



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL

JARBAS RODRIGUES CHAVES

**BIOENSAIOS EM SORO DE LEITE DOCE COM CÉLULAS LIVRES E
IMOBILIZADAS DE *ASPERGILLUS NIGER* AN 400 PARA PRODUÇÃO DE
BIOPRODUTOS E REDUÇÃO DE POTENCIAL POLUIDOR**

FORTALEZA-CEARÁ

2015



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL

JARBAS RODRIGUES CHAVES

BIOENSAIOS EM SORO DE LEITE DOCE COM CÉLULAS LIVRES E
IMOBILIZADAS DE *ASPERGILLUS NIGER* AN 400 PARA PRODUÇÃO DE
BIOPRODUTOS E REDUÇÃO DE POTENCIAL POLUIDOR

Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa

FORTALEZA-CEARÁ

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca Waldyr Diogo de Siqueira

C512b Chaves, Jarbas Rodrigues.

Bioensaios em soro de leite doce com células livres e imobilizadas de *Aspergillus Niger* AN 400 para produção de bioprodutos e redução de potencial poluidor /. Jarbas Rodrigues Chaves - Fortaleza: IFCE, 2015.

107p.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental).
Orientador: Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva.

1. GESTÃO AMBIENTAL - DISSERTAÇÃO. 2. ASPERGILLUS NIGER. 3. SORO DE LEITE. 4. B-GALACTOSIDASE. I. Título.

CDD 363.7

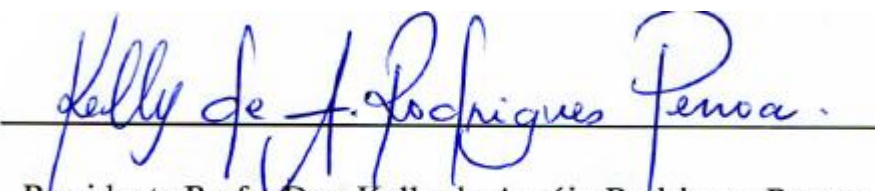
JARBAS RODRIGUES CHAVES

**BIOENSAIOS EM SORO DE LEITE DOCE COM CÉLULAS LIVRES E
IMOBILIZADAS DE *ASPERGILLUS NIGER* AN 400 PARA PRODUÇÃO DE
BIOPRODUTOS E REDUÇÃO DE POTENCIAL POLUIDOR**

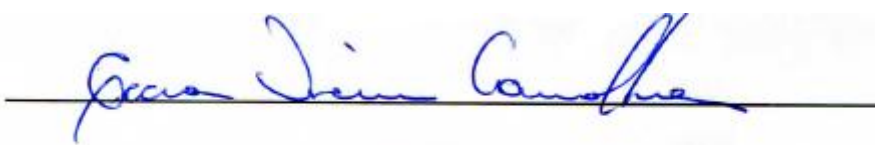
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de
Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental
do Instituto Federal do Ceará como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Tecnologia e
Gestão Ambiental.

Aprovada em 14/09/15

BANCA EXAMINADORA


Presidente Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa
IFCE Campus Fortaleza


Membro Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo
IFCE Campus Fortaleza


Membro Profa. Dra. Técia Vieira Carvalho
Parque de Desenv. Tecnológico - PADETEC

A Deus.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Gratidão eterna a Deus, por todas as oportunidades e pelas conquistas na minha vida.

Aos meus pais, que mesmo com todas as dificuldades se dedicaram incondicionalmente aos seus filhos.

À minha esposa Lusirene e ao meu filho Davi, que muitas vezes foram renunciados durante esta pesquisa.

À Professora Glória Maria Marinho Silva pela orientação, conhecimento e paciência durante a pesquisa e a elaboração deste trabalho.

À Professora Kelly Rodrigues, pelas correções e total disposição na fase de conclusão deste trabalho.

A todo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM), pelo material cedido para a realização desta pesquisa.

Ao Professor Rinaldo dos Santos Araújo e à Professora Tecia Vieira Carvalho, que participaram da banca com relevantes contribuições.

Aos colegas de mestrado, em especial a Reuben Moreira e Gizeuda Freitas, pela grande amizade e pelo apoio que ultrapassaram as atividades acadêmicas.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *campus* Fortaleza e ao Programa de Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental, por possibilitar a realização deste mestrado, extensivo a todos os professores pela dedicação na formação e capacitação dos alunos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *campus* Limoeiro do Norte, em especial a todos do Laboratório de Controle Ambiental-LCA (Bolsistas e aos Professores Doutores Heraldo Antunes e Elivânia Vasconcelos), Laboratório de Saneamento Ambiental-Labosam (Bolsistas, à Professora Hosineide Rolim e ao Técnico de laboratório e amigo Francisco Jonathan), Laboratório de Química de Alimentos (Mayra) e ao Labsat (Natanael, Esiana) por todo o suporte para realização desta pesquisa.

À Professora Dra. Ariosvana Fernandes, por todo apoio e pelo material cedido, que me auxiliou nos ensaios enzimáticos.

Aos meus amigos Professor Diego Gadelha e Fátima Freitas, pelas constantes hospedagens, sempre me recebendo de forma tão cordial e amiga.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O soro de queijo, um resíduo rico em compostos orgânicos e nitrogenados, de elevado potencial poluidor, produzido em grandes quantidades pela indústria de laticínios, foi empregado neste trabalho como substrato, usando como inóculo o fungo *Aspergillus niger* AN 400. O objetivo deste estudo foi verificar a síntese de proteína unicelular e β -galactosidase pelo fungo, avaliando a simultânea redução do potencial poluidor desse resíduo. Para isso, inicialmente realizou-se um ensaio com três tipos diferentes de soro *in natura* (doce, ácido, salgado). O efeito sobre o metabolismo fúngico das diferentes condições de pH inicial e de extrato de levedura no soro de leite foi realizado no tempo de 120 h. Posteriormente, realizaram-se ensaios em até 192 h para estudar o tempo ótimo para a produção de proteína unicelular no soro sozinho e no soro enriquecido com glicose a 0,5 % e 1,0 %. Para os ensaios da síntese enzimática empregaram-se duas formas de crescimento da cultura: dispersa na ausência e na presença de glicose (0,5 %), e imobilizada em espuma de poliuretano de 0,3 cm³. Os resultados mostraram que o pH mais favorável ao crescimento celular do fungo foi de 3,0, enquanto que a maior atividade enzimática ocorreu em pH = 3,7 (0,06 U.mL⁻¹). Durante os testes com suplementação de extrato de levedura, foi verificado o crescimento do fungo na forma filamentosa, maior rendimento celular, uma maior redução de DQO (69,57 %), elevado consumo de amônia, bem como uma maior atividade da enzima β -galactosidase (0,15 U.mL⁻¹) quando enriquecidos com 2 g.L⁻¹ de extrato de levedura. As células produzidas na faixa de pH de 3,0 a 6,0 e nas diferentes concentrações de extrato de levedura apresentaram cerca de 30 % de proteína bruta, confirmando o elevado teor proteico da biomassa deste fungo. Na avaliação do tempo ótimo para a produção de proteína unicelular, verificado no tempo reacional de 72 h, no qual apresentou cerca de 40 % de proteína bruta, houve uma redução de até 58 % da DQO no final de 8 dias, ocorrendo a remoção de amônia em mais de 90 % em dois ensaios no final de 48 h. Nos ensaios para a síntese enzimática as atividades máximas de β -galactosidase foram de 0,10 U.mL⁻¹ e 0,15 U.mL⁻¹ respectivamente no soro de leite e no soro acrescido de 0,5 % de glicose, no 5º dia, na cultura crescida livre. Na cultura imobilizada, a atividade máxima de β -galactosidase foi de 0,22 U.mL⁻¹, com remoção de compostos orgânicos de 85,2 % e açúcares redutores de 83,1%.

Palavras-chaves: Soro de leite, *Aspergillus niger*, DQO, amônia, β -galactosidase.

ABSTRACT

The whey, a residue rich in organic compounds and nitrogen, high pollution potential, produced in large quantities by the dairy industry, was used in this paper as a substrate, using as inoculum the fungus *Aspergillus niger* AN 400. The objective of this study was verify unicellular protein synthesis, and beta-galactosidase by the fungus, assessing the simultaneous reduction in the polluting potential of that residue. For this, initially, a test was carried out with three different types of serum in nature (sweet, acid, salty). The effect on the fungal metabolism in different initial pH and yeast extract in whey was conducted in time of 120 h. Subsequently, tests were carried out up to 192 hours for studying the optimum time for the production of single cell protein in serum alone and serum supplemented with 0,5 % and 1,0 % glucose. For testing of the enzymatic synthesis were employed in two forms of culture growth: dispersed in the absence and presence of glucose (0,5 %) and immobilized on polyurethane foam of 0,3 cm³. The results showed that the pH more favorable to cell growth of the fungus was 3,0, while the highest enzyme activity occurred at pH = 3,7 (0,06 U.mL⁻¹). During testing with yeast extract supplementation, was observed growth of fungus in the filamentous form, greater cell yield, a greater reduction of COD (69,57 %), high consumption of ammonia, as well as increased activity of the enzyme β -galactosidase (0,15 U.mL⁻¹) when enriched with 2,0 g.L⁻¹ yeast extract. The cells produced in the pH range from 3,0 to 6,0 and in different yeast extract concentrations showed about 30 % crude protein, confirming the high protein content of the biomass of this fungus. In the evaluation of the optimal time for the production of single cell protein, checked in reaction time of 72 h, in which presented about 40 % crude protein, there was a reduction of up to 58 % of COD at the end of 8 days, occurring ammonia removal in more than 90 % in two assays at the end of 48 h. In the assays for the enzymatic synthesis the maximum activity of beta-galactosidase were 0,10 U.mL⁻¹ and 0,15 U.mL⁻¹ respectively in whey and serum plus 0,5 % glucose on day 5, in free culture grown. The immobilized culture, the maximum activity of β -galactosidase was 0,22 U.mL⁻¹, with removal of organic compounds of 85,2 % and reducing sugars of 83,1 %.

Key words: Whey, *Aspergillus niger*, COD, ammonia, β -galactosidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da molécula de lactose.	22
Figura 2 - Reação de hidrólise enzimática da lactose pelo uso de β -galactosidase.....	26
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de <i>Aspergillus niger</i> desenvolvido em tecido de poliéster com destaque nos canais formado entre as hifas.....	31
Figura 4 - Macro (a) e micromorfologia (b) do <i>Aspergillus niger</i>	32
Figura 5 - Fluxograma da pesquisa com as etapas desenvolvidas durante a pesquisa.	40
Figura 6 - (a) Bancada para a contagem dos esporos. Microscópio óptico (I). Câmara de Neubauer e lamínula (II). Micropipetador (III). Pipeta de Pasteur (IV). Agitador vortex (V). Tubos de ensaio (VI). (b) Câmara de Neubauer com destaque dos quadrantes usados para a contagem.....	42
Figura 7 - Fluxograma representando a produção de queijos e a geração dos soros usados na etapa preliminar.	43
Figura 8 - Soro salgado (a) e soro doce (b) com <i>A. niger</i> AN 400 apresentando crescimento micelial livre.	55
Figura 9 - Morfologia exibida pelo <i>A. niger</i> AN 400 no soro proveniente da produção da ricota (segundo soro).	55
Figura 10 - Consumo de açúcar total em diferentes tipos de soro pelo <i>A. niger</i> no final de 8 dias.....	57
Figura 11 - Redução de DQO para os três diferentes soros pelo <i>A. niger</i> AN 400 no final de 8 dias.....	58
Figura 12 - (a) Resultado do crescimento celular em FSG, FS e controles da esquerda para a direita apresentando crescimento na forma de <i>pellets</i> para o meio contendo inóculo. (b) Crescimento filamentosos ocorrido no terceiro ensaio. (c) Separação por simples filtração. (d) Biomassa após secagem e maceração.....	65
Figura 13 - Crescimento celular do fungo na forma de <i>pellets</i> durante os dois primeiros ensaios (a). Crescimento do fungo na forma filamentosos durante o terceiro ensaio (b).	66
Figura 14 - Resultados de DQO para amostras controles (C) com ensaios realizados simultaneamente nas mesmas condições de FS sem a presença de inóculo.....	69
Figura 15 - Redução do potencial poluidor do soro de leite na produção de proteína para três ensaios no qual o fungo apresentou a morfologia na forma de <i>pellets</i> (ensaios 1 e 2) e na forma de micélio livre (ensaio 3).....	69

Figura 16 - Valores de DQO durante a produção de proteína na presença de glicose em 1 % (ensaios 1 e 2 com crescimento em <i>pellets</i>) e 0,5 % (ensaio 3 com crescimento filamentosos).	71
Figura 17 - Valores de pH assumidos durante o metabolismo do fungo em soro de leite adicionado de glicose a 1,0 % e 0,5 %.	72
Figura 18 - Variação da concentração de amônia durante a produção de proteína unicelular.	73
Figura 19 - Atividade enzimática de β -galactosidase de <i>A. niger</i> em crescimento disperso em soro de leite mais extrato de levedura (2 g.L ⁻¹) e na presença de glicose (0,5 %).	76
Figura 20 - (a) <i>Pellets</i> fúngicos lisos e esféricos formado em soro de leite + extrato de levedura com diâmetros variados denotando a presença de fragmentos (aumento de 40x). (b) <i>Pellets</i> lisos crescidos em soro de leite na presença de glicose e extrato de levedura com morfologia arredondada com tamanhos homogêneos (aumento de 40x). (c) Imagem dos <i>pellets</i> produzidos na ausência e (d) na presença de glicose no soro de leite.....	77
Figura 21 - Comparativo do consumo de açúcares redutores em soro de leite suplementado com 2,0 g.L ⁻¹ de extrato de levedura submetido às mesmas condições de ensaio entre a cultura imobilizada em espuma de poliuretano com a cultura crescida livre.	80
Figura 22 - (a) Cubos de espuma de poliuretano de 0,3 cm ³ . (b) Canais existentes na espuma de poliuretano observados através de microscópio óptico com aumento de 40x de uma fina camada cortada (c) Imagem das biopartículas lavadas antes do processo. (d) Observação em microscópio em lente de aumento de 40x do micélio imobilizado.	81
Figura 23 - Relação entre o consumo de açúcar redutor e a remoção da DQO solúvel no soro de leite pelo <i>A. niger</i> AN 400.	82
Figura 24 - Redução de DQO (■) e de açúcar redutor (▲) pelo fungo imobilizado em EP com respectivos valores em porcentagem (●).	83
Figura 25 - Metabolismo do fungo <i>A. niger</i> AN 400 com célula imobilizada e dispersa na presença de nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico no soro leite.....	84
Figura 26 - Atividade de β -galactosidase de <i>A. niger</i> imobilizado em (EP) em soro de leite suplementado com extrato de levedura.	85
Figura 27 - (a) Biopartículas de <i>A. niger</i> utilizada no ensaio com soro de leite suplementado. (b) Pequenos <i>pellets</i> dispersos no meio visualizado em microscópio com aumento de 40x....	86
Figura 28 - Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica da β -galactosidase a pH = 3,5.	87
Figura 29 - Influência do pH sobre a atividade hidrolítica da β -galactosidase a 60 °C.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variabilidade das características de efluentes de laticínio em função do produto lácteo.....	19
Tabela 2 - Tecnologias de tratamento utilizadas em águas residuárias da indústria de laticínio.	28
Tabela 3 - Comparação dos valores nutritivos de biomassa de algas, leveduras, fungos e bactérias.....	36
Tabela 4 - Produção de proteína bruta por diferentes micro-organismos a partir de resíduos agroindustriais.	37
Tabela 5 - Micro-organismo e produtos de processos da biotecnologia com soro de leite.....	39
Tabela 6 - Principais parâmetros analisados no soro de leite e métodos utilizados.	41
Tabela 7 - Composição do grupo de reatores usados para a produção de proteína unicelular.	46
Tabela 8 – Caracterização dos soros gerados na indústria de laticínio.	51
Tabela 9 – Características dos soros empregados nos ensaios preliminares.	54
Tabela 10 – Efeito do pH inicial do soro no metabolismo do fungo.....	59
Tabela 11 - Influência da suplementação com extrato de levedura no soro doce sobre atividade metabólica do fungo <i>A. niger</i>	63
Tabela 12 - Percentual da produção de proteína unicelular pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> AN 400 produzida em soro de leite em diferentes tempos de ensaio.....	67
Tabela 13 - Valores de pH verificados a cada 24 h com o fungo crescido em soro de leite (FS).	70
Tabela 14 - Consumo de material orgânico do soro de leite suplementado com extrato de levedura na presença e na ausência de glicose.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias do Queijo
AR	Açúcar Redutor
C	Controle
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio ($\text{gO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)
DQO	Demanda Química de Oxigênio ($\text{gO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)
ε	Coeficiente de extinção molar ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)
EP	Espuma de poliuretano
EQ	Eletroquímico
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA	Administração de alimentos e remédios
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fungo crescido em soro
FSG	Fungo crescido em soro contendo glicose
GRAS	Generally Recognized as Safe
IPS	Isolados proteicos de soro
NF	Nanofiltração
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
ONPG	O-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo
OR	Osmose reversa
PSC	Proteína de soro concentrada
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RPM	Rotação por minuto
SCP	Single cell protein
SLA	Sistemas de lodo ativado
ST	Sólidos totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
STV	Sólidos totais voláteis ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
STF	Sólidos totais fixos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos.....	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Geração e composição de efluentes líquidos da indústria de laticínio	17
2.2 Subproduto da produção de queijo (soro de leite)	19
2.2.1 Tipos de soro de leite.....	21
2.3 Lactose	22
2.3.1 Hidrólise da lactose.....	23
2.4 As enzimas β-galactosidase	24
2.5 Tratamento convencional dos efluentes de laticínio	26
2.6 Tratamento biológico com fungos	29
2.6.1 Morfologia dos fungos em reatores com crescimento submerso.....	30
2.6.2 Reatores com fungos com crescimento imobilizado.....	30
2.6.3 Tratamento com o fungo <i>Aspergillus niger</i>.....	32
2.6.4 Produção de biomassa e proteína unicelular (Single Cell Protein)	35
2.7 Biotecnologia com soro de leite.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Coleta e caracterização do efluente.....	41
3.2 Preparo do inóculo fúngico	42
3.3 Testes com agitação com fungo <i>Aspergillus niger</i> AN 400 com diferentes soros	43
3.4 Pré-tratamento ácido do soro de leite	44
3.5 Efeito do pH.....	45
3.6 Influência da suplementação com nitrogênio.....	45
3.7 Testes com biomassa dispersa para a produção de proteína unicelular.....	45
3.8 Testes com biomassa dispersa para a síntese de β-galactosidase	46
3.9 Ensaio com biomassa imobilizada em batelada agitada para a síntese de β-galactosidase.....	47
3.10 Principais métodos analíticos	47
3.10.1 Açúcar total.....	47

3.10.2 Açúcares redutores expresso em lactose.....	48
3.10.3 Determinação da biomassa fúngica.....	48
3.10.4 Determinação da proteína bruta	48
3.10.5 Determinação da atividade da enzima β -galactosidase através da hidrólise do substrato ONPG.....	48
3.10.6 Estudos da estabilidade térmica da enzima e efeito do pH sobre a atividade enzimática	49
3.11 Estudo estatístico dos dados	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Características do soro de leite.....	51
4.2 Testes preliminares com diferentes soros de queijo	54
4.2.1 Morfologia do fungo em diferentes soros.....	54
4.2.2 Consumo de açúcares totais	56
4.2.3 Remoção de matéria orgânica.....	57
4.3 Efeito do pH do soro de leite no metabolismo do fungo.....	58
4.4 Influência da suplementação no soro de leite doce com extrato de levedura.....	62
4.5 Efeito do tempo e da glicose na produção de proteína unicelular de <i>Aspergillus niger</i> em soro de leite.....	64
4.5.1 Produção de biomassa	64
4.5.2 Produção de proteína unicelular de biomassa fúngica.....	67
4.5.3 Redução do potencial poluidor.....	68
4.5.3.1 Remoção da DQO durante a produção de proteína unicelular	68
4.5.3.2 Remoção de amônia na produção de proteínas	72
4.6 Ensaio para a síntese enzimática	75
4.6.1 Atividade de β -galactosidase em batelada agitada com biomassa dispersa com soro suplementado	75
4.6.2 Ensaio em batelada agitada com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano...	79
4.6.2.1 Consumo dos substratos orgânicos.....	81
4.6.2.2 Metabolismo do nitrogênio do fungo <i>A. niger</i> após a suplementação com extrato de levedura	83
4.6.3 Atividade de β -galactosidase com biomassa imobilizada em batelada agitada com soro suplementado	85
4.6.4 Estabilidade térmica da enzima e efeito do pH	86

5 CONCLUSÕES.....	89
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE 1	107

1 INTRODUÇÃO

A geração de resíduos é inerente às atividades conduzidas nas indústrias durante a fabricação de bens e produtos, os quais, se não forem dispostos ou tratados de forma correta, comprometem a qualidade ambiental.

Das atividades industriais, o setor de alimentos destaca-se por um maior consumo de água e uma maior geração de efluentes por unidade produzida, além de gerar um grande volume de lodo nas estações de tratamento biológico (RAMJEAWON, 2000). Nesse setor, entre as mais importantes para a economia brasileira, destaca-se é a indústria de laticínio, pela sua diversidade de produtos e processos, além da geração de efluentes com características bastante variáveis.

Entre os efluentes lácteos, o soro de leite, proveniente da produção de queijo, apresenta-se como o mais importante, tanto devido ao seu potencial poluidor, decorrente da expressiva quantidade de compostos orgânicos, quanto devido à sua nobre composição química, caracterizada por manter uma grande parte dos componentes do leite, como lactose, proteínas, minerais como cálcio, fósforo, magnésio, zinco, vitaminas e traços de gordura do leite (ALMEIDA, 2004).

Devido à riqueza nutricional do soro de leite, nas últimas décadas, vários processos foram desenvolvidos para o seu aproveitamento dentro ou fora da indústria, destacando-se a formulação em pó (sendo esta a principal valorização comercial do soro) (HUFFMAN; HARPER, 1999) e o uso no enriquecimento nutricional de diversos produtos alimentares, como as bebidas lácteas (PELEGRINE; CARRASQUEIRA, 2008). Apesar dessas e de várias outras possibilidades, estima-se que de todo o soro gerado da produção de queijo no mundo, a metade não é aproveitada passando a compor as águas residuárias de laticínio (FARIZOGLU *et al.*, 2007).

O provável impacto ambiental do lançamento nos corpos hídricos desse tipo de resíduo, quando não se tem o tratamento prévio ou apenas um tratamento parcial, deve-se à elevada carga orgânica com um potencial de poluição, aproximadamente, 100 vezes maior que a do esgoto doméstico, atribuído principalmente à presença da lactose e outros compostos orgânicos, que tem como consequência a depleção do oxigênio no corpo receptor.

Em relação à questão ambiental, as indústrias de laticínios vêm aplicando melhorias para uma produção mais limpa e eficiente, através de tecnologias de tratamento para controle da poluição e atendimento às exigências da legislação específica para

lançamento de efluentes. Nesse contexto, é preferido o tratamento biológico aeróbio e anaeróbio. Em alguns casos os tratamentos físicos e químicos, também são empregados.

No entanto, o tratamento biológico convencional desse tipo específico de efluente, como sistemas de lodos ativados, lagoas de estabilização e reatores anaeróbios, não é fácil, pois vários problemas têm sido relatados, como: a produção de espuma, a má sedimentação do lodo, resistência baixa ao choque de carga orgânica, dificuldades na remoção de nutrientes, elevado teor de sódio, pH baixo (3,8 a 6,5) e alcalinidade baixa (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; MACHADO *et al.*, 2002; PRAZERES *et al.*, 2012).

Por manter uma grande parte dos componentes do leite e estar disponível em grandes quantidades, o soro se apresenta como uma alternativa viável e estratégica para uso em bioprocessos. O soro de leite, que não é aproveitado na indústria, pode ser destinado aos processos biológicos com valorização, condicionado à adição de micro-organismos externos com capacidade para degradar um substrato específico, reduzindo a carga poluidora do efluente e permitindo através das reações bioquímicas a obtenção de produtos com valor comercial.

Os fungos, em particular o *Aspergillus niger*, têm demonstrado grande potencial para o uso em biotecnologia, pois é capaz de produzir ampla diversidade de produtos com grande valor comercial (WUCHERPFENNIG *et al.*, 2010). Substâncias como ácido cítrico, ácido glucônico e uma diversidade de enzimas estão entre alguns produtos comerciais obtidos com alto rendimento (ANDERSEN *et al.*, 2008).

Além disso, o uso do *A. niger* para a degradação de poluentes orgânicos e nitrogenados tem sido objeto de uma série de estudos que confirmam a capacidade em degradar diferentes poluentes (DJELAL; AMRANE, 2013; LOPES *et al.* 2011; LIU *et al.* 2011; SILVA, 2010).

Em sendo assim, esta pesquisa teve como objetivo investigar o desempenho do fungo *Aspergillus niger* AN 400 na utilização do soro de leite como substrato, para obtenção de produtos, bem como para reduzir o potencial poluidor.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Investigar o desempenho do fungo *Aspergillus niger* AN 400 no metabolismo do soro de leite como substrato, para obtenção de produtos, bem como para reduzir o potencial poluidor, deste efluente.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o soro de leite de uma indústria de produção de queijo em termos de parâmetros físico-químicos.
- Avaliar o potencial poluidor do soro de queijo e sua composição para utilização como meio de cultivo.
- Verificar o efeito do pH e a influência de substratos externos como fonte de carbono (glicose) e nitrogênio (extrato de levedura) no metabolismo do fungo sobre o soro de leite.
- Verificar a produção de biomassa e o teor de proteína produzida pelo fungo *Aspergillus niger* utilizando como substrato o soro de leite.
- Comparar a atividade enzimática de β -galactosidase com *Aspergillus niger* crescido livre e imobilizado em espuma de poliuretano.
- Determinar a redução do potencial poluidor do efluente em termos de matéria orgânica (DQO) e amônia no soro bruto em diferentes tempos de reação durante a produção de proteína unicelular e síntese enzimática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Geração e composição de efluentes líquidos da indústria de laticínio

Dependendo de determinadas características de produção da fábrica de laticínios como o tipo de produto final obtido (iogurte, queijo, manteiga, leite, sorvetes, etc.), tipos de sistemas e métodos de operação, as águas residuárias dessas indústrias podem variar significativamente, tanto em quantidade como em qualidade (GUTIÉRREZ *et al.*, 1991).

Geralmente, essas águas residuárias são compostas principalmente de leite diluído (ou produtos transformados), águas contendo substâncias químicas com características alcalina e ácida que compõe o efluente após os processos de limpeza de garrafas, tanques, silos de leite e equipamentos entre os ciclos de produção (CARVALHO *et al.*, 2013; ANDERSON *et al.*, 1994; DANALEWICH *et al.*, 1998).

Outras fontes de águas residuárias estão associadas com o mau funcionamento de equipamento ou erros operacionais como o derramamento de leite durante a recepção e processamento, transbordamento de silos, perdas de produtos processados derivados do leite, vazamento de tubulações, bombas e tanques, descarga de leite e produtos lácteos estragados e perda durante operações de embalagem (EROGLU *et al.*, 1991).

As águas residuárias provenientes das indústrias de laticínios usualmente apresentam fluxos intermitentes, de modo que a vazão dos efluentes se altera significativamente, frequentemente associadas com os procedimentos de lavagem no final de ciclos de produção (EROGLU *et al.*, 1991). Além de flutuações horárias e diárias na vazão, variações sazonais acontecem com frequência, o volume de leite recebido para o processamento varia em determinados períodos do ano (verão e inverno), relacionando-se diretamente com o volume de efluente produzido (KOLARSKI; NYHUIS, 1995).

De acordo com Demirel *et al.* (2005) e Britz *et al.* (2008), são muito escassas as publicações contemplando a composição das águas residuárias de laticínios. Mas sabe-se que são compostas principalmente por proteínas, carboidratos, concentrações elevadas de sólidos dissolvidos e suspensos, incluindo óleos e gorduras, frações significativas de nutrientes como amônia e fosfatos e, portanto, requerem a devida atenção antes da disposição final (SARKAR *et al.*, 2006; BRITZ *et al.*, 2008).

Os sólidos presentes nesse tipo de efluente confere uma quantificação indireta dos componentes orgânicos, que por sua vez influenciarão nos valores de DBO. Efluentes de laticínio incluindo o soro de queijo apresentam concentrações de sólidos suspensos totais em

uma faixa de 0,1 a 22 g.L⁻¹, na sua grande maioria açúcares e proteínas suscetíveis de biodegradação (CARVALHO *et al.*, 2013). A concentração de sólidos (SST, SSV) pode ser usada para indicar a tratabilidade dos efluentes lácteos por processo biológicos. Danalewich *et al.* (1998) observaram que a proporção entre sólidos suspensos totais, voláteis e fixos pode variar significativamente. Através de 15 coletas de amostras compostas de efluente de laticínio, os autores verificaram que cerca de 76 % dos sólidos suspensos totais eram compostos por sólidos voláteis, indicando uma boa biodegradabilidade dos resíduos gerados.

A presença nos efluentes de carboidratos e proteínas do leite, tais como lactose e caseína, respectivamente, refletem uma elevada carga orgânica com valores da demanda química de oxigênio (DQO) entre 1000 a 100000 mg.L⁻¹, com um índice de biodegradabilidade (DBO₅/DQO) tipicamente na faixa de 0,4 a 0,8 (PRAZERES *et al.*, 2012).

Já o nitrogênio se origina principalmente a partir de proteínas do leite e está presente em várias formas, tanto como nitrogênio orgânico (proteínas, ureia, ácidos nucleicos), como na forma ionizada como amônia, nitrito e nitrato. O fósforo é encontrado principalmente em formas inorgânicas, como ortofosfato e polifosfato, podendo ser encontrado também em formas orgânicas (GUILLEN-JIMENEZ *et al.*, 2000).

Normalmente, esses efluentes têm um valor de pH baixo, mas, devido à utilização de produtos de limpeza como desinfetantes, ácidos e bases na indústria de laticínio podem resultar em valores de pH altamente variáveis nas águas residuárias, podendo ocorrer valores de pH entre 4,4 a 12,0 (CARVALHO *et al.*, 2013; DANALEWICH *et al.*, 1998).

Os agentes mais utilizados são carbonato de sódio, hidróxido de sódio, ácido nítrico, ácido fosfórico e hipoclorito de sódio. Os ácidos são usados para remoção de depósitos minerais em equipamentos que trabalham com temperatura elevada e também sanitização, enquanto os detergentes básicos atuam na saponificação de gorduras e remoção de substâncias proteicas (BRITZ *et al.*, 2008).

Conforme Morente *et al.* (2013) e Jiménez-Pichardo *et al.* (2015), sanitizantes como o hipoclorito de sódio também são usados em quantidades relativamente baixas, contendo geralmente grandes quantidades de cloro, sais quartenários de amônio com propriedades antissépticas e germicidas, os quais podem afetar o tratamento biológico das águas residuárias.

Na Tabela 1 são apresentadas as principais características físicas e químicas dos efluentes líquidos gerados em laticínios, demonstrando uma variação grande quanto a sua composição, dependendo do processo e do produto fabricado.

Tabela 1 - Variabilidade das características de efluentes de laticínio em função do produto lácteo.

Setor de produção	pH	DQO ¹ g.L ⁻¹	SST ² g.L ⁻¹	SSV ³ g.L ⁻¹	NTK ⁴ g.L ⁻¹	NH ₃ g.L ⁻¹	PT ⁵ g.L ⁻¹	Referências
Produção de Leite <i>in natura</i>	6,9	4,7	-	-	-	-	-	Strydom <i>et al.</i> (1997)
Produção de sorvetes	5,2	5,2	3,1	2,1	0,06	0,015	-	Borja e Banks, (1995)
Processamento misto	8,5	4,6	1,1	0,6	0,14	0,011	0,015	Andrade, (2011)
Processamento misto	3,4	63,1	2,5	2,1	-	-	-	Hwang e Hansen (1998)
Produção de queijo	4,7	60,0	2,5	-	0,83	-	0,280	Gavala <i>et al.</i> (1999)
Produção de queijo	4,6	86,8	5,0	-	0,81	0,15	0,230	Kargi, Uzunçar (2012)
Produção de queijo	3,9	74,5	9,4	8,3	0,15	-	0,124	Erguder <i>et al.</i> (2001)
Produção de queijo cottage	5,4	58,5	8,3	-	-	-	-	Janczukowicz <i>et al.</i> (2008)
Produção de queijo	5,8	73,4	7,2	-	-	-	-	Janczukowicz <i>et al.</i> (2008)
Produção de queijo	4,9	74,2	22,1	21,9	1,49	0,17	-	Ghaly e Kamal, (2004)
Produção de manteiga	-	1,9	-	-	0,08	0,001	0,009	Janczukowicz <i>et al.</i> (2012)

¹DQO - Demanda química de oxigênio, ²SST - Sólidos suspensos totais, ³SSV - Sólidos suspensos voláteis,

⁴NTK - Nitrogênio Total Kjeldahl, ⁵PT - Fósforo total.

Fonte: Autor (2015).

2.2 Subproduto da produção de queijo (soro de leite)

Os efluentes de sorvete, manteiga e de queijo (o soro de leite) são os principais resíduos na forma líquida da indústria de laticínio (PRAZERES *et al.*, 2012). Destes, o soro é o subproduto de maior importância, devido ao volume produzido, ao amplo espectro de possibilidades de reutilização visto seu potencial nutritivo e, principalmente, seu elevado poder poluente (CHIARARDIA; FERREIRA, 1999; ZIMMER, 2006).

A estimativa da Associação Brasileira das Indústrias do Queijo - ABIQ (2011) é que a produção de queijo, em 2010, tenha chegado a 745 mil toneladas. Considerando que para produzir 1 kg de queijo são necessários 10 kg de leite gerando 9 Kg de soro, tem-se que nesse ano foram geradas $6,7 \times 10^9$ toneladas de soro.

O soro de queijo pode ser definido como um líquido verde amarelado resultante da precipitação e remoção da caseína do leite durante o processo de fabricação de queijo

(SISO, 1996). A cor amarelada do soro de leite é causada pela presença de riboflavina (vitamina B2) (DE WIT, 2001). A porção aquosa que se separa do coágulo do leite representa, aproximadamente, 85 a 90 % do leite utilizado para a produção de queijo, retendo aproximadamente 55 % dos nutrientes presentes no leite (MIZUBUTI, 1994; SISO, 1996).

De acordo com Ghaly e Kamal (2004), a maior parte dos componentes se encontra solubilizado na água presente no soro, sendo os principais a lactose (5 %), compostos nitrogenados (0,9 %), minerais (0,8 %) e pequenas quantidades de vitaminas.

A maior parte da lactose do leite, em torno de 39 g.L⁻¹ a 60 g.L⁻¹, permanece no soro, constituindo a fração principal da carga orgânica, que, em conjunto com elevados volumes gerados, faz do soro de queijo um problema ambiental muito preocupante, e soluções para a sua valorização são de extrema importância (GHALY; KAMAL, 2004; KISAALITA *et al.*, 1990).

Efluentes da produção de queijo apresentam valores de DBO na faixa de 0,6 a 60 g.L⁻¹ podendo ocasionar um impacto ambiental significativo quando lançado em corpos d'água pelo alto consumo de oxigênio dissolvido na estabilização da carga orgânica (LEE *et al.*, 2003; JANCZUKOWICZ *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, o soro foi visto como resíduo sem qualquer valor comercial e descarregado em cursos de água ou no solo sem tratamento ou ainda incorporado em rações para animais (TORRES, 2005; PRAZERES *et al.*, 2012). De acordo com Fischer (2010), essa abordagem tem sido abandonada nas últimas décadas, muito devido às propriedades nutricionais e funcionais excelentes do soro, visto que contém metade dos sólidos do leite.

Conforme Sienkiewicz e Riedel, (1990) *apud* Siso (1996), os volumes crescentes de soro de leite produzido, devido ao crescimento do setor de produção e as exigências legais mais estritas em relação à qualidade do efluente, são também fatores importantes para o surgimento de novas alternativas para o soro. Com isso, o soro de leite passou a ser tratado como produto com elevado valor agregado.

De acordo com Ghaly e Kamal (2004), o principal processo industrial aplicado no soro é a formulação em pó. No Brasil, uma parte dos 4,5 bilhões de litros de soro de leite produzidos anualmente tem sido processada em sistemas de torre de secagem (spray dryer), sistemas utilizados nas principais áreas de processamento de leite e soros de leite ao redor do mundo.

Entretanto, muitos outros usos são encontrados para o soro e lactose incluindo formulações para crianças, produtos de panificação, laticínios e confeitaria, alimento animal e suprimento alimentar para derivados da lactose após fermentação (MATIOLI *et al.*, 2001).

Ainda assim, a demanda é insuficiente para toda a lactose disponível no soro, o resultado é um baixo valor de mercado. Uma grande parte do soro produzido não é utilizado e descartado como efluente tornando-se um significativo problema de desperdício e poluição para o meio ambiente (PANESAR *et al.*, 2007).

2.2.1 Tipos de soro de leite

O tipo de soro de leite pode variar de acordo com as técnicas de processamento para a precipitação e remoção da caseína do leite líquido (PANESAR *et al.*, 2007). De acordo com Siso (1996), duas principais variedades de soro de leite são produzidos, o soro ácido (com pH menor que 5,0) produzido a partir da adição de ácidos orgânicos para a precipitação da caseína e o soro doce de pH entre 6 e 7, baseado na coagulação da caseína pela adição de enzimas coagulantes. Em relação ao soro doce, o soro ácido normalmente apresenta uma maior concentração de minerais e um teor de proteína mais baixo, sendo a sua utilização na alimentação mais limitada, justamente por conta de seu sabor ácido e alto teor de sal (MAWSON, 1994).

Para Prazeres *et al.* (2012), na produção de queijo são gerados três principais efluentes: o soro de queijo (resultante da produção de queijo), o segundo soro de queijo proveniente do reaproveitamento do soro na produção da ricota e o soro de queijo de águas residuárias (água de lavagem que contém diferentes frações de soro de queijo e/ou segundo soro de queijo).

No entanto, para Peres (2011), podem existir diversos tipos de soros originados de processos industriais devido à suscetibilidade de deterioração do soro líquido, tais como:

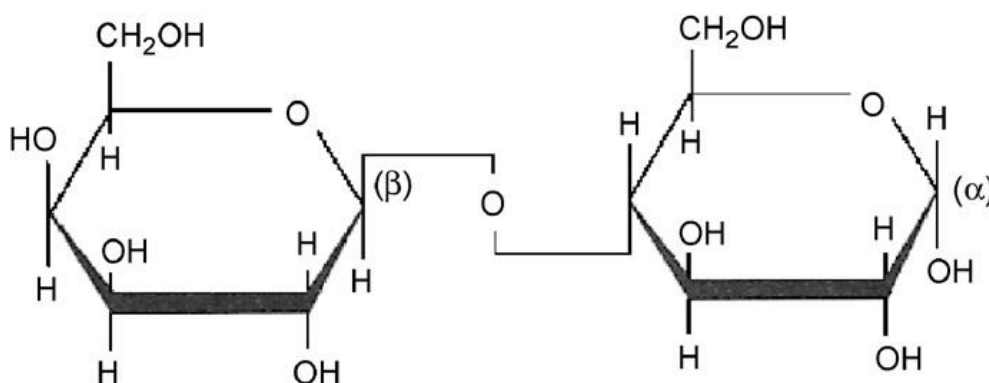
- Soro de leite em pó “doce” que advém da produção de queijos, sendo o produto mais simples também conhecido como integral;
- Soro de leite em pó desmineralizado, com 25 % a 90 % dos seus minerais extraídos;
- Soro delactosado, com até 30 % de concentração de proteína;
- Concentrados proteicos de soro de leite conhecidos como proteína de soro concentrada (PSC), com mais de 30 % de concentração de proteínas;
- Isolados proteicos de soro de leite (IPS) produzidos a partir da concentração de 80 % da proteína do soro.

2.3 Lactose

A lactose é o principal carboidrato do leite estando presente exclusivamente no leite dos mamíferos. A concentração aproximada no leite bovino varia entre 4,4 % e 5,2 %, no leite humano é de 7 % e no soro de leite bovino seco em torno de 70 % a 80 % (CARVALHO *et al.*, 2013).

A lactose é um dissacarídeo (4-0-β-galactopiranosil-d-glucopiranoose, $C_{12}H_{22}O_{11}$) constituído por uma molécula de glicose, unida por uma ligação glicídica β-1,4 a uma molécula de galactose. É considerado um açúcar redutor, porque o grupo anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, portanto ela está livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2000). Em soluções aquosas, a lactose está presente nas formas anoméricas α e β (Figura 1), responsáveis pelas diferentes propriedades desse açúcar.

Figura 1 - Estrutura da molécula de lactose.



Fonte: Ganzle *et al.* (2008).

Uma característica distintiva da lactose é sua manifestação em diferentes configurações e inter-relações físico-químicas dependentes da temperatura. Quando em solução produz-se a transformação de uma forma em outra (a forma α se transforma em β e vice versa), até alcançar o equilíbrio; esse fenômeno é denominado de mutarrotação, que influi na sua solubilidade (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). No equilíbrio a 20 °C α-lactose equivale a 37,3 % e β-lactose 62,7 %, esta relação de equilíbrio é ligeiramente afetada por diferenças de temperatura.

A α-lactose é menos solúvel que a forma β-lactose, cristalizando-se a primeira em soluções aquosas com temperaturas inferiores a 93,5 °C. A β-lactose pode ser obtida por processos de cristalização com temperaturas maiores que 93,5 °C. Cristais de α-lactose monohidratada podem ser preparados concentrando-se uma solução aquosa de lactose a uma taxa

moderada de temperatura, abaixo de 93,5 °C, visto que durante a ocorrência do fenômeno de mutarrotação a forma β transforma-se gradativamente na α até supersaturar dando início ao processo de cristalização (DRAPIER-BECHE *et al.*, 1999).

As formas dos cristais mais predominantes são prismas, pirâmides, ou "tomahawks" dependendo das condições de cristalização. Se a dimensão dos cristais estiver entre 10 e 16 μm , podem os mesmos ser detectados sensorialmente depreciando os produtos lácteos devido a um efeito chamado de "arenosidade" (GANZLE *et al.*, 2008). Visando ampliar seu espectro de utilização, emprega-se a hidrólise desse dissacarídeo redutor obtendo um açúcar mais adocicado, solúvel e digerível.

2.3.1 Hidrólise da lactose

A hidrólise da lactose pode ser realizada de duas formas, tanto por agente químico como por tratamento enzimático (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005). A hidrólise química é caracterizada por condições ácidas ($\text{pH} < 1,5$) e temperaturas elevadas de até 150 °C (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Apesar do baixo custo, por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido sulfúrico e clorídrico, quando a hidrólise é realizada por esse processo, apresentam-se algumas desvantagens, tais como a desnaturação de proteínas, necessidade de pré-desmineralização, aparecimento de uma coloração castanha devido a reações de Maillard e a formação de produtos indesejáveis, que impedem a sua utilização direta em alimentos (SISO, 1996; CARMINATTI, 2001).

Como consequência, a hidrólise enzimática empregando a enzima β -galactosidase em condição mais branda de pH e temperatura é a via preferencial para a hidrólise da lactose, processo de grande interesse tecnológico, já que os compostos resultantes são facilmente fermentáveis e absorvidos pelo intestino humano (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). De acordo com Jurado *et al.* (2004), a hidrólise enzimática da lactose é um dos mais importantes processos biotecnológicos, porque os produtos hidrolisados podem ser consumidos por pessoas com má digestão da lactose, devido à eliminação da intolerância à lactose.

Além disso, o processo enzimático apresenta vantagens tecnológicas e ambientais da sua aplicação na indústria, incluindo (JURADO *et al.*, 2002):

- Formação de galacto-oligossacarídeos durante a hidrólise da lactose que favorece o crescimento da microflora bacteriana intestinal. A presença desses compostos é considerada desejável em alimentos;

- Melhoria nas características tecnológicas e sensoriais de alimentos que contêm lactose hidrolisada de leite ou soro de leite, devido à presença dos açúcares glicose e galactose que são mais fáceis de fermentar;
- Maior biodegradabilidade do soro de leite em que a lactose foi hidrolisada.

2.4 As enzimas β -galactosidase

A β -galactosidase comumente conhecida como lactase é uma enzima (EC 3.2.1.23) classificada como uma hidrolase, que catalisa a hidrólise de resíduos terminais não redutores β -D-galactopiranosil (Gal β 1-4Glc) da lactose para formar glicose e galactose (GASTEIGER *et al.*, 2003).

As β -galactosidases são encontradas na natureza em diversos vegetais (amêndoas, pêssago, damasco, maçã), órgãos de animais (intestino, cérebro, testículos, placenta) e também produzidas por uma grande variedade de micro-organismos (SANTIAGO *et al.*, 2004; HUSSAIN, 2010). Entre os micro-organismos utilizados na síntese de β -galactosidase, aparecem às bactérias, os fungos filamentosos e as leveduras, sendo preferidas para uso industrial as enzimas obtidas a partir de *Aspergillus spp.* e *Kluyveromyces spp.* (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O interesse particular na aplicação industrial das β -galactosidases produzidas por essas culturas vai desde sua classificação como GRAS (Generally Recognized as Safe) pela Food and Drug Administration (FDA), sendo esse um critério importante para aplicações alimentícias, até a facilidade de obtenção, boa produtividade e rendimento a partir desses micro-organismos (KOSSEVA *et al.*, 2009; PANESAR *et al.*, 2006).

No Brasil, a resolução RDC nº 26/2009 regulamenta o preparo de enzimas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano e ressalta que a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes micro-organismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces sp.* (BRASIL, 2009).

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* tem a capacidade de secretar a β -galactosidase para o meio extracelular. Essa característica é uma vantagem importante da lactase proveniente de *A. niger*, já que as enzimas extracelulares são mais fáceis de serem produzidas e isoladas, enquanto as enzimas intracelulares devem passar por processos onerosos de desintegração celular ou de permeabilização da membrana (AWAN *et al.*, 2010).

As enzimas fúngicas têm um pH ótimo na faixa ácida (2,5 a 5,4) e uma temperatura ótima elevada, o que permite a sua utilização a temperaturas de até 50 °C (PANESAR *et al.*, 2006). A β -galactosidase proveniente de fungos filamentosos é adequada para a hidrólise da lactose de soro de leite ácido, soro de queijo doce previamente acidificado e alimentos lácteos fermentados, porque a sua atividade a valores de pH mais elevado do que o ótimo (cerca de 3,5) é muito diminuída (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Além do uso na hidrólise da lactose do soro, estudos indicam ainda que a enzima fúngica pode ser adequada para uso em um ambiente gástrico, por exemplo, o estômago humano, para aliviar os sintomas de má absorção. O'Connell e Walsh (2010) utilizaram uma enzima purificada de *Aspergillus niger* que apresentava temperatura ótima de 65 °C e um pH ótimo entre 2,0 e 4,0, combinada com uma β -galactosidase neutra de *Kluyveromyces marxianus* e observaram uma elevada estabilidade quando expostas a condições gástricas simulada “*in vitro*”. A cápsula contendo a dupla lactase teve uma atividade 3,5 vezes maior do que a lactase comercial, retendo 68 ± 2 % do nível de atividade original.

No entanto, a aplicação convencional e comercial da β -galactosidase mais comum tem sido na hidrólise da lactose do leite, nesse caso as enzimas proveniente de leveduras são mais adequadas devido à atividade ocorrer em pH ótimo entre 6,2 a 7,5, ou ainda em produtos derivados, em particular do soro de queijo (OLIVEIRA *et al.*, 2011; ANSARI; HUSAIN, 2012).

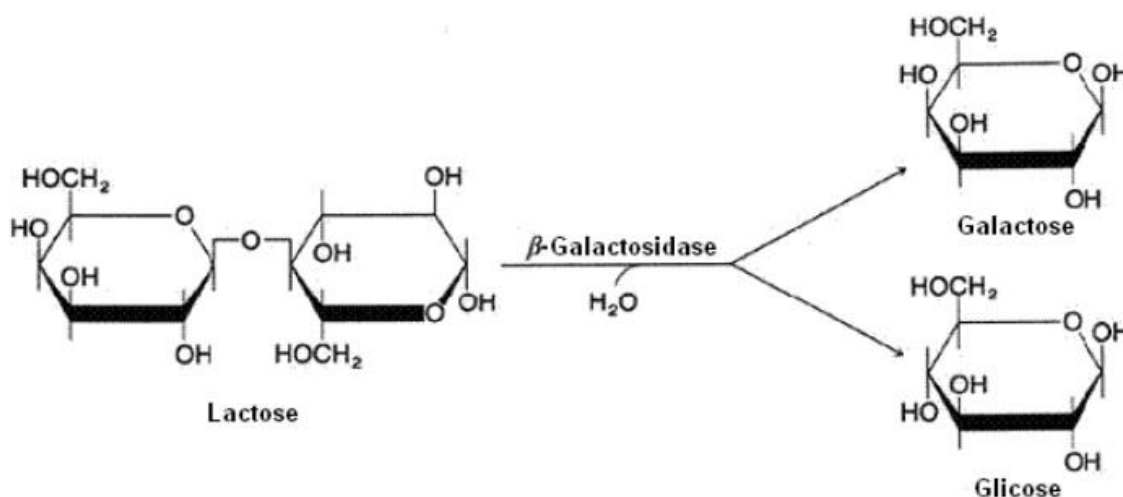
A importância industrial na aplicação da β -galactosidase na redução do teor de lactose em produtos lácteos visa atender a um público que apresenta intolerância a esse açúcar devido à deficiência genética intestinal de lactase (HAIDER; HUSSAIN, 2008). Pessoas intolerantes à lactose se restringem a quantidade de lactose que podem ingerir diariamente devido à presença insuficiente da enzima.

A baixa atividade da enzima na mucosa do intestino delgado (hipolactasia) resulta na má absorção ou má digestão da lactose devido à diminuição na capacidade de hidrolisar a lactose no intestino, sendo passado o açúcar direto para o sangue e, posteriormente, para urina e intestino causando vários distúrbios (SHUKLA, 1975 *apud* DOMINGUES *et al.*, 2005). O resultado é uma modificação na flora intestinal que leva a uma produção excessiva de gás e de ácido causando desordens intestinais como cólica, flatulência e diarreia (KARDEL *et al.*, 1995).

Além de aumentar a disponibilidade de produtos lácteos à população, incluindo um grande contingente que apresenta intolerância à lactose, outra vantagem do processo é a conversão da lactose em seus monômeros que evita a cristalização em produtos como sorvetes

e leite condensado, e acentua a doçura e a solubilidade em alimentos pela presença da glicose e galactose (LIFRAN *et al.*, 2000). Na Figura 2 é mostrado o mecanismo de hidrólise da lactose pela enzima β -galactosidase, na qual hidrolisa o dissacarídeo nos seus monossacarídeos constituintes.

Figura 2 - Reação de hidrólise enzimática da lactose pelo uso de β -galactosidase.



Fonte: Adaptado de Vieira (2009).

2.5 Tratamento convencional dos efluentes de laticínio

Efluentes lácteos são tratados por métodos físico, químico ou tratamento biológico. Os processos físico-químicos como coagulação/floculação apresentam o inconveniente de custos elevados com reagentes químicos além de não serem eficientes na remoção da DQO solúvel (VIDAL *et al.*, 2000).

Métodos mais sofisticados como a osmose reversa (VOURCH *et al.* 2005; SARKAR *et al.* 2006), ultrafiltração (LUO *et al.* 2012) ou tratamento eletroquímico (KUSHWAHA *et al.* 2010), apesar de eficientes, demonstraram ser muito alto de custos operacionais. Além disso, a manutenção de uma DQO muito baixa no tratamento com o uso de membranas após alguns ciclos de operação torna-se bastante difícil (BALANNEC *et al.*, 2005).

Dessa forma, são geralmente preferidos os processos biológicos por serem mais rentáveis e com possibilidades da obtenção de subprodutos com valor comercial (DEMIREL *et al.*, 2005). De acordo com Carvalho *et al.* (2013), o tratamento de efluentes da produção de

queijo baseia-se principalmente nos processos biológicos de tratamento através da digestão anaeróbia ou aeróbia. A razão entre os valores de DBO/DQO geralmente maior que 0,5 indicam esses resíduos como adequados para serem tratados pela via biológica empregando principalmente o tratamento com lagoas, sistemas de lodo ativado e reatores anaeróbios (PRAZERES *et al.*, 2012).

Apesar da preferência, conforme Danalewich *et al.* (1998), o tratamento biológico de efluentes lácteos podem não ser simples, principalmente devido às altas variações nas características do efluente (carga orgânica e volume) e a presença de produtos químicos. Esses autores, avaliando o nível de desempenho com as estratégias convencionais de tratamento aplicadas às águas residuárias de laticínios, encontraram vários problemas, sendo os principais: sobrecargas no sistema, geração de odores, grandes volumes de biomassa excedente, presença de lodo filamentosos, dificuldade na manutenção em concentrações adequadas de oxigênio dissolvido em sistemas de lodo ativado e produção de espuma.

Orhon *et al.* (1992), investigando a tratabilidade de efluente de laticínio em sistemas de lodo ativado, verificaram que as águas residuárias que contêm proteínas do leite são lentamente biodegradadas necessitando de até 150 h de adaptação para efetiva biodegradação.

Janczukowicz *et al.* (2008), analisando a biodegradabilidade de efluentes laticínios em lodo ativado pela respirometria, observaram que todos os efluentes de laticínios testados podem ser tratados em conjunto, com exceção do soro de leite, que se apresentou como o de maior dificuldade de ser oxidado por via biológica, devendo ser gerido separadamente dos demais resíduos.

Gavala *et al.* (1999), aplicando efluente da produção de queijo em um reator UASB e avaliando diferentes aplicações de carga orgânica volumétrica e tempo de detenção hidráulica (TDH), concluíram que eficiências de 98 % podem ser conseguidas para o efluente diluído para uma DQO de 37 g.L⁻¹ (carga orgânica de 2,0 g DQO.L.d⁻¹), necessitando de um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 6 dias. À medida que aumenta a concentração de DQO constatou-se que o desempenho do reator caiu consideravelmente, verificando-se que a alimentação do efluente de soro de queijo sem diluição ocasionou a necessidade de tempos de detenção hidráulica maiores que 30 dias para uma remoção de até 81 %.

Em tempo, devido principalmente ao elevado valor da carga orgânica presente nos efluentes de queijo, vários pesquisadores apontam a tecnologia anaeróbia como a mais viável para o tratamento. A baixa produção de lodo de excesso, o menor consumo de energia e

requisitos de área são vantagens adicionais do processo anaeróbio em comparação com os processos por lodos ativados (GAVALA *et al.*, 1996; DEMIREL *et al.*, 2005).

Os fungos têm recebido menos atenção para o tratamento de águas residuárias de laticínios em relação aos reatores nos quais predominam bactérias. Contudo, os biorreatores com fungos se apresentam como uma tecnologia promissora e vantajosa, devido ao potencial produtivo de enzimas degradantes, bem como à sua capacidade para suportar condições severas, especialmente de flutuações de cargas dos poluentes, de tolerar baixa concentração de nutrientes e baixo pH (JEYAKUMAR *et al.*, 2013; GRIMM *et al.*, 2005).

Na Tabela 2 são mostrados alguns trabalhos em que foram utilizadas tecnologias para o tratamento de efluentes de laticínio incluindo: reatores anaeróbios do tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), sistemas de lodo ativado (SLA), osmose reversa (OR), nanofiltração (NF), tratamento eletroquímico (EQ) e biorreatores com fungos (BRF).

Tabela 2 - Tecnologias de tratamento utilizadas em águas residuárias da indústria de laticínio.

Tecnologia	Tipo de efluente	DQO (g.L⁻¹)	TDH^a (h)	Remoção de DQO (%)	Referências
UASB	Efluente sintético (leite diluído)	0,28	20	52	Campos <i>et al.</i> (2004)
UASB	Efluente de laticínio incluindo soro de queijo	37	144	98	Gavala <i>et al.</i> (1999)
UASB	Efluente de laticínio incluindo soro de queijo	42	144	85	Gavala <i>et al.</i> (1999)
SLA	Efluente sintético (leite diluído)	3,9	15	92,7	Kushwaha <i>et al.</i> (2013)
SLA	Efluente sintético (leite diluído)	3,9	30	97,1	Kushwaha <i>et al.</i> (2013)
OR	Efluente sintético	110	-	99,9	Balannec <i>et al.</i> (2005)
NF	Efluente sintético	110	-	99,8	Balannec <i>et al.</i> (2005)
EQ	Efluente sintético	7,5	-	80	Bensadok <i>et al.</i> (2011)
BRF	Efluente sintético (leite diluído)	3,0	65	75	Djelal e Anrane (2013)
BRF	Efluente sintético (leite diluído)	0,38 - 0,56	8	75	Silva (2010)

^aTDH – Tempo de detenção hidráulica.

Fonte: Autor (2015).

2.6 Tratamento biológico com fungos

Os fungos possuem habilidade para se desenvolverem em qualquer substância orgânica, fazendo uso de substratos variados. As fontes de carbono como polissacarídeos, lignina, glicose, manose, frutose, óleos e ácidos orgânicos são importantes fornecedoras de energia para a atividade metabólica dos fungos (POMPEU, 2010).

Além dessas substâncias, tem-se comprovado que os fungos sobrevivem e crescem em meios com concentrações elevadas de compostos recalcitrantes e são capazes de utilizá-los como fonte de energia para crescimento e manutenção do seu metabolismo (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; SOLÍS *et al.*, 2012).

O interesse na aplicação de fungos na biorremediação de poluentes cresce também devido à sua fisiologia, facilidade de cultivo, capacidade de crescer a valores de pH inferiores a 5,0, boas taxas de reprodução e de tolerar grandes variações e escassez de umidade e oxigênio, demonstrando o potencial desses micro-organismos para o tratamento de águas residuárias.

Apesar de recente, em comparação com outros sistemas biológicos, a utilização de fungos na biorremediação de poluentes de fácil e de difícil degradação tem sido relatada na literatura especializada devido ao potencial enzimático desses micro-organismos (VAN LEEUWEN *et al.*, 2012).

Entre as vantagens do uso de fungos no tratamento em relação às bactérias, pode-se citar o fato de que nos fungos não se observa a limitação da difusão de substrato para o interior da célula, pois secretam enzimas para o meio que degradam compostos complexos em moléculas menores, facilitando a assimilação e permitindo uma maior tolerância às concentrações elevadas de poluentes (KAPDAN *et al.*, 2000; BENNETT, 1998).

Os fungos são capazes, além de degradar os compostos orgânicos, de promover também a nitrificação e a desnitrificação. No tratamento de águas residuárias, o processo tem se concentrado em bactérias nitrificantes e desnitrificantes, excluindo o efeito de outros micro-organismos. No entanto, os fungos filamentosos são capazes de remover nitrogênio de águas residuárias. Segundo Guest e Smith (2002), no metabolismo do nitrogênio pelo fungo, podem-se obter diversas vantagens em relação às bactérias como: taxas de nitrificação de 1 a 4 vezes maior do que de bactérias autotróficas, uma maior resistência aos fatores inibitórios do processo de nitrificação, uma produção final elevada de compostos gasosos de nitrogênio com taxas de desnitrificação em torno de 100 %.

2.6.1 Morfologia dos fungos em reatores com crescimento submerso

Em biorreatores, os fungos filamentosos, tais como, o *Aspergillus niger*, podem apresentar diferentes morfologias, variando de agregados micelias densamente entrelaçados denominado de *pellets* ao crescimento micelial disperso (GRIMM *et al.*, 2005).

A opção pela morfologia varia de acordo com o produto desejado, devido à produtividade ótima estar correlacionada a uma morfologia específica, havendo a necessidade de uma análise prévia das diferentes culturas (*pellets* ou micélio) para cada processo biológico (GIBBS *et al.*, 2000; KRULL *et al.*, 2013).

De acordo com Espinosa-ortiz *et al.* (2016), para aplicações no tratamento de águas residuárias, o crescimento do micélio disperso em biorreatores não é desejável, devido às dificuldades operacionais que causam os fungos filamentosos. Quando os fungos crescem na forma filamentosa ou micelial verifica-se aumento significativo na viscosidade limitando o fornecimento de oxigênio e nutrientes. Em comparação, os meios de cultivo com *pellets* distintos mostram comportamento de fluxo newtoniano, favorecendo a transferência de oxigênio para os *pellets*, reduzindo o consumo de energia para aeração e agitação (KRULL *et al.*, 2013). No entanto, a limitada disponibilidade de nutrientes pode ocorrer dentro da parte interna dos *pellets* de maiores diâmetros. O contínuo crescimento exponencial e ilimitado da camada periférica do *pellet*, restringe o fornecimento de oxigênio na zona interior, podendo ocorrer autólise caracterizado por *pellets* com o núcleo oco (BARRY *et al.*, 2009).

2.6.2 Reatores com fungos com crescimento imobilizado

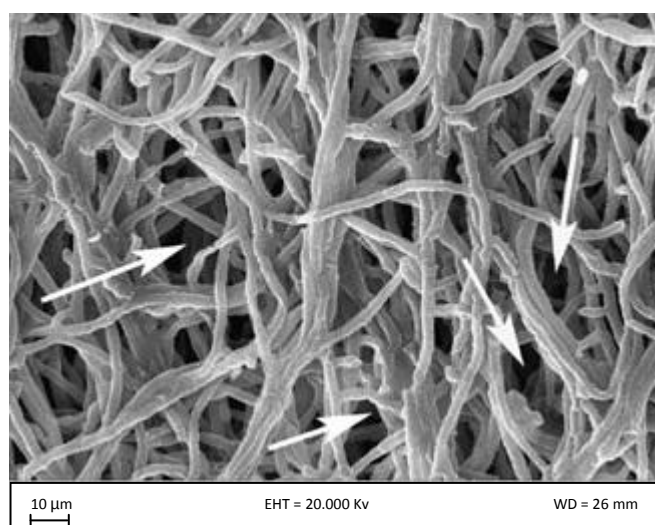
Na natureza, os micro-organismos crescem ligados principalmente a superfícies, formando biofilmes, devido a sua tendência natural para aderir em estruturas sólidas (GAMARRA *et al.*, 2010). Essa particularidade faz com que o uso de micro-organismos imobilizados seja considerado como uma tecnologia promissora para a produção de enzimas e outros metabólitos.

De acordo com Ibrahim *et al.* (2014), a imobilização de células tornou-se uma ferramenta importante na área de biotecnologia. Entre as potenciais vantagens para a utilização de células viáveis imobilizadas, incluem-se a fácil separação e reutilização das células, a manutenção de concentrações celulares elevadas, flexibilidade na concepção do reator e no seu funcionamento (FREEMAN; LILLY, 1998).

Considerando que o crescimento submerso livre dos fungos filamentosos não é a forma natural de vida, eles são adaptados ao crescimento em superfícies e nestas condições eles demonstram um comportamento fisiológico e morfológico que é diferente, por exemplo, da fermentação em estado sólido (FES) (VILLENA; GUTIÉRREZ-CORREA, 2006).

No caso da formação de biofilme, em comparação com a produção de grânulos, a orientação do crescimento tem sido descrita de forma distinta: enquanto os *pellets* aumentam em densidade, o biofilme aumenta principalmente em sua profundidade, favorecido pela formação de canais nas camadas de hifas que facilitam a passagem de líquidos (Figura 3), implicando em uma melhor transferência de massa, o que explica as maiores taxas de crescimento específico (HILLE *et al.*, 2005; VILLENA; GUTIÉRREZ-CORREA, 2006; GUTIÉRREZ-CORREA *et al.*, 2012).

Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Aspergillus niger* desenvolvido em tecido de poliéster com destaque nos canais formado entre as hifas.



Fonte: Adaptado de Gutiérrez-correa *et al.* (2012).

Além da diferença do crescimento estrutural em relação aos *pellets*, o arranjo de hifas no interior do biofilme reflete um processo celular coordenado com diferentes respostas metabólicas que são distintas dos *pellets*. A partir desse ponto de vista, a adesão celular tem sido considerada como o passo inicial necessário para desencadear a sinalização e a expressão diferencial de genes, mecanismos ausentes no crescimento submerso convencional (GUTIÉRREZ-CORREA *et al.*, 2012).

De acordo com O'toole *et al.* (2000), o crescimento em biofilme promove a ativação de diferente expressão de genes que mudam a fisiologia das células. Embora ainda

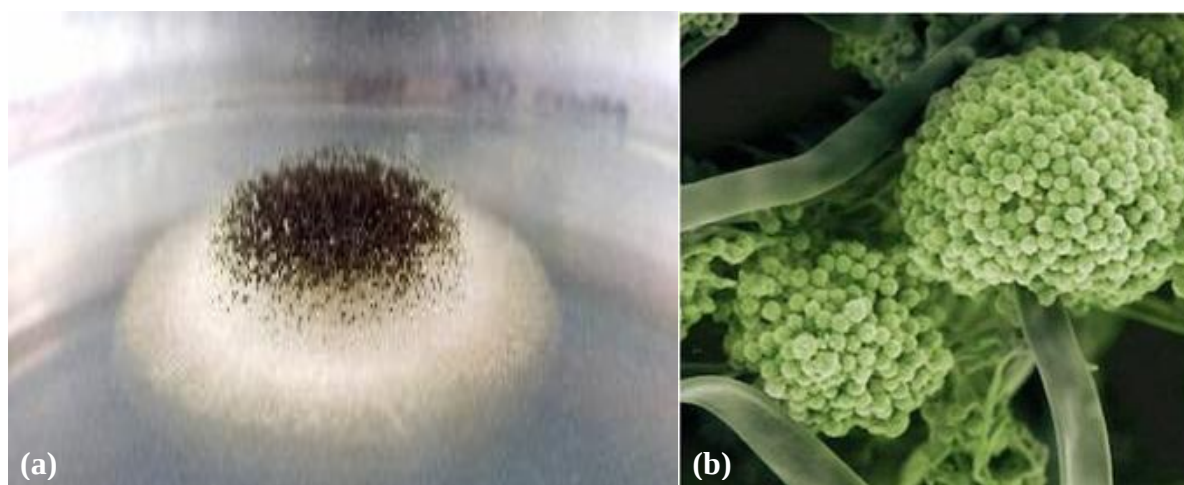
não completamente compreendido, vários processos têm sido relatados em que o uso de células imobilizadas de micro-organismos permitiu diversas vantagens em relação à cultura livre, tais como: uma maior produtividade enzimática (SKOWRONEK; FIEDUREK, 2006), redução no tempo de fermentação (YANG *et al.*, 2005), reutilização das células com manutenção da produtividade (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005) e maiores eficiências de remoção de diferentes poluentes em águas residuárias (TSEKOVA *et al.*, 2010; AKHTAR *et al.*, 2010).

2.6.3 Tratamento com o fungo *Aspergillus niger*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são fungos saprófitos, mesofílicos e no que tange à sua morfologia, produzem micélios septados e ramificados, cujas porções vegetativas encontram-se submersas ao nutriente quando cultivados estaticamente (PELCZAR *et al.*, 1996).

Entre os fungos filamentosos, o *Aspergillus niger* (Figura 4) se destaca pela sua capacidade metabólica, apresentando-se como um dos principais micro-organismos em bioprocessos, com potencial de se tornar futuramente o mais utilizado na biotecnologia (ANDERSEN *et al.*, 2008). Como sugere o nome, é um fungo filamentoso negro comumente denominado como “mofo negro”, apresentando como características particulares colônias brancas a amarelo pálido em que rapidamente se formam milhares de esporos de 3 a 5 μm que se tornam rugosos ao atingir a maturação (WAINWRIGHT, 1995; PRADO, 2002).

Figura 4 - Macro (a) e micromorfologia (b) do *Aspergillus niger*.



Fonte: Joint Genome Institute (2015).

Uma das razões para o notável interesse por *Aspergillus niger* pode ser explicada pela diversidade de produtos por ele sintetizados. Esse fungo é uma das poucas espécies desse reino classificadas como GRAS (Geralmente Reconhecido Como Seguro) pela Food and Drug Administration (FDA). De acordo com Van Dijck *et al.* (2003), o longo uso industrial de produtos a parti de *A. niger* em alimentos e a ampla distribuição do fungo na natureza não conduziu a qualquer sintoma de patogenicidade derivado da presença de toxinas produzidas pelo fungo. Diante dessas características apresentadas, essa espécie é utilizada na produção de enzimas, sua massa celular é empregada como constituinte na alimentação animal e sua fermentação geram ácidos orgânicos, dentre outros compostos, de valor econômico significativo.

Além da sua ampla aplicação em processos industriais, o fungo *A. niger* também se mostra com capacidade de crescer em diferentes águas residuárias, utilizando os compostos no seu metabolismo, obtendo bons resultados de remoção de matéria orgânica, caracterizando-o como micro-organismo com capacidade para o tratamento biológico de águas residuárias (FÉLIX, 2005).

No tratamento de efluente de laticínios, Djelal e Amrane (2013) utilizaram um consórcio fúngico incluindo *Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis* e *Galactomyces geotrichum* em escala laboratorial, em escala piloto e em escala industrial. Os resultados confirmaram melhores rendimentos na remoção de DQO saindo de um percentual de 55 % na ausência para 75 % na presença dos fungos, agindo principalmente na DQO recalcitrante dos efluentes.

Liu *et al.* (2011) utilizaram o fungo *Aspergillus niger* em uma primeira etapa no tratamento biológico de águas residuárias provenientes da produção de pasta mecânica da indústria de celulose. Com os ensaios realizados em batelada agitada com biomassa dispersa, foi possível remover 60,2 % da DQO em 72 h de ensaio e obter uma produção de biomassa sólida de 7,12 g.L⁻¹ com potencial para uso na alimentação animal e na produção de fertilizantes orgânicos devido ao fato de ela conter 8,91 % de proteínas e 9,16 % de aminoácidos.

Em estudo realizado por Mishra *et al.* (2004), os fungos *A. niger* e *A. foetidus* foram aplicados no tratamento de águas residuárias do processamento de batata. O fungo *A. niger* reduziu 59,3 % da DQO e *A. foetidus* 63,2 % em 72 h. A cultura mista conseguiu remover entre 66,1 a 79,7 % da DQO, já em condições otimizadas de pH e nutrientes houve a redução de 82,75 % da DQO atingindo 90,5 % após 60 h de ensaio, com simultânea produção de biomassa fúngica rica em proteínas (39 a 40 %).

Coulibaly *et al.* (2002) realizaram estudos com *A. niger* avaliando o potencial do inóculo em cinco biorreatores em séries com o objetivo de degradar macromoléculas tornando solúvel a carga orgânica, servindo como um pré-tratamento para sistemas de tratamento de esgoto. Nessa ocasião, utilizando amido simulado como poluente macromolecular, o processo se mostrou eficiente na biorremediação de águas residuárias complexas, sendo possível degradar o polissacarídeo e acumular produtos hidrolisados, obtendo 90 % de degradação do amido com TDH de 17 h.

Além de matéria orgânica nas águas residuárias, os nutrientes são também os substratos de interesse para a remoção biológica no metabolismo microbiano. Recentemente tem sido reconhecido que além de bactérias outros micro-organismos têm a capacidade de promover a remoção de nitrogênio do meio, sendo de grande interesse os fungos filamentosos (GUEST; SMITH, 2002).

Segundo Lopes *et al.* (2011), *A. niger* tem habilidade para degradar resíduos nitrogenados, através de mecanismo da redução desassimilatória do nitrato, ocorrendo à conversão de nitrato em nitrito e deste em amônia, a qual é usada em reações de síntese pelo fungo. Os autores avaliaram a remoção desses compostos nitrogenados de águas residuárias do processamento de castanha de caju em reator em batelada e obtiveram bons resultados em uma das etapas de estudo, conseguindo remoção de nitrito da ordem de 90 % e amônia e nitrato em mais de 75 %.

Os compostos nitrogenados são essenciais para a nutrição e metabolismo dos fungos, utilizando amônia diretamente (anabolismo) ou a partir da redução de nitrato à amônia, a qual é a forma diretamente assimilada, incorporando-se o nitrogênio em sua biomassa (ZHOU *et al.*, 2002).

O trabalho de Silva (2010), que tratou do efluente sintético de laticínio, avaliou o comportamento do *fungo A. niger* AN 400 em reatores em batelada sequencial imobilizados em espuma e em PET triturado objetivando remover compostos nitrogenados inorgânicos. Nesse estudo, durante os ciclos de operação, foi possível identificar o processo assimilatório pelo fungo das formas nitrogenadas de nitrato e amônia. O sistema proporcionou uma remoção global de nitrato nos reatores com espuma de 99 %, e nos de PET de 91 %.

Além de fontes inorgânicas de nitrogênio, os fungos tem a capacidade de utilizar o nitrogênio orgânico. Hwang *et al.* (2004) obtiveram bons resultados de remoção de diferentes compostos nitrogenados de águas residuárias da aquicultura empregando um reator de placas com fluxo contínuo contendo o fungo *Aspergillus niger* NBG5. Os três resíduos nitrogenados,

(amônia, nitrito e proteínas) foram consumidos simultaneamente removendo mais de 95 % dos compostos em 50 h.

2.6.4 Produção de biomassa e proteína unicelular (*Single Cell Protein*)

Os sistemas convencionais de tratamento biológico de esgoto, que utilizam como principais micro-organismos as bactérias na remoção de material orgânico e nutrientes, são a essência da engenharia sanitária (VAN LEEUWEN *et al.*, 2012).

No tratamento aeróbio acontece a conversão do material orgânico em CO₂ e água e a produção de biomassa microbiana. Cerca de 2/3 de todo material orgânico é convertido em novas células, em que cada grama de DQO removida corresponde à produção de 0,45 g de biomassa (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999). Nessa tecnologia, a produção e consequentemente a retirada do lodo de excesso do sistema se torna o principal problema econômico e ambiental, de forma que o custo com o tratamento e destino final desse lodo pode chegar a 60 %, se tornando bastante oneroso (CANALES *et al.*, 1994).

Por outro lado, os fungos na biorremediação de águas residuárias convertem as substâncias orgânicas presentes no efluente em biomassa fúngica rica em proteínas que podem ser facilmente separadas e utilizadas como fonte de alimentação de animais e potencialmente em dietas de humanas (MISHRA *et al.*, 2004).

O termo *Single Cell Protein* (SCP) é usado para descrever a proteína derivada de células de microrganismos, que são cultivados em diferentes substratos e utilizados como fonte de proteína na alimentação humana e animal (NAJAFPOUR, 2007).

A levedura foi o primeiro micro-organismo cuja importância como suplemento alimentar animal foi reconhecida. Durante a Primeira Guerra Mundial, a Alemanha substituiu metade das fontes de proteína importadas pela levedura (NASSERI *et al.*, 2011). Além de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*, a *Spirulina* e a *Chlorella* são também micro-organismos considerados seguros e aceitos pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura para o consumo humano - FAO (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

A proteína unicelular tem sido produzida a partir de diversos micro-organismos, sendo algas, leveduras, fungos e bactérias as principais fontes de SCP. Como citado entre as algas, as mais utilizadas são as espécies de *Spirulina*. As mais populares entre as leveduras são as dos gêneros: *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Saccharomyces*. Entre as bactérias, *Cellulomonas* e *Alcaligenes* são os gêneros usados com mais frequência.

Aspergillus, *Trichoderma*, *Penicillium*, entre outros, são alguns dos fungos cultivados para a obtenção de SCP (ALBUQUERQUE, 2003).

O valor nutricional e a utilidade da proteína desses micro-organismos baseiam-se na sua composição. Além de estar livre de substâncias tóxicas e apresentar um elevado teor proteico, a biomassa deve conter vitaminas, minerais, carboidratos, nitrogênio não proteico como os ácidos nucleicos e aminoácidos (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000). No caso de ácidos nucleicos em SCP, a quantidade presente na biomassa tem sido um dos principais fatores que dificultam a sua utilização como fonte de alimento para seres humanos. Ingestão excessiva de ácidos nucleicos pode levar a precipitação de ácido úrico, causando problemas de saúde, tais como “gota” ou a formação de pedra nos rins (NASSERI *et al.*, 2011). Assim, o conteúdo de ácidos nucleicos na biomassa para satisfazer os requerimentos proteicos em humanos deve ser de até 3 % em base seca (ABOU-ZEID *et al.*, 1995). Na Tabela 3 a composição das células de diferentes micro-organismos pode ser observada.

Tabela 3 - Comparação dos valores nutritivos de biomassa de algas, leveduras, fungos e bactérias.

Componente (%)	Algas	Leveduras	Fungos filamentosos	Bactérias
Proteína bruta	40-60	47-56	30-70	50-83
Nitrogênio total	45-65	7,5-9,0	35-70	60-80
Lisina	4,6-7,0	-	6,5-7,8	4,3-5,8
Metionina	1,4-2,6	-	1,5-1,8	2,2-3,0
Lipídios	5-10	2,6	5-13	8-10
Ácidos nucleicos	4-6	6,12	9,7	15-16

Fonte: Adaptado de Anupama e Ravindra (2000).

Em relação aos meios de crescimento, diversos subprodutos agroindustriais têm sido usados como substratos para a produção de proteína unicelular. Na Tabela 4 são mostrados alguns trabalhos em que resíduos potencialmente poluidores foram degradados por micro-organismos para a produção de SCP.

De acordo com Anupama e Ravindra (2000), no cultivo com resíduos orgânicos de baixo custo, é mais conveniente utilizar fungos e bactérias para produção de SCP. O rápido crescimento e o elevado teor de proteínas fazem destes, os principais micro-organismos para uso como fontes de SCP.

Tabela 4 - Produção de proteína bruta por diferentes micro-organismos a partir de resíduos agroindustriais.

Micro-organismo	Resíduo	Proteína (%)	Referência
<i>Kluyveromyces marxianus/Candida krusei</i>	Soro de leite	44,3	Yadav <i>et al.</i> (2014)
<i>Aspergillus niger</i>	Espigas de milho	30,4	Singh <i>et al.</i> (1991)
<i>Aspergillus niger</i>	Casca de laranja	29,8	Azam <i>et al.</i> (2014)
<i>Sacchromyces cerevisiae</i>	Casca de laranja	23,5	Azam <i>et al.</i> (2014)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Água residuária da indústria de vinho	35,3	Zhang <i>et al.</i> (2008)
<i>Trichoderma viride</i>	Água residuária da indústria de vinho	19,8	Zhang <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus terreus</i>	Bagaço de cana de açúcar	21-28	El-Nawwi e El-Kader (1996)
<i>Aphanothece microscopica nãgeli</i>	Efluente de arroz	60,2	Zepka <i>et al.</i> (2010)
<i>Cândida utilis</i>	Farelo de arroz	32,8	Rajoka <i>et al.</i> (2006)

Fonte: Autor (2015).

Além de crescer em quase todas as fontes de matéria orgânica, as células dos fungos (filamentoso ou *pellet*) são também mais fáceis de serem separadas do meio de cultura, sendo um processo mais prático e econômico em relação a outros micro-organismos que apresentam células menores dificultando a recuperação da biomassa (ZHANG *et al.*, 2008). Segundo El-Aasar (2006), outra vantagem do uso do micélio fúngico é que as células desses micro-organismos são menos propensas a causar reações adversas nos seres humanos, tais como reações alérgicas ou toxicidade, quando comparadas as SCP derivadas de outros micro-organismos.

2.7 Biotecnologia com soro de leite

Na maioria dos processos fermentativos são usados meios de cultivo menos onerosos, principal característica para o emprego em grande escala. Entre os meios que não possuem sua composição definida (meios complexos), pode-se mencionar o uso de diversas matérias-primas naturais de baixo valor comercial, porém com elevado teor de carboidratos, tais como caldo de cana-de-açúcar, melaços, diversas farinhas (trigo, milho, soja, cevada), água de maceração de milho etc. que podem constituir substratos para processos fermentativos (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O uso desses resíduos em bioprocessos representa uma forma de se agregar valor a resíduos abundantes, dando solução para seu acúmulo, que representa um sério problema

ambiental. Além do baixo custo para a obtenção são desejáveis em meios de cultivo as seguintes características (BON *et al.*, 2008):

- Ter composição adequada para o crescimento do micro-organismo e formação do produto de interesse;
- Ter elevada disponibilidade e facilidade de padronização dos componentes, e
- Não contribuir para dificultar os processos de separação do produto.

No caso da gestão dos resíduos da produção de queijo, três opções podem ser consideradas: primeira, aplicação do tratamento físico-químico, tais como a coagulação-floculação, ozonização, processo Fenton, precipitação térmica, precipitação ácida, osmose reversa etc; segunda, uso de tecnologias que são introduzidas para recuperar compostos valiosos, tais como proteínas e lactose presentes no soro, além do processamento de produtos diversos como o soro em pó, bebida láctea, ricota, concentrado proteico, produtos de panificação, sorvetes e bebidas, entre outros; e por último, os processos biológicos que podem ser também utilizados como uma tecnologia de valorização (PRAZERES *et al.*, 2012).

Desde que seja comprovada a capacidade de utilização dessa fonte de carbono em processos biológicos, o soro de queijo pode ser utilizado como uma fonte alternativa de substrato para micro-organismos na produção econômica de diferentes bioprodutos (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005).

A utilização do soro lácteo como substrato para micro-organismos se justifica pela sua rica composição, sendo que a presença da lactose e de outros nutrientes essenciais para o crescimento microbiano faz dele um substrato bem atrativo (PANESAR *et al.*, 2007).

Dentre algumas substâncias valorosas possíveis de serem produzidas com soro excedente em bioprocessos, encontram-se: a proteína unicelular para alimentação humana ou animal (GHALY; KAMAL, 2004), ácidos orgânicos, como ácido lático (ELDELEKLIOGLU *et al.*, 2013), ácido cítrico, (EL-SAMRAGY *et al.*, 1996), ácido glucônico (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005), álcool etílico de grau combustível (MURARI *et al.*, 2013), gás metano (ERGUDER *et al.*, 2001), e hidrogênio (KARGI *et al.* 2012; AZBAR *et al.* 2009; ROSA *et al.* 2014), além de enzimas como β -galactosidase (BARROS, 2011).

Na Tabela 5 é demonstrado que, dependendo do micro-organismo e utilizando principalmente a lactose presente no soro de leite como fonte básica de carbono e energia, podem-se gerar diversos produtos de elevado interesse comercial.

Tabela 5 - Micro-organismo e produtos de processos da biotecnologia com soro de leite.

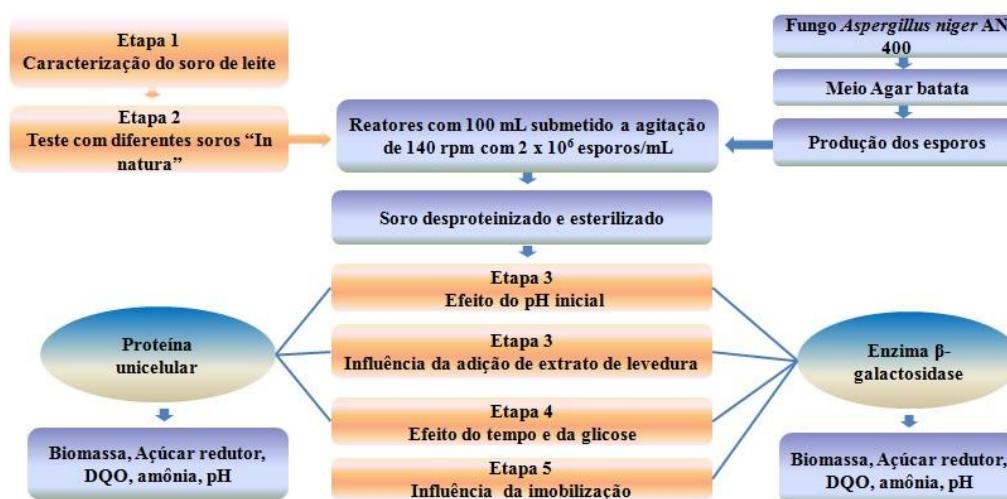
Micro-organismo	Produto	Produção máxima	Referências
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido glucônico	92 g.L ⁻¹	Mukhopadhyay <i>et al.</i> (2005)
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	1,06 g.L ⁻¹	El-Samragy <i>et al.</i> (1996)
<i>Aspergillus niger</i>	β-galactosidase	0,95 U.mL ⁻¹	Barros (2011)
<i>Aspergillus niger</i>	β-galactosidase	2,5 U.mL ⁻¹	Silva <i>et al.</i> (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	β-galactosidase	16,02 UGI.mL ⁻¹	Barbosa e Araújo, (2007)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Biomassa celular	0,66 g/g lactose	Ghaly e Kamal (2004)
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL-B-1922	Ácido láctico	61,0 g.L ⁻¹	Eldeleklioğlu <i>et al.</i> (2013)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> 229	Etanol	18,70 g.L ⁻¹	Murari <i>et al.</i> (2013)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	β-galactosidase	28,0 UGI.mL ⁻¹	Santiago <i>et al.</i> (2004)

Fonte: Autor (2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A investigação do metabolismo do *A. niger* AN 400 em soro de leite foi realizada em cinco etapas, como ilustrada na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma da pesquisa com as etapas desenvolvidas durante a pesquisa.



Fonte: Autor (2015).

Etapa 1 - O soro de leite proveniente do processamento de queijo foi caracterizado com relação à composição de carbono e nutrientes para uso como meio de cultivo e para conhecer o seu potencial poluidor.

Etapa 2 – Nessa etapa foi avaliada a capacidade do fungo em degradar diferentes tipos de soro “*in natura*”, gerados na indústria de laticínio, em bateladas agitadas simples, com o objetivo de definir o soro com melhor composição para os ensaios subsequentes.

Etapa 3 - Após a definição do tipo de soro, foi realizado um pré-tratamento e investigado a influência do pH e da adição de nitrogênio no metabolismo do fungo na produção de biomassa, de proteína e na atividade enzimática.

Etapa 4 - Dois produtos do metabolismo do fungo em soro de leite foram acompanhados durante os ensaios em até 8 dias de tempo reacional. Testes em bateladas agitadas com biomassa dispersa foram realizados para avaliar a produção de proteína unicelular pelo *A. niger* AN 400 no soro bruto desproteínizado, analisando a influência da glicose como substrato externo no rendimento do processo e acompanhando a redução do potencial poluidor do soro. Em um segundo momento, o soro de leite foi suplementado com extrato de levedura e utilizado em reatores agitados com o fungo em crescimento disperso para a síntese da enzima β-galactosidase.

Etapa 5 – Foi verificada a influência da imobilização do fungo em espuma de poliuretano (EP) para a síntese enzimática, consumo dos compostos orgânicos e nitrogenados a fim de traçar um comparativo com os valores obtidos com o crescimento disperso.

3.1 Coleta e caracterização do efluente

A matéria-prima utilizada durante esta pesquisa foi o soro resultante da produção de queijo, cedido por uma indústria de laticínio localizada na cidade de Limoeiro do Norte-CE-BR.

Experimentalmente foram analisadas amostras de três diferentes tipos de soro gerados na indústria, sendo: soro doce (15 amostras), soro salgado (02 amostras) e soro ácido (02 amostras), correspondendo um total de 19 amostras, que após a coleta, foram armazenadas em recipientes plásticos e transportadas para o Laboratório de Controle Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *campus* Limoeiro do Norte.

Os resíduos líquidos foram caracterizados segundo as seguintes variáveis físico-químicas: Demanda Química de Oxigênio (DQO), pH, alcalinidade, sólidos, nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, fósforo total e açúcares totais.

As análises foram realizadas em conformidade com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater APHA (2012), à exceção de açúcares totais, que foi realizada de acordo com DUBOIS *et al.* (1956). Na tabela 6 estão apresentados os métodos para a determinação das referidas variáveis.

Tabela 6 - Principais parâmetros analisados no soro de leite e métodos utilizados.

Variável	Método	Referência
pH	Potenciométrico	4500 B/APHA <i>et al.</i> (2012)
Alcalinidade	Potenciométrico	2320 B/APHA <i>et al.</i> (2012)
Condutividade elétrica	Condutimetria	2510 B/APHA <i>et al.</i> (2012)
DQO	Titulométrico refluxo fechado	5220 C/APHA <i>et al.</i> (2012)
Açúcares totais	Fenol-ácido sulfúrico	DUBOIS <i>et al.</i> (1956)
NTK	Semi-Micro Kjeldahl	4500 C/APHA <i>et al.</i> (2012)
Amônia	Fenato	4500 F/APHA <i>et al.</i> (2012)
Nitrito	Colorimétrico	4500 B/APHA <i>et al.</i> (2012)
Nitrato	Redução com cádmio	4500 E/APHA <i>et al.</i> (2012)
Fósforo	Ácido ascórbico	4500 E/APHA <i>et al.</i> (2012)
Sólidos totais	Gravimétrico	2540 B/APHA <i>et al.</i> (2012)
Sólidos totais voláteis	Gravimétrico	2540 E/APHA <i>et al.</i> (2012)
Sólidos totais fixos	Gravimétrico	2540 E/APHA <i>et al.</i> (2012)

Fonte: Autor (2015).

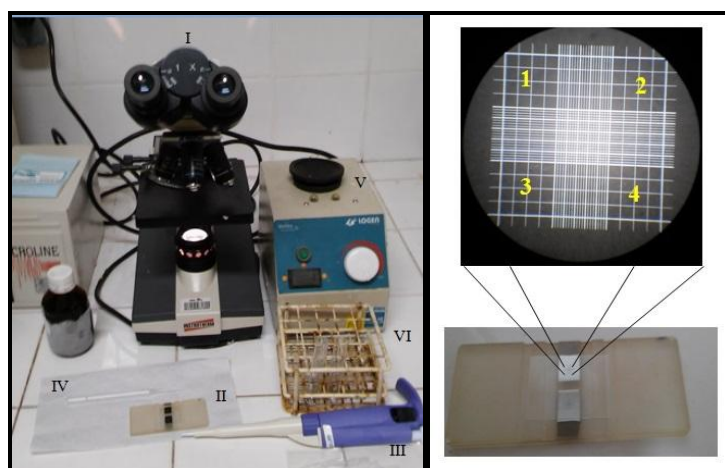
3.2 Preparo do inóculo fúngico

Neste trabalho foi utilizada a linhagem *Aspergillus niger* AN 400 como inóculo devido à comprovada capacidade de crescer em diferentes fontes de matéria orgânica e da síntese de um grande número de metabólitos (SILVA, 2010; BARBOSA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.* 2012).

Para obtenção do inóculo, os esporos do fungo *A. niger* foram crescidos em placas de Petri contendo 15 mL do meio sólido Agar batata dextrose e incubados a 28 °C. Após o tempo de incubação, entre 5 e 7 dias, com auxílio de alça de Drigalski, removiam-se os esporos com solução salina com Tween-80 0,1 % (v/v), os quais eram transferidos e armazenados em frascos esterilizados.

Na Figura 6a encontram-se ilustrados os materiais e equipamentos usados para a contagem dos esporos. Nesse procedimento, uma solução diluída era preparada utilizando 20 µL da suspensão produzida, bem homogeneizada, acrescida de 980 µL de Tween 80, resultando em uma diluição de 1:50. Uma alíquota da solução diluída de esporos previamente agitada em vortex era transferida por capilaridade para uma câmara de Neubauer de 0,1 mm³ até o completo preenchimento. Um microscópio óptico com aumento de 400x foi utilizado para a contagem dos quatro quadrantes laterais (Figura 6b).

Figura 6 - (a) Bancada para a contagem dos esporos. Microscópio óptico (I). Câmara de Neubauer e lamínula (II). Micropipetador (III). Pipeta de Pasteur (IV). Agitador vortex (V). Tubos de ensaio (VI). (b) Câmara de Neubauer com destaque dos quadrantes usados para a contagem.



Fonte: Autor: (2015).

O cálculo da concentração de esporos da solução estoque foi feito de acordo com a Equação 1, baseado em Borzani *et al.* (2001):

$$\text{Esporos/mL} = \frac{\text{Número de esporos} \times 10^4 \times \text{diluição}}{\text{Número de quadrantes}} \quad (1)$$

Após a determinação da concentração da solução estoque calculava-se o volume a ser adicionado para ajustar o inóculo nos ensaios em 2×10^6 esporos/mL. Os esporos produzidos foram mantidos em uma temperatura de -15°C para futura utilização, sendo renovada a cultura a cada 4 semanas.

3.3 Testes com agitação com fungo *Aspergillus niger* AN400 com diferentes soros

De início foram avaliados três tipos de soro de leite, conforme ilustrado na Figura 7, representando a forma como os soros foram gerados durante a produção de queijo: soro doce, derivado da fabricação de queijos produzidos com enzimas; segundo soro, ou soro ácido, resultante da fabricação da ricota e soro salgado, gerado após a etapa de salga com cloreto de sódio durante a produção de queijos.

Figura 7 - Fluxograma representando a produção de queijos e a geração dos soros usados na etapa preliminar.



Fonte: Adaptado de Aquarone (2001).

Os soros coletados foram transferidos para béqueres e a eles adicionou-se ácido láctico concentrado até pH 4,0, 1,0 mL.L⁻¹ de solução Vishniac e 0,1 g.L⁻¹ de antibiótico Megacilin Super Plus para inibir a influência de outros micro-organismos.

Os três soros (doce, salgado, segundo soro) foram adicionados em frascos erlenmeyer de 250 mL em volume de 100 mL. Em seguida, os frascos foram inoculados com suspensão de esporos ($2,0 \times 10^6$ esporos/mL) de *A. niger* AN 400 e mantidos sob agitação rotativa de 140 rpm por 192 h a 30 °C. No final de oito dias foi determinado a DQO remanescente e o açúcar total. O soro que se apresentou como melhor meio em função da remoção de DQO e açúcares foi utilizado nos ensaios subsequentes, sendo o mesmo pré-tratado como descrito a seguir.

3.4 Pré-tratamento ácido do soro de leite

Após os ensaios preliminares foi verificada a necessidade de remoção das proteínas do soro, uma vez que os primeiros ensaios realizados com o soro *in natura* conduziram à forma micelial livre do fungo o que afetou excessivamente a viscosidade e a mistura do meio. Além da grande interferência no processo, a presença das proteínas dificultaram as análises de concentração celular por massa seca, pois as mesmas precipitam junto às células do micro-organismo após centrifugação e não se separam por simples filtração a vácuo.

O pré-tratamento foi realizado utilizando um processo de adição direta de ácido orgânico (ácido láctico) ao soro aquecido. A remoção da fração proteica foi realizada de acordo com Santiago *et al.* (2004) utilizando o método ácido e térmico.

O soro colocado em recipiente de alumínio foi previamente aquecido em um agitador/aquecedor em pH ajustado até 4,8 com ácido láctico comercial sob suave agitação. Após ajuste do pH, o soro continuou sendo aquecido até 90 °C controlando a temperatura com auxílio de um termômetro. Ao atingir 90 °C, o aquecimento e agitação foram interrompidos e a solução foi mantida em repouso entre 15 e 30 minutos, para que fossem cuidadosamente sedimentadas as proteínas. Por fim, o soro de leite pré-tratado foi separado das proteínas sifonando o sobrenadante até um volume que era possível permanecer no recipiente apenas a massa proteica formada.

3.5 Efeito do pH

Como o pH é uma condição importante para o metabolismo fúngico, o efeito de diferentes valores de pH iniciais foi testado. Frascos de 250 mL contendo 100 mL de soro de leite desproteínizado tiveram o pH ajustado para 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0, utilizando HCl 1,0 M ou NaOH 1,0 M, sendo em seguida esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento, em temperatura ambiente, foram inoculados com 2×10^6 esporos/mL do fungo *A. niger* NA 400 e o meio foi submetido a agitação orbital durante 5 dias a 140 rpm.

Para os ensaios realizados em duplicata foi determinado o crescimento celular através dos sólidos suspensos voláteis, o teor de proteínas no material retido por filtração, a atividade de β -galactosidase, DQO remanescente, açúcares redutores e amônia do filtrado.

3.6 Influência da suplementação com nitrogênio

Verifica-se em muitos trabalhos que o nitrogênio orgânico desempenha um papel importante para a produção de β -galactosidase (AWAN *et al.* 2010; BARROS, 2011; LIMA, 2012). Desse modo, testes foram realizados com adição de diferentes concentrações de extrato de levedura (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 g.L⁻¹) no soro de leite. Os experimentos foram executados em frascos contendo 100 mL de soro esterilizado com pH ajustado para 4,0, e inóculo de 2×10^6 esporos/mL da cultura fúngica sob agitação de 140 rpm. Decorrido cinco dias de reação, todo o material foi filtrado em filtro de fibra de vidro de 0,45 μ m de porosidade. Para o material sólido retido no filtro foi determinado o crescimento do fungo e o teor de proteína. No sobrenadante foi avaliado o consumo de compostos orgânicos através da determinação da DQO, de açúcares redutores e nitrogênio amoniacal.

3.7 Testes com biomassa dispersa para a produção de proteína unicelular

Experimentos foram realizados com soro coletado na indústria em três períodos diferentes, que foram pré-tratados para a remoção das proteínas (item 3.4). Neste estudo, os reatores receberam 100 mL de soro com pH ajustado para 4,0 com ácido láctico, que foram esterilizados em autoclave.

Como apresentado na Tabela 7, os reatores foram divididos em grupos, sendo: 8 frascos sem inóculo contendo apenas soro desproteínizado denominados de controle (C); 8 com inóculo fúngico e soro de leite (FS) e 8 contendo o inóculo no soro e adicionado glicose

denominado de (FSG). Nos reatores FSG, os dois primeiros ensaios foram montados com glicose a um 1,0 %. Para o terceiro ensaio diminuiu-se a glicose para 0,5 % em todos os frascos.

Tabela 7 - Composição do grupo de reatores usados para a produção de proteína unicelular.

Ensaio	Controle (C)	Fungo + soro de leite (FS)	Fungo + soro de leite + glicose (FSG)
1	Soro de leite sem inóculo	Soro de leite com inóculo	Soro de leite com inóculo + 1 % de glicose
2	Soro de leite sem inóculo	Soro de leite com inóculo	Soro de leite com inóculo + 1 % de glicose
3	Soro de leite sem inóculo	Soro de leite com inóculo	Soro de leite com inóculo + 0,5 % de glicose

Fonte: Autor (2015).

Todos os reatores foram mantidos sob as mesmas condições de agitação (140 rpm) e temperatura (30 °C), assim como os que foram inoculados receberam a mesma concentração de esporos, já definida. A cada 24 h, durante 8 dias, foi desmontado um reator para análise do crescimento celular através da biomassa retida no filtro e realizadas as determinações de proteína da biomassa seca; e de amônia, DQO e pH no filtrado.

3.8 Testes com biomassa dispersa para a síntese de β -galactosidase

Os ensaios foram realizados com dois grupos de reatores. O primeiro grupo foi composto de reatores que receberam soro adicionado de extrato de levedura na concentração de 2,0 g.L⁻¹. Ao segundo grupo, além da suplementação com extrato de levedura (2,0 g.L⁻¹) foi adicionado 0,5 % de glicose.

Os reatores continham 100 mL do meio com pH ajustado para 4,0 com uso de ácido láctico, que foram esterilizados a 121° C durante 15 minutos. Em seguida, os reatores foram inoculados com fungo (2×10^6 esporos/mL) e mantidos em agitação orbital de 140 rpm, conforme os testes anteriores. Para os ensaios realizados com seis réplicas, a cada 24 h, durante 8 dias, foram retiradas assepticamente alíquotas de 3 mL e analisada a atividade para β -galactosidase, assim como açúcares redutores, DQO e amônia.

3.9 Ensaaios com biomassa imobilizada em batelada agitada para a síntese de β -galactosidase

A imobilização da biomassa foi baseada em Sanromán *et al.* (1994). O meio para a produção de biopartículas era composto por soro de leite desproteínizado adicionado de extrato de levedura na concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$. O pH do meio foi ajustado para 4,0 com ácido láctico, distribuído 100 mL em frascos de Erlenmeyer de 250 mL e adicionado 1,0 g dos cubos de espuma de poliuretano (EP) de $0,3 \text{ cm}^3$, previamente lavados, secos, e todo conjunto esterilizados a 121°C , durante 15 minutos.

Após resfriamento, à temperatura ambiente, adicionou-se aos reatores contendo o soro e o meio para a imobilização, 2×10^6 esporos/mL do fungo que foram mantidos em agitação a 140 rpm durante 3 dias. Após o tempo de incubação, as biopartículas produzidas foram separadas do meio por peneiramento e lavadas com água estéril para serem utilizadas nos reatores visando à produção de enzima.

Para os ensaios realizados com seis réplicas, as biopartículas produzidas eram adicionadas aos reatores de 250 mL contendo soro de leite nas mesmas condições da imobilização, em seguida submetidos às mesmas condições de agitação, com remoção de alíquotas a cada 24 h para análise da atividade enzimática de β -galactosidase, açúcares redutores, DQO e amônia do filtrado.

3.10 Principais métodos analíticos

3.10.1 Açúcar total

Este procedimento analítico foi realizado na caracterização do soro de leite e nos ensaios preliminares com diferentes soros “*in naura*”. A análise de açúcar total medido como lactose foi realizado através do método fenol-ácido sulfúrico, descrito por Dubois *et al* (1956).

Neste método, após a diluição necessária, adicionou-se em tubo de ensaio 100 μL da amostra diluída, 700 μL de água destilada, 48 μL de solução de fenol 80 % e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitar e incubar por 30 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a leitura de absorbância a 490 nm.

Juntamente com a análise, construiu-se uma curva de calibração com concentrações de lactose variando de 10 a 50 mg.L^{-1} . Para o branco, foi realizado o mesmo procedimento usando água destilada em lugar da amostra.

3.10.2 Açúcares redutores expresso em lactose

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959). A determinação da concentração de açúcares redutores foi feita adicionando 1 mL da amostra diluída a 2 mL do reagente DNS em tubos de ensaio, que foram incubados em banho de água fervente por 5 minutos. Após esse tempo, resfriavam-se os tubos em banho com água à temperatura ambiente e completava-se o volume a 25 mL com água destilada. Em seguida, os tubos eram homogeneizados para a realização da leitura da absorbância a 540 nm.

Para a calibração, foi realizado um branco em que 1 mL de água destilada substituíu a amostra, seguindo o mesmo procedimento. A concentração foi determinada a partir de uma curva padrão de lactose de 0,5 a 5,0 mg.mL⁻¹ (adaptação do método de Miller).

3.10.3 Determinação da biomassa fúngica

Nos ensaios sob agitação para produção de proteína, a biomassa fúngica produzida no meio nutritivo foi determinada ao final de cada tempo reacional. Para tanto, todo o conteúdo dos frascos foi filtrado através de membrana em fibra de vidro 0,45 µm e a biomassa foi lavada duas vezes com água destilada, seguida de secagem em estufa até obter uma massa constante a 105 °C. O crescimento celular do fungo em soro de leite, em diferentes tempos de ensaio, foi expresso em grama por litro (g.L⁻¹).

3.10.4 Determinação da proteína bruta

O percentual de proteína da biomassa seca do fungo *Aspergillus niger* para cada tempo de ensaio foi estimado de acordo com APHA (2012), utilizando o método Micro-Kjeldahl para a determinação de nitrogênio, o qual foi convertido em proteínas multiplicando pelo fator de 6,25 (AOAC, 1975).

3.10.5 Determinação da atividade da enzima β-galactosidase através da hidrólise do substrato ONPG

A enzima β-galactosidase foi determinada através da medição da liberação de o-nitrofenol (o-NP) a partir do substrato o-nitrofenil β-d-galactopiranosídeo (ONPG) adquirido

da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). A atividade enzimática foi realizada através de um teste colorimétrico, considerando que o substrato O-NPG é um composto incolor que após hidrólise produz a galactose incolor e o-NP com coloração amarela. O coeficiente de extinção molar do produto o-nitrofenol (O-NP) foi determinado experimentalmente segundo metodologia do CODEX CHEMICALS (1981), o resultado obtido foi de $4,3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$. Uma unidade (U) de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que libera $1 \mu\text{mol}$ de o-nitrofenol por minuto sob as condições do ensaio.

O ensaio de β -galactosidase foi baseado em Hatzinikolaou *et al.* (2005). Para a determinação da enzima, 1,9 mL de uma solução de ONPG 2,5 mM, diluído em tampão de citrato fosfato a 100 mM (pH 3,5) foi colocado em tubos de ensaio. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 60°C para equilibrar a temperatura e adicionou-se uma alíquota do caldo fermentado (0,1 mL). Após a incubação de 10 minutos em banho de água, foi utilizado 1 mL de carbonato de sódio a 10 % para cessar a reação. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (PG – Instruments T70) no comprimento de onda (λ) de 410 nm, a fim de determinar a quantidade de o-nitrofenol liberado. Para o branco, foi feito o mesmo procedimento, colocando-se água destilada no lugar da amostra. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a Equação 2 a seguir, baseada em Lima (2012).

$$At (\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{A \times V_t}{\varepsilon \times L \times V_a \times t} \quad (2)$$

Sendo:

At = atividade enzimática; A= absorbância lida; V_t = volume do ONPG + volume da amostra + volume de carbonato de sódio (3 mL), ε = coeficiente de extinção molar ($4,3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$), L = caminho óptico de 1 cm, V_a = volume da amostra (0,1 mL), t = tempo de reação (10 minutos).

3.10.6 Estudos da estabilidade térmica da enzima e efeito do pH sobre a atividade enzimática

A influência da temperatura na reação da enzima β -galactosidase foi determinada através da hidrólise do substrato ONPG 2,5 mM em tampão citrato-fosfato a pH 3,5 seguindo o mesmo procedimento descrito no **item 3.10.5**, porém incubando o substrato bruto nas temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C .

O pH ótimo da enzima foi determinado à temperatura de 60 °C, variando-se o pH (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0) da solução no qual o substrato sintético ONPG na concentração de 2,5 mM foi dissolvido.

3.11 Estudo estatístico dos dados

Os dados da caracterização do soro bruto foram avaliados de acordo com a estatística descritiva padrão (média, desvio padrão, coeficiente de variância, valor mínimo e valor máximo), usando o Excel como ferramenta para análise dos dados.

Através do software estatístico SPSS versão 20 foram realizados testes de hipótese. O Teste T de *student* com amostras emparelhadas foi utilizado para verificar se existem diferenças significativas no crescimento do fungo e produção de proteína no soro bruto (FS) com o rendimento celular e o teor de proteína do fungo após a suplementação com glicose nas duas concentrações (FSG).

O teste T foi aplicado também para comparar os valores de açúcares redutores determinados durante os ensaios a fim de conferir se existe diferença significativa entre o consumo de açúcares redutores na cultura crescida dispersa com a cultura imobilizada em espuma de poliuretano (EP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados da fase experimental da pesquisa, considerando os dados produzidos referentes à caracterização do resíduo de laticínio, assim como os resultados dos ensaios em bateladas agitadas usando o fungo *Aspergillus niger* AN 400 como inóculo, crescido livre ou imobilizado em espuma de poliuretano em meio contendo o soro de leite bruto ou suplementado com glicose e extrato de levedura.

4.1 Características do soro de leite

Como pode ser observado na Tabela 8, no soro de leite, incluindo os das amostras de soro doce, ácido e salgado, encontra-se uma elevada carga orgânica com valores de DQO no intervalo de 53,6 a 86,90 g.L⁻¹.

Conforme a literatura, como mostrado na Tabela 1, os efluentes da produção de queijo são fortemente poluidor, causadores de sérios impactos ambientais se lançados nos corpos hídricos, e determinantes de problemas em estações de tratamento de esgotos domésticos se lançados na rede coletora devido às concentrações elevadas de matéria orgânica, além do desperdício de um produto valioso (DEMIREL *et al.*, 2005; DANALEWICH *et al.*, 1998).

Tabela 8 – Caracterização dos soros gerados na indústria de laticínio.

Parâmetros	Unidade	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	CV (%)
DQO	g O ₂ L ⁻¹	68,1	53,6	86,9	10,2	15
Açúcar total	g.L ⁻¹	46,6	34,7	54,5	5,8	12
pH	-	5,1	3,5	6,8	1,2	24
Alcalinidade	mg CaCO ₃ L ⁻¹	587	0,0	1330	621	106
Fósforo	mg P L ⁻¹	261,3	149,1	331,8	55	21
Amônia	mg NH ₃ L ⁻¹	21,3	4,48	73,6	18,7	88
Nitrito	mg NO ₂ L ⁻¹	0,08	0,0	0,23	0,09	121
Nitrato	mg NO ₃ L ⁻¹	0,6	0,26	1,5	0,36	59
NTK	mg N L ⁻¹	1134	386	1867	404	36
ST	g.L ⁻¹	62,4	23,9	69,8	11,7	19
STV	g.L ⁻¹	58,1	18,1	67,7	11,8	2,24
STF	g.L ⁻¹	4,2	1,5	7,3	1,7	39

Fonte: Autor (2015).

Comparando o valor médio da DQO dos soros de $68,1 \text{ g.L}^{-1}$ com a carga orgânica das águas residuárias domésticas com força média de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de DQO (JORDÃO; PESSÔA, 2005), observou-se um potencial poluidor em torno de 130 vezes maior que o esgoto sanitário. O principal componente nos soros responsável pela elevada DQO é a lactose. Os valores de açúcar total variaram entre $34,7 \text{ g.L}^{-1}$ e $54,5 \text{ g.L}^{-1}$, com valor médio de $46,6 \text{ g.L}^{-1}$.

O pH das amostras de soro de leite se apresentou sempre abaixo da neutralidade, com valores de até 6,8. A pouca variação do pH é um indicativo de que não existia a presença de compostos químicos e produtos de limpeza, que geralmente é relacionada a amplas faixas de pH em efluentes lácteos (ANDRADE, 2011). Em algumas coletas, os valores de pH foram menores que 4,0, o que inibe o crescimento da maioria dos micro-organismos que crescem em uma faixa ótima de pH entre 6,0 e 8,0. Para o desenvolvimento de processos envolvendo fungos, a faixa de pH encontrada nesse trabalho pode ser definida como adequada, devido ao fato do metabolismo máximo desses micro-organismos estar condicionado pelo pH do meio de crescimento, geralmente em condições ácidas de pH com valores menores que 5,0 (van LEEUWEN *et al.*, 2012).

Os teores de fósforo se mostraram bastante elevados, com valores entre 149,1 e $331,8 \text{ mg.L}^{-1}$, apresentando-se dentro das proporções relatadas por Kargi e Uzunçar, (2012). Considerando-se que o leite contém aproximadamente 1000 mg.L^{-1} de fósforo total (GAUCHERON, 2005), para o valor médio encontrado de $261,3 \text{ mg.L}^{-1}$, pode-se afirmar que em torno de 26 % de fósforo é o percentual que compõe o soro de leite.

Para amônia e nitrogênio total, os valores médios foram de $21,3 \text{ mg.L}^{-1}$ e 1134 mg.L^{-1} , respectivamente, sendo esses os principais compostos nitrogenados presentes no soro. Os valores de nitrito e nitrato apresentaram, em sua maioria, baixas concentrações, o que já era esperado uma vez que o leite não apresenta concentrações consideráveis. De acordo com Santos *et al* (2005), nitrito e nitrato podem aparecer como contaminantes do leite, embora se apresente comumente em concentrações reduzidas.

Seraphim *et al* (1998), analisaram amostras de leite da região de Alfenas, no estado de Minas Gerais, e verificaram uma variação de concentração de 0,02 a $2,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de nitrato e de 0,05 a $0,18 \text{ mg.L}^{-1}$ de nitrito. Maiores concentrações no soro de leite são resultantes da adição de sais de nitrato, o que não ocorre durante a produção de queijo na empresa, diante das concentrações determinadas. Nitrato de sódio ou de potássio tem a função de inibir a ação de contaminantes, especialmente bactérias do gênero *Clostridium* que causa estufamento do queijo. O nitrato adicionado é reduzido a nitrito pela ação da xantina oxidase durante a maturação (PERRY, 2004).

No Brasil, esta adição é permitida em queijos, à exceção de queijos frescos, no limite de 50 mg/Kg, quantificado como nitrato de sódio ou de potássio no produto a ser consumido (BRASIL, 1996).

Para os valores médios da relação DQO/N/P, a composição do efluente de queijo pesquisado apresenta uma proporção aproximada de 260/4,4/1.

Prazeres *et al.* (2012) afirmaram que uma proporção de C/N/P de efluentes de queijo pode ser aproximada em 200/3,5/1, podendo ser considerada como deficiente em compostos nitrogenados para o tratamento biológico, o que justifica uma gestão diferenciada desse resíduo produzido, como por exemplo, o seu uso em bioprocessos.

Considerando apenas a relação DQO/N, o soro de leite apresentou relação bastante alta e aproximada de 60:1. Em geral, um meio equilibrado para fungos deve conter cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio (10:1) para garantir um elevado teor de proteínas. Dessa forma, verifica-se a necessidade de suplementação de nitrogênio no soro para a produção de enzimas (BARROS, 2011; LIMA, 2012). Uma relação C/N em excesso (50:1), como encontrado no soro, favorece o acúmulo de metabólitos secundários, álcoois, lipídeos e polissacarídeos secundários (CARLILE; WATKINSON, 1994).

Os resultados da composição indicam que o soro de leite contém fósforo em quantidades suficientes para o crescimento de fungos. Santoro *et al.* (1999), analisando a composição de nutrientes do soro de leite para a produção de ácido oxálico pelo *A. niger*, não verificaram influência da suplementação de fósforo na produção do ácido orgânico pelo fungo. Em relação à amônia, as concentrações são bastante variáveis (CV = 88 %) ocorrendo entre 4,4 e 73,6 mg.L⁻¹.

De acordo com Papagianni (2004), treze diferentes compostos são essenciais para o crescimento de fungos, desses, oito, incluindo o fósforo e o nitrogênio, são requeridos em quantidades relativamente grandes.

Com o uso do soro de leite para crescimento de fungo, a adição de nutrientes, principalmente o fósforo, seria desnecessária, uma vez que o nitrogênio pode ser necessário para obter um melhor balanço entre C/N/P, ou ainda o uso de fontes específicas, como o extrato de levedura, para favorecer a produção de enzimas (BON *et al.*, 2008).

4.2 Testes preliminares com diferentes soros de queijo

Na Tabela 9, é mostrada a composição da matéria orgânica carbonácea, representado pela DQO, açúcares totais e de nutrientes (amônia e fósforo), assim como a condutividade elétrica e pH de três diferentes amostras de soros produzidos na fábrica e usados nos ensaios preliminares.

Tabela 9 – Características dos soros empregados nos ensaios preliminares.

Tipos de soro	pH -	DQO (g.L⁻¹)	Açúcar total (g.L⁻¹)	Fósforo (mg.L⁻¹)	Amônia (mg.L⁻¹)	CE (μS.cm⁻¹)
Doce	6,28	58,37	46,7	289,46	14,56	3980
Salgado	6,29	60,25	44,5	296,61	8,96	22000
Ácido	4,01	52,51	40,6	191,73	6,72	4720

Fonte: Autor (2015).

A composição físico-química dos diferentes soros de leite amostrados é variável conforme o tipo de queijo produzido, tratamento térmico e manipulação e, desta forma, determinadas produções podem influenciar tanto na qualidade do soro, como, dependendo do processo, contribuir ainda mais para a poluição ambiental dos corpos d'água.

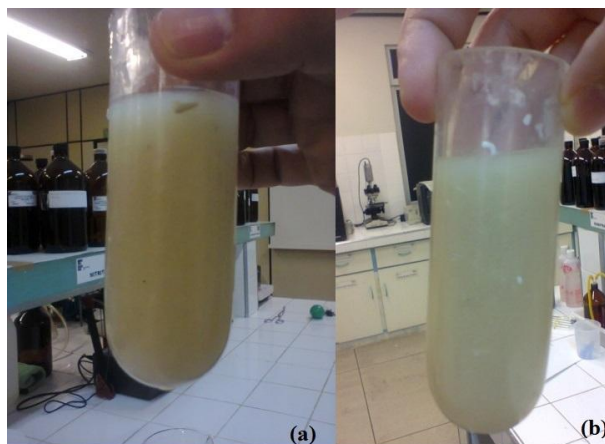
Como exemplo pode ser citado o soro salgado, que, embora produzido em menor volume, contém um constituinte de difícil tratamento, que é o cloreto de sódio adicionado durante o processo.

Com relação aos resultados de pH, o segundo soro apresentou o valor de pH mais baixo, indicativo da presença de ácidos orgânicos, tais como cítrico e láctico que são usados para a precipitação das proteínas na fabricação da ricota.

4.2.1 Morfologia do fungo em diferentes soros

Os resultados visuais da morfologia do fungo deixaram claro que houve crescimento celular em todos os tipos de soro testados. Como ilustrado na Figura 8, no soro salgado e no soro doce, que apresentam elevada concentração de proteínas do leite, o fungo apresentou crescimento na forma de micélio livre.

Figura 8 - Soro salgado (a) e soro doce (b) com *A. niger* AN 400 apresentando crescimento micelial livre.



Fonte: Autor (2015).

Nessa condição de ensaio, com concentrações elevadas das proteínas do leite, ocorreram mudanças intensas nas propriedades do meio reacional, observações visuais durante o ensaio indicavam um grande aumento na viscosidade, devido à dificuldade de mistura, e que deve ter influenciado na taxa de consumo das fontes de carbono e de nutrientes. De acordo com Riley *et al.* (2000), o crescimento micelial livre de fungos filamentosos cria alta viscosidade, podendo alcançar níveis em que a transferência de massa não pode ser provida pelo sistema de mistura.

Na Figura 9, quando do uso do segundo soro, o fungo apresentou um crescimento diferenciado dos demais tipos em que cresceu na forma de micélios dispersos. O segundo soro, sem a presença de proteínas do leite, permitiu o crescimento de *pellets* que são caracterizados por massas miceliais densamente entrelaçadas e compactas.

Figura 9 - Morfologia exibida pelo *A. niger* AN 400 no soro proveniente da produção da ricota (segundo soro).



Fonte: Autor (2015).

A produção de *pellets* no segundo soro pode estar relacionada à limitação de nutrientes, no caso o nitrogênio. A falta de nitrogênio é um dos agentes indutores na produção de agregados miceliais, morfologia importante para a produção bem sucedida de alguns metabólitos como ácido cítrico e itacônico (PAPAGIANNI, 2004).

Entre os soros utilizados, nesta pesquisa, o segundo soro foi o que proporcionou menos fontes de nitrogênio para o fungo, além da menor concentração de amônia, apresenta concentração baixa de proteínas, devido à remoção no processo produtivo da ricota.

4.2.2 Consumo de açúcares totais

Os resultados para a determinação de açúcares totais demonstram que o uso destes pelos fungos filamentosos, em determinadas condições, pode ser limitado. Como mostrado na figura 10, o consumo de açúcares do soro foi um processo lento, no final de 8 dias, valores elevados foram ainda determinados com concentrações remanescentes entre 32,8 e 37,3 g.L⁻¹. Com relação ao consumo os valores variaram de acordo com o soro utilizado, apresentando o fungo morfologia de crescimento e metabolismo diferenciado.

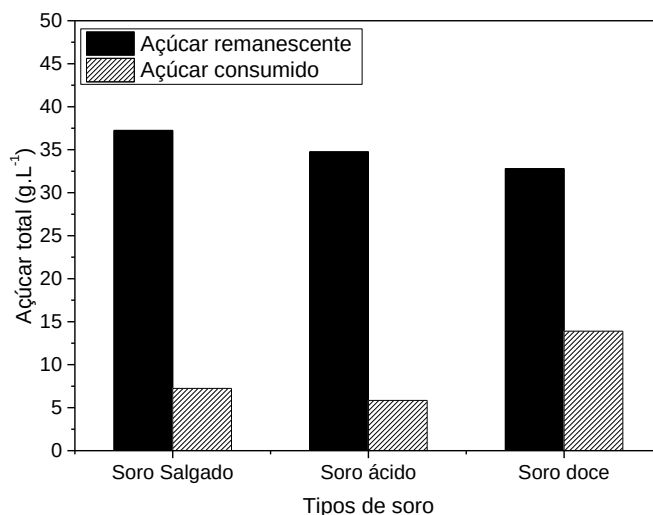
No caso do soro salgado, além das proteínas que influenciam na morfologia, interferindo no processo de mistura, os valores elevados de condutividade elétrica (22.000 $\mu\text{S.cm}^{-1}$) evidenciam uma condição ambiental de elevada salinidade. Como mostrado na Figura 10, no soro salgado, houve um consumo de 7,25 g.L⁻¹ (16,3 %) de açúcares totais, no 8º dia. A concentração final foi de 37,25 g.L⁻¹.

Samapundo *et al.* (2010) estudaram o efeito antimicrobiano de diferentes sais sobre espécies de *Penicillium roqueforti* e *Aspergillus niger*. Os resultados mostram que entre os componentes testados, o cloreto de sódio e o cloreto de magnésio têm, em geral, um maior potencial antimicrobiano. Com esses sais foram observadas taxas mais lentas de crescimento das colônias das espécies com longa duração da fase lag.

El-Samragy *et al.* (1996) estudaram os fatores ambientais e seu efeito sobre a produção de ácido cítrico em duas linhagens do fungo *Aspergillus niger*, utilizando como substrato o soro de leite. Nesse estudo, entre as variantes, a concentração de sal foi investigada, e, após nove dias, a maior concentração de lactose consumida ocorreu no soro que estava livre de sal (19,0 g.L⁻¹), com correspondente produção de 1,06 g.L⁻¹ de ácido cítrico, enquanto o menor consumo foi de 3,1 g.L⁻¹, ocorrido na batelada que continha 12 % de sal. Nesse meio salino foi verificado a menor produção de ácido cítrico (0,76 g.L⁻¹).

Assim como nesses estudos, nessas condições de salinidade do soro, pode ter ocorrido um efeito limitante na utilização da lactose pelo *Aspergillus niger* AN 400.

Figura 10 - Consumo de açúcar total em diferentes tipos de soro pelo *A. niger* no final de 8 dias.



Fonte: Autor (2015).

O consumo de lactose medido como açúcares totais no segundo soro, desta pesquisa foi de 5,85 g.L⁻¹ (14,4 %). No final de oito dias, houve uma grande fragmentação dos *pellets* produzidos. Esse fator aliado à deficiência de nitrogênio nesse soro pode ter influenciado o baixo consumo de açúcar pelo fungo.

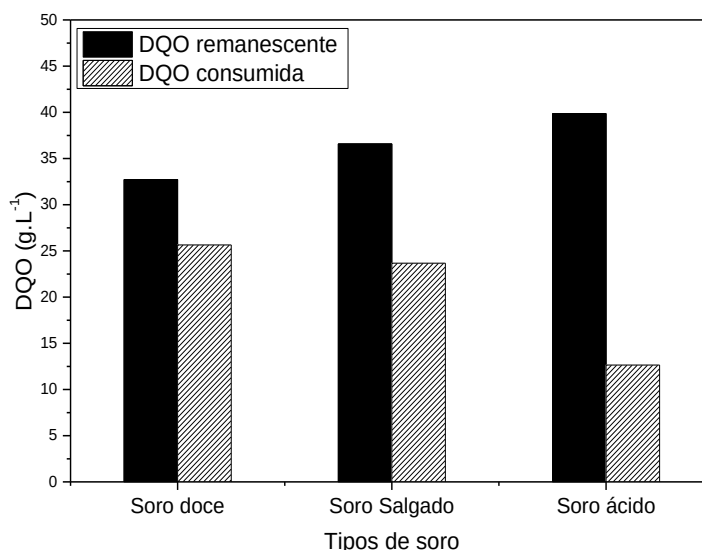
No que se refere ao consumo de açúcares totais, o soro doce, que é gerado em maior quantidade, se apresentou como o melhor substrato para os ensaios subsequentes com o fungo. Melhores condições de salinidade e nutrientes, como, por exemplo, uma maior concentração de amônia, forma nitrogenada prontamente disponível para o fungo, pode ter influenciado positivamente no processo. No final do ensaio, os açúcares totais foram reduzidos de 46,7 g.L⁻¹ para 32,8 g.L⁻¹, o que representou um consumo de 29,9 %.

4.2.3 Remoção de matéria orgânica

Na Figura 11, verifica-se que ao final de 8 dias a DQO inicial (58,37 g.L⁻¹) no soro doce foi reduzida para 32,72 g.L⁻¹, representando uma eficiência na remoção de 43,95 %. O soro salgado apresentou o consumo das fontes de matéria orgânica ligeiramente menor, removendo 39,29 % da DQO inicial. O menor desempenho pelo fungo na redução da DQO

ocorreu no segundo soro, com remoções de 24,1 % da DQO, o que se deve provavelmente a deficiência de nutrientes nesse tipo de soro.

Figura 11 - Redução de DQO para os três diferentes soros pelo *A. niger* AN 400 no final de 8 dias.



Fonte: Autor (2015).

A ocorrência de uma maior redução de DQO no soro doce, provavelmente, deve-se a um melhor balanço de nutrientes. Zhang *et al.* (2008), utilizando o *Aspergillus niger* para a produção de proteína unicelular, observaram que o aumento da fonte de nitrogênio na forma de amônia resultou em maiores redução de DQO das águas residuárias da produção de vinho, com aumento do percentual de remoção de 40 % para 84,1 %, após a suplementação de 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio.

A influência do nitrogênio na oxidação dos compostos orgânicos verificado nesta pesquisa pode ser também comprovada para os resultados do soro da produção de ricota (segundo soro), o qual continha menos compostos nitrogenados, resultando na redução da capacidade metabólica do fungo.

4.3 Efeito do pH do soro de leite no metabolismo do fungo

O efeito de diferentes valores de pH inicial no meio sobre o metabolismo do fungo no soro doce ao final de 5 dias encontra-se resumido na Tabela 10.

Tabela 10 – Efeito do pH inicial do soro no metabolismo do fungo.

pH	Características dos pellets	pH final	Bio massa (g.L ⁻¹)	Pro teína (%)	β-galactosidase (U.mL ⁻¹)	DQO removida (%)	Redução de açúcar (%)	Amônia (mg.L ⁻¹)
3,0	Superfície lisa, macia e compacta	3,66	11,31	34,6	0,03	39,0	44,2	0,49
3,5	Superfície lisa, macia e compacta	3,72	9,87	31,5	0,06	35,5	46,9	0,83
4,0	Superfície lisa, macia e compacta	3,71	9,17	30,2	0,06	33,3	45,1	3,35
4,5	Redondos e hirsutos	3,36	7,53	28,8	0,04	11,0	14,2	31,17
5,0	Irregulares e hirsutos	4,45	7,10	28,5	0,03	8,2	17,5	16,37
5,5	Redondos e hirsutos	4,41	6,64	29,2	0,03	12,4	15,4	17,35
6,0	Redondos e hirsutos	4,72	6,27	29,6	0,03	11,7	21,9	25,33

- Condições iniciais: DQO solúvel = 65,45 g.L⁻¹; Açúcar redutor = 45,4 g.L⁻¹; Amônia = 9,89 mg.L⁻¹

Fonte: Autor (2015).

Em todos os meios, com diferentes condições de pH inicial, houve crescimento de biomassa na forma de *pellets*, porém estes possuíam características visualmente diferenciadas, variando desde *pellets* lisos, compactos e estáveis até *pellets* hirsutos com formas arredondadas e irregulares.

Como se encontra apresentado na Tabela 10, na faixa de pH estudada o fungo apresentou um crescimento entre 6,27 e 11,31 g.L⁻¹, com um melhor rendimento celular nos meios com menores valores de pH, variando a produtividade celular dependendo do pH inicial. O crescimento do fungo em soro de leite em pH entre 3,0 e 4,0, no final de 5 dias, demonstrou ser o mais favorável, com aumento da produção de biomassa de 9,17 para 11,31 g.L⁻¹. Houve um aumento em 80,4 % no crescimento do fungo no pH mais ácido (pH 3,0) em relação ao valor de pH 6,0 com crescimento de 6,27 g.L⁻¹.

Zhang *et al.* (2008), avaliando o efeito do pH, na faixa de 3,5 a 6,0 no metabolismo do fungo *Aspergillus niger*, em águas residuária da produção de vinho, observaram uma maior redução da DQO (58,3 %) e aumento na biomassa (2,92 g.L⁻¹) quando o pH foi 4,5. El-Holi e Al-Delaimy (2003), utilizando apenas soro de leite como substrato

para a produção de ácido cítrico, com pH inicial de 3,0, observaram aumento da biomassa de *Aspergillus niger* ATCC 9642 de 14,3 g.L⁻¹ no final de 16 dias.

Nos reatores com soro com pH igual a 3,0 após o preparo do meio (esterilização a 121 °C durante 15 minutos) houve mudança de cor no soro de leite. Embora o pH ajustado e a temperatura de esterilização não sejam adequados para a hidrólise química da lactose, não se pode descartar a possibilidade da produção de outras substâncias como oligossarídeos ou a própria glicose e galactose durante o tratamento térmico prévio, que pode influenciar no metabolismo do fungo, aumentando a produtividade celular e provocando a inibição de metabólitos de interesse.

Outro composto que aparece no leite, podendo também ocorrer no soro tratado pelo calor é a lactulose (galactose+frutose), utilizado como indicador de aquecimento do leite (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005), o qual pode ter estimulado um maior crescimento do fungo, em meio com pH mais baixo.

Em relação a um dos subprodutos do processo, a quantidade de proteína na biomassa, a concentração foi mantida em níveis elevados para as diferentes condições de pH inicial, sendo mais favorável para a produção de proteínas, o pH = 3,0, tanto pela maior quantidade de biomassa produzida como também pelo maior valor médio de proteína contida nas células de 34,6 %. A partir do pH 4,5 houve um maior decréscimo no crescimento e no teor de proteína na biomassa, sendo o mínimo de 28,5 %, determinado quando o pH inicial foi 5,0.

Tanto os compostos orgânicos, como o nitrogênio amoniacal foram reduzidos de forma mais efetiva em pH na faixa mais baixa. A maior redução da DQO ocorreu no pH entre 3,0 e 4,0, reduzindo em média 35 % da DQO, provavelmente, devido ao tamanho dos *pellets* formados.

Apesar de o crescimento peletizado ser uma forma atraente para processos envolvendo fungos filamentosos, neste ensaio os *pellets* produzidos apresentava maior diâmetro, quando comparados visualmente com o crescimento em ensaios posteriores, o que deve ter influenciado no metabolismo do fungo, devido à limitação da transferência de massa (nutrientes e oxigênio) presente no meio para o núcleo, tornando a parte interna da biomassa metabolicamente inativa (KRULL *et al.*, 2013; BARRY *et al.*, 2009).

Pode-se inferir ainda que ocorreu a produção e acúmulo de ácidos orgânicos, como o ácido oxálico no final do experimento, principalmente para os valores de pH mais elevado, entre 5,0 e 6,0.

Os valores de pH do meio entre 4,0 e 6,0, favorecem a produção da enzima oxaloacetato acetil-hidrolase, a qual está envolvida na biossíntese de ácido oxálico que é induzida apenas nesta faixa de pH (STRASSER *et al.*, 1994). Essa hipótese pode ser reforçada para os valores de DQO e açúcar redutor nos teste com pH inicial de 6,0, porque, embora tenha havido o consumo, em torno de 20 %, dos açúcares redutores, houve remoção baixa de DQO (11,7 %), indicando a síntese de ácidos pelo fungo, nesta pesquisa.

Em relação à amônia, esta foi praticamente consumida nos reatores com soro em pH de 3,0 e 3,5. A partir do pH 4,5, houve síntese e acúmulo de amônia no meio. De acordo com Griffin (1994), o metabolismo ótimo da amônia por fungos acontece preferivelmente em pH mais alcalino. Entretanto, nesta pesquisa, a espécie estuda num meio reacional, na faixa estritamente ácida, também se mostrou favorável para assimilação e retirada da fase líquida.

No caso da amonificação, o processo se deve possivelmente à presença ainda de proteínas do leite que foram convertidas a amônia passando a ser utilizadas pelo fungo. É provável que o pH mais elevado favoreça o uso do nitrogênio orgânico pelo fungo. Dependendo da quantidade de proteína presente no soro, durante o metabolismo do fungo, a concentração de amônia pode ser muitas vezes maior do que a inicial.

Santoro *et al.* (1999) também observaram um aumento na concentração de amônia em soro de leite utilizando uma estirpe de *Aspergillus niger* quando o pH foi de 6,0, com aumento da concentração de 37 mg.L⁻¹ para 137 mg.L⁻¹ N-NH₃, relativamente maior do que o acúmulo neste experimento com variação de pH, considerando que os autores usaram no processo o soro contendo uma grande parte da fração proteica.

Na faixa de pH estudada nesta pesquisa (3,0 a 6,0), a atividade enzimática foi mais elevada quando o pH final ficou em torno de 3,7 para os ensaios em que o pH original era de 3,5 e 4,0. Para o pH igual a 3, no qual foi obtido a maior redução de DQO (39,03 %), não foi registrada atividade considerável da enzima β -galactosidase (0,03 U.mL⁻¹). Provavelmente, pode ter ocorrido à produção de substâncias inibitórias durante a esterilização, o que reforça a ideia original da hidrólise da lactose em glicose e galactose, não ocorrendo o efeito indutivo e interferindo na produção da enzima β -galactosidase, que é dependente da presença do dissacarídeo no meio de crescimento.

De acordo com Domingues *et al.* (2005), a existência em maiores concentrações de açúcares como glicose e galactose no meio de crescimento pode reprimir a produção de β -galactosidase, diminuindo a porcentagem de células produtoras da enzima.

4.4 Influência da suplementação no soro de leite doce com extrato de levedura

O resultado da influência da suplementação com extrato de levedura sobre o metabolismo do fungo no soro de leite está apresentado na Tabela 11.

Durante este ensaio, mesmo no soro bruto, houve uma maior predominância da forma filamentosa em relação à quantidade de *pellets*, diferente dos resultados obtidos com a variação de pH, em que eram preponderantes *pellets* de grande granulometria.

Como as condições físicas (agitação, tamanho do inóculo e temperatura) que podem influenciar na mudança da morfologia foram mantidas de um ensaio para o outro, é possível que a composição química do meio possa ter condicionado a mudança morfológica. Como já discutido, a composição do soro de leite pode ser variável e a técnica de separação das proteínas também não garante o mesmo percentual de remoção. É provável que tenha permanecido uma maior quantidade residual de proteínas do soro, além da adição extra de extrato de levedura, favorecendo o crescimento filamentoso e reprimindo a produção de *pellets*, sendo que um dos fatores considerados para induzir a formação de *pellet* em fungos filamentosos é a limitação de nutrientes específicos, incluindo o nitrogênio (BRAUN; VECHT-LIFSHITZ, 1991).

No entanto, é muito difícil definir quais condições foram relevantes para a mudança na morfologia do fungo. Fatores que não foram controlados durante o processo como pH e oxigênio dissolvido também tem influência no tipo de morfologia (DECKWER *et al.*, 2006). Assim como nessa pesquisa, já é reconhecida a dificuldade de compreender quais as condições ambientais que podem influenciar na morfologia dos fungos e os efeitos resultantes sobre a produção e excreção de proteínas. Esse fato aparece como uma desvantagem para uma utilização mais ampla de *Aspergillus* como um produtor de proteínas (HESHAM, 2006).

Quando comparados os resultados analíticos do crescimento na forma filamentosa do *Aspergillus niger* AN 400 com aqueles obtidos nos experimentos com variação de pH, em que foram verificados *pellets* grandes, evidenciou-se que a produção de micélio disperso afetou positivamente o metabolismo do fungo no soro de leite, resultando em um maior crescimento celular. Portanto, essa forma morfológica mostrou-se como preferencial para a remoção dos compostos orgânicos, nutrientes e para a produção da enzima em meio composto por soro de leite, nas condições estudadas.

Tabela 11 - Influência da suplementação com extrato de levedura no soro doce sobre atividade metabólica do fungo *A. niger*.

Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	Morfo logia	Bio massa (g.L ⁻¹)	Pro teína (%)	Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)	DQO removida (%)	Consumo de açúcar redutor (%)	Amônia (mg.L ⁻¹)
0	Micélio disperso	14,95	29,0	0,08	57,7	57,0	0,06
0,5	Micélio disperso	15,51	30,4	0,10	59,4	57,9	0,09
1,0	Micélio disperso	16,10	29,9	0,13	68,8	76,1	0,16
1,5	Micélio disperso	16,33	29,7	0,13	68,4	73,5	0,15
2,0	Micélio disperso	16,77	30,3	0,15	69,2	71,8	0,21
3,0	Micélio disperso	17,07	32,7	0,05	69,6	69,9	0,22

- Condições iniciais: DQO solúvel = 56,39 g.L⁻¹; amônia = 8,58 mg.L⁻¹; Açúcar redutor = 53,09 g.L⁻¹; pH = 4,0.
Fonte: Autor (2015).

A forma micelial livre, mesmo sem a suplementação, removeu maior quantidade de compostos orgânicos, determinada na forma da DQO solúvel, e consumiu uma maior quantidade dos açúcares redutores, indicando maior produtividade da enzima degradante da lactose, quando comparado aos *pellets* de grande dimensão, percebidos nos testes de pH. De acordo com Riley *et al.* (2000), o crescimento na forma filamentosa é realizado na maioria das culturas em processos industriais, devido ao maior crescimento celular e produtividade mais elevada.

A maior redução da DQO ocorreu na maior concentração de extrato de levedura adicionada, 69,6 % de remoção, contudo não houve diferença significativa a partir de 1,0 g.L⁻¹ (68,8 %). O nitrogênio amoniacal foi completamente consumido em todos os ensaios no final de cinco dias. A taxa de consumo dos compostos nitrogenados foram maiores na forma filamentosa, não havendo acúmulo na fase líquida, mesmo nos ensaios com adição da fonte orgânica nitrogenada.

A suplementação com extrato de levedura melhorou expressivamente a síntese da enzima β -galactosidase, aumentando em mais de 90 % a atividade enzimática em relação ao soro bruto, quando foi utilizado extrato de levedura, na concentração de 2,0 g.L⁻¹. Esses resultados concordam com Awan *et al.* (2010), que, utilizaram diferentes fontes de nitrogênio,

aumentaram a atividade enzimática de β -galactosidase proveniente do fungo *A. niger* NIAB 280, em meio contendo farelo de trigo como substrato.

A atividade de β -galactosidase foi menor no soro bruto que as respectivas atividades medidas com o meio suplementado com a fonte extra de nitrogênio, com exceção da maior concentração de extrato de levedura. Uma maior atividade enzimática de β -galactosidase foi obtida no soro suplementado até a concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$, sendo que na concentração de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ houve diminuição da atividade da enzima, devido, provavelmente, a alterações provocada na reologia do meio. Visualmente maiores dificuldades de mistura ocorreram para essa concentração, o que deve ter influenciado na transferência de oxigênio nessa velocidade de rotação (140 rpm).

Apesar do favorecimento da atividade enzimática, a suplementação não teve tanto efeito na produção de proteína unicelular, sendo interessante notar que o fungo *Aspergillus niger* AN 400, quando crescido na forma filamentosa, pode alcançar uma elevada produção de biomassa com alto teor proteico, reduzindo em mais da metade a carga orgânica solúvel do soro de leite e eliminando completamente a amônia do meio, sem a necessidade de adição de nutrientes. Um aumento moderado foi observado à medida que aumentou a suplementação com extrato de levedura. O teor de proteína foi de 29 %, na ausência da fonte de nitrogênio, e de 32,7 % no meio com a maior adição, representando um leve aumento de 3,7 %.

4.5 Efeito do tempo e da glicose na produção de proteína unicelular de *Aspergillus niger* em soro de leite

4.5.1 Produção de biomassa

Embora o soro doce, rico em lactose, não seja substrato comumente empregado em bioprocessos com *Aspergillus niger*, os resultados de sólidos demonstraram a capacidade do fungo em crescer em soro de leite, concordando com Dhillon *et al.* (2011) e Mukhopadhyay *et al.* (2005), que utilizaram o soro sozinho como substrato ou combinado com outras fontes de carbono na produção de ácidos orgânicos pelo fungo *A. niger*.

Se comparado a açúcares simples como glicose e frutose, em que os fungos podem assimilar rapidamente, os mesmos crescem lentamente e com fases de crescimento bem maior quando da presença de lactose no meio. El-Samragy *et al.* (1996), usando duas estirpes do fungo *Aspergillus niger* denominada de CAIM 111 e CAIM 167 em soro de leite com o pH ajustado para 4,0, após 9 dias de ensaio, obtiveram um crescimento micelial de 19,7

g.L^{-1} e $18,4 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. El-Aasar (2006), usando soro de leite com pH ajustado para 6,0, obteve crescimento celular de *A. niger* de $2,66 \text{ g.L}^{-1}$ no final de 6 dias.

Neste experimento, o tempo compreendido entre 24 a 48 horas em dois ensaios, proporcionou o crescimento em forma de *pellets*, sendo esta morfologia predominante em todos os tempos reacionais nos ensaios com o fungo e soro (FS) e o fungo com soro e glicose 1,0 % (FSG), como se encontra apresentado na Figura 12a. No terceiro ensaio, foi verificado o crescimento filamentososo do fungo, como se encontra em destaque na Figura 12b, provavelmente favorecido pela maior concentração de nitrogênio orgânico proveniente do leite.

A morfologia exibida durante todo o processo, principalmente quando a biomassa se apresentou na forma de grânulos compactos, proporcionou nas etapas posteriores dos ensaios uma boa facilidade de separação das fases (biomassa e líquido), sendo separados do meio líquido com grande eficiência por filtração, como destacado na Figura 12c.

Figura 12 - (a) Resultado do crescimento celular em FSG, FS e controles da esquerda para a direita apresentando crescimento na forma de *pellets* para o meio contendo inóculo. (b) Crescimento filamentososo ocorrido no terceiro ensaio. (c) Separação por simples filtração. (d) Biomassa após secagem e maceração.



Fonte: Autor (2015).

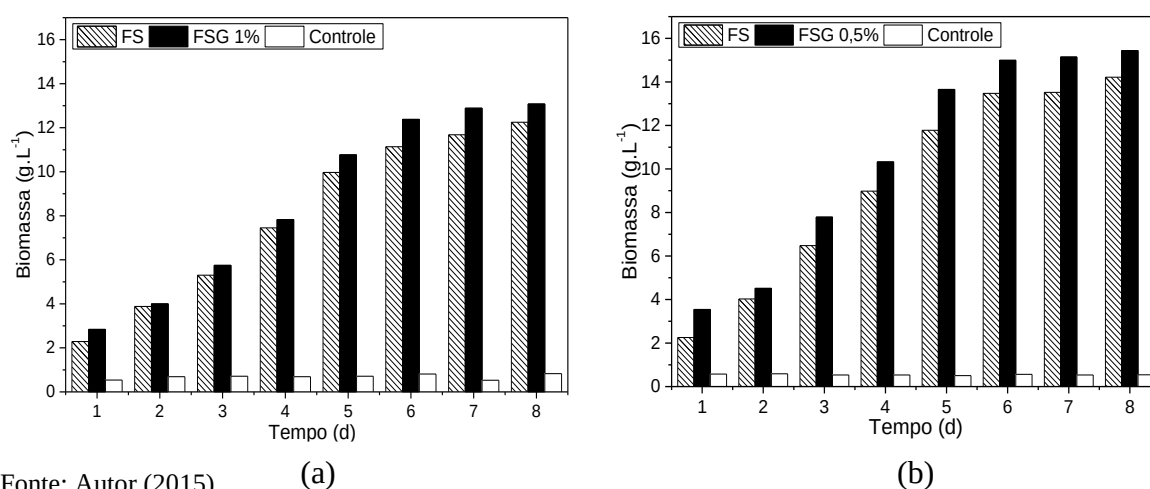
A concentração celular obtida em (FS) indica que a cepa de *Aspergillus niger* cresceu facilmente no soro doce, sem que houvesse a necessidade de suplementação de cosubstratos. Nos meios em que o fungo cresceu na forma de *pellets* contendo apenas a lactose do soro como a principal fonte de carbono para o fungo (FS), o crescimento máximo

foi verificado no último dia ($12,3 \text{ g.L}^{-1}$). No meio suplementado com glicose (FSG 1 %), houve um aumento gradual nos tempos de ensaio atingindo $13,1 \text{ g.L}^{-1}$ no 8º dia da cultura (Figura 13a). Quando o fungo exibiu a forma filamentosa durante o terceiro ensaio, ocorreu um maior rendimento celular, o crescimento celular foi de $14,2 \text{ g.L}^{-1}$ em FS e de $15,4 \text{ g.L}^{-1}$ em FSG suplementado com 0,5 % de glicose (Figura 13b).

O crescimento de *Aspergillus niger* na forma de *pellets* pode ter limitado a difusão de oxigênio e de outros nutrientes para partes internas dos sedimentos, semelhante ao estudo de Withers *et al.* (1994), os quais observaram uma taxa específica de crescimento inferior em forma de *pellet* para o *Aspergillus oryzae* em comparação com micélio filamentoso produzido pelo fungo.

Apesar de não ocorrer um grande aumento de biomassa fúngica na presença da glicose nas duas concentrações, como se verifica nas Figuras 13a e 13b, em relação ao fungo crescido apenas no soro, aplicando o teste T emparelhado ao nível de confiança de 95 % (Apêndice 1), foi possível identificar a possibilidade de existir diferenças significativas no crescimento na presença de glicose em relação ao soro sem suplementação. Verificou-se ainda, na presença da glicose no meio, uma maior estabilidade dos *pellets* quando o fungo exibiu essa morfologia, ocorrendo menos fragmentação quando comparado ao crescimento apenas no soro de leite.

Figura 13 - Crescimento celular do fungo na forma de *pellets* durante os dois primeiros ensaios (a). Crescimento do fungo na forma filamentosa durante o terceiro ensaio (b).



Fonte: Autor (2015).

4.5.2 Produção de proteína unicelular de biomassa fúngica

Utilizando soro de leite bruto sem proteínas, o fungo demonstrou potencial para a bioconversão desse resíduo em produtos úteis, entre esses a produção de proteína unicelular. Esse subproduto se apresenta como uma matéria-prima com potencial para ser utilizada na alimentação humana e animal, produção de adubos orgânicos compensando os custos com processos de tratamento convencional (JIN *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2011).

Na Tabela 12 são apresentados os percentuais de proteína verificados para o fungo crescido em soro (FS) e no fungo crescido em soro e glicose (0,5 % e 1 %), em que níveis razoavelmente elevados de proteínas foram determinados em todos os tempos estudados. A biomassa de *A. niger* crescida em lactossoro apresentou conteúdo proteico elevado atingindo o pico máximo em ambos os ensaios no tempo de 72 h com valores de 39,8 %, 41,7 % e 37,3 % para FS, FSG 1 % e FSG 0,5 % respectivamente (Tabela 12). Os valores máximos no soro sozinho e suplementado foram semelhantes à produtividade de proteína unicelular com *Aspergillus niger* utilizando como substrato águas residuárias da indústria de vinho. Zhang *et al.* (2008) verificaram um teor de proteína de 36,6 % em 48 h de ensaio com a redução da DQO do efluente em 87 %.

Tabela 12 - Percentual da produção de proteína unicelular pelo fungo *Aspergillus niger* AN 400 produzida em soro de leite em diferentes tempos de ensaio.

Tempo (h)	Teor de proteína em FS (%)	Teor de proteína em FSG com 1 % de glicose (%)	Teor de proteína em FSG com 0,5 % de glicose (%)
24	34,0	38,6	35,5
48	34,7	38,1	36,2
72	39,8	41,7	37,3
96	34,4	37,3	33,4
120	29,9	36,3	29,6
144	29,2	24,2	28,9
168	28,0	25,3	27,5
192	27,6	25,1	26,6

Fonte: Autor (2015).

Em nenhum tempo posterior foi possível o mesmo percentual, havendo decréscimo a percentuais de 27,6 % no soro bruto e de 25,1 % e 26,6 % no soro acrescido de glicose. Jin *et al.* (2002), utilizando as espécies *Aspergillus orizae* e *Rhizopus oligosporus* em águas residuárias de amido, observaram que a produtividade de proteína fúngica aumentou até

um tempo ótimo de incubação e decresceu em tempos maiores do que 20 h. Ghaly e Kamal (2004) atribuíram a queda de produtividade de proteína unicelular a partir de *Kluyveromyces fragilis* usando como substrato soro de queijo com a fase de declínio e morte dos micro-organismos. Além da idade das células como referido acima, o esgotamento das fontes de nitrogênio e açúcar também pode estar relacionado com o decréscimo no teor de proteína em tempos maiores de incubação. EL-Aasar (2006) atribuiu a esses fatores a diminuição na produtividade de proteína unicelular de *A. niger* utilizando o soro de leite como meio de crescimento.

A presença do substrato externo na concentração de 0,5 % e 1,0 % de glicose no meio não foi fator determinante na produção de proteína unicelular, não havendo diferenças significativas nos tempos estudados. Aplicando o teste t a um nível de confiança de 95 %, os resultados constataram não existir diferenças significativas na concentração de proteínas no soro sozinho e depois da adição de glicose nas duas concentrações (Apêndice 1). Os valores encontrados em (FS) e (FSG) são relativamente superiores à maioria dos cereais (milho, trigo, arroz, centeio, sorgo, aveia) utilizados na alimentação que tem valor proteico de 9 a 13 % e que geralmente tem baixa qualidade biológica devido à deficiência em aminoácidos essenciais, como a lisina e a metionina.

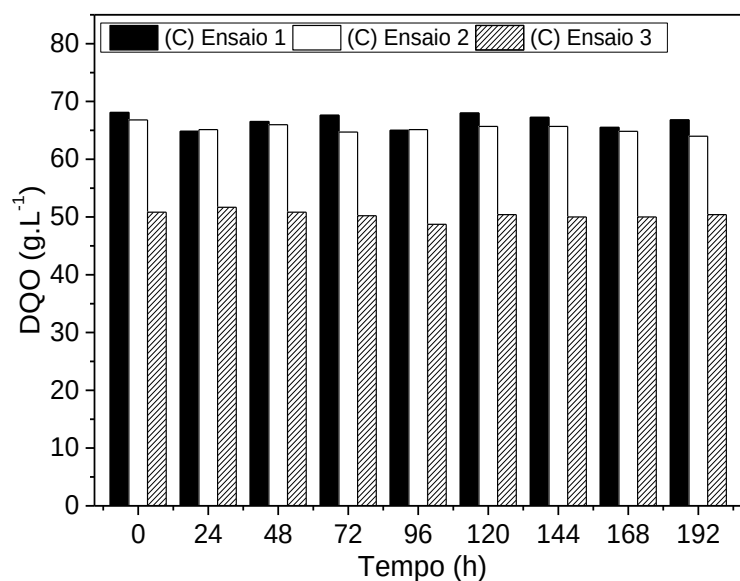
4.5.3 Redução do potencial poluidor

Nesta fase da pesquisa, foi investigada durante a produção de proteína unicelular, a redução da matéria orgânica do soro de leite em duas condições diferentes de produção, o processo com o fungo inoculado no soro bruto (FS) e no soro acrescido de glicose como coss substrato (FSG 1 % e FSG 0,5 %).

4.5.3.1 Remoção da DQO durante a produção de proteína unicelular

As análises de DQO realizadas para as amostras de controle esterilizadas e sem inóculo denotam não ter ocorrido contaminação ou crescimento de micro-organismo no meio, assim como já tinha sido verificado pela determinação de sólidos, apenas em alguns tempos de coleta verificou-se um percentual de remoção em torno de 4 % em relação à DQO inicial (Figura 14).

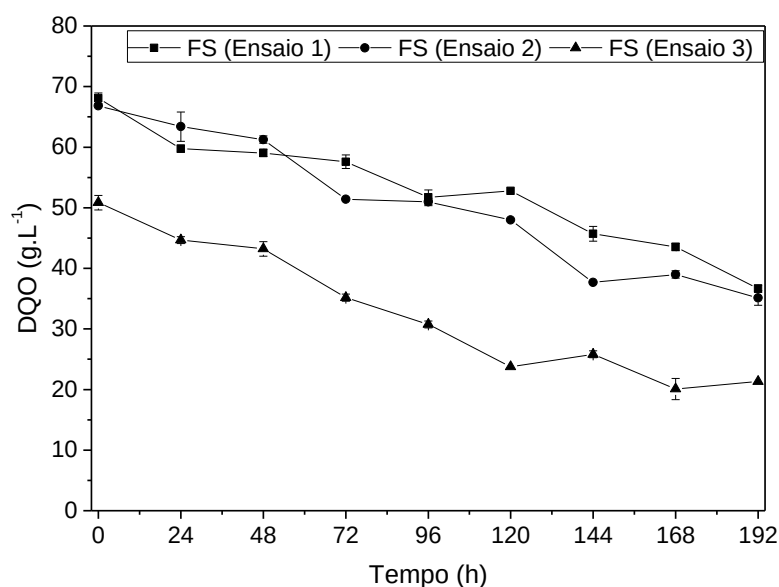
Figura 14 - Resultados de DQO para amostras controles (C) com ensaios realizados simultaneamente nas mesmas condições de FS sem a presença de inóculo.



Fonte: Autor (2015).

Na Figura 15 são apresentados os percentuais de remoção de DQO durante três ensaios com soro desproteinizado. A DQO inicial para o controle (C) e para o soro com fungo (FS) era de 68,09 g.L⁻¹, 66,80 g.L⁻¹ e 50,85 g.L⁻¹ para os ensaios 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 15 - Redução do potencial poluidor do soro de leite na produção de proteína para três ensaios no qual o fungo apresentou a morfologia na forma de *pellets* (ensaios 1 e 2) e na forma de micélio livre (ensaio 3).



Fonte: Autor (2015).

Nos reatores contendo apenas soro bruto removido da fração proteica no último dia, foi verificado que o fungo reduziu a DQO inicial para 36,64 g.L⁻¹ removendo 46,19 %. No ensaio 2 a concentração foi de 35,12 g.L⁻¹ com remoção de 47,44 % da carga orgânica e no ensaio 3 atingiu-se 21,31 g.L⁻¹, reduzindo o potencial poluidor em 58,09 %. Esses resultados indicam que a morfologia do fungo tem influência no metabolismo dos compostos orgânicos do soro de leite.

O fungo crescido na forma filamentosa mais uma vez se mostrou mais eficiente na remoção dos compostos orgânicos, quando comparado aos *pellets*, considerando que não foi utilizada qualquer estratégia para o controle no tamanho dos *pellets* durante os ensaios, ocorrendo que nessas condições de reação o desenvolvimento dos mesmos era de grande dimensão.

Apesar de apresentar uma tendência de remoção gradual de matéria orgânica carbonácea, em alguns momentos (ensaio 1 no 5º dia, ensaio 2 no 7º dia, ensaio 3 no 6º dia), houve um ligeiro aumento da DQO no meio. É possível que nesses dias tenha havido o acúmulo de ácidos orgânicos produzidos pelo fungo. No entanto, quando o subproduto do processo são esses metabólitos (ácidos orgânicos), é necessário o controle rígido do pH, para que se possa ter não só produtividade, mas também acúmulo. Bohlmann *et al.* (1998), buscaram otimizar a produção de ácido oxálico por *A. niger* em soro de leite, e realizaram fermentações com o pH controlado em 5, 6, 7 e 8 e sem controle de pH. Nesses ensaios observaram a maior produtividade com o pH = 6,0 e a menor produtividade de ácido oxálico nos frascos que não tiveram o pH controlado. Durante esta pesquisa, uma vez que não houve controle para manutenção de um pH ótimo, com valores oscilantes durante esses experimentos (Tabela 13) é possível que tenha havido o subsequente consumo pelo fungo, não ocorrendo grande acúmulo nos tempos de amostragem.

Tabela 13 - Valores de pH verificados a cada 24 h com o fungo crescido em soro de leite (FS).

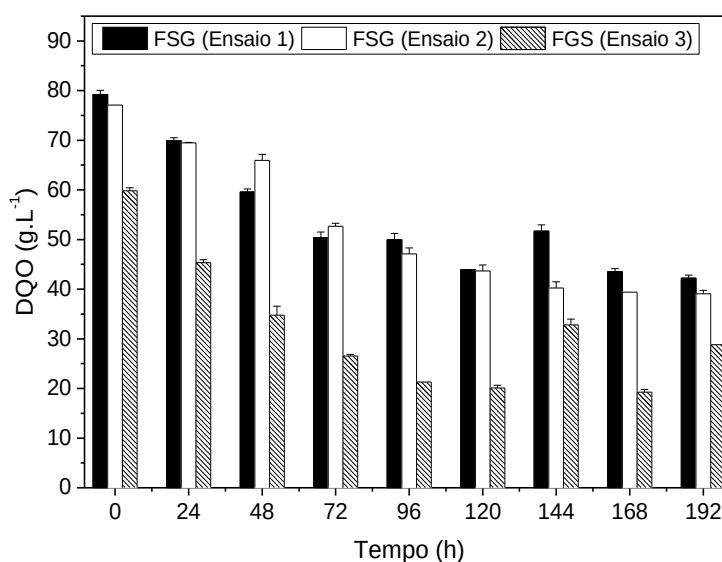
Tempos (h)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
24	4,29	3,94	4,20
48	4,58	4,17	4,32
72	5,02	4,66	4,43
96	6,48	4,67	4,65
120	6,17	4,01	5,30
144	4,25	3,63	5,87
168	4,17	3,76	5,67
192	4,90	3,32	5,70

Fonte: Autor (2015).

Os resultados apresentados na Figura 16 mostraram que a remoção de compostos orgânicos na presença de glicose foi bastante similar aos ensaios em que o soro não recebeu adição desse cossubstrato. No final de 8 dias, foi removido em torno de 50 % da matéria orgânica, com uma DQO remanescente de 42,24 g.L⁻¹ e de 39,06 g.L⁻¹, respectivamente nos ensaios 1 e 2.

No terceiro ensaio a DQO foi reduzida em mais de 65 % no final de 5 dias (59,83 g.L⁻¹ para 20,08 g.L⁻¹). Contudo, o aumento da DQO devido ao acúmulo de compostos orgânicos produzidos pelo fungo ficou mais evidente quando havia a presença de glicose no meio, como pode ser observado durante os ensaios 1 e 3.

Figura 16 - Valores de DQO durante a produção de proteína na presença de glicose em 1 % (ensaio 1 e 2 com crescimento em *pellets*) e 0,5 % (ensaio 3 com crescimento filamentososo).



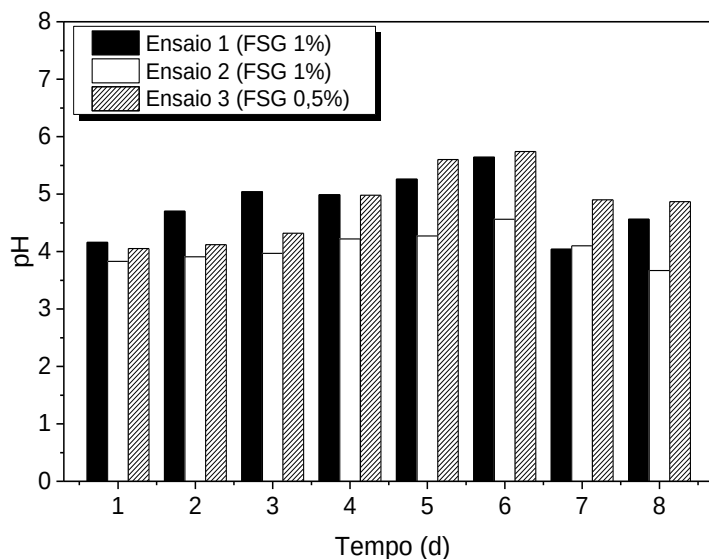
Fonte: Autor (2015).

Como está ilustrado na Figura 17, o comportamento do pH nas amostras enriquecidas com glicose, medido a cada 24 h durante os três experimentos, pode ter favorecido a produção de ácidos orgânicos. Os valores de pH foram sempre menores que a neutralidade com valor mínimo e máximo, respectivamente, de 3,67 e 5,74.

É provável que o pH mais elevado durante dois ensaios favoreça o acúmulo de ácidos orgânicos (ácido glucônico ou oxálico), os quais são os principais ácidos produzidos em pH próximo à neutralidade, o que pode ter depreciado a remoção dos compostos orgânicos do soro de leite. No caso do ácido oxálico, tem-se que ele é o principal ácido produzido em condições de pH superior a 5 pelo *A. niger*, necessitando da manutenção de valores próximos

à neutralidade para que não só haja a sua síntese, mas que também seja efetivo o seu acúmulo (RUIJTER *et al.*, 1999).

Figura 17 - Valores de pH assumidos durante o metabolismo do fungo em soro de leite adicionado de glicose a 1,0 % e 0,5 %.



Fonte: Autor (2015).

Santoro *et al.* (1999) utilizaram o soro de leite em pó solubilizado inoculado com o *Aspergillus niger* para a produção de ácido oxálico, e, a partir disso, verificaram que a produção máxima foi de 37 g.L⁻¹, com o processo totalmente dependente da manutenção de pH igual a 6,0 com uso de alcalinizante durante todo o processo.

O comportamento do pH que foi observado em dois ensaios caracteriza a possibilidade de haver acúmulo de ácidos no meio. Os valores registrados de pH foram respectivamente, para os ensaios 1 e 3, de 5,64 e 5,74 no final de 144 h, muito próximos ao valor definido como ideal (pH 6,0) por Strasser *et al.* (1994), para obter alto rendimento na produção de ácido oxálico pelo *A. niger*.

4.5.3.2 Remoção de amônia na produção de proteínas

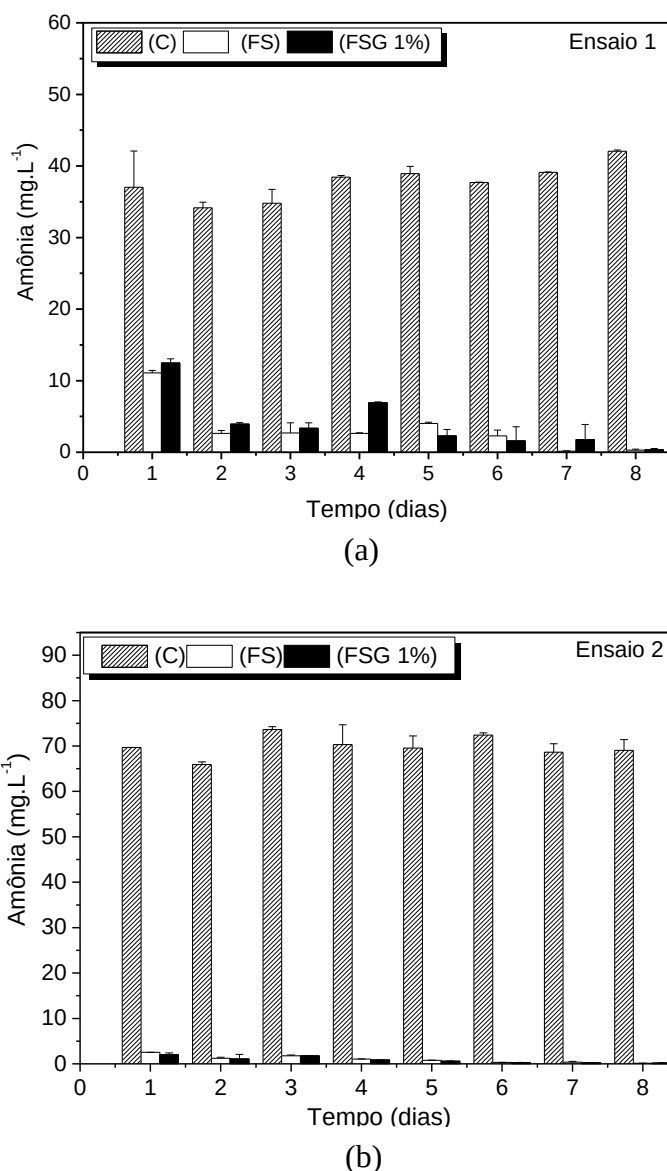
A fonte de nitrogênio para os fungos, com poucas exceções, pode estar representada por compostos inorgânicos como nitrato, nitrito e amônia, ou materiais orgânicos nitrogenados tais como extrato de levedura e peptona (VAN LEEUWEN *et al.*, 2012; PAPAGIANNI, 2004). Entre essas formas nitrogenadas, como verificado durante a caracterização do efluente, a amônia pode estar presente em concentrações consideráveis e

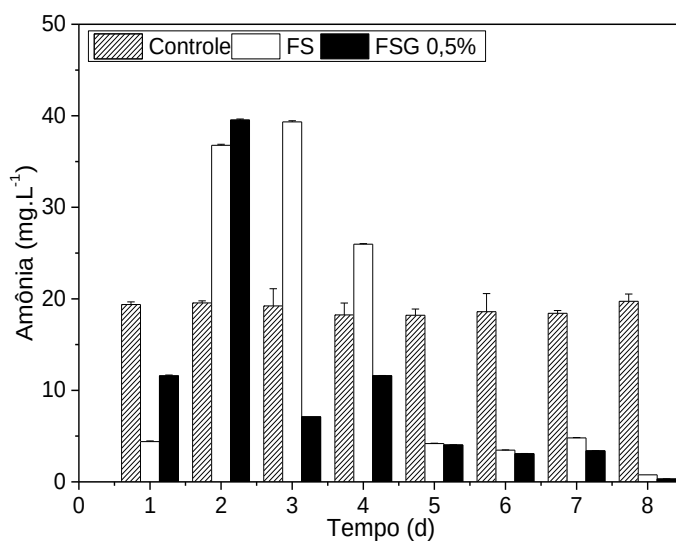
muito variáveis em soro de leite apresentando-se na forma preferencial para o metabolismo dos fungos.

Nas Figuras 18a, 18b e 18c é mostrado o comportamento do fungo em relação ao metabolismo da amônia durante os ensaios em batelada agitada com biomassa dispersa na produção de proteína. Em todos os testes na presença do inóculo, houve assimilação de amônia nos tempos estudados, quando comparado aos resultados dos controles que se apresentaram com pouca oscilação.

A eficiência de remoção de amônia em dois ensaios variou entre 66 % e 97 % (Figura 18a e 18b), nas primeiras 24 horas, não ocorrendo limitação do uso pelo fungo quando a concentração inicial de amônia no soro foi elevada (Figura 18b).

Figura 18 - Variação da concentração de amônia durante a produção de proteína unicelular.





Fonte: Autor (2015).

(c)

Maiores concentrações de amônia em relação a um tempo de reação inferior foram verificadas durante o processo produtivo (Figura 18a e 18c), o que foi atribuído à decomposição de proteínas pelo fungo, as quais foram convertidas à amônia, passando a ser utilizada no metabolismo.

Santoro *et al.* (1999) identificaram o metabolismo de compostos orgânicos nitrogenados pelo fungo *Aspergillus niger* em soro de leite, devido ao aumento da concentração de amônia e a diminuição no teor de proteínas de 1700 mg.L⁻¹ para 600 mg.L⁻¹ no final do experimento.

Silva (2010), utilizando o fungo *Aspergillus niger* AN400 no tratamento de efluente sintético de laticínio em reator em batelada sequencial, também verificou concentrações de amônia bem maiores que os valores iniciais durante dois ciclos, apontando como a possível causa a transformação pelo fungo de compostos orgânicos de nitrogênio em formas inorgânicas.

A conversão do nitrogênio orgânico em amônia pelo fungo é mais evidenciada para os resultados do terceiro ensaio (Figura 18c), como uma maior produção de amônia ao longo do processo. Com 48 h de ensaio, a concentração de amônia praticamente dobrou, ocorrendo 36,77 mg.L⁻¹ no soro bruto (FS) e 39,53 mg.L⁻¹ no soro acrescido de glicose (FSG 0,5 %). Durante o ensaio, verificou-se o consumo da amônia produzida pelo fungo, ocorrendo na presença de glicose o consumo mais rápido, a partir do qual houve diminuição significativa de sua concentração com 72 h de ensaio, enquanto que, sem a presença do açúcar, o processo

veio a atingir valores insignificantes com 120 h de ensaio, confirmando que presença do cossustrato de fácil assimilação pode favorecer a remoção de amônia.

As condições de ensaio com pH ajustado para 4,0 não interferiram na assimilação da amônia como fonte de nitrogênio pelo fungo e a retirada da fase líquida, obtendo uma remoção superior a 90 % para FS e para FSG para os testes 1 e 2, com 48 h de ensaio; e no experimento 3, de aproximadamente 80 % no final de 120 h.

Na produção de “*single cell protein*”, utilizando soro bruto removido à fração proteica, o fungo *A. niger* crescido livre se mostrou eficiente na remoção do substrato amônia. Em tempo, nos dois primeiros testes, foi possível uma remoção efetiva coincidindo com a máxima produtividade de proteína. No terceiro ensaio, que evidenciou a presença elevada de nitrogênio orgânico, o processo teria que seguir até o 5º dia para que houvesse a remoção efetiva de amônia, no entanto resultaria em menor rendimento do subproduto.

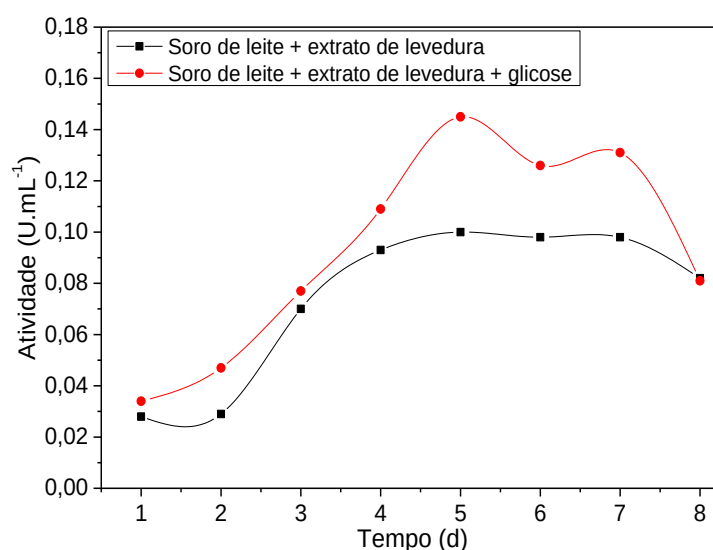
4.6 Ensaios para a síntese enzimática

4.6.1 Atividade de β -galactosidase em batelada agitada com biomassa dispersa com soro suplementado

A Figura 19 apresenta a atividade obtida para β -galactosidase com biomassa dispersa em diferentes tempos, determinada no extrato bruto na temperatura de 60 °C e pH = 3,5.

A maior atividade enzimática foi obtida no 5º dia de cultivo correspondente a 0,10 U.mL⁻¹ para o meio com soro mais extrato de levedura e de 0,15 U.mL⁻¹ para o meio com soro mais extrato de levedura e glicose (0,5 %). Silva *et al.* (2009), usando como meio de cultivo soro de leite em pó contendo 60 g.L⁻¹, tendo como inóculo o *Aspergillus niger* ATCC 16404, verificaram a atividade máxima de 2,5 U.mL⁻¹, resultado bem superior ao obtido neste estudo com o uso de *Aspergillus niger* AN 400 em soro de leite bruto desproteinizado. Barros (2011), utilizando a mesma linha fúngica (*Aspergillus niger* ATCC 16404) crescido em soro de leite em pó (60 g.L⁻¹), com extrato de levedura (3,0 g.L⁻¹) e sais, verificou a atividade de β -galactosidase com valores entre 0,7 e 0,95 U.mL⁻¹. A atividade máxima obtida por Barros (2011) também foi superior à obtida neste trabalho, porém a atividade foi determinada com a enzima concentrada, além do cultivo que foi realizado com soro de leite em pó, no qual é mais fácil o controle da composição do meio.

Figura 19 - Atividade enzimática de β -galactosidase de *A. niger* em crescimento disperso em soro de leite mais extrato de levedura (2 g.L^{-1}) e na presença de glicose (0,5 %).



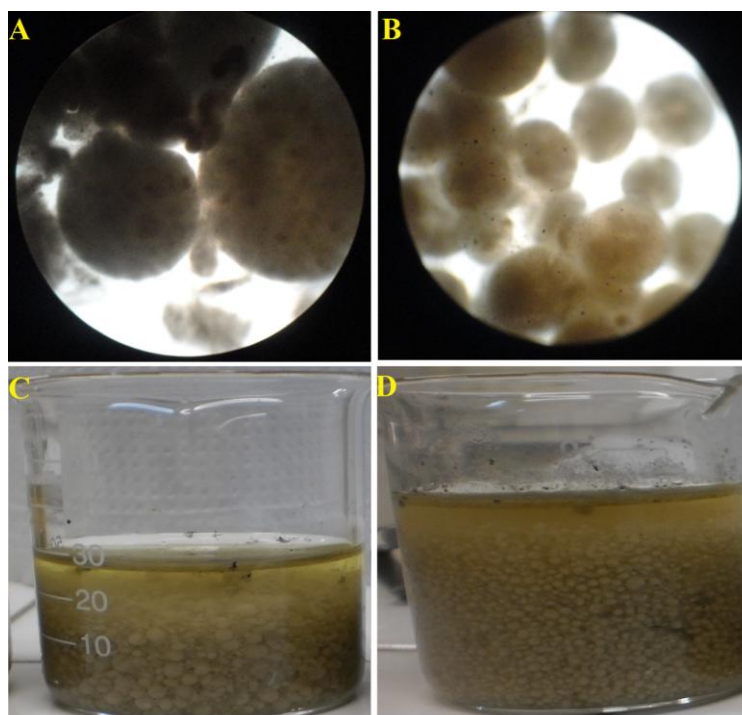
Fonte: Autor (2015).

O meio com a presença de glicose favoreceu de forma moderada uma maior atividade enzimática ($0,15 \text{ U.mL}^{-1}$), não havendo repressão na produção de proteínas nessa concentração. Enquanto a presença de lactose exerce um efeito indutivo em meios de cultura sintetizando quantidade significativas de β -galactosidase (SCHUBER *et al.*, 2012), a glicose é reconhecida pelo efeito repressor na produção de lactase. A própria taxa de hidrólise da lactose mais elevada em relação ao metabolismo de glicose e galactose pelo micro-organismo pode levar ao acúmulo de açúcar no meio diminuindo as células produtoras de β -galactosidase (DOMINGUES *et al.*, 2005).

No entanto, na medida em que a glicose é consumida, a repressão catabólica deixa de exercer seu papel (MADIGAN *et al.*, 2010). Na presente pesquisa, provavelmente nos ensaios com a presença dos dois açúcares, o fungo utiliza no seu metabolismo primeiramente a glicose, um substrato de maior afinidade em relação à lactose, favorecendo o crescimento celular, não havendo efeito repressor nos tempos maiores de reação.

Um fator preponderante para uma maior expressão extracelular da enzima na presença de glicose pode estar relacionado ao tamanho dos *pellets* formados. Como mostrado na Figura 20b e 20d, o meio de cultura na presença de glicose combinado com extrato de levedura favoreceu o crescimento de *pellets* bem menores e mais regulares quando comparado aos *pellets* crescidos no soro de leite sem glicose (Figura 20a e 20c).

Figura 20 - (a) *Pellets* fúngicos lisos e esféricos formado em soro de leite + extrato de levedura com diâmetros variados denotando a presença de fragmentos (aumento de 40x). (b) *Pellets* lisos crescidos em soro de leite na presença de glicose e extrato de levedura com morfologia arredondada com tamanhos homogêneos (aumento de 40x). (c) Imagem dos *pellets* produzidos na ausência e (d) na presença de glicose no soro de leite.



Fonte: Autor (2015).

Os *pellets* têm o fornecimento de oxigênio e nutrientes até um diâmetro crítico, para os *pellets* de *A. niger* este diâmetro é cerca de 400 μm (HILLE *et al.*, 2005). A limitada disponibilidade de nutrientes dentro da parte interna do biopelote, principalmente nas maiores pelotas, podem levar a autólise tendo um efeito significativo no metabolismo celular.

No caso dos *pellets* produzidos no soro de leite sem cossubstrato, embora maiores e possivelmente menos funcionais, não houve sinais de autólise com núcleos ociosos como pode ser observado na Figura 20a, no entanto o núcleo pode ainda ser formado por hifas não viáveis. Assim, ao longo do processo, a morfologia de *Aspergillus niger* com formação de *pellets* pequenos no soro de leite suplementado com extrato de levedura (2 g.L^{-1}) e glicose (0,5 %) pode ser considerada desejável, em vez da formação de *pellets* grandes, o que ocorreu nos ensaios com diferentes valores de pH e nos reatores que receberam apenas o soro sozinho, pois a presença de *pellets* pequenos garantiria de forma mais ativa o transporte de nutrientes ao núcleo destes.

4.6.1.1 Remoção de material orgânico durante a síntese enzimática em biomassa dispersa com soro suplementado

Como discutido anteriormente, o soro de leite apesar de ser um meio rico em nutrientes, dependendo do produto desejado, pode não manter as condições equilibradas entre carbono e nutrientes. Muitos estudos usando soro de leite como substrato para diferentes micro-organismos, principalmente para a produção enzimática, optam pelo soro em pó em que as condições de carboidratos podem ser controladas, adicionado ainda principalmente de uma boa fonte de nitrogênio e sais. No caso do soro líquido, em que há variação nas concentrações de lactose e principalmente de nitrogênio, pode-se ter influência no rendimento do processo e na obtenção de bioprodutos.

A suplementação com uma fonte externa de nitrogênio (extrato de levedura) suprime a ausência e favorece o metabolismo do material orgânico no soro de leite, melhorando o processo de hidrólise da lactose.

Na Tabela 14 é mostrado a redução da DQO durante a atividade enzimática máxima ocorrida no 5º dia e no final de 8 dias, com valores de 66,5 % de remoção na ausência da glicose e de 55 % na presença do substrato orgânico externo.

Tabela 14 - Consumo de material orgânico do soro de leite suplementado com extrato de levedura na presença e na ausência de glicose.

Parâmetros	Soro de leite + extrato de levedura	Remoção (%)	Soro de leite + extrato de levedura e glicose 0,5 %	Remoção (%)
DQO inicial (g.L ⁻¹)	60,23	-	66,11	-
DQO 5º dia (g.L ⁻¹)	24,38	59,5	35,12	46,9
DQO 8º dia (g.L ⁻¹)	20,20	66,5	29,75	55,0
AR Inicial (g.L ⁻¹)	52,93	-	57,40	-
AR 5º dia (g.L ⁻¹)	34,89	34,1	38,26	33,3
AR 8º dia (g.L ⁻¹)	20,49	61,3	22,29	61,2

Fonte: Autor (2015).

É muito provável que a presença da glicose no meio favoreça o metabolismo do fungo em soro de leite, assim como a produção de ácidos orgânicos e seu acúmulo elevem os resultados de DQO. El-Holi e Al-Delamy (2003) e El-Samragy *et al.* (1996) observaram baixa produtividade de ácidos orgânicos (ácido cítrico) pelo *A. niger* utilizando soro de leite sozinho como substrato, obtendo produtividades máximas de 2,43 g.L⁻¹ e 1,06 g.L⁻¹, respectivamente. Para Hossain *et al.* (1984; 1985), a natureza do açúcar tem efeito significativo na produção de

ácido cítrico, sendo preferida a sacarose seguida pela glicose, frutose e maltose. De acordo com Hossain (1984), quando esses açúcares foram utilizados para produção de ácido cítrico pelo *A. niger*, a atividade enzimática de piruvato carboxilase foi elevada, mas a atividade 2-oxoglutarato desidrogenase não foi detectada, demonstrando existir uma forte relação entre a produção e acúmulo de ácido cítrico em relação a essas enzimas. Quando galactose foi a fonte de açúcar, a atividade da piruvato carboxilase foi baixa, mas a atividade do 2-oxoglutarato de desidrogenase foi alta.

Diante dessas observações, é possível dizer que a galactose, a fração hidrolisada do dissacarídeo lactose, tem um forte efeito inibidor na produção de ácido cítrico, devido à alta atividade da enzima 2-oxoglutarato desidrogenase, enzima chave para que ocorra o acúmulo de ácido cítrico (MODDAX *et al.*, 1986).

Assim, quando combinado o soro de leite com outras fontes de carbono, pode-se elevar a produtividade de ácido no meio, sendo esta uma alternativa também viável para o reaproveitamento do soro. Entre vários exemplos que reforça esta afirmação, podem ser citados os estudos de Mukhopadhyay *et al.* (2005), que, utilizando soro de leite acrescido de glicose (0,5 %) e lactose (9,5 %) em pH 6,0, conseguiram uma boa produtividade de ácido glucônico com *Aspergillus niger* alcançando uma concentração de gluconato de 69,1 g.L⁻¹. El-Aasar (2006), em seus estudos, alcançou apenas 4,6 g.L⁻¹ usando somente o soro de leite, já utilizando soro + melaço de cana e soro de leite + melaço de beterraba crua o fungo *A. niger* produziu respectivamente 24,7 g.L⁻¹ e 27,1 g.L⁻¹ de ácido cítrico.

Como apresentado na Tabela 14, o consumo de açúcares redutores pelo fungo no soro de leite sozinho e na presença de glicose foi semelhante, com remoção de 61,3 % no soro sem suplementação de uma fonte de carbono e de 61,2 % no soro suplementado com glicose, contudo eficiências de remoção de matéria orgânica foram distintas, provavelmente quando a glicose foi adicionada ocorreu a conversão dos açúcares em metabólitos orgânicos que também são produtos de interesse comercial.

A redução de açúcares redutores evidencia que o *A. niger* AN 400 é um fungo que contém os genes β -galactosidase, a enzima é responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose, processo necessário para o metabolismo do açúcar pelo fungo.

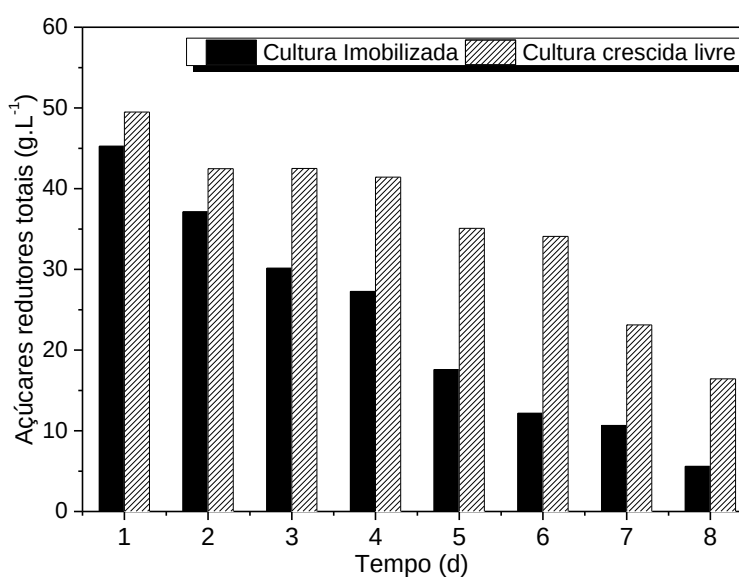
4.6.2 Ensaio em batelada agitada com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano

O processo de imobilização do *A. niger* em espuma de poliuretano se mostrou interessante para os processos biológicos usando soro de leite suplementado. Algumas

vantagens frente ao crescimento disperso foram verificadas, como: aparentemente menores alterações na reologia do meio, o que favorece o suprimento de oxigênio e transferência de massa; maior consumo dos compostos orgânicos e, por consequência, uma maior redução da carga poluidora do soro.

A Figura 21 mostra, para um dos ensaios, que nas mesmas condições, o consumo de açúcares redutores foi maior quando o processo foi realizado na cultura imobilizada em EP em relação à cultura livre, com maior utilização de açúcar redutor nos tempos de ensaio. Comparando os resultados, verificou-se que estatisticamente houve diferença significativa ao nível de 95 % de confiança entre os valores de açúcares redutores medidos no crescimento disperso em relação aos valores determinados com fungo imobilizado (Apêndice 1).

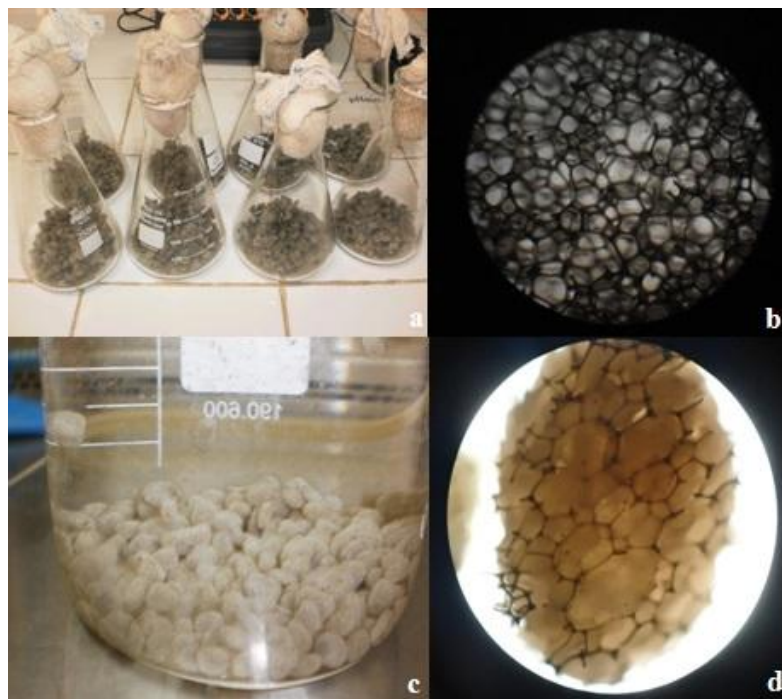
Figura 21 - Comparativo do consumo de açúcares redutores em soro de leite suplementado com $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura submetido às mesmas condições de ensaio entre a cultura imobilizada em espuma de poliuretano com a cultura crescida livre.



Fonte: Autor (2015).

As Figuras 22a e 22b mostram o meio suporte utilizado na imobilização e as Figuras 22c e 22d, o fungo *Aspergillus niger* formando uma rede micélio dentro das cavidades da (EP), podendo-se observar que, com a técnica adequada, a espuma pode ser utilizada com sucesso como meio de imobilização, apresentando porosidade suficiente e superfície disponível para fixação dos esporos e crescimento micelial, retendo grande parte da biomassa.

Figura 22 - (a) Cubos de espuma de poliuretano de 0,3 cm³. (b) Canais existentes na espuma de poliuretano observados através de microscópio óptico com aumento de 40x de uma fina camada cortada (c) Imagem das biopartículas lavadas antes do processo. (d) Observação em microscópio em lente de aumento de 40x do micélio imobilizado.



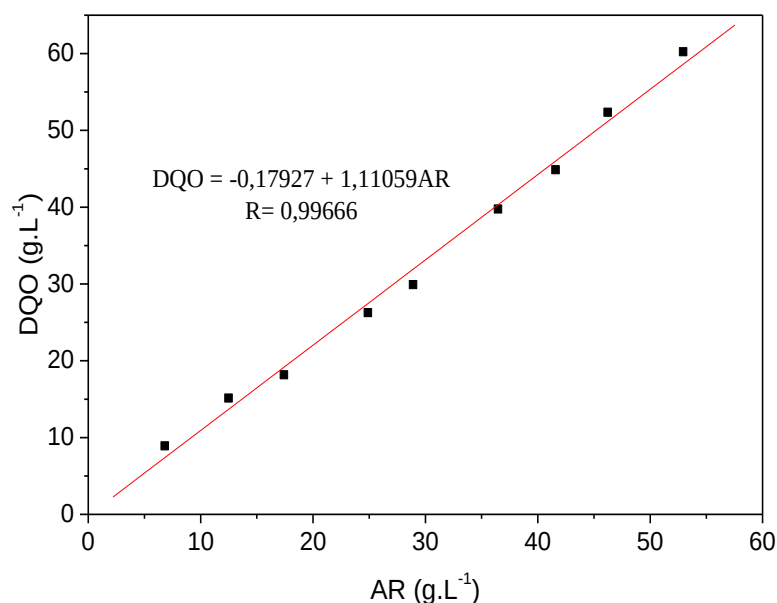
Fonte: Autor (2015).

4.6.2.1 Consumo dos substratos orgânicos

Como a lactose é o principal contribuinte para a carga orgânica, os valores de DQO solúvel, medidos durante um dos ensaios em shaker, foram verificados em relação aos valores de açúcares redutores (Figura 23).

Desse modo, a relação entre DQO e açúcar redutor (AR) medido como lactose foi descrito pela equação linear $DQO = -0,17927 + 1,11059AR$, apresentando uma boa relação entre as variáveis com $R^2 = 0,99$. A boa correspondência entre os valores de DQO e açúcares redutores indica, durante esse experimento, não ter havido um maior acúmulo de ácidos, o que provavelmente ocorreria dependendo das condições do meio, como o pH, que tem efeito na produtividade e acúmulo dos ácidos.

Figura 23 - Relação entre o consumo de açúcar redutor e a remoção da DQO solúvel no soro de leite pelo *A. niger* AN 400.

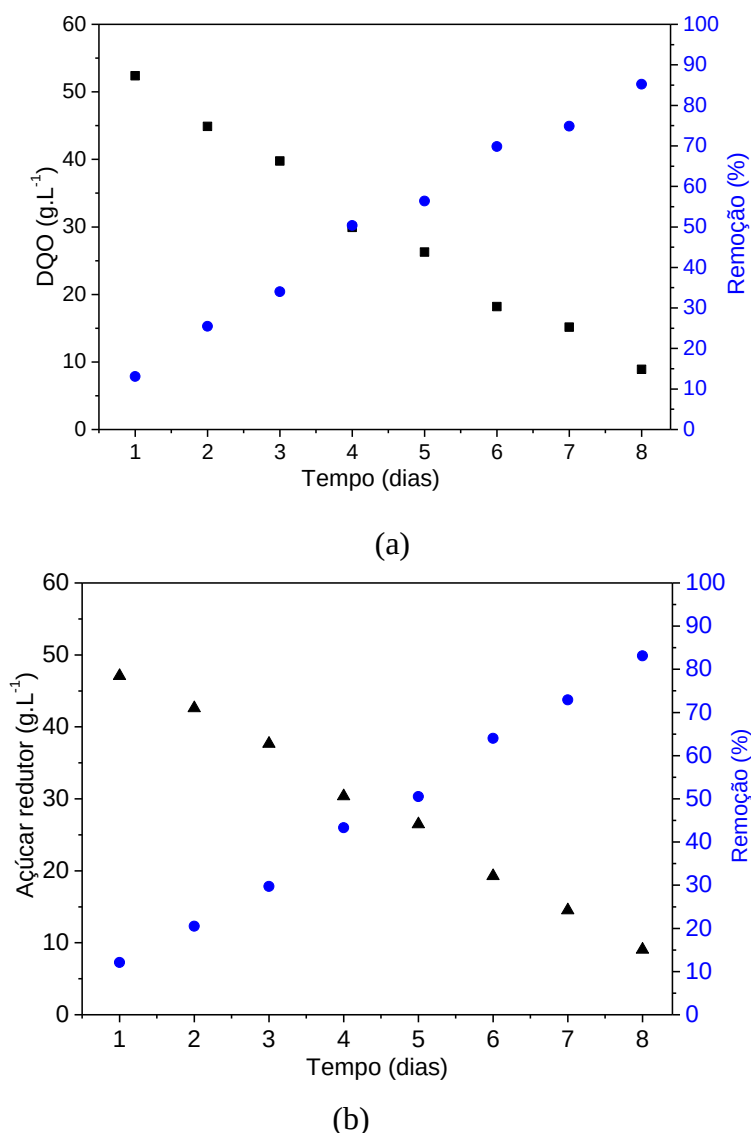


Fonte: Autor (2015).

Na Figura 24, é mostrada a redução dos compostos orgânicos do soro de leite, representada pelos valores de DQO (Figura 24a) e de açúcar redutores (Figura 24b) quando o fungo foi imobilizado em (EP). Em geral, pode-se ressaltar que o consumo de açúcar do soro de leite suplementado na cultura imobilizada foi sempre maior do que no crescimento submerso com células livres. O consumo de açúcares redutores foi de 44,52 g.L⁻¹ reduzindo 83,1 % do valor inicial, consumo similar ao estudo de Mandal e Banerjee (2005), que conseguiram, em 7 dias, um consumo de 41 g.L⁻¹ de lactose utilizando o *A. niger* imobilizado em EP para a produção de ácido oxálico.

Também houve redução considerável da DQO nos ensaios com fungo imobilizado, reduzindo no 8º dia a DQO solúvel de 60,23 g.L⁻¹ para 8,92 g.L⁻¹, o que representa uma redução de 85,2 %. Esses resultados comprovam que as células aprisionadas em meio suporte com meio de cultivo com concentrações equilibradas de carbono e nutrientes são sistemas morfológicamente mais eficientes e produtivos do que a cultura crescida em meio disperso.

Figura 24 - Redução de DQO (■) e de açúcar redutor (▲) pelo fungo imobilizado em EP com respectivos valores em porcentagem (●).



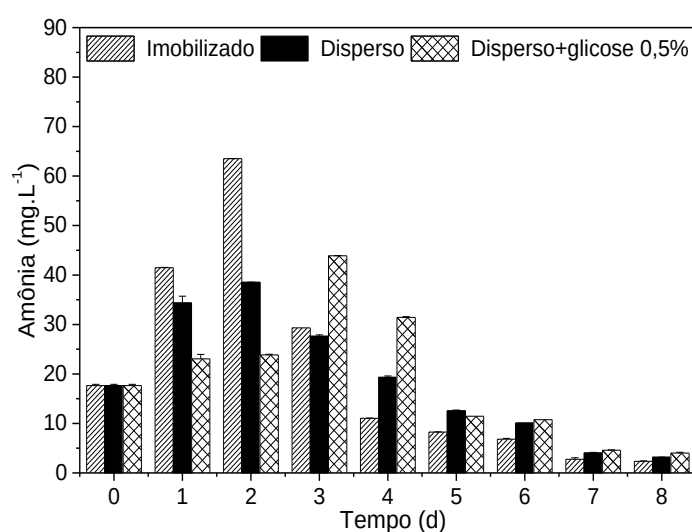
Fonte: Autor (2015).

4.6.2.2 Metabolismo do nitrogênio do fungo *A. niger* após a suplementação com extrato de levedura

A ocorrência do consumo de fontes orgânicas de nitrogênio por fungos filamentosos também foi considerada. Os resultados do metabolismo do fungo no soro de leite indicam que, além da assimilação da amônia presente no meio, houve amonificação resultado da hidrólise de proteínas do leite, por enzimas extracelulares produzidas pelo fungo, as proteases (CARLILE; WATKISON, 1994).

Quando o soro recebeu a suplementação com extrato de levedura também foi verificado o aumento de amônia no meio. Como apresentado na Figura 25, inicialmente a concentração de amônia no soro de leite era de $17,65 \text{ mg.L}^{-1}$, e logo no início houve um aumento acentuado, não havendo repressão no uso das proteínas adicionada para essa concentração inicial no soro, o que poderia ter ocorrido por ser a amônia o principal regulador do metabolismo do nitrogênio pelo fungo.

Figura 25 - Metabolismo do fungo *A. niger* AN 400 com célula imobilizada e dispersa na presença de nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico no soro leite.



Fonte: Autor (2015).

Nesses ensaios, a amônia pode ter sido rapidamente consumida nas primeiras horas tanto na cultura crescida dispersa como na cultura imobilizada ou ainda utilizada simultaneamente com a fonte de proteína (HWANG *et al.*, 2004), ocorrendo logo de início amonificação devido ao uso da fonte orgânica.

O processo de conversão das proteínas em amônia foi maior no crescimento imobilizado, no qual ocorreram concentrações elevadas no primeiro dia ($41,48 \text{ mg.L}^{-1}$) e no segundo dia ($63,51 \text{ mg.L}^{-1}$), quando comparado com a cultura dispersa para o crescimento em soro de leite e soro de leite e glicose 0,5 %.

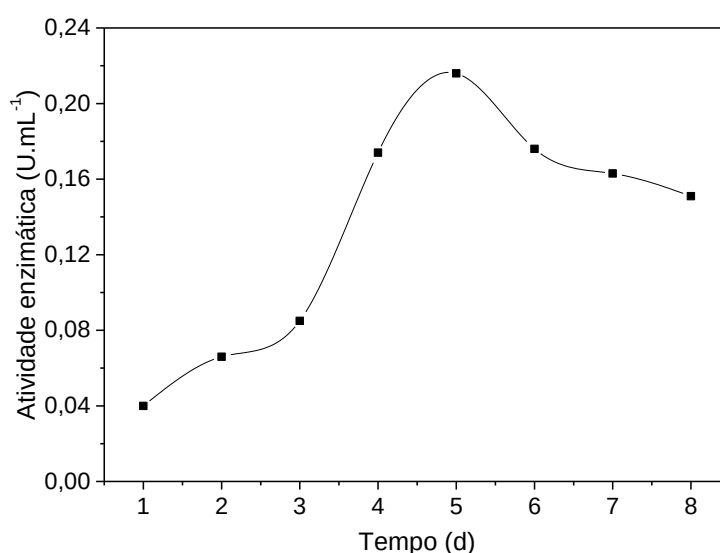
A resposta metabólica distinta das biopartículas de *A. niger* dá uma ideia da produtividade enzimática, visto que uma maior síntese de amônia indica que uma maior atividade de proteases ocorreu na cultura imobilizada. A cultura crescida em (EP) se mostrou metabolicamente mais eficiente também para o consumo das formas nitrogenadas, colocando as células imobilizadas do fungo *A. niger* em uma categoria preferencial, também, para a

remoção de nitrogênio amoniacal e orgânico podendo, com isso, obter maior eficiência e melhores taxas de remoção desses poluentes.

4.6.3 Atividade de β -galactosidase com biomassa imobilizada em batelada agitada com soro suplementado

Na Figura 26, mostra-se a atividade enzimática com biomassa imobilizada medida nos diferentes tempos de ensaio. A maior atividade enzimática foi de $0,22 \text{ U.mL}^{-1}$ no final de 5 dias.

Figura 26 - Atividade de β -galactosidase de *A. niger* imobilizado em (EP) em soro de leite suplementado com extrato de levedura.



Fonte: Autor (2015).

Comparando a atividade das células imobilizadas com a atividade máxima no ensaio submerso com crescimento livre em soro de leite suplementado com extrato de levedura ($0,10 \text{ U.mL}^{-1}$) e com soro de leite na presença de extrato de levedura e glicose ($0,15 \text{ U.mL}^{-1}$), a atividade foi maior em 120 % e 47 %, respectivamente.

O'connell e Walsh (2010), utilizando *Aspergillus niger* van Tiegh, tendo como substrato farelo de trigo inoculado com 1,0 ml de suspensão contendo 10^7 esporos/mL incubado durante 144 horas a 30°C num agitador orbital a 200 rpm, obtiveram máxima atividade enzimática de β -galactosidase de $0,22 \text{ U.mL}^{-1}$ também no 5º dia de cultivo.

Ibrahim *et al.* (2014) compararam a atividade enzimática de pectinase de *A. niger* em células livres e imobilizadas em cubos de esponja de nylon. Quando crescido em meio

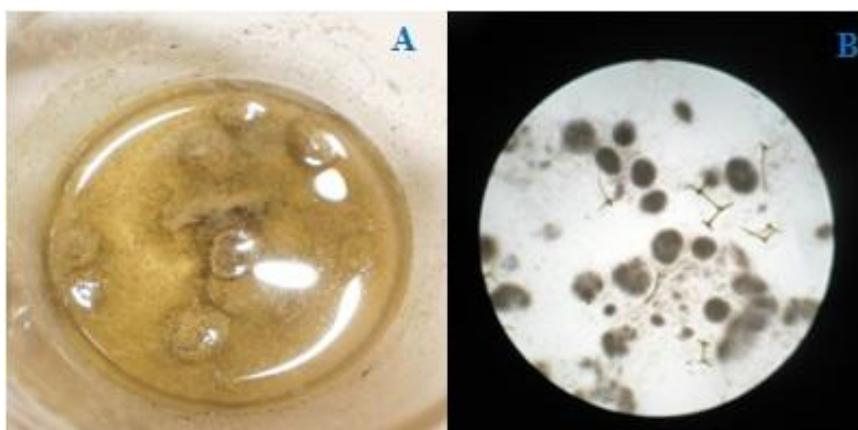
suporte, a atividade máxima ocorreu no 6º dia da cultura obtendo $11,05 \text{ U.mL}^{-1}$, enquanto a atividade máxima nos ensaios com célula livre foi de $2,54 \text{ U.mL}^{-1}$, representando um aumento de 335 %.

Gamarra *et al.* (2010), utilizando a lactose como fonte de carbono, estudaram a produção de celulase por *Aspergillus niger* em três formas diferentes de crescimento (biofilme, estado sólido e células dispersas). A cultura crescida em biofilme usando perlita como meio suporte produziu maior atividade de celulase do que a fermentação em estado sólido e submersa apresentando as três, respectivamente, 1,77, 1,165 e $1,17 \text{ U.L}^{-1}$.

Além de uma maior atividade enzimática, o processo com células imobilizadas permitiu uma separação mais fácil das células do meio reacional, o que pode facilitar o isolamento e refinamento do produto, permitindo ainda a utilização repetida das células aprisionadas, embora isso não tenha sido avaliado nesta pesquisa.

Nas Figuras 27a e 27b é apresentada a morfologia do *A. niger* imobilizado em cubos de EP. Além do crescimento aderido houve também o crescimento disperso do fungo no substrato, predominando pequenos *pellets*, os menores observados durante todos os ensaios, o que provavelmente também contribuíram para uma maior atividade enzimática do fungo.

Figura 27 - (a) Biopartículas de *A. niger* utilizada no ensaio com soro de leite suplementado. (b) Pequenos *pellets* dispersos no meio visualizado em microscópio com aumento de 40x.



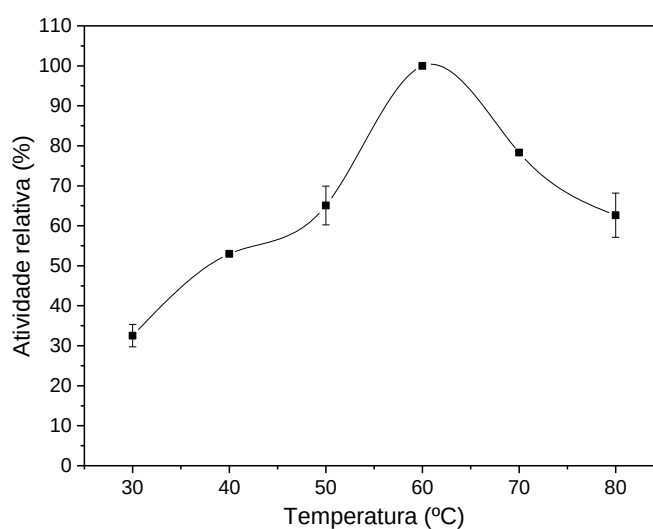
Fonte: Autor (2015).

4.6.4 Estabilidade térmica da enzima e efeito do pH

O efeito da temperatura na faixa entre 30 e 80 °C sobre a atividade da β -galactosidase pode ser observado na Figura 28. A atividade da enzima bruta foi bastante

diminuída na temperatura de 30 e 40 °C, apresentando uma maior atividade na temperatura ótima de 60 °C, com mais de 60 % da atividade residual mantida entre 50 e 80 °C, resultados dentro da faixa relatada para várias β -galactosidases fúngicas, como reportado nos estudos de Manzanares *et al.* (1998), que determinaram a temperatura ótima de β -galactosidase produzida por *A. niger* entre 60 e 65 °C.

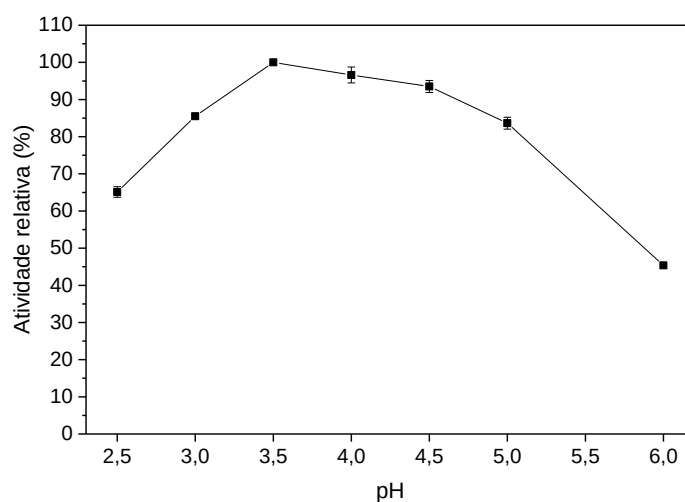
Figura 28 - Influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica da β -galactosidase a pH = 3,5.



Fonte: Autor (2015).

Avaliando a atividade característica da enzima em diferentes condições de pH, a enzima mostrou boa atividade nos valores de pH entre 3,0 e 5,0 (Figura 29).

Figura 29 - Influência do pH sobre a atividade hidrolítica da β -galactosidase a 60 °C.



Fonte: Autor (2015).

Conforme pode ser visto na imagem acima, a atividade enzimática foi mantida em até 85 % nessa faixa de pH, apresentando melhor atividade em pH 3,5, valor que também tem sido relatado para a β -galactosidase proveniente de *Aspergillus niger* nos estudos de Hatzinikolaou *et al.*(2005) e Manzanares *et al.* (1998).

5 CONCLUSÕES

- O resíduo de laticínio usado na pesquisa demonstrou ser fortemente poluidor, com concentrações elevadas de DQO (53,6 a 86,9 g.L⁻¹) e de nutrientes, como o nitrogênio e fósforo, com valor médio de 1134 mg.L⁻¹ e 261 mg.L⁻¹, respectivamente. Essas mesmas características fazem desse resíduo um substrato interessante para processos em biotecnologia, apesar da necessidade de suplementação nitrogenada verificada na relação DQO/N, o que demonstrou ser importante, na síntese enzimática pelo fungo aumentando em mais de 90 % a atividade enzimática.
- O fungo crescido em soro de leite apresentou formas morfológicas distintas, pois cresceu tanto na forma de *pellets* quanto na forma filamentosa. Essa mudança de morfologia pode estar relacionada, principalmente, com a modificação na composição do soro de leite.
- Quando crescido na forma de *pellets* de grande dimensão, no final de 5 dias verificou-se uma redução de 39 % da DQO a pH = 3,5. Já o micélio livre prevaleceu durante a suplementação com extrato de levedura, em ensaios de até 5 dias, ocorrendo a remoção de DQO de 57 % e consumo de praticamente toda amônia, indicando esta morfologia como a mais desejável para os processos envolvendo o fungo nesse tipo de resíduo.
- O pH mostrou-se um parâmetro importante, influenciando no crescimento e no metabolismo dos compostos do soro de leite. Nos ensaios conduzidos em diferentes condições de pH inicial, a amônia foi consumida em pH 3,0 e 3,5, ocorrendo a nitrificação do meio no pH de 4,5 a 6,0, indicando assimilação de compostos orgânicos nitrogenados pelo fungo em pH mais elevado.
- Assim como o pH, pode-se concluir que a adição da fonte externa de nitrogênio (extrato de levedura) favorece o metabolismo de compostos orgânicos, com redução da DQO (69 %) e de açúcar redutor (71,8 %) na concentração de 2,0 g.L⁻¹, melhorando significativamente a atividade de β -galactosidase (0,15 U.mL⁻¹) em relação ao soro bruto (0,08 U.mL⁻¹).
- Com os resultados concluiu-se ainda ser possível integrar o tratamento de águas residuária de laticínio a produção de biomassa fúngica rica em proteína. O fungo produziu elevado teor de proteína unicelular em soro de leite em até 8 dias, com valores entre 25,1 % e 41,7 %. Não houve diferença estatística após adição de glicose em 1 % e 0,5 % na produção, contudo essa adição favoreceu a produção de ácidos orgânicos. Na

produção de proteína unicelular o fungo reduziu no soro de leite a DQO na faixa de 46 % a 58 % em 192 h na ausência de substratos auxiliares e de 47 % a 52 % na presença de glicose.

- Na produção de proteína unicelular a partir de *Aspergillus niger* AN 400 em soro de leite foi verificada também, a remoção de amônia ocorrendo em mais de 90 % no final de 48 h em dois ensaios. No entanto, dependendo da presença do nitrogênio orgânico no meio reacional podem ocorrer concentrações bem maiores que as iniciais, necessitando de tempos maiores para a efetiva remoção, como observado no terceiro ensaio.
- Para outro subproduto do processo investigado, a síntese enzimática, foi verificada que uma pequena adição de glicose no meio (0,5 %), não inibe a atividade de β -galactosidase pelo *A. niger* AN 400 em soro de leite, favorecendo *pellets* menores e homogêneos em relação aos *pellets* produzidos em soro de leite acrescido apenas de extrato de levedura. A atividade enzimática foi de $0,15 \text{ U.mL}^{-1}$ na presença de glicose e de $0,10 \text{ U.mL}^{-1}$ sem a presença do açúcar adicionado, no final de 5 dias.
- A partir da comparação da atividade enzimática de β -galactosidase da cultura crescida livre com a atividade da cultura imobilizada em meio suporte, conclui-se que a atividade enzimática é maior em 120 % com o fungo crescido em meio suporte, correspondente a um valor de $0,22 \text{ U.mL}^{-1}$.
- Em relação à estabilidade térmica, a enzima apresentou maior atividade a 60°C , enquanto que para os valores de pH a máxima atividade foi encontrada em pH 3,5.
- Pode-se concluir ainda que maiores remoções de DQO são obtidas com o fungo imobilizado em espuma de poliuretano, reduzindo em mais de 80 % a carga poluidora do soro e os açúcares redutores no final de 8 dias.
- Os resultados indicam que é possível utilizar o soro de leite sem suplementação na produção de proteína unicelular tendo como o inóculo o *A. niger* AN 400, com redução do potencial poluidor. Em relação à enzima β -galactosidase, os resultados foram baixos, contudo confirmam que o soro de leite pode ser usado como agente indutor na síntese da enzima pelo *Aspergillus niger*, ao invés de ser eliminado no meio ambiente.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a qualidade da proteína fúngica produzida pelo *Aspergillus niger* quanto à presença de aminoácidos essenciais.
- Avaliar o potencial do *A. niger* AN 400 para outro subproduto presenciado durante o processo, que foram os ácidos orgânicos, utilizando soro de leite isolado e enriquecido com outras fontes de carbono.
- Determinar a concentração ótima de glicose que pode favorecer uma maior atividade enzimática do fungo sem causar efeito inibitório.
- Avaliar a reutilização das células imobilizadas para a remoção de compostos orgânicos, nitrogenados e para a síntese enzimática.
- Avaliar diferentes condições de cultura como o uso de outras fontes de nitrogênio, diferentes condições de agitação, tamanho do inóculo e temperatura para uma maior síntese enzimática e de biomassa.

REFERÊNCIAS

- ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO: Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos.
<http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17> Acesso em 23/07/2014.
- ABOU-ZEID, A.-Z. A.; KHAN, J. A.; ABULNAJA, K. O. On methods for reduction of nucleic acids content in a single-cell protein from gas oil. **Bioresource Technology**, v.52, p.21-24, 1995.
- AKHTAR, N.; IQBAL, J.; IQBAL, M. Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. **Journal of Hazardous Materials**, v.108, p.85-94, 2004.
- ALBUQUERQUE, P. M. Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã. 2003. 92f. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- ALMEIDA, E. S. Tratamento do Efluente da Indústria de queijos por processos biológicos e químicos, 2004. 81f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- ANDERSEN, M. R.; NIELSEN, M. L.; NIELSEN, J. Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. **Molecular Systems Biology**, v.4, p.1-13, 2008.
- ANDERSON, G. K.; KASAPGIL, B.; INCE, O. Comparison of porous and non-porous media in upflow anaerobic filters when treating dairy wastewater. **Water Research**, v.28, p.1619-1624, 1994.
- ANDRADE, L. H. Tratamento de efluente de indústria de laticínios por duas configurações de biorreator com membranas e nanofiltração visando o reúso. 2011. 214f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Escola de Engenharia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v.90, p.351-359, 2012.
- ANUPAMA, RAVINDRA, P. Value-added food: single-cell protein. **Biotechnology Advances**, v.18, p.459-479, 2000.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. 1975.
- APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22 ed. Washington: American Public Health Association. 2012.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHIMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial**. v.4. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001.

AWAN, M. S.; KHAN, S. A.; REHMAN, Z. U.; SALEEM, A.; RAJOKA, M. I. Influence of nitrogen sources on production of β -galactosidase by *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.2918-2922, 2010.

AZAM, S.; KHAM, Z.; AHMAD, B.; KHAN, I.; ALI, J. Production of single cell protein from orange peels using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Global Journal of Biotechnology e Biochemistry**, v.9, p.14-18, 2014.

AZBAR, N.; DOKGOZ, F. T.; KESKIN, T.; KORKMAZ, K. S.; SYED, H. M. Comparative evaluation of biohydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. **International Journal of Green Energy**, v.6, p.192-200, 2009.

BALANNEC, B.; VOURCH, M.; RABILLER-BAUDRY, M.; CHAUFER, B. Comparative study of different nanofiltration and reverse osmosis membranes for dairy effluent treatment by dead-end filtration. **Separation and Purification Technology**, v.42, p.195-200, 2005.

BARBOSA, B. C. A.; MIRANDA, M. F.; GABRIELE, C. S. M.; PESSOA, K. A. R.; WANDERLEY, C. R. P.; SILVA, G. M. M. Uso de etanol como cossubstrato para micodegradação de corante azo. **Revista DAE**, p. 1-12, 2015.

BARBOSA, M. R.; ARAÚJO, E. H. Estudo da produção da enzima lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentosos *Aspergillus niger*. **Horizonte Científico**, v.1, p.1-22, 2007.

BARROS, M. A. Produção de Celulase por Fermentação Submersa Empregando Resíduos Agroindustriais para a Produção de Etanol. 2011.77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

BARRY, D. J.; CECILIA, A. E.; CHAN, A. E.; WILLIAMS, G. A. Morphological quantification of filamentous fungal development using membrane immobilization and automatic image analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.787-800, 2009.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações. Fundamentos de bioprocessos**. 1 ed. edufscar. São Carlos. 2010.

BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal Biotechnology**, v.66, p.101-107, 1998.

BENSADOK, K.; EL HANAFI, N.; LAPICQUE, F. Electrochemical treatment of dairy effluent using combined Al and Ti/Pt electrodes system. **Desalination**, v.280, p.244-251, 2011.

BOHLMANN, J. T.; CAMESELLE, C.; NUNEZ, M. J.; LEMA, J. M. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*. **Bioprocess Engineering**. v.19, p.337-342, 1998.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicações e mercado**. 1 ed. Interciência. Rio de Janeiro. 2008.

BORJA, R.; BANKS, C. J. Response of an anaerobic fluidized bed reactor treating ice-cream wastewater to organic, hydraulic, temperature and pH shocks. **Journal of Biotechnology**, v.39, p.251-259, 1995.

BORZANI, W.; SHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. Vol. I. 2 ed. Edagar Bucher L.T.D.A. São Paulo. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 26 de 26 de maio de 2009. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/> > Acesso em: 12/09/2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. Disponível em: < <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/> > Acesso em: 29/01/2015.

BRAUN, S.; VECHT-LIFSHITZ, S. E. Mycelial morphology and metabolite production. **Trends Biotechnology**, v.9, p.63-68, 1991.

BRITZ, T. J.; LAMPRECHT, C.; SIGGE, G. O. **Dealing with environmental issues**. 2008. In: BRITZ, T. J.; ROBINSON, R. .K. (coord). Advanced dairy science and technology. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, cap. 2, p.35-75.

CAMMAROTA, M. C; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v.97, p.2195-2210, 2006.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 3ª Ed, 751p.

CAMPOS, C. M. M.; LUIZ, F. A. R.; BOTELHO, C. G.; DAMASCENO, L. H. S. Avaliação da eficiência do reator UASB tratando efluente de laticínio sob diferentes cargas orgânicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.1376-1384, 2004.

CANALES, A.; PAREILLEUX, A.; ROLS, J. L.; GOMA, G.; HUYARD, A. Decreased sludge production strategy for domestic treatment. **Water Science and Technology**, v.30, p.97-116, 1994.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. San Diego: Academic Press, 1th ed., 1994.

CARMINATTI, C. A. Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando a β -galactosidase de *Kluyveromyces Lactis*. 2001. 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CARVALHO, F; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v.445-446, p.385-396, 2013.

- CHIARARDIA, A. C. N.; FERREIRA, P. E. Redução do impacto ambiental causado pelo soro de queijo. In: Congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, 20, 1999, Rio de Janeiro, Anais do 20º Congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental. Rio de Janeiro: ABES, 1999. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/brasil20/vi-081.pdf>>. Acesso em 12 jul. 2014.
- COULIBALY, L.; NAVEAU, H.; AGATHOS, S. N. A tanks-in-series bioreactor to simulate macromolecule-laden wastewater pretreatment under sewer conditions by *Aspergillus niger*. **Water Research**, v.36, p.3941-3948, 2002.
- DANALEWICH, J. R.; PAPAGIANNIS, T. G.; BELYEA, R. L.; TUMBLESON, M. E.; RASKIN, L. Characterization of dairy waste streams, current treatment practices, and potential for biological nutrient removal. **Water Research**, v.32, p.3555-3568, 1998.
- DE WIT, J.N. **Lecturers handbook on whey and whey products, first**. Bélgica: 1 ed. EWPA- European Whey Products Association, 2001.
- DECKWER, W. D.; JAHN, D.; HEMPEL, D. C.; ZENG, A. P. System biology approach to bioprocess development. **Life Science Engineering**, v.6, p.455-469, 2006.
- DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T. T. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review, **Process Biochemistry**, v.40, p.2383-2395, 2005.
- DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v.54, p. 83-92, 2011.
- DJELAL, H.; AMRANE, A. Biodegradation by bioaugmentation of dairy wastewater by fungal consortium on a bioreactor lab-scale and on a pilot-scale. **Journal of Environmental Sciences**, v.25, p.1906-1912, 2013.
- DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. *Aspergillus niger* β -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. **Process Biochemistry**, v.40, p.1151-1154, 2005.
- DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. 2006. **Novas Metodologias para a Fermentação Alcoólica do Soro de Queijo**. In: Actas da 6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente. Lisboa, Portugal. Universidade Nova de Lisboa. p.271-280.
- DRAPIER-BECHE, N.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Physical and chemical properties of molecular compounds of lactose. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2558-2563, 1999.
- DUBOIS, M.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.1-7, 1956.
- EL-AASAR, S. A. Submerged Fermentation of Cheese Whey and Molasses for Citric acid Production by *Aspergillus niger*. **International Journal of Agriculture and biology**, v.4, p. 463-567, 2006.

ELDELEKLIOGLU, B.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, U. The effects of nutrient supplements on the production of lactic acid from cheese whey. **Turkish Journal of Biochemistry**, v.38, p.81-91, 2013.

EL-HOLI, M. A.; AL-DELAIFY, K. S. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p.356-359, 2003.
EL-NAWWI, S. A.; El-Kader, A. A. Production of single-cell protein and cellulase from sugarcane bagasse: effect of culture factors. **Biomass and Bioenergy**, v.1, p.361-364, 1996.

EL-SAMRAGY, Y. A.; KHORSHID, M.A.; FODA, M. I.; SHEHATA, A. E. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus Niger*. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.411-416, 1996.

ERGUDER, T. H.; TEZEL, U.; GÜVEN, E.; DEMIRER, G. N. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. **Waste Management**, v.21, p.643-650, 2001.

EROGLU, V.; OZTURK, I.; DEMIR, I.; AKÇA, L.; ALP, K. 1991. **Sequencing Batch and Hybrid Anaerobic Reactors Treatment of Dairy Wastes**. In: Proceedings of 46th Purdue industrial waste conference. p.413-422.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. 2 ed.. Educs, Caxias do Sul. 2004.

FARIZOGLU, B.; KESKINLER, B.; YILDIZ, E.; NUHOGLU, A. Simultaneous removal of C, N, P from cheese whey by jet loop membrane bioreactor (JLMBR). **Journal Hazardous Materials**, v.146, p.399-407, 2007.

FÉLIX, J. P. L. Remoção de DQO e fenóis totais de água residuária de refinaria de petróleo aplicando reatores aeróbios inoculados com *Aspergillus niger*. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Departamento de Engenharia Civil. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

FISCHER, J. Hidrólise da lactose por β -galactosidase de *Aspergillus Orizae* Imobilizada em reator de leito fixo. Uberlândia, 2010. 116f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

FOOD CHEMICAL CODEX. **General tests and apparatus**. 3 ed. Washington: Nat. Acad. Press, 1981, p.491-492.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, p. 335-345, 1998.

GAMARRA, N. N.; VILLENA, G. K.; GUTIERREZ-CORREA, M. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.87, p.545-551, 2010.

GANZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v.18, p.685-694, 2008.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.3784–3788, 2003.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p. 473-483, 2005.

GAVALA, H. N.; KOPSINIS, H.; SKIADAS, I. V.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. Treatment of Dairy Wastewater Using an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v.73, p.59-63, 1999.

GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; BOZINIS, N. A.; LYBERATOS, G. Anaerobic codigestion of agricultural industries wastewaters. **Water Science and Technology**, v.34, p.67-75, 1996.

GHALY, A.E.; KAMAL, M.A. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. **Water Research**, v.38, p.631-644, 2004.

GIBBS, P.A.; SEVIOUR, R.J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.20, p.17-48, 2000.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2 ed. New York: Wiley-Liss. 1994.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D.C. Morphology and productivity of filamentous fungi, **Applied Microbiology Biotechnology**, v.69, p.375-384, 2005.

GUEST, R. K.; SMITH, D. W. A potential new role for fungi in a wastewater MBR biological nitrogen reduction system. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v.1, p.433-437, 2002.

GUILLEN-JIMENEZ, E.; ALVAREZ-MATEOS, P.; ROMERO-GUZMAN, F.; PERED-MARIN, J. Bio-mineralization of organic matter in dairy wastewater, as affected by pH. The evolution of ammonium and phosphates. **Water Research**, v.34, p.1215-1224, 2000.

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

GUTIÉRREZ-CORREA, M.; LUDEÑA, Y.; RAMAGE, G.; VILLENA, G. K. Recent Advances on Filamentous Fungal Biofilms for Industrial Uses. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.167, p.1235-1253, 2012.

GUTIÉRREZ, J. L. R.; ENCINA, P. A. G.; POLANCO, F. F. Anaerobic treatment of cheese production wastewater using UASB reactor. **Bioresource Technology**, v.37, p.271-276, 1991.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Concanavalin A layered calcium alginate–starch beads immobilized β galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. **International Journal of Pharmaceutics**, v.359, p.1-6, 2008.

HATZINIKOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A. D.; CHRISTAKOPOLUS, P.; KEKOS, D. Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v.24, p.161-172, 2005.

HESHAM, E.; KLEINE, J.; RINAS, U. Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.41, p.2103-2112, 2006.

HILLE, A.; NEU, T. R.; HEMPEL, D. C.; HORN, H. Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 92, p.614-623, 2005.

HOSSAIN, M.; BROOKS, J. D.; MODDAX, I. S. Galactose inhibition of citric production from glucose by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.22, p. 98-102, 1985.

HOSSAIN, M.; BROOKS, J. D.; MODDAX, I. S. The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.19, p.393-397, 1984.

HUFFMAN, L. M.; HARPER, W. J. Maximizing the value of milk through separation technologies. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2238-2244, 1999.

HUSSAIN, Q. β -Galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.30, p.41-62, 2010.

HWANG, S. C.; LIN, C. S.; CHEN, I. M.; CHEN, J. M.; LIU, L. Y.; DODDS, W. K. Removal of multiple nitrogenous wastes by *Aspergillus niger* in a continuous fixed-slab reactor. **Bioresource Technology**, v.93, p.131-138, 2004.

HWANG, S.; HANSEN, C. L. Characterization of and bioproduction of short-chain organic acids from mixed dairy-processing wastewater. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v.41, p.1795-1802, 1998.

IBRAHIM, D.; WELOOSAMY, H.; SHEH-HONG, L. Potential use of nylon scouring pad cubes attachment method for pectinase production by *Aspergillus niger* HFD5A-1. **Process Biochemistry**, v.49, p.660-667, 2014.

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v.29, p.47-54, 1994.

JANCZUKOWICZ, W. RODZIEWICZ, J.; THORNTON, A.; CZAPLICKA, K. Effect of fermented wastewaters from butter production on phosphates removal in a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v.120, p.34-39, 2012.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELINSKI, M.; DEBOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v.99, p.4199-4205, 2008.

JEYAKUMAR, D.; CHRISTEEN, J.; DOBLE, M. Synergistic effects of pretreatment and blending on fungi mediated biodegradation of polypropylenes, **Bioresource Technology**, v.148, p.78-85, 2013.

JIN, B.; VAN LEEUWEN, H. J.; PATEL, B.; YU, Q. Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, v.66, p.201-206, 1998.

JIN, B.; YAN, X. Q.; YU, Q.; VAN LEEUWEN, J. H. A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. **Advances in Environmental Research**, v.6, p.179-189, 2002.

JOINT GENOME INSTITUTE. Disponível em
<<http://genome.jgipsf.org/Aspni1/Aspni1.home.html>> Acesso em: 10/01/2015.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. **Tratamento de esgotos domésticos**. 5ª ed. Rio de Janeiro. 2005.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase de *Kluyveromices fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.300-309, 2002.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic model for lactose hydrolysis in a recirculation hollow-fibre bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v.59, p.397-405, 2004.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by versicolor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.381-387, 2000.

KARDEL, G.; FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. Lactase na indústria de laticínio. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.4, p.15-17, 1995.

KARGI, F.; EREN, N. S.; OZMIHCI, S. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, p.2260-2266, 2012.

KARGI, F.; UZUNÇAR, S. Simultaneous hydrogen gas formation and COD removal from cheese whey wastewater by electrohydrolysis. **International journal of hydrogen energy**, v.37, p. 656-665, 2012.

KISAALITA, W.S.; LO, K.V.; PINDER, K.L. Influence of whey protein on continuous acidogenic degradation of lactose. **Biotechnology Bioengineering**, v.36, 642-646, 1990.

KOLARSKI, R.; NYHUIS, G. **The use of sequencing batch reactor technology for the treatment of high strength dairy processing waste**. 1995. In: Proceedings of the 50th Purdue Hungary, International waste conference, West Lafayette, Indiana, Purdue Research Foundation, p.485-494.

KOSSEVA, M.R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J. F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.45, p.437-447, 2009.

KRULL, R.; WUCHERPFENNIG, T.; ESFANDABADI, M. E.; WALISKO, R.; MELZER, G.; HEMPEL, D. C.; KAMPEN, I.; KWADE, A.; WITTMANN, C. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v.163, p.112-123, 2013.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V. C.; MALL, I. D. Organics removal from dairy wastewater by electrochemical treatment and residue disposal. **Separation and Purification Technology**, v.76, p.198-205, 2010.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V. C.; MALL, I. D. Sequential batch reactor for dairy wastewater treatment: Parametric optimization; kinetics and waste sludge disposal. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.1, p.1036-1043, 2013.

LEE, H.; SONG, M.; YU, Y.; HWANG, S. Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics. **Biochemical Engineering Journal**, v.15, p.93-99, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3 ed. Artmed. São Paulo. 2002.

LIFRAN, E.V.; HOURIGAN, J.A.; SLEIGH, R.W.; JOHNSON, R. L. New wheys for lactose. **Food Austrália**, v.52, p.120-1255, 2000.

LIMA, A. F. Imobilização de uma β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1564 cultivada em soro de leite. 2012.101f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará, 2012.

LIU, T.; HE, Z.; HU, H.; NI, Y. Treatment of APMP pulping effluent based on aerobic fermentation with *Aspergillus niger* and post coagulation/flocculation. **Bioresource Technology**, v.102, p.4712-4717, 2011.

LOPES, M. S. S.; OLIVEIRA, P. C. C.; ANDRADE, M. V. F.; ARAÚJO, R. S.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. Remoção de macronutrientes de efluente da indústria de castanha de caju por uso de reator aeróbio em batelada com inóculo fúngico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.16, p.17-26, 2011.

LUO, J.; CAO, W.; DING, L.; ZHU, Z.; WAN, Y.; JAFFRIN, M. Y. Treatment of dairy effluent by shear-enhanced membrane filtration: The role of foulants. **Separation and Purification Technology**, v.96, p.194-203, 2012.

MACHADO, R. M. G.; FREIRE, V. H.; SILVA, P. C.; FIGUERÊDO, D. V.; FERREIRA, P. E. **Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de laticínios**. 1 ed. Segrac, Belo Horizonte, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARDINGO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Artmed. Porto Alegre. 2010.

MANDAL, S. K.; BANERJEE, P. C. Submerged production of oxalic acid from glucose by immobilized *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.40, p. 1605-1610, 2005.

MANZANARES, P.; GRAAFF, L. H.; VISSER, J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel α -galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.383-390, 1998.

MATIOLI, G.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. **Acta Scientiarum**, v.23, p.655-659, 2001.

MAWSON, A. J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, v.47, p.195-213, 1994.

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

MISHRA, B. K.; ARORA, A.; LATA. Optimization of a biological process for treating potato chips industry wastewater using a mixed culture of *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v.94, p.9-12, 2004.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de leite: Composição, processamento e utilização na alimentação. **Semana de Ciência Agrárias**, v.15, p.80-94, 1994.

MODDAX, I. S.; HOSAIN, M. J.; BROOKS, D. The effect of methanol on citric acid production from galactose by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.23, p.203-205, 1986.

MORENTE, E. O.; FERNÁNDEZ-FUENTES, M. A.; BURGOS, M. J. G.; ABRIOUEL, H.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A. Biocide tolerance in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, p. 13-25, 2013.

MUKHOPADHYAY, R.; CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B. P.; BANERJEE, P. C.; GUHA, A. K. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. **International Dairy Journal**, v.15, p.299-303, 2005.

MURARI, C. S.; MORAES, D. C.; BUENO, G. F.; DEL BLANCHI, V. L. Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *Kluyveromyces Marxianus* 229. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.68, p.42-50, 2013.

NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 1 ed. Elsevier. 421p. 2007.

NASSERI, A. T.; RASOULI-AMINI, S.; MOROWVAT, M. H.; GHASEMI, Y. Single Cell Protein: Production and process. **American Journal of Food Technology**, v.6, p.103-116, 2011.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. **Bioreaction Engineering Principles**. New York, 2003. 548p.

O'CONNELL, S.; WALSH, G. A novel acid-stable, acid-active β -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.517-524, 2010.

O'TOOLE, G.; KAPLAY, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p. 49-79, 2000.

OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. R; DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v.29, p.600-609, 2011.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de Alimentos: Alimentos de origem animal**. Vol. II. 1 ed. Artmed. Porto Alegre. 2005.

ORHON, D.; GORGUN, E.; GERMIRLI, F.; ARTAN, N. Biological treatability of dairy wastewater. **Water Research**, v.27, p.625-633, 1992.

ESPINOSA-ORTIZ, E. J.; RENE, E. R.; PAKSHIRAJAN, K.; van HULLEBUSCH, E. D.; LENS P. N. L.; Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives, **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p.553-571, 2016.

PANESAR, P. S.; PANESAR, R.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; KUMAR, H. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.530-543, 2006.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v.105, p.1-14, 2007.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**, v.22, p.189-259, 2004.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia. Conceitos e Aplicações** Vol.1. 2 ed. Makron books. 1996.

PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, p.145-151, 2008.

PERES, C. Soro de leite em pó: uma alternativa auto-suficiente. Tendência brasileira que coíbe a poluição e gera alternativas para o mercado. **Revista Mais Leite**, v.5, p. 54-57, 2011.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v.27, p.293-300, 2004.

JIMÉNEZ-PICHARDO, R.; REGALADO, C.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; MEAS-VONG, Y.; SANTOS-CRUZ, J. S.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E. Evaluation of electrolyzed water as cleaning and disinfection agent on stainless steel as a model surface in the dairy industry. **Food Control**, No prelo 2015.

POMPEU, G. B. Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol. 2010. 96f. Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PRADO, F. C. Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca. 2002, 81f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

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

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

RAMJEAWON, T. Cleaner production in Mauritian cane-sugar factories. **Journal of Cleaner Production**, v.8, p.503-510 2000.

RILEY, G. L.; TUCKER, K. G.; PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68, p.160–172, 2000.

RODRIGUES, K.; OLIVEIRA, P. C. C.; JÚNIOR, F. W. A.; SIQUEIRA, J. P. S.; ARAÚJO, R. S.; WANDERLEY, C. R. P.; MARINHO, G. Tratamento de água com hidrocarbonetos aromáticos por uso de reator em bateladas sequenciais com inóculo fúngico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 17, p.163-170, 2012.

ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SAKAMOTO, I. K.; VARECHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. **Bioresource Technology**, v.161, p.10-19, 2014.

RUIJTER, G. J. G.; Van De VONDERVOORT, P. J. I.; VISSER J. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. **Microbiology**, v.145, p.2569-2576, 1999.

SAMAPUNDO, S.; DESCHUYFFELEER, N.; VAN LAERE, D.; LEYN, D.; DEVLIEGHERE, F. Effect of NaCl reduction and replacement on the growth of fungi important to the spoilage of Bread. **Food Microbiology**, v.27, p.749-756, 2010.

SANROMÁN, A.; PINTADO, J.; LEMA, J. M. A comparison of two techniques (adsorption and entrapment) for the immobilization of *aspergillus niger* in polyurethane foam. **Biotechnology Techniques**. v.8, p.389-394, 1994.

SANTIAGO, P. A.; MARQUES L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *kluveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.567-572, 2004.

SANTORO, R.; CAMESELLE, S.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, A. Influence of milk whey, nitrogen and phosphorus concentration on oxalic acid production by *Aspergillus niger*. **Bioprocess Engineering**, v.20, p.1-5, 1999.

SANTOS, J. S.; BECK, L.; WALTER, M.; SOBCZAK, M.; OLIVO, C. J.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Nitrato e nitrato em leite produzido em sistemas convencional e orgânico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.304-309, 2005.

SARKAR, B.; CHAKRABARTI, A.; VIJAYKUMAR, V. K. Wastewater treatment in dairy industries-possibility of reuse. **Desalination**, v.195, p.141-152, 2006.

SERAPHIM, K. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; FERNÍCOLA, N. A. G. Nitrates and nitrites in raw and commercially pasteurized Milk in the Ciudad Alfenas region, Minas Gerais, Brasil. **Alimentaria**, v.296, p.49-52, 1998.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica**. Vol. 2. 1 ed. Edgard Blücher. São Paulo. 2001.

SCHUBER, L. C. L.; CRUZ, M. C. R.; BONFIM, T. M. B.; BRAND, D.; PASTORE, G. M.; ALMEIDA, M. M. Isolamento e seleção de fungos produtores de β -galactosidase. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, v.12, p.19-40, 2012.

SHUKLA, T. P. Beta-galactosidase technology: a solution to the lactose problem. **Critical Reviews in Food Technology**, v.5, p.325-356, 1975.

SIENKIEWICZ, T.; RIEDEL, C. L. **Whey and Whey Utilization: Possibilities for Utilization in Agriculture and Food Stuffs Production**. 2 ed. . Verlag Th. Mann, Germany. 1990.

SILVA, L. V. C. Tratamento aeróbio de efluente sintético de laticínio usando reatores inoculados com fungos *Aspergillus niger* AN 400. 2010. 102f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental. Instituto Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SILVA, N. K. G.; BARBOSA, R. C.; FILHO, U. C.; CARDOSO, V. L. 2009. **Crescimento celular e produção de beta-galactosidase e celulase por *Aspergillus Niger* em soro de leite**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia-Mg, Anais do 8º COBEQ-IC. Uberlândia. p. 1-5.

SINGH, A.; ABIDI, A.B.; AGRAMAL, A. K.; DARMWAL, N. S. Single cell protein production by *Aspergillus niger* and its evaluation. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v.146, p.181-184, 1991.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. V.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.541-549, 2010.

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

- SKOWRONEK, M.; FIEDUREK, J. Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.162-167, 2006.
- SOLÍS, M.; SOLÍS, A.; PEREZ, H. I.; MANJARREZ, N.; FLORES, M. Microbial decolourization of azo dyes: a review. **Process Biochemistry**, v.47, p.1723-1748, 2012.
- STRASSER, H.; BURGSTALLER, W.; SCHINNER, F. High-yield production of oxalic acid for metal leaching processes by *Aspergillus niger*. **FEMS Microbiology Lett**, v.119, p.365-370, 1994.
- STRYDOM, J. P.; BRITZ, T. J.; MOSTERT J. F. Two-phase anaerobic digestion of three different effluents using a hybrid bioreactor. **Water Salination**, v.23, p.151-156, 1997.
- TORRES, D. P. M. Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino-Comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos). Departamento de Engenharia Biotecnológica, Universidade do Minho, Braga, 2005.
- TSEKOVA, K.; TODOROVA, D.; GANEVA, S. Removal of heavy metals from industrial wastewater by free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 64, p.447-451, 2010.
- VAN DIJCK, P. W. M.; SELTEN, G. C.M.; HEMPENIUS, R. A. On the safety of a new generation of DSM *Aspergillus niger* enzyme production strains. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.38, p.27-35, 2003.
- VAN HAANDEL, A; MARAIS, G. O **comportamento dos sistemas de lodos ativados: Teoria e aplicações para projetos e operações**. 1 ed. Campina Grande. 1999.
- VAN LEEUWEN, J. H.; RASMUSSEN, M. L.; SANKARAN, S.; KOZA, C. R.; ERICKSON, D. T.; MITRA, D.; JIN, B. Fungal treatment of crop processing wastewaters with value-added co-products. **Sustainable Bioenergy and Bioproducts**, p.13-44, 2012.
- VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MENDEZ, R.; LEMA, J. M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. **Bioresour Technology**, v.74, p.231-239, 2000.
- VIEIRA, D. C. Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. 2009. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. Departamento de Engenharia Química, São Paulo, 2009.
- VILLENA G.K.; GUTIERREZ-CORREA, M. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. **The Society for Applied Microbiology**, v.46, p.262-268, 2006.
- VILLENA, G. K.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.231-237, 2007.

VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Nanofiltration and reverse osmosis of model process waters from the dairy industry to produce water for reuse.

Desalination, v.172, p.245-256, 2005.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995.

WITHERS, J. M.; WIEBE, M. G.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J. Development of morphological heterogeneity in glucose-limited chemostat cultures of *Aspergillus oryzae*.

Mycology Research, v.98, p.95-100, 1994.

WUCHERPFENNIG, T.; KIEP, S.; DERSCH, P.; SEIBEL, J. Morphology and rheology in filamentous cultivations. **Advances in Applied Microbiology**, v.72, p.89-136, 2010.

YADAV, J. S. S.; BEZAWADA, J.; AJILA, C. M.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. **Bioresource Technology**, v.164, p.119-127, 2014.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v.40, p.2095-2103, 2005.

ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; GOLDBECK, R.; SOARES, A. S.; QUEIROZ, M. I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica Nägeli*. **Bioresource Technology**, v.101, p.7107-7111, 2010.

ZHANG, Z. Y.; JIN, B.; BAI, Z. H.; WANG, X. Y. Production of fungal biomass protein using microfungi from winery wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v.99, p.3871-3876, 2008.

ZHOU, Z.; TAKAYA, N.; NAKAMURA, A.; YAMAGUCHI, M.; TAKEO, K.; SHOUN, H. Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.1896-1896, 2002.

ZIMMER, T. R. Influência da carga orgânica e do tempo de enchimento sobre o desempenho do reator anaeróbio em batelada seqüencial com biomassa granulada tratando soro de queijo. São Carlos, 2006. 160f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

APÊNDICE 1

Quadro 1 – Quadro representativo do teste t-Student acerca dos valores do crescimento do fungo na ausência e na presença de glicose a 1 %.

Paired Samples Test								
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 FS– SG 1 %	-,69750	,39684	,14030	-1,02926	-,36574	-4,971	7	,002

Quadro 2 – Quadro representativo do teste t-Student acerca dos valores do crescimento do fungo na ausência e na presença de glicose a 0,5 %.

Paired Samples Test								
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 FS-FSG 0,5 %	-1,33400	,40427	,14293	-1,67198	-,99602	-9,333	7	,000

Comparando o valor de Sig. (2-tailed) do quadro 1 e quadro 2, respectivamente de 0,002 e 0 com o nível de significância de 0,05, pode ser observado que os valores são menores que 0,05, o que indica existirem diferenças significativas entre os valores de crescimento do fungo em soro de leite (FS) em comparação ao crescimento do fungo em soro suplementado com glicose nas duas concentrações (FSG).

Quadro 3 – Quadro representativo do teste *t-Student* acerca dos valores de produção de proteína unicelular na ausência e na presença de glicose a 1 %.

Paired Samples Test								
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 FS-FSG 1%	-1,1250	4,03759	1,4275	-4,50051	2,25051	-,788	7	,456

Quadro 4 – Quadro representativo do teste *t-Student* acerca dos valores de produção de proteína unicelular na ausência e na presença de glicose a 0,5 %.

Paired Samples Test								
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 FS-FSG 0,5 %	,32500	1,32746	,46933	-,78478	1,43478	,692	7	,511

Comparando o valor de Sig. (2-tailed) com o nível de significância de 5 %, pode ser verificado que os valores 0,456 e 0,511 são maiores que 0,05, ou seja, não existem diferenças significativas entre o teor de proteína unicelular para os valores de FS (sem a presença de glicose) em relação aos valores após adição de glicose em 0,5 % e 1 %.

Quadro 5 – Quadro representativo do teste t-Student acerca dos valores de açúcares redutores verificados durante o ensaio com fungo crescido livre em comparação com os valores medidos no ensaio com o fungo imobilizado em espuma de poliuretano.

Paired Samples Test								
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Disperso - Imobilizado	12,35625	5,83661	2,06355	7,47672	17,23578	5,988	7	,001

Comparando o valor de Sig. (2-tailed) com o nível de significância de 5 %, pode ser observado que o valor de 0,001 é menor que 0,05, ou seja, para as mesmas condições de ensaio existem diferenças significativas entre o consumo de açúcares redutores na cultura crescida livre em comparação ao consumo com o fungo imobilizado em espuma de poliuretano.