avaliando o tratamento enzimático simultâneo à digestão). Nos tratamentos enzimáticos foi utilizada uma unidade de atividade por grama de substrato, ou seja, 250 U. A lipase selecionada foi a lipase obtida no cultivo do fungo *M. circinelloides* em soro de queijo, com 153,73 U g⁻¹ de atividade com 61,19% de umidade. O perfil de deslocamento da solução de NaOH pode ser observado na Figura 5.14 e estão presentes, na íntegra, no APÊNDICE D.

Figura 5.14 - Medição indireta do volume de gás metano produzido na digestão anaeróbia



Fonte: Própria autora.

Observa-se que o soro de queijo integral apresentou produção de metano severamente reduzida (volume máximo 387 mL, em média) se comparada com os meios tratados prévia e simultaneamente (médias de produção máxima de metano de 2885 e 3333 mL, respectivamente). Considerando o emprego do substrato previamente tratado (soro de queijo hidrolisado), a redução na fase *lag* é ressaltada. No caso do tratamento simultâneo, apesar da redução na fase *lag* não ser tão acentuada, a adição de micélios concomitantemente à digestão anaeróbia proporcionou os valores mais elevados de produção de metano.

Os resultados obtidos nos testes de biodegradabilidade foram ajustados de acordo com a equação de Gompertz modificada para determinação dos parâmetros: taxa de produção máxima de metano, produção máxima de metano e tempo da fase de adaptação (fase *lag*) (ALVES *et al.*, 2019). Os parâmetros calculados por esse ajuste podem ser observados na Tabela 5.12.

O tratamento prévio do soro de queijo proporcionou um aumento de cerca de 8 vezes na produção máxima de metano e redução de 43,7% da fase *lag* com relação ao soro não tratado, que apresentou um tempo de adaptação de 6,34 dias conforme o modelo. Apesar do tratamento simultâneo ter apresentado produção máxima de metano (em 9 vezes), a redução da fase *lag* foi de apenas 11,4% de acordo com o ajuste.

Tabela 5.12 - Parâmetros modificados do modelo de Gompertz dos ensaios de digestão anaeróbia do soro de queijo

	Produção total de metano (mL)	Taxa de produção máxima de metano (mL h ⁻¹)	Fase <i>lag</i> da produção de metano (d)
Soro não tratado	355,60	99,65	6,34
Soro tratado previamente	2828,49	283,32	3,57
Soro tratado simultaneamente	3203,35	406,10	5,62

Fonte: Própria autora.

A digestão anaeróbia proporcionou discreta degradação da matéria orgânica, que correspondeu à redução de cerca de 30% da DQO em todos os ensaios. O soro *in natura* e o lodo anaeróbico apresentaram DQO de 94470 e

41710 mg O₂ g⁻¹ respectivamente. Após o processo de digestão anaeróbia, o soro *in natura*, o soro hidrolisado e o soro com micélio apresentaram DQO de 62793, 58293 e 62876 mg O₂ g⁻¹, respectivamente. Esperava-se uma redução maior da DQO nos ensaios onde o tratamento enzimático foi aplicado, contudo, a adição de micélios não foi levada em consideração no cálculo da DQO inicial e pode ter contribuído com a liberação de matéria orgânica no meio reacional. Ainda assim, o tratamento enzimático se mostrou como uma solução em potencial para a transformação do soro de queijo em produtos de maior valor agregado.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo avaliar opções de valorização do soro de queijo. Para tanto, optou-se pelo emprego de células íntegras de fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium* e *Mucor* com elevada atividade hidrolítica em reações de hidrólise e digestão anaeróbia. Os resultados obtidos foram promissores e, com base nos dados relatados neste trabalho, concluiu-se que:

- ✓ Os fungos selecionados foram capazes de produzir lipases ligadas ao micélio com elevada atividade lipolítica, com destaque para o *M. circinelloides* (268,2 U g⁻¹), seguido do *P. jantinelum* (218,6 U g⁻¹) e *P. italicum* (146,6 U g⁻¹).
- ✓ Com base nos parâmetros selecionados da análise do planejamento as condições adequadas para hidrólise do soro de queijo foram estabelecidas em: lipase ligada ao micélio de *M. circinelloides*, 350 U de atividade, pH_{inicial} 9,0 e 37 °C). No experimento confirmatório, foi constatada a produção de 77,37 mmol L⁻¹ de ácidos graxos livres.
- ✓ O soro de queijo apresentou bom potencial como meio de cultivo do fungo *M. circinelloides* para produção de lipase ligada ao micélio, sendo constatado propriedades bioquímicas e cinéticas similares das lipases produzidas em meio padrão (azeite de oliva).
- ✓ A lipase de *M. circinelloides* cultivada no soro de queijo foi efetiva na hidrólise de soro de queijo e óleos vegetais, apresentando preferência na clivagem da cadeia de triacilgliceróis com ácidos graxos de menor massa molecular (< C 16:0). Essa lipase também apresentou potencial de utilização em hidrólises consecutivas com reciclo, revelando tempo de meia-vida em torno de 53,8 h.
- ✓ A digestão anaeróbia do soro de queijo in natura foi lenta conforme esperado, entretanto os tratamentos com a lipase *M. circinelloides* prévio ou simultâneo a digestão anaeróbica foram opções promissoras à valorização do soro de queijo, apresentando redução na fase *lag* de até 43,7% e aumento na produção de biogás em 8 a 9 vezes.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, T.; TAUSEEF, S. M.; ABBASI, S. A. **Biogas Energy**. New York: Springer, 2012.
- ADULKAR, T. V.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1083–1089, 2014.
- ALBERTON, D. et al. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 28–35, 2010.
- ALMEIDA STREITWIESER, D. Comparison of the anaerobic digestion at the mesophilic and thermophilic temperature regime of organic wastes from the agribusiness. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 985–992, 2017.
- ALVES, A. M. et al. *Penicillium citrinum* whole-cells catalyst for the treatment of lipid-rich wastewater. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 433–438, 2019.
- AMHA, Y. M. et al. Inhibition of anaerobic digestion processes: Applications of molecular tools. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 999–1014, 2018.
- ANDRADE, G. S. S. et al. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183–188, 2012.
- ANDRADE, G. S. S. et al. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 12, p. 2539–2548, 2014.
- AOCS. Official Method Ce 1-62. **Official Methods and Recommended Practices of The American Oil Chemists' Society**, 2004.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21st ed., Washington: American Public Health Association, 2005
- AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.
- ARAYA, K. et al. Whole cell three phase bioreactors allow for effective production of fatty acid alkyl esters derived from microalgae lipids. **Fuel**, v. 144, p. 25–32, 2015.
- BAUR, C. et al. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 23–29, 2015.
- BON, E. P. S. et al. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e**

Mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.

BOUGRIER, C.; DELGENÈS, J. P.; CARRÈRE, H. Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion. **Chemical Engineering Journal**, v. 139, n. 2, p. 236–244, 2008.

BOŽANIĆ, R.; BARUKČIĆ, I.; LISAK, K. Possibilities of whey utilisation. **Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 2, n. 7, p. 1–7, 2014.

CARRERE, H. et al. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 386–397, 2016.

CARVALHO, A. K. F. et al. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. **Industrial Crops and Products**, 2013.

CARVALHO, A. K. F. et al. Performance of whole-cells lipase derived from *Mucor circinelloides* as a catalyst in the ethanolysis of non-edible vegetable oils under batch and continuous run conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 287–294, 2015.

CARVALHO, A. K. F. et al. Sustainable enzymatic approaches in a fungal lipid biorefinery based in sugarcane bagasse hydrolysate as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 269–275, 2019.

CHATZIPASCHALI, A. A.; STAMATIS, A. G. Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. **Energies**, v. 5, n. 9, p. 3492–3525, 2012.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource technology**, v. 99, n. 10, p. 4044–64, 2008.

CÓRDOVA, O. et al. Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2806–2813, 2018.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. de; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85–96, 2017.

DA SILVA, D. F. et al. Physical and functional properties of cheese powders affected by sweet whey powder addition before or after spray drying. **Powder Technology**, v. 323, p. 139–148, 2018.

DE CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

DHEEMAN, D. S. et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3–4, p. 256–262, 2011.

DOMINGUES, R. F. et al. Effect of enzymatic pretreatment on the anaerobic digestion of milk fat for biogas production. **Food Research International**, v. 73, p. 26–30, 2015.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Anuário Leite: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite>. Acesso em: 04 abr. 2019.

ESCALANTE-HERNÁNDEZ, H. et al. Feasibility of the anaerobic digestion of cheese whey in a Plug Flow Reactor (PFR) under local conditions. **Ingeniería, investigación y tecnología**, v. 18, p. 264–277, 2017.

ESCALANTE, H. et al. Anaerobic digestion of cheese whey: Energetic and nutritional potential for the dairy sector in developing countries. **Waste Management**, v. 71, p. 711–718, 2018.

FAO. **Milk and dairy products in human nutrition**. Rome: FAO, 2013.

FAO. **Milk Total Data**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#search/milk-total>. Acesso em: 4 abr. 2019.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese: An Overview. In: MCSWEENEY, P. L. H. et al. (ed.). **Cheese**. 4th. ed. San Diego: Elsevier, 2017. p. 5–21.

FREITAS, A. et al. Taguchi Method Applied to Environmental Engineering. In: SILVA, M. B. (ed.). **Design of Experiments - Applications**. 1st. ed. Rijeka: InTech, 2013. p. 120.

GANJU, S.; GOGATE, P. R. A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. **Journal of Food Engineering**, v. 215, p. 84–96, 2017.

GIROTTI, F.; ALIBARDI, L.; COSSU, R. Food waste generation and industrial uses: A review. **Waste Management**, v. 45, p. 32–41, nov. 2015.

GULDHE, A. et al. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. **Renewable Energy**, v. 85, p. 1002–1010, 2016.

GUO, X. M. et al. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 19, p. 10660–10673, 2010.

GUPTA, R. et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57,

p. 40–54, jan. 2015.

HARRIS, P. W.; MCCABE, B. K. Review of pre-treatments used in anaerobic digestion and their potential application in high-fat cattle slaughterhouse wastewater. **Applied Energy**, v. 155, p. 560–575, 2015.

IBGE. **PPM - Pesquisa Pecuária Municipal**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/74>. Acesso em: 4 abr. 2019.

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. Valparaiso: Springer Science, 2008.

INYANG, M. et al. Biochar from anaerobically digested sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8868–8872, 2010.

JHA, P.; SCHMIDT, S. Reappraisal of chemical interference in anaerobic digestion processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 954–971, 2017.

KAFLE, G. K.; CHEN, L. Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manures and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models. **Waste Management**, v. 48, p. 492–502, 2016.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KHANAL, S. K. **Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production**. Singapore: Wiley-Blackwell, 2009.

KIM, M. S.; KIM, D. H.; YUN, Y. M. Effect of operation temperature on anaerobic digestion of food waste: Performance and microbial analysis. **Fuel**, v. 209, p. 598–605, 2017.

KONDUSAMY, D.; KALAMDHAD, A. S. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production – A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1821–1830, 2014.

KYEONG, J. S.; YEOM, S. H. Preparation of immobilized whole cell biocatalyst and biodiesel production using a packed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 11, p. 2189–2198, 2014.

LEAL, M. C. M. R. et al. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1173–1178, 2006.

LI, N.; ZONG, M. H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 43–54, 2010.

LI, S. et al. Technology prospecting on Enzymes: Application, Marketing and

Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2012.

LOO, J. L. et al. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Geotrichum candidum*. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8556–8570, 2014.

MAROTTI, B. S. et al. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**, v. 40, n. 4, p. 427–435, 2017.

MASOTTI, F. et al. Technological tools to include whey proteins in cheese: Current status and perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 64, p. 102–114, 2017.

MENDES, A. A. **Avaliação da biodegradabilidade de efluentes com alto teor de lipídios previamente tratados com enzimas hidrolíticas**. 2004. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena/SP, 2004.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F. Biodegradação de Águas Residuárias de Laticínios Previamente Tratadas por Lipases. **Brazilian journal of food technology**, v. 9, n. 2, p. 143–149, 2006.

MENG, Y. et al. Enhancing anaerobic digestion performance of crude lipid in food waste by enzymatic pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 48–55, 2017.

MOBARAK-QAMSARI, E. et al. Enzymatic pre-hydrolysis of high fat content dairy wastewater as a pretreatment for anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Research**, v. 6, n. 2, p. 475–480, 2012.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 5th. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

MONTGOMERY, D. C. **Introduction to Statistical Quality Control**. 7th. ed. New York: John Wiley & Sons, 2012.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. São Paulo: Varela, 1998.

MORIN-SARDIN, S. et al. *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 12–32, 2017.

NALEPA, B.; OLSZEWSKA, M. A.; MARKIEWICZ, L. H. Seasonal variances in bacterial microbiota and volatile organic compounds in raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 267, p. 70–76, 2018.

NIZAMI, A. S. Anaerobic digestion: Processes, Products, and Applications. In: CARUANA, D. J.; OLSEN, A. E. (ed.) **Potential of Activated Sludge Utilization**.

New York: Nova Science, 2012. p. 133–147.

NOUROOZ-ZADEH, J.; APPELQVIST, L. Å. Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Butter and cheese. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 10, p. 1635–1641, 1988.

PANESAR, P. S. et al. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 1–14, 2007.

PAUDEL, S. R. et al. Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: Current state and challenges. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1194–1205, 2017.

PETERS, R. H. Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6–9, p. 537–545, 2005.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48–68, 2012.

REN, Y. et al. A comprehensive review on food waste anaerobic digestion: Research updates and tendencies. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1069–1076, 2018.

ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 861–866, 2007.

ROSA, D. R. et al. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6170–6176, 2009.

RUFFINO, B. et al. Improvement of anaerobic digestion of sewage sludge in a wastewater treatment plant by means of mechanical and thermal pre-treatments: Performance, energy and economical assessment. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 298–308, 2015.

SARMAH, N. et al. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 1, p. 5–28, 2018.

SASSI, H. P. et al. Comparative survival of viruses during thermophilic and mesophilic anaerobic digestion. **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 15–19, 2018.

SETH, S. et al. An insight into plant lipase research – Challenges encountered. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 13–21, 2014.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 1–11, 1996.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695–704, 2008.

SNYDER, A. B.; CHUREY, J. J.; WOROBO, R. W. Characterization and control of *Mucor circinelloides* spoilage in yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 228, p. 14–21, 2016.

SOLARTE, C. et al. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 78–83, 2014.

SOUZA, H. J. C. de et al. Robust Design and Taguchi Method Application. In: SILVA, M. B. (ed.). **Design of Experiments - Applications**. 1st. ed. Rijeka: InTech, 2013. p. 120.

STREITWIESER, D. A. Comparison of the anaerobic digestion at the mesophilic and thermophilic temperature regime of organic wastes from the agribusiness. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 985–992, 2017,

TAVARES, T.; MALCATA, F. X. Whey and Whey Powders: Fermentation of Whey. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 486–492, 2015.

TETRA PAK DAIRY INDEX. **Um equilíbrio global: oferta e demanda de produtos lácteos**. Lausanne: Tetra Pak International SA, 2014. .

VASCO-CORREA, J. et al. Anaerobic digestion for bioenergy production: Global status, environmental and techno-economic implications, and government policies. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1015–1026, 2018.

WACHTMEISTER, J.; ROTHER, D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 169–177, 2016.

WANG, J.; WAN, W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 1, p. 235–244, 2009.

XIAO, B. et al. Temperature-phased anaerobic digestion of food waste: A comparison with single-stage digestions based on performance and energy balance. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 826–834, 2018.

XU, F. et al. Anaerobic digestion of food waste – challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1047–1058, 2017.

YADAV, J. S. S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology**

Advances, v. 33, n. 6, p. 756–774, 2015.

ZHANG, C. et al. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 38, p. 383–392, 2014.

ZHANG, Q.; HU, J.; LEE, D.-J. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. **Renewable Energy**, v. 98, p. 108–119, 2016.

ZHEN, G. et al. Overview of pretreatment strategies for enhancing sewage sludge disintegration and subsequent anaerobic digestion: Current advances, full-scale application and future perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 69, p. 559–577, 2017.

APÊNDICE A: Avaliação da flora microbiana do soro de queijo

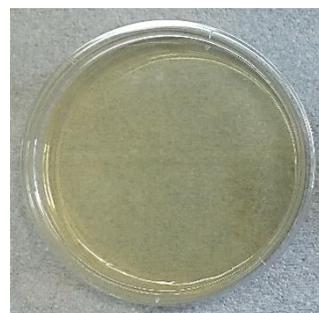
Considerando que o soro de queijo é um meio rico em nutrientes, as amostras foram inoculadas em meio sólido (PDA) utilizando placas de Petri, sendo mantidas a 30 °C por 48 h (Figura A.1) para atestar a presença de microrganismos. Foram utilizadas três amostras para a inoculação:

- Soro de queijo caseiro congelado por três meses;
- Soro de queijo caseiro fresco (coletado no dia da inoculação);
- Soro de queijo caseiro autoclavado a 0,5 kgf/cm² durante 15 minutos.

Figura A. 1 - Crescimento de bactérias pela inoculação de diferentes soros em ágar batata dextrose (48 h)



(a) Controle (ágar batata dextrose)



(b) Soro autoclavado



(c) Soro caseiro refrigerado



(d) Soro caseiro fresco

Fonte: Própria autora.

Foi observado crescimento bacteriano nas amostras (c) e (d), contendo soro caseiro refrigerado e fresco, respectivamente. Pode-se observar a presença mais significativa de microrganismos na amostra (d), mas a presença de microrganismos na amostra (c) indica que o soro de queijo possui culturas microbianas resistentes ao congelamento. A atividade hidrolítica do soro de queijo caseiro foi medida conforme o procedimento descrito no item 4.3.9 (utilizando 1,0 g de soro de queijo),

e foi concluído que o soro possui atividade hidrolítica (22 U g^{-1}) muito menor que a do micélio (223 U g^{-1} em média).

Dados descritos na literatura abrangem o estudo dos microrganismos no leite cru (e, conseqüentemente, no soro de queijo). Baur *et al.* (2015) isolaram 231 espécies de microrganismos presentes em 20 amostras de leite, provenientes de laticínios e fazendas, nas quais 11 espécies apresentavam atividade hidrolítica. O tipo e número de microrganismos variam sazonalmente e encontram no leite um ambiente ideal para crescimento, pelo seu alto valor nutricional, alta atividade de água e pH relativamente neutro. Esses microrganismos podem contaminar o leite pelo ar, solo, água, alimentação, equipamento de ordenha, teta da vaca e outros fatores (BAUR *et al.*, 2015; NALEPA; OLSZEWSKA; MARKIEWICZ, 2018).

APÊNDICE B: Seleção das melhores condições de hidrólise pelo método de Taguchi

Experimento 1

O primeiro experimento consistiu na hidrólise de soro de queijo com ajuste do pH_{inicial} em 7,0, empregando solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹. A temperatura foi fixada em 30 °C e a lipase utilizada era proveniente do fungo *P. janthinellum*. O carregamento de lipase foi de 70 U, o que correspondeu a 0,57 g de micélios com 237,56 U g⁻¹ de atividade e 48,27% de umidade.

Tabela A. 1 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 1 da matriz L9 de Taguchi)

Tempo (h)	Controle			Reação		
	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)
0	6,9	12,69	-	6,7	19,61	-
4	6,3	16,55	3,87	5,6	30,02	10,41
8	5,3	24,42	11,73	4,5	52,96	33,36
12	4,3	34,96	22,27	4,0	52,95	33,34
24	4,0	42,28	29,60	4,0	52,36	32,76

Fonte: Própria autora.

Experimento 2

O segundo experimento consistiu na hidrólise do soro de queijo com ajuste do pH_{inicial} em 8,0 e temperatura foi de 35 °C. O carregamento de lipase foi de 210 U proveniente do fungo *P. janthinellum*, o que correspondeu a 2,73 g de micélios com 155,11 U g⁻¹ de atividade e 50,40% de umidade.

Tabela A. 2 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 2 da matriz L9 de Taguchi)

Tempo (h)	Controle			Reação		
	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)
0	8,0	9,24	-	6,9	24,24	-
4	7,3	9,74	0,50	6,4	36,40	12,16
8	6,0	17,68	8,44	4,8	56,51	32,27
12	5,0	31,19	21,95	4,5	63,46	39,22
24	4,3	45,55	36,31	4,3	71,48	47,24

Fonte: Própria autora.

Experimento 3

O terceiro experimento consistiu na hidrólise do soro de queijo com ajuste do pH inicial em 9,0. A temperatura foi fixada em 37 °C e a lipase utilizada era proveniente do fungo *P. janthinellum*. O carregamento de lipase foi de 350 U, o que correspondeu a 2,93 g de micélios com 237,56 U g⁻¹ de atividade e 49,62% de umidade.

Tabela A. 3 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 3 da matriz L9 de Taguchi)

Tempo (h)	Controle			Reação		
	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)
0	8,7	6,84	-	8,6	31,74	-
4	8,1	7,86	1,02	5,8	57,03	25,29
8	7,1	11,36	4,52	5,1	77,68	45,93
12	4,5	31,67	24,83	4,5	98,20	66,46
24	3,9	44,78	37,94	4,0	104,77	73,03

Fonte: Própria autora.

Experimento 4

O quarto experimento foi realizado por meio da hidrólise do soro de queijo com ajuste do pH inicial em 8,0. A temperatura foi fixada em 37 °C e a lipase utilizada era proveniente do fungo *P. italicum*. O carregamento de lipase foi de 70 U, o que correspondeu a 1,06 g de micélios com 123,06 U g⁻¹ de atividade e 46,03% de umidade.

Tabela A. 4 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 4 da matriz L9 de Taguchi)

Tempo (h)	Controle			Reação		
	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)
0	8,1	13,42	-	7,6	10,37	-
4	6,7	14,60	1,18	6,0	25,89	15,52
8	5,6	25,90	12,48	4,7	47,23	36,86
12	5,0	33,77	20,35	4,4	54,91	44,54
24	4,6	45,83	32,41	4,4	59,28	48,91

Fonte: Própria autora.

Experimento 5

O quinto experimento consistiu na hidrólise do soro de queijo com ajuste do pH inicial em 9,0. A temperatura foi fixada em 30 °C e a lipase utilizada era proveniente do fungo *P. italicum*, com carregamento de lipase de 210 U, o que correspondeu a 3,17 g de micélios com 123,06 U g⁻¹ de atividade e 46,03% de umidade.

Tabela A. 5 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 5 da matriz L9 de Taguchi)

Tempo (h)	Controle			Reação		
	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)
0	8,8	7,08	-	7,1	19,25	-
4	8,4	7,73	0,65	6,6	29,15	9,90
8	8,0	7,38	0,30	5,8	47,29	28,04
12	7,3	9,66	2,58	4,7	61,96	42,71
24	4,7	35,78	28,69	4,4	81,87	62,62

Fonte: Própria autora.

Experimento 6

O segundo experimento consistiu na hidrólise do soro de queijo com ajuste do pH inicial em 7,0. A temperatura foi fixada em 35 °C e a lipase utilizada era proveniente do fungo *P. italicum*, com carregamento de lipase de 350 U, o que correspondeu a 5,28 g de micélios com 156,72 U g⁻¹ de atividade e 46,03% de umidade.

Tabela A. 6 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 6 da matriz L9 de Taguchi)

Tempo (h)	Controle			Reação		
	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)
0	6,9	13,46	-	6,4	17,90	-
4	6,4	14,36	1,29	6,2	38,57	20,67
8	6,0	19,05	5,97	5,8	48,88	30,98
12	5,5	25,96	12,89	5,1	61,55	43,65
24	4,5	38,03	24,96	4,5	71,50	53,60

Fonte: Própria autora.

Experimento 7

O sétimo experimento consistiu na hidrólise do soro de queijo com ajuste do pH inicial em 9,0. A temperatura foi fixada em 35 °C e a lipase utilizada era proveniente do fungo *M. circinelloides*. O carregamento de lipase foi de 70 U, o que correspondeu a 0,45 g de micélios com 246,78 U g⁻¹ de atividade e 36,28% de umidade.

Tabela A. 7 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 7 da matriz L9 de Taguchi)

Tempo (h)	Controle			Reação		
	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)
0	9,0	5,46	-	8,6	8,18	-
4	8,7	5,81	0,36	7,9	12,10	3,92
8	8,5	6,04	0,58	7,0	15,12	6,94
12	8,4	6,12	0,66	6,0	23,56	15,38
24	7,2	10,36	4,90	4,8	55,07	46,89

Fonte: Própria autora.

Experimento 8

O oitavo experimento consistiu na hidrólise do soro de queijo com ajuste de pH inicial em 7,0. A temperatura foi fixada em 37 °C e a lipase utilizada era proveniente do fungo *M. circinelloides*. O carregamento de lipase foi de 210 U, o que correspondeu a 1,34 g de micélios com 246,78 U g⁻¹ de atividade e 36,28% de umidade.

Tabela A. 8 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 8 da matriz L9 de Taguchi)

Tempo (h)	Controle			Reação		
	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)
0	6,8	13,74	-	6,4	21,57	-
4	6,5	14,26	0,14	6,5	32,01	10,44
8	5,9	19,35	5,23	5,9	39,63	18,06
12	5,2	27,41	13,29	5,2	63,68	42,11
24	4,7	40,06	25,94	4,7	86,82	65,25

Fonte: Própria autora.

Experimento 9

O nono experimento consistiu na hidrólise do soro de queijo com ajuste do pH inicial em 8,0. A temperatura foi fixada em 30 °C. O carregamento de lipase proveniente do fungo *M. circinelloides* foi de 350 U, o que correspondeu a 2,23 g de micélios com 246,78 U g⁻¹ de atividade e 36,28% de umidade.

Tabela A. 9 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento 9 da matriz L9 de Taguchi)

Tempo (h)	Controle			Reação		
	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)
0	8,1	8,19	-	6,7	22,73	-
4	7,5	8,88	0,33	6,2	28,57	5,84
8	7,2	10,30	1,75	6,0	42,01	19,28
12	6,4	14,67	6,12	5,8	57,02	34,30
24	4,7	33,21	24,66	4,8	72,59	49,86

Fonte: Própria autora.

Experimento confirmatório da melhor condição de hidrólise do soro de queijo catalisado com lipases

A confirmação das melhores condições experimentais (*M. circinelloides*, 350 U, pH_{inicial} 9,0 e 37 °C), consistiu na hidrólise do soro de queijo até 48 h, ajustado nas condições selecionadas. O carregamento de lipase correspondeu a 2,09 g de micélios com 310,44 U g⁻¹ de atividade e 46,06% de umidade.

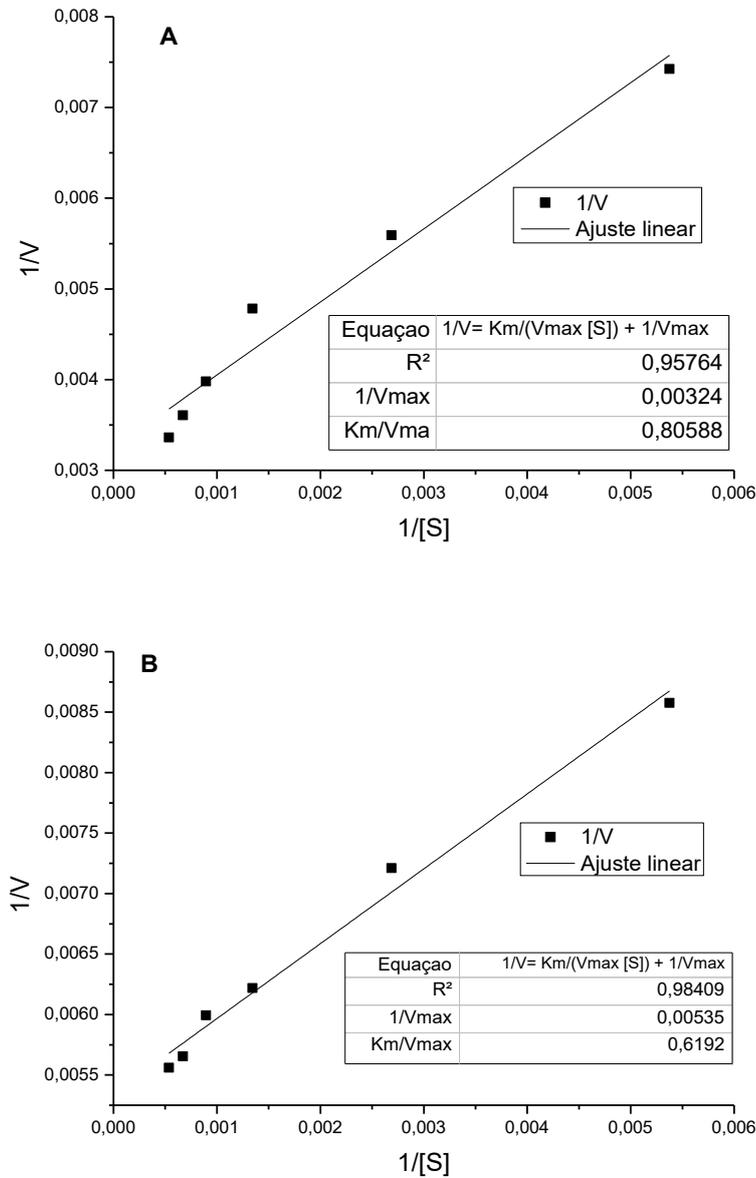
Tabela A. 10 - Resultados obtidos na hidrólise do soro de queijo (experimento confirmatório da matriz L9 de Taguchi)

Tempo (h)	Controle			Reação		
	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)	pH	AGL (mmol L ⁻¹)	Δ AGL (mmol L ⁻¹)
0	8,9	6,71	-	7,5	18,18	-
4	8,1	8,54	1,84	6,2	34,41	16,23
8	6,9	13,03	6,33	5,2	56,59	38,41
12	5,7	24,47	17,77	5,0	70,22	52,04
24	5,1	35,73	29,03	4,3	107,76	89,59
48	5,2	47,34	40,62	4,0	136,17	118,00

Fonte: Própria autora.

APÊNDICE C: Modelo de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da lipase de *M. circinelloides*

Figura A. 2 - Gráficos de linearização dos parâmetros cinéticos para as lipases produzidas com meio contendo azeite de oliva (A) e soro de queijo (B)



Fonte: Própria autora.

APÊNDICE D: Potencial de geração de biogás quantificado pela atividade metanogênica específica

Tabela A. 11 - Volume deslocado acumulado nos ensaios de digestão anaeróbia do soro de queijo

Tempo (dias)	Soro de queijo não tratado (mL)		Soro de queijo hidrolisado (mL)		Soro de queijo com adição de lipase (mL)	
0,00	0	0	0	0	0	0
0,24	3	3	12	8	5	6
1,01	5	19	17	13	11	8
2,06	10	25	49	335	21	16
2,99	17	30	162	485	39	27
5,11	34	47	350	720	105	470
6,48	47	52	455	955	400	578
7,07	63	58	589	1088	480	930
8,02	225	65	905	1430	500	1370
8,95	500	72	1355	1770	534	1820
9,94	510	86	1805	1875	965	2230
11,00	541	95	2150	2040	1450	2680
11,90	542	100	2161	2280	1925	3085
14,03	540	115	2375	2455	2395	3485
14,97	542	115	2420	2450	2413	3500
15,92	542	150	2600	2460	2425	3512
19,01	540	170	2680	2735	2465	3560
21,17	541	180	2709	2785	2493	3624
22,01	540	185	2718	2794	2504	3645
23,08	540	190	2735	2796	2545	3690
25,06	546	210	2790	2801	2661	3770
27,93	548	225	2960	2810	2770	3895

Fonte: Própria autora.