



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DE LACTOSE DO SORO DE QUEIJO EM
ETANOL EM SISTEMAS DE BIORREACTORES IMOBILIZADOS**

Sabrina Gabardo

Porto Alegre

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DE LACTOSE DO SORO DE QUEIJO EM
ETANOL EM SISTEMAS DE BIORREACTORES IMOBILIZADOS**

Sabrina Gabardo

Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia-
UERGS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos como um dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientador (a): Rosane Rech

Porto Alegre

2011

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO

Gabardo, Sabrina
G112o Otimização da bioconversão de lactose do soro de queijo em etanol em sistemas de biorreatores imobilizados. / Sabrina Gabardo. -- Porto Alegre, 2011.

83f. : il.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR-RS, 2011.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Bibliografia

1. Bioconversão de soro de queijo 2. Lactose 3. Etanol I. Título. II. Ayub, Marco Antônio Záchia (Orient.). III. Rech, Rosane (Co-orient.)

CDU 637.3:635.5

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Sabrina Gabardo
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia - UERGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: 17/12/2010
Pela Banca Examinadora:

Homologada em: 11/01/2011
Por:

Marco Antônio Záchia Ayub
Orientador – PPGCTA/UFRGS

José Maria Wiest
Coordenador do Programa de Pós Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA)

Rosane Rech
Co-orientador – UFRGS

Graziela Bruschi Brinques
Banca – UNISINOS

Gilvane Souza de Matos
Banca – UERGS

Vitor Manfrói
Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos. ICTA/UFRGS

Simone Hickmann Flôres
Banca – UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Marco Antônio Záchia Ayub pelos ensinamentos transmitidos, pela dedicação e apoio realizados constantemente ao longo desses dois anos. Pela compreensão, paciência e por sua amizade.

À professora e co-orientadora Rosane Rech, por todo conhecimento passado, empenho e amizade, pela sempre pronta disposição no esclarecimento de dúvidas. Por toda dedicação e auxílio proporcionados incansavelmente durante todo esse período.

Ao Professor Plinho Francisco Hertz pelas conversas, conselhos e amizade. Pelo conhecimento transmitido.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade e aprendizado proporcionados no mestrado.

Aos colegas do Bioteclab pela amizade, cooperação e coleguismo. Em especial, à Nicole Sehnem e à Priscila Souza-Cruz pela colaboração, principalmente na etapa inicial do mestrado em momentos angustiantes. O apoio de vocês foi muito importante. À Débora Faccin pela disponibilidade e auxílio em diversos momentos. À colega Fernanda Rech pelas conversas, amizade, por compartilhar momentos bons e ruins. Agradeço a equipe pelos momentos de descontração e de apoio.

À minha querida bolsista Juliana Zaparoli, por todo auxílio prestado, pela cooperação e amizade.

Às meninas do Laboratório de Enzimologia pelas conversas, amizade e coleguismo.

Ao Mauro, meu namorado, pela paciência, apoio e compreensão. Por estar comigo em todos os momentos. Todos mesmo, de angústia, alegrias, pelas noites, finais de semana e madrugada em laboratório. Pelo seu carinho, atenção, palavras de incentivo, companheirismo e pela amizade.

Aos meus queridos pais, Maria Helena e Hilário, faltam palavras de agradecimento. Muito obrigada por seus ensinamentos, pelo amor, paciência, e apoio, muitas vezes acreditando mais em mim do que eu mesma. A minha admiração por vocês é eterna. Vocês são exemplo para mim, meus verdadeiros mestres.

Aos meus irmãos Douglas e Cássio pelos bons momentos, pelo apoio, carinho e amizade. Por acreditarem em meus ideais.

Às minhas queridas avós, Iolanda e Therezinha, pela torcida, apoio e carinho.

RESUMO

O soro de queijo, um subproduto industrial altamente poluidor, constitui-se em um substrato rico em nutrientes e de grande potencial de aproveitamento em bioprocessos. A utilização de substratos alternativos e de baixo custo para a produção de etanol, tais como resíduos industriais, vem sendo recentemente estudada, com resultados promissores. Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo otimizar a bioconversão do soro de queijo em etanol em biorreatores imobilizados usando *Kluyveromyces marxianus* como biocatalisador e avaliar as limitações de transferência de massa em esferas de alginato de cálcio mediante o cálculo do coeficiente de difusão. Valores similares do fator de conversão da lactose em etanol, $Y_{EtOH/S}$, ($0,44 \pm 0,01 \text{ g g}^{-1}$) foram encontrados ao testar a produção do etanol por três linhagens de *K. marxianus* (CBS 6556, CCT 4086 e CCT 2653) em biorreator de leito fluidizado em regime batelada, e uma diminuição na eficiência de conversão (83,3-66,1%) e na produtividade volumétrica ($0,96$ a $0,78 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) foi observada ao aumentar a temperatura de fermentação (30-40°C) utilizando *K. marxianus* CBS 6556 imobilizada. Em seguida, foram testados biorreatores de leito fixo e fluidizado operados continuamente por diferentes taxas de diluição ($0,1$ - $0,3 \text{ h}^{-1}$). Os valores indicaram que o aumento da taxa de diluição leva a um decréscimo da utilização de lactose e da produção de etanol e um aumento da produtividade volumétrica (Q_P). Valores semelhantes do fator de conversão de lactose em etanol ($Y_{EtOH/S}$) foram encontrados para todas as taxas de diluição testadas, em ambos sistemas de biorreator (fixo e fluidizado). A maior produtividade volumétrica foi obtida para a taxa de diluição de $0,3 \text{ h}^{-1}$ em biorreator de leito fluidizado, alcançando 87% da conversão teórica, e a maior concentração de etanol ($27,9 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida com a taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$. As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) na superfície das esferas mostraram que a imobilização em alginato de cálcio foi eficaz. O estudo da transferência de massa da lactose e do etanol em esferas de cálcio foi realizado através da medição do coeficiente de difusão com base na abordagem matemática da Segunda Lei de Fick. Diferentes condições experimentais foram testadas. Os resultados obtidos mostraram que o coeficiente de difusão independe da concentração da solução de lactose (25, 50 e 75 g L^{-1}) e de etanol (25 e 50 g L^{-1}), bem como da concentração de alginato (3, 4 e 6%), e que é afetado pela temperatura (25, 30 e 35 °C), aumentando de $4,67 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ a $6,96 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para a lactose, e de $1,46 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ a $2,68 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para o etanol.

Palavras-chave: soro de queijo, lactose, etanol, alginato de cálcio, coeficiente de difusão.

ABSTRACT

Cheese whey, an industrial by-product with highly pollutant characteristics, is a substrate for cell growth, rich in nutrients and with great potential for use in bioprocesses. The utilization of alternative and low cost substrates for the production of ethanol, such as industrial waste, has been recently studied with promising results. In this context, the aim of this work was to optimize the bioconversion of cheese whey into ethanol in bioreactors using immobilized *Kluyveromyces marxianus* as biocatalyst and evaluate the mass transfer limitations in Ca-alginate beads by measuring the diffusion coefficient. Similar ethanol yields (0.44 ± 0.01 g EtOH g sugar⁻¹) were found when testing the ethanol production by three strains of *K. marxianus* (CBS 6556, CCT 4086 and CCT 2653) in batch fluidized bed bioreactor, a decrease in conversion efficiency (83.3 to 66.1%) and ethanol productivity (0.96 to 0.78 g L⁻¹.h⁻¹) was observed with the increase of fermentation temperature (30-40°C) by immobilized *K. marxianus* CBS 6556. Continuous fluidized and packed bed bioreactors with different dilution rates (0.1 to 0.3 h⁻¹) were performed. Values indicated that the increase of dilution rate led to a decrease in lactose utilization and ethanol production and an increase in ethanol productivity (Q_P). Similar ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$) were obtained for all dilution rates tested, in both bioreactor systems. The highest ethanol productivity (3.5 g L⁻¹.h⁻¹) was obtained at dilution rate of 0.3 h⁻¹ in the fluidized bed bioreactor, with 87% of the theoretical conversion. The highest ethanol concentration (27.9 g L⁻¹) was obtained at dilution rate of 0.1 h⁻¹. The SEM micrographies of beads demonstrated that the cell immobilization in the Ca-alginate was effective. Lactose and ethanol mass transfer studies in Ca-alginate beads was performed by measuring the diffusion coefficient based on the mathematical approach of the Fick's second Law. Different experimental conditions were tested. Results showed that diffusion coefficients were independent from the concentration of lactose (25, 50 and 75 g L⁻¹) and ethanol (25 and 50 g L⁻¹), as well as from the concentration of Ca-alginate (3, 4 and 6%), but were affected by temperature, increasing from 4.67×10^{-10} m² s⁻¹ to 6.96×10^{-10} m² s⁻¹ for lactose, and from 1.46×10^{-10} m² s⁻¹ to 2.68×10^{-10} m² s⁻¹ for ethanol.

Keywords: Cheese whey, lactose, ethanol, Ca-alginate, diffusion coefficient.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Soro de queijo	3
2.1.1 Aplicações biotecnológicas do soro de queijo	5
2.1.2 Bioconversão de soro de queijo a etanol	6
2.2 Imobilização celular	8
2.3 Biorreatores com células imobilizadas	11
2.4 Limitações de transferência de massa em sistemas de imobilização celular	13
2.5 Distribuição celular em sistemas de imobilização	14
3. RESULTADOS	16
3.1 Resultados I – Determination of lactose and ethanol diffusion coefficients in calcium alginate gel spheres: predicting values to be used in immobilized bioreactors	16
3.2 Resultados II – Performance of different immobilized-cells systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed and fluidized continuous bed bioreactors	34
4. DISCUSSÃO GERAL	60
PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota metabólica da fermentação da lactose em etanol.....	8
Figura 2. Diferentes métodos de imobilização celular: (A) ligação a superfícies sólidas, (B) aprisionamento em matrizes porosas, (C) floculação (natural ou artificial) e (D) contenção por membranas.....	9
Resultados I	
Fig. 1. Lactose diffusivity in calcium alginate beads as a function of time. Conditions were Ca-alginate 4% at 30 °C. Lactose concentration solutions of 25 (◆); 50 (■); and 75 g L ⁻¹ (▲).....	30
Fig.2. Ethanol diffusivity in calcium alginate beads as a function of time. Conditions were Ca-alginate 4% at 30 °C. Ethanol concentration solutions of 25 (◆) and 50 g L ⁻¹ (■).....	31
Fig.3. Lactose diffusion in calcium alginate beads of (A) 3%, (B) 4%, and (C) 6% at different temperatures: 25 °C (◆), 30 °C (■), 35 °C (▲).....	32
Fig.4. Ethanol diffusion in calcium alginate beads of (A) 3%, (B) 4%, and (C) 6% at different temperatures: 25 °C (◆), 30 °C (■), 35 °C (▲).....	33
Resultados II	
Fig. 1. Schematic diagram of continuous fluidized bed bioreactor.....	54
Fig. 2. Kinetics of lactose consumption (A), and ethanol production (B) of the three strains of <i>Kluyveromyces marxianus</i> in batch fluidized bioreactor at 30°C. (◆) CBS 6556, (■) CCT 4086, (▲) CCT 2653.....	55
Fig. 3. Kinetics of lactose consumption (A), and ethanol production (B) by <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 in the batch fluidized bed bioreactor as a function of temperature: (◆) 30°C, (■) 35°C, and (▲) 40°C.....	56
Fig. 4. Kinetics of lactose consumption (A), ethanol production (B), and free biomass (C) in the continuous fluidized bed bioreactor at three dilution rates; kinetics of lactose consumption (D) and ethanol production (E) in the continuous packed bed bioreactor at three dilution rates. 0.1 h ⁻¹ (◆), 0.2 h ⁻¹ (■), 0.3 h ⁻¹ (▲).....	57
Fig. 5. Scanning electron micrography showing the colonization profile of Ca-alginate beads by <i>K. marxianus</i> CBS 6556: (a) outer surface of beads at time 0 h; (b) inner surface of beads at time 0 h; (c) outer surface of beads at cultivation time 128 h; (d) inner surface of beads at cultivation time 128 h.....	58

Fig. 6. Variation of ethanol productivity (Q_P), ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$), ethanol concentration (g L^{-1}) with dilution rate (D) by fluidized bed bioreactor (A) and packed bed bioreactor (B).
 Q_P (\blacklozenge), $Y_{EtOH/S}$ (\blacksquare), ethanol concentration (\blacktriangle).....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do soro doce e do soro ácido.....	4
Resultados I	
Table 1. Diffusion coefficients for lactose and ethanol as a function of solution concentration in 4% Ca-alginate beads at 30 °C.....	28
Table 2. Calculated diffusion coefficients for lactose ($D_{lact} \times 10^{10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) and ethanol ($D_{EtOH} \times 10^{10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) in Ca-alginate beads, and as a function of alginate concentration and temperature.....	29
Resultados II	
Table 1. Ethanol yield ($Y_{EtOH/S}$), conversion efficiency (η) and ethanol productivity (Q_P) by three strains of <i>Kluyveromyces marxianus</i> in batch fermentation.....	51
Table 2. Ethanol yield ($Y_{EtOH/S}$), conversion efficiency (η) and ethanol productivity (Q_P) by <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 in batch fermentation at three temperatures.....	52
Table 3. Comparison of lactose utilization (%) and ethanol concentration (g L^{-1}) as a function of dilution rates, in the fluidized and packed bed bioreactors. Results are the mean of duplicates.....	53

1. INTRODUÇÃO

A indústria de laticínios constitui uma parcela importante da indústria de alimentos, sendo significativa a sua contribuição em termos de geração de resíduos. O soro do queijo representa o principal e mais problemático subproduto deste tipo de indústria em decorrência de sua elevada carga orgânica e grande volume gerado.

A produção mundial anual de soro de queijo é estimada em aproximadamente 100 milhões de toneladas, sendo que o Brasil contribui para esta geração em aproximadamente 6%. Este subproduto representa grandes perdas econômicas para a indústria de laticínios, visto que cerca de 50% da produção mundial é desperdiçada em plantas de tratamento de águas residuais ou ainda utilizada para a alimentação animal. Adicionalmente, as indústrias produtoras de queijo no Brasil são, em geral, de pequeno e médio porte, não dispoem de meios econômicos ou tecnológicos para o adequado aproveitamento do soro de queijo, fato que vem a contribuir para o incremento dessa problemática visto o inadequado descarte diretamente em cursos hídricos.

O aproveitamento do soro de queijo em novos processos produtivos ainda não é uma realidade mundial, muito embora a abordagem deste como um resíduo industrial venha sendo oportunamente abandonada. Este subproduto caracteriza-se como rico em nutrientes, com quantidades apreciáveis de lactose, proteínas e sais minerais, constituindo, portanto em um potencial substrato para realização de processos biotecnológicos. Adicionalmente, no Brasil, esse subproduto industrial pode ser obtido a um baixo custo, fato que estimula a sua utilização em diversos bioprocessos, tais como aqueles que remetem a conversão da lactose para a produção de metabólitos de interesse, como o etanol.

Estudos que visam o aproveitamento de subprodutos industriais, considerados como resíduos, para a produção de etanol vêm sendo recentemente realizados devido ao mercado crescente e a potencial redução dos custos de produção associada a sua utilização. Resíduos de biomassa, tais como aqueles compostos de materiais lignocelulósicos tem sido bastante estudados para a produção de etanol. Contudo, estes materiais devem passar por tratamentos prévios antes de sua devida utilização visto que o processo requer a separação da lignina-celulose e hidrólise da celulose para a posterior liberação de açúcares fermentescíveis. A utilização de soro de queijo, além de não requerer tratamentos prévios, auxilia na produção de

etanol e pode, ainda, solucionar um problema grave de geração de subprodutos das indústrias de laticínios, juntamente com a vantagem de agregar valor a este subproduto nobre.

Com a perspectiva de crescimento da demanda mundial de etanol e pela necessidade da geração de fontes alternativas de energia, as quais repercutem menores danos ambientais daquelas provindas de fontes fósseis, tecnologias capazes de melhorar o desempenho e a eficiência de processos fermentativos ganham importância fundamental no Brasil e no mundo. Neste contexto, o emprego de técnicas de imobilização celular pode contribuir significativamente e positivamente para o desenvolvimento de processos mais eficazes, e, conseqüentemente, bastante vantajosos.

A tecnologia de imobilização celular tem sido amplamente estudada e difundida nas últimas décadas, favorecendo numerosos processos biotecnológicos devido às vantagens que estes sistemas proporcionam, como, por exemplo, o aumento da produtividade, diminuição do tempo de fermentação e redução dos riscos de contaminação. A principal limitação desses sistemas consiste nos requerimentos de transferência de massa, sendo o seu entendimento crucial para a otimização de bioprocessos e desenvolvimento de sistemas mais eficientes.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo aperfeiçoar o aproveitamento de um subproduto da indústria de laticínios, o soro de queijo, como meio alternativo de fermentação para a produção de etanol de forma a agregar valor a este subproduto. Em um primeiro momento foi estudado as limitações de transferência de massa da lactose (substrato) e do etanol (produto) em esferas de alginato de cálcio, e em segunda instância foi estudada a otimização da bioconversão da lactose em etanol, através da técnica de imobilização celular em alginato de cálcio, em biorreatores de coluna de leito fixo e fluidizado.

Mais especificamente, os objetivos deste trabalho foram:

1. Estudar a difusão das moléculas de lactose e etanol no interior de esferas de alginato de cálcio através do cálculo do coeficiente de difusão;
2. Avaliar a fermentação do soro de queijo em biorreatores imobilizados de leito fluidizado operados em regime batelada para diferentes linhagens de *Kluyveromyces marxianus* e em diferentes temperaturas de fermentação;
3. Avaliar a fermentação do soro de queijo por *K. marxianus* CBS 6556 em biorreatores imobilizados de leito fixo e fluidizado operados continuamente em diferentes taxas de diluição;
4. Avaliar o comportamento da biomassa na superfície de esferas de alginato de cálcio através de microscopia eletrônica de varredura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Soro de queijo

O soro de queijo constitui-se no líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite, por coagulação ácida ou enzimática, durante o processo de fabricação de queijos. Representa 85 a 95% do volume de leite utilizado na elaboração de queijos e contém cerca de 55% dos sólidos existentes no leite (SISO, 1996). É o principal subproduto da indústria de laticínios, caracterizado por elevados valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), que variam na faixa de 30-50 g L⁻¹, sendo a lactose a principal contribuinte para os altos valores (SISO, 1996; DOMINGUES et al., 1999; OZMIHCI e KARGI, 2007a; GUIMARÃES et al., 2010).

Por apresentar elevada carga orgânica e ser produzido em grandes volumes, o soro de queijo representa uma importante fonte de poluição ambiental, sendo o subproduto mais problemático das indústrias de laticínios (BRAILE e CAVALCANTI, 1993; PONSANO e CASTRO-GÓMEZ, 1995; ZAFAR e OWAIS, 2006; KOSSEVA et al., 2009; KOUTINAS et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010). Em média, para a fabricação de um quilo de queijo necessita-se de dez litros de leite, recuperando-se nove litros de soro (KOSIKOWSKI, 1979). Adicionado a isso, o soro de queijo representa grandes perdas econômicas para a indústria de laticínios já que aproximadamente metade da produção mundial é disposta em plantas de tratamento de efluente ou utilizada para alimentação animal (RECH e AYUB, 2007).

A produção de soro de queijo vem crescendo anualmente a valores consideráveis, sendo que aproximadamente 50% é utilizado para a formulação de produtos lácteos, de panificação, chocolate e biscoitos na Europa e em países como os Estados Unidos, que são os responsáveis pelas maiores produções de queijo no mundo (Manual de Referência para Produtos de Soro dos EUA, 1997; ANDRADE e MARTINS, 2002). Contudo, o restante do soro de queijo é desperdiçado pelo inadequado aproveitamento. Em indústrias brasileiras de pequeno e médio porte este subproduto é freqüentemente descartado diretamente nos corpos d'água, uma vez que as mesmas não dispõem de meios econômicos ou tecnológicos para o adequado aproveitamento ou tratamento (MENDES et al., 2006), fato que acaba por conduzir a sérios problemas ambientais, provocando a destruição da flora e da fauna aquática (RICHARDS, 2002; PORTO et al., 2005).

A produção mundial anual de soro de queijo é estimada em 10^8 toneladas, apresentando incremento anual de 1-2% (GUIMARÃES et al., 2010). Somente no ano de 2009 foram produzidos no mundo 14,5 milhões de toneladas de queijo, o que remete à produção aproximada de $1,30 \times 10^8$ toneladas de soro. A produção de queijos no Brasil tem crescido nos últimos 10 anos, sendo que o volume estimado de queijo produzido em 2009 foi de 614 mil toneladas, correspondendo à produção de aproximadamente 5,5 milhões de toneladas de soro. Para o ano de 2010 está prevista uma produção brasileira de queijos de 648 mil toneladas (MAPA/SPA, 2010).

Diante das propriedades nutricionais do soro de queijo, a abordagem deste como um resíduo industrial vem sendo oportunamente abandonada. Entre os nutrientes constituintes mais abundantes encontram-se a lactose (4,5-5% m/v), proteínas solúveis (0,6-0,8% m/v), lipídeos (0,4-0,5% m/v) e sais minerais (8-10% do extrato seco). Contendo aproximadamente 6,9% de sólidos totais, o soro de queijo também é composto por menores quantidades de outros nutrientes tais como o ácido cítrico e vitaminas (SGARBIERI, 1996; SISO, 1996; RICHARDS, 2002). Acrescido a isso, a composição do soro pode variar de acordo com o tipo de queijo fabricado, ou seja, de acordo com o procedimento empregado na precipitação da caseína. Na elaboração de queijos frescos se obtém um soro mais ácido (pH <5) de composição diferente do soro provindo de queijos de massa prensada. O soro doce (pH 6-7) contém menor quantidade de ácido láctico, percentual de lactose mais elevado e menor teor de minerais em relação ao soro ácido (MADRID et al., 1995; SISO, 1996). As composições do soro ácido e doce encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição do soro doce e do soro ácido.

Componentes	Soro Doce (%)	Soro Ácido (%)
Água	93-94	94-95
Gordura	0,3-0,5	0,3-0,6
Proteína	0,8-1,0	0,8-1,0
Lactose	4,5-5,0	3,8-4,2
Minerais	0,5-0,7	0,7-0,8
Ácido láctico	0,1	0,1-0,8

Fonte: Madrid et al., 1995

Nesse contexto, o soro de queijo é visto não apenas como um subproduto, mas como um produto nobre e um substrato rico em nutrientes podendo ser aplicado em áreas tecnológicas promissoras, tais como a de bioprocessos e engenharia das fermentações.

2.1.1 Aplicações biotecnológicas do soro de queijo

A composição nutricional do soro de queijo permite a sua aplicação em diversos bioprocessos. Nesse contexto, pesquisas que utilizam este subproduto como substrato alternativo vem sendo constantemente realizadas, tais como aquelas que visam à obtenção de enzimas (RECH e AYUB, 2006; ORNELAS et al., 2008), biogás (ANTONOPOULOU et al. 2008; NAJAFPOUR et al., 2010), ácidos orgânicos (PANESAR et al., 2007; KIM et al., 2006), polissacarídeos (MESOMO et al., 2009; SILVA et al., 2009); além de etanol (SILVEIRA et al. 2005; LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; OZMIHCI e KARGI, 2009), entre outros bioprodutos (SISO, 1996; KOUTINAS et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010).

Uma das tecnologias oportunamente estudada e aplicada com sucesso consiste na produção da enzima β -galactosidase, popularmente conhecida como lactase, a qual é empregada principalmente na fabricação de leite com baixo teor de lactose. A produção de β -galactosidase foi obtida por Santiago et al. (2004), através do cultivo de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 em meio a base de soro de queijo (desproteinado) contendo diferentes concentrações de lactose e extrato de levedura (30°C, 150 rpm, pH 5,5). Os meios de cultivo mostraram-se adequados para o crescimento da levedura, e quando suplementados com extrato de levedura, observou-se um favorecimento no crescimento celular e na síntese da enzima. Resultados similares foram obtidos por Rech et al. (1999) ao avaliar a produção de β -galactosidase pelas leveduras *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 e CBS 6556 em soro de queijo (200 rpm, 30°C, pH 5,5), onde foi verificado, entre outros fatores estudados, maior crescimento celular ao suplementar o meio de soro de queijo com extrato de levedura, especialmente para a linhagem CBS 712. Adicionado a isso, nesse mesmo estudo, não foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros cinéticos de crescimento ao avaliar a produção da enzima por *K. marxianus* CBS 6556 em soro de queijo concentrado (210 g L⁻¹) em biorreator aerado, o que sugere o aproveitamento deste subproduto sem a necessidade de concentrá-lo. Nesse mesmo sentido, outras pesquisas vêm sendo desenvolvidas na tentativa de aperfeiçoar a produção da enzima com diferentes estratégias, como por exemplo, aplicando o

emprego de técnicas de imobilização (BECERRA et al., 2001), batelada alimentada (RECH e AYUB, 2006; 2007) e cultura contínua (ORNELAS et al. 2008).

Entre as possíveis aplicações biotecnológicas para a utilização do soro de queijo, encontra-se a produção de goma xantana, um polissacarídeo de grande aplicação em indústrias de alimentos, cosmética e química. A produção da goma xantana a partir de três diferentes meios de cultura à base de soro de queijo (integral, desproteinado e hidrolisado com β -galactosidase) foi estudada por Nitschke et al. (2001) através da utilização da linhagem *Xanthomonas campestris* C₇L, sendo que a maior produção da goma foi observada para o meio soro de queijo integral, sugerindo o soro como um meio de cultivo apropriado para a produção do polissacarídeo. Adicionalmente, Silva et al. (2009) utilizaram soro de queijo *in natura* como fonte alternativa de carbono adicionado de diferentes concentrações de sacarose e sais (K₂HPO₄ e MgSO₄.7H₂O) para a síntese de goma xantana, a partir de duas linhagens de *Xanthomonas campestris* (1230 e 1182), e obtiveram a maior produção quando o soro de queijo foi utilizado livre da adição de sacarose, ou seja, como a única fonte de carbono com a adição de 2% (m/v) de K₂HPO₄ e 0,1% (m/v) de MgSO₄.7H₂O.

Outras pesquisas têm sido empregadas na redução da carga poluente (DBO) com a concomitante geração de produtos. Nesse contexto encontram-se trabalhos que obtiveram a minimização da carga poluente em 90% com a produção simultânea de proteína unicelular (MOEINI et al. 2004) e de 75% com a concomitantemente produção de etanol, biomassa e metano (MAWSON, 1994). Ponsano e Castro-Gómez (1995) verificaram valores menores de redução da carga poluente, onde *Kluyveromyces fragilis* levou à minimização da DBO em 33,3%, gerando como produtos a biomassa e o etanol.

Estudos direcionados ao aproveitamento do soro de queijo como substrato alternativo para o crescimento celular e geração de compostos de interesse em bioprocessos vem sendo oportunamente desenvolvidos, entre estes, encontram-se aqueles destinados à produção de etanol, os quais tem se intensificado nas duas últimas décadas.

2.1.2 Bioconversão de soro de queijo a etanol

A fermentação alcoólica do soro de queijo constitui-se em uma alternativa tecnológica promissora devido às vantagens nutricionais, ambientais e econômicas proporcionadas pelo aproveitamento deste subproduto. O etanol é produzido no mundo em 80% via processo fermentativo e apresenta ampla aplicação na indústria química, farmacêutica e na indústria

alimentícia, seja na forma de matéria-prima, solvente ou combustível (ZAFAR et al., 2005; ZAFAR e OWAIS, 2006). A produção mundial de etanol foi de aproximadamente 65 bilhões de litros no ano de 2008, sendo o continente Americano responsável pela maior parte dessa produção. O maior produtor são os Estados Unidos com uma produção de 19,8 bilhões de litros por ano, com o milho como matéria-prima. Em segundo lugar encontra-se o Brasil, com uma produção anual de 17,8 bilhões de litros a partir da cana de açúcar, posicionando-se no cenário internacional com uma parcela bastante significativa (DEMIRBAS, 2007; SILVA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010). O soro de queijo se mostra como uma excelente fonte de matéria-prima para a produção de etanol visto ser barato e especialmente rico em nutrientes. Além do mais, considerando que a quantidade disponível de lactose para a produção do etanol é maior que 4 milhões de toneladas por ano, e considerando uma eficiência de conversão de 85%, se poderia obter uma produção cerca de 2,3 bilhões de litros de etanol, ou seja, 3,5% do total da produção mundial de 2008 (GUIMARÃES et al., 2010).

Poucas linhagens de levedura apresentam a capacidade de metabolizar a lactose presente no soro de queijo a etanol. Entre esses microrganismos encontram-se *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Candida pseudotropicalis* (ZAFAR et al., 2005; ZAFAR e OWAIS, 2006; FONSECA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010). Essa capacidade é devido à presença de dois genes *LAC12* e *LAC4*, responsáveis pela codificação das enzimas lactose-permease e β -galactosidade, respectivamente, as quais desempenham diferentes papéis. A lactose-permease intermedeia o transporte da lactose através da membrana citoplasmática para o interior da célula, e a β -galactosidade é responsável pela hidrólise da lactose (dissacarídeo) em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose. Essas duas fontes de açúcar são metabolizadas pela via glicolítica (Embden–Meyerhof–Parnas), contudo, antes de participar dessa rota metabólica, a galactose é convertida no intermediário glicolítico glicose-6-fosfato através da via Leloir, pela ação de três de enzimas (galactoquinase, galactose-1-P uridiltransferase e UDP-galactose 4-epimerase) (FREY, 1996; RUBIO-TEIXEIRA, 2006; GUIMARÃES et al., 2010). Sob condições anaeróbias o piruvato (produto da via glicolítica) é reduzido em etanol e CO₂. A representação esquemática das rotas metabólicas envolvidas no processo da fermentação do soro de queijo em etanol encontra-se ilustrada na Figura 1.

Devido à necessidade do aproveitamento de resíduos agro-industriais, tais como o soro do queijo, aliado à exaustão das reservas de combustíveis fósseis e à preocupação ambiental, o avanço de estratégias na produção de etanol vem sendo incentivado constantemente. Dessa forma, a produção de etanol pela fermentação de resíduos agro-industriais tem surgido como

uma das estratégias mais viáveis no que diz respeito a fontes não convencionais de energia (ZAFAR et al., 2005; LAL, 2008).

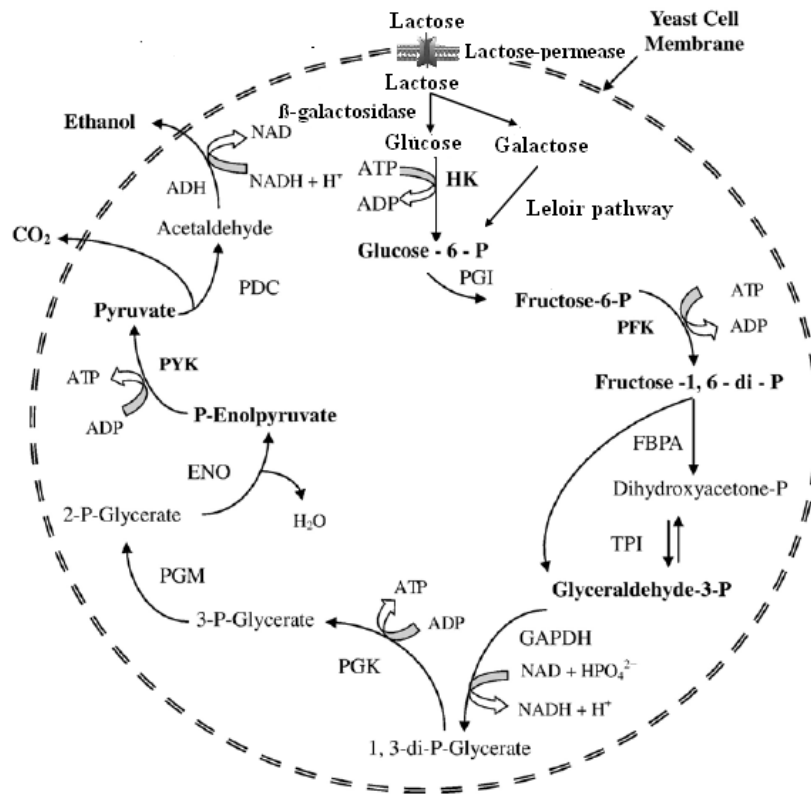


Figura 1. Rota metabólica da fermentação da lactose em etanol (Adaptado de: Rubio-Teixeira, 2006; Bai et al., 2008).

Diferentes abordagens de pesquisas estão sendo desenvolvidas no que se refere à produção de etanol a partir do soro de queijo, incluindo fermentação em batelada (GHALY e EL-TAWEL, 1995; ZAFAR e OWAIS, 2006; SANSONETTI et al., 2009), fermentação em batelada alimentada (OZMIHICI e KARGI, 2007a), fermentação semi-contínua (STANISZEWSKI et al., 2009), fermentação contínua (GHALY e EL-TAWEL, 1997; OZMIHICI e KARGI, 2007b, 2007c, 2008), imobilização de leveduras em diferentes suportes (KOURKOUTAS et al., 2002; LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; OZMIHICI e KARGI, 2009), fermentação com leveduras termotolerantes (BANAT et al., 1992; BRADY et al., 1994; BANAT e MARCHANT, 1995), fermentação através de *Sacharomyces cerevisiae* co-imobilizada em β -galactosidase (LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007), e fermentação com leveduras recombinantes (DOMINGUES et al., 1999, 2001; GUIMARÃES et al., 2008).

2.2 Imobilização celular

A imobilização celular pode ser definida como o uso de uma estrutura física de confinamento que obrigue as células a permanecerem em uma região particular do suporte de modo a preservar a sua atividade catalítica (KAREL et al., 1985). O processo de imobilização geralmente imita o que ocorre naturalmente no crescimento celular em superfícies ou dentro de estruturas naturais, visto que muitos microrganismos apresentam a capacidade de adesão em diferentes tipos de superfícies na natureza (KOURKOUTAS et al., 2004).

A tecnologia da imobilização celular tem sido amplamente desenvolvida nas últimas décadas, alcançando áreas como da biotecnologia, analítica e médica. Numerosos processos biotecnológicos são favorecidos pelo emprego da técnica de imobilização, e por isso, uma variedade de técnicas e materiais de suporte tem sido proposta. Entre as diferentes técnicas de imobilização, encontram-se quatro categorias principais com base no mecanismo físico empregado: ligação a superfícies sólidas, aprisionamento em matrizes porosas, floculação (natural ou artificial) e contenção por membranas (Figura 2) (PILKINGTON et al., 1998; KOURKOUTAS et al., 2004; ZANGH e FRANCO, 2002).

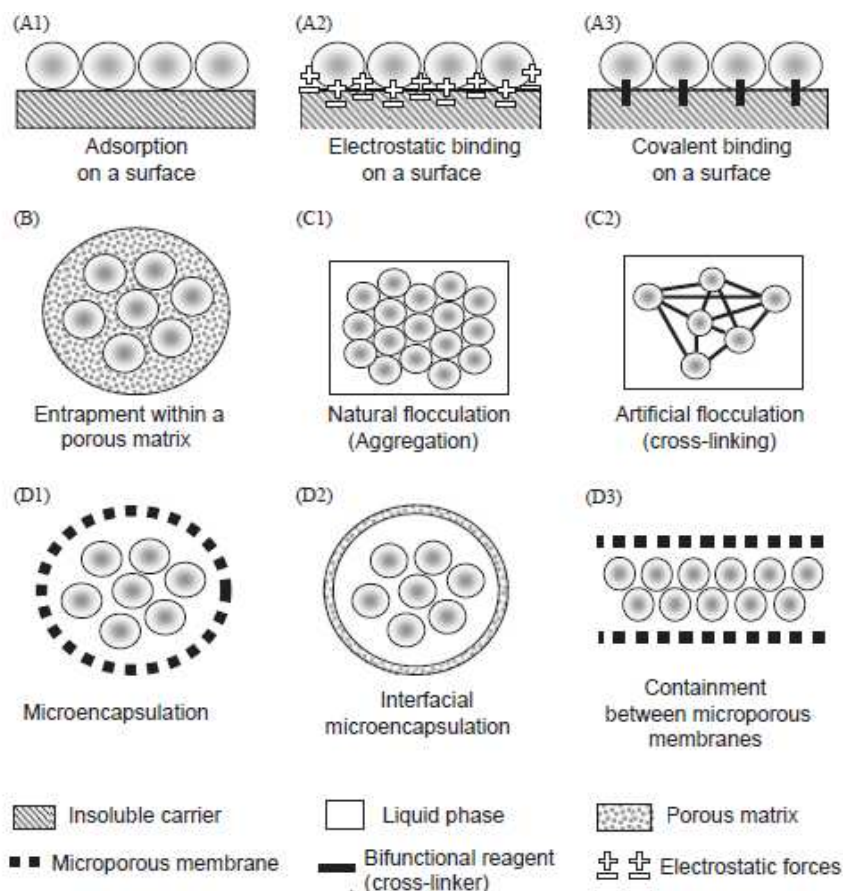


Figura 2. Diferentes métodos de imobilização celular. (A) ligação a superfícies sólidas, (B) aprisionamento em matrizes porosas, (C) floculação (natural ou artificial) e (D) contenção por membranas (KOURKOUTAS et al., 2004).

De forma sucinta, o método de imobilização por superfícies sólidas consiste na interação entre a superfície celular e a superfície do suporte através de ligações iônicas ou ligações covalentes. Já a técnica de aprisionamento em matrizes porosas caracteriza-se pela inclusão das células em uma matriz porosa que contenha poros menores que as células, viabilizando, dessa forma, a permanência dos biocatalisadores na matriz e a troca de fluidos (nutrientes e metabólitos) no compartimento. A floculação, outro método de imobilização, é baseada na capacidade de adesão e agregação que alguns tipos de células apresentam quando em suspensão, podendo ser de forma natural ou artificial (ligação cruzada promovida por agente químico). Outra forma de imobilizar célula consiste na contenção por barreiras que pode ser realizada pelo uso de uma membrana microporosa ou pela compartimentação das células em uma microcápsula, ou ainda através de uma superfície decorrida da interação entre dois líquidos imiscíveis (PILKINGTON et al., 1998; PRADELLA, 2001; KOURKOUTAS et al., 2004; VERBELEN et al., 2006).

Os sistemas de imobilização caracterizam-se por diversas vantagens interessantes, como: alta densidade celular por unidade de volume do biorreator, levando ao aumento da produtividade, à diminuição do tempo de fermentação e à redução dos riscos de contaminação; melhora na estabilidade do biocatalisador, promovendo a proteção contra o estresse ambiental (pH, temperatura) e à maior tolerância por altas concentrações de substrato e à diminuição da inibição pelo produto final; facilidade de recuperação do produto com redução de operações unitárias; permite o reaproveitamento da célula, assim como o sistema de operação contínua, além de possibilitar projetos de biorreator com menor escala, reduzindo, portanto, os custos de processo (PRADELLA, 2001; ZHANG e FRANCO, 2002; JUNTER e JOUENNE, 2004; VERBELEN et al., 2006; KOURKOUTAS et al., 2004; COVIZZI et al., 2007). Como principal desvantagem decorrida desses sistemas, encontra-se as limitações de transferência de massa do substrato e produtos formados (abordado com detalhes no item 2.4).

O aprisionamento em matrizes porosas é um dos métodos mais amplamente estudados, sendo a técnica de imobilização em alginato de cálcio uma das mais empregadas devido às inúmeras vantagens que apresenta como matriz-suporte. Os géis de alginato de cálcio são bastante interessantes pela facilidade da técnica, alta capacidade de retenção e preservação da viabilidade celular, não são tóxicos e são baratos. O alginato é um polissacarídeo natural extraído de algas marrons (*Phaeophyceae*) que apresenta cargas negativas devido à presença dos ácidos D-manurônico e L-gulucurônico, os quais contêm grupos carboxílicos em sua estrutura. O procedimento de imobilização consiste basicamente

na mistura da suspensão celular com o alginato seguido do contato dessa mistura, através do gotejamento, com uma solução contendo íons divalentes, como por exemplo, o cálcio (Ca^{2+}), que leva a formação de um gel (geleificação) devido à ligação dos polieletrólitos dos grupos carboxílicos com os íons cálcio presentes em solução, formando uma rede tridimensional (GROBOILLOT et al., 1994; VELINGS e MESTDAGH, 1995; AMSDEM e TURNER, 1999; SERP et al., 2001).

Diferentes metabólitos têm sido produzidos pela utilização da técnica de imobilização em alginato, tais como ácido láctico (GARBAYO et al., 2004; GIVRY et al., 2008), lactase (BECERRA et al., 2001), glicoamilase (ALTERRIS et al., 2004), e de forma mais difundida, o etanol (GUNASEKARAN e KAMINI, 1991; GUO et al., 2010; LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; LINS e LEÃO, 2002; NAJAFPOUR et al., 2004).

2.3 Biorreatores com células imobilizadas

A escolha de um sistema de imobilização adequado depende do processo e das condições a serem utilizadas. Entre os fatores de maior influência e que devem ser levados em consideração na escolha de um biorreator, destacam-se o tipo de suporte e o método de imobilização a ser empregados, requerimentos de operação e viabilidade celular, a natureza do substrato, cinética de reação envolvida, facilidade de regeneração do biocatalisador e requerimentos de transferência de massa (FUKUDA, 1994; BARON et al., 1996; PILKINGTON et al., 1998; KOSSEVA et al., 2009).

Os procedimentos de confinamento celular permitem a utilização de biorreatores de configuração diferenciada do tradicional tanque agitado contínuo (CSTR), merecendo destaque aqueles constituídos de colunas (PRADELLA, 2001). De acordo com o padrão de escoamento, os reatores utilizados para o cultivo de células imobilizadas podem ser divididos em três grandes categorias: reatores de tanque agitado (STR), reatores de leito empacotado e reatores de leito fluidizado (FUKUDA, 1994; BARON et al., 1996).

Um reator tanque agitado (STR) ideal, também denominado reator de mistura, se caracteriza por não apresentar gradientes de concentração no meio em toda a sua geometria. Apresenta vantagens como o fácil controle de temperatura e pH, além de oferecer as melhores características de mistura. A principal desvantagem deste tipo de biorreator consiste na tensão de cisalhamento exercida sobre as matrizes de imobilização (GROBOILLOT et al., 1994; KOSSEVA et al., 2009). Este tipo de biorreator com culturas imobilizadas tem sido utilizado na produção de diversos produtos biotecnológicos, tais como a penicilina (SWAROOPA et

al., 2003) e etanol (RIVALDI et al., 2008). Outras aplicações consistem na produção de xilitol, como por exemplo, no estudo de Da Cunha et al. (2009) que utilizou hidrogel de álcool polivinílico (PVA) como material suporte, e na produção de ácido láctico com o emprego de fibra de poliuretano (PUF) como suporte (KOSSEVA et al., 1995).

Em reatores de leito fixo (empacotado) a coluna é preenchida com o suporte por meio da qual a alimentação passa de forma ascendente. Esse tipo de biorreator se caracteriza pela pequena ou praticamente inexistente movimentação das partículas na coluna (compactação) e pela variação da concentração do meio ao longo do comprimento do biorreator. Entre as vantagens desse tipo de sistema, encontra-se a simplicidade de operação, o baixo custo e altas produtividades volumétricas. Contudo, não é interessante para cultivos aerados devido à depleção rápida do oxigênio no início da coluna. Adicionado a isso, o acúmulo de gases e de biomassa suspensa podem levar à formação de caminhos preferenciais, prejudicando a transferência de massa e conseqüentemente à redução das taxas de produção. O reator de leito empacotado é o tipo de reator mais freqüentemente utilizado em sistemas de imobilização, especialmente em fermentações (GROBOILLOT et al., 1994; PRADELLA, 2001; VERBELEN et al., 2006; KOSSEVA et al., 2009). Rivaldi et al., 2008 estudaram a produção de bioetanol por dois sistemas de biorreatores diferentes (CSTR e reator de leito empacotado) utilizando como suporte PVA e verificaram melhor eficiência de conversão e produtividade em biorreator do tipo CSTR em virtude da agitação do meio, o qual permitiu uma melhor transferência de massa. Ozmihci e Kargi (2009) utilizaram diferente matriz de imobilização para a produção de etanol. Neste estudo, caroços de azeitona foram empregados para preencher a coluna do biorreator de leito empacotado. Adicionado a isso, outros trabalhos também têm sido relatados quanto à produção de etanol em biorreatores de leito empacotado empregando esferas de alginato como suporte de imobilização (MARWAHA e KENEDY, 1988; MELZUCH et al., 1994; SINGH et al., 2009) e em outros suportes de imobilização (NIGAM et al., 1998, 2000).

Os reatores de leito fluidizado se caracterizam pela movimentação das partículas ao longo da coluna devido à agitação do meio, a qual pode ser obtida pela injeção de ar ou de um gás inerte, como no caso de reatores de coluna de bolhas e ou “air-lift”, ou pode ser obtida através recirculação de meio no biorreator (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Essa movimentação contribui, dessa forma, para diminuição das limitações de transferência de massa do sistema. Pode-se dizer que os biorreatores de leito fluidizado representam uma fusão entre reatores de mistura completa e reatores de leito fixo, com boas condições de mistura a baixas tensões de cisalhamento. A transferência de massa é facilitada devido à

homogeneização do meio e à movimentação das partículas, removendo, dessa forma, gases mais facilmente e evitando a decantação de células no fundo do biorreator. Alguns trabalhos tem sido relatados quanto a utilização de reatores de leito fluidizado com células imobilizadas, como para a produção de gás hidrogênio (DE AMORIN et al., 2009) e etanol (KRISHNAN et al., 1999).

2.4 Limitações de transferência de massa em sistemas de imobilização celular

A utilização de biocatalisadores imobilizados vem sendo bastante estudada, especialmente aquelas que utilizam o alginato de cálcio como suporte em virtude das vantagens que a técnica confere. Contudo, esses sistemas também apresentam limitações, destacando-se aquelas ocasionadas pela resistência à difusão de substratos e produtos na partícula (ESTAPÉ et al., 1992; AMSDEM e TURNER, 1999; BARRANCO-FLORIDO et al., 2001).

Os sistemas de biorreatores com células imobilizadas podem ser caracterizados por dois compartimentos diferentes, ou seja, uma fase líquida que compõe o meio de cultivo e uma fase sólida, na qual se encontram os biocatalisadores imobilizados. Ambos os compartimentos são locais de reações metabólicas e de crescimento celular que se comunicam através de fenômenos difusivos. Um dos aspectos mais importantes dos sistemas de imobilização deve-se aos efeitos que as limitações de transferência de massa podem ocasionar sobre as transformações bioquímicas das células. Essas resistências podem ser decorridas da difusão externa, ou seja, pela resistência à transferência de substratos e produtos em direção a partícula devido ao filme de fluido que se forma ao redor mesma, assim como ser decorrida pela difusão interna, devido a resistência a transferência de massa no interior da própria partícula. De forma geral, a difusão externa depende das condições hidrodinâmicas do fluido e de suas propriedades físicas; e a difusão interna depende de fatores como concentração celular, estrutura e tamanho da matriz-suporte e do tamanho das moléculas que se difundem através da partícula (QUIRÓS et al., 1995; PILKINGTON et al., 1998; PRADELLA, 2001; ZHANG e FRANCO, 2002).

Dessa forma, os efeitos da transferência de massa em biorreatores de células imobilizadas são caracterizados como críticos do sistema, visto que os nutrientes que se encontram no meio de cultivo devem atravessar a fase líquida até alcançar a superfície da partícula, onde então, estes devem atravessar o interior da mesma, chegando finalmente às células. Contraditoriamente a isso, o produto celular deve realizar o caminho oposto, ou seja,

sendo liberado das células e partindo em direção a fase líquida externa (PILKINGTON et al., 1998; ZHANG e FRANCO, 2002).

Particularmente em sistemas de aprisionamento em matrizes porosas, como esferas de alginato de cálcio, as limitações à transferência de massa interna são de especial importância. O entendimento das propriedades de transporte nesse sistema é essencial para prever o comportamento das moléculas no interior da esfera. Através da Lei de Fick pode-se definir o transporte de massa interno por difusão molecular (PILKINGTON et al., 1998). Esta lei pode ser aplicada para definir a difusividade de substratos e produtos em compartimentos de fase sólida, tais como as esferas de alginato de cálcio. Em se tratando de sistemas de imobilização em biorreatores, nos quais a concentração do substrato e do produto varia com o tempo, ou seja, onde a difusão ocorre em estado não-estacionário, a equação que melhor descreve a transferência de massa é a Segunda Lei de Fick (FAVRE et al., 2001):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \quad (\text{eq. 1})$$

onde, C é a concentração do soluto na fase líquida, D é o coeficiente de difusão do soluto, t é o tempo e r é a distância radial a partir do centro da esfera. Essa lei descreve a velocidade de variação da concentração de determinado soluto em função do tempo e do deslocamento. Em sistemas de imobilização onde a geometria é esférica, como, por exemplo, em partículas de alginato, a transferência de massa acontece por difusão radial (BEINUM et al., 1999; FAVRE et al., 2001).

2.5 Distribuição celular em sistemas de imobilização

Os sistemas de imobilização podem adotar diferentes densidades, distribuições e formas de crescimento celular dependendo das condições empregadas. Essas condições incluem os fatores físicos, como tipo e estrutura do gel; fatores químicos como composição do meio e condições de imobilização, além dos fatores biológicos, como características de crescimento e quantidade do inóculo. A cinética de crescimento, transferência de massa e estabilidade do sistema é estabelecida pela relação desses fatores, afetando o modelo do biorreator e modo de operação (GROBOILLOT et al., 1994; ZHANG e FRANCO, 2002).

De acordo com Zhang e Franco (2002) existe uma tendência ao crescimento celular próximo da superfície da matriz polimérica e a ausência destas ou até mesmo a morte no

centro da partícula, fato que leva a uma distribuição heterogênea da biomassa no interior da partícula, e conseqüentemente afeta as propriedades de transferência de massa de substratos e produtos e a atividade fisiológica das células. Contudo em estudos mais recentes (NAJAFPOUR et al., 2004; LIU et al., 2008) foi demonstrado que as células podem crescer no espaço interno da partícula e inclusive migrar para a superfície externa, resultando na sua liberação para o meio.

Acrescido a isso, a distribuição das células pode ser afetada pela própria heterogeneidade estrutural da matriz suporte. Um exemplo pode ser atribuído ao gel de alginato, em que as partículas formadas podem apresentar uma concentração de alginato maior na superfície do que no interior da partícula. Diferentes tipos de modificações na estrutura de géis de imobilização podem ser encontrados, incluindo microcanais, cavidades discretas e camadas de blocos concêntricos de gel, as quais interferem na densidade, distribuição e o crescimento celular no interior dessas matrizes (SAUCEDO et al., 1994; ZHANG e FRANCO, 2002).

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos submetidos à publicação. Os artigos constituintes desse capítulo estão apresentados nos itens Resultados I e II, respectivamente, de acordo com as normas exigidas pelos periódicos.

3.1 Resultados I – Determination of lactose and ethanol diffusion coefficients in calcium alginate gel spheres: predicting values to be used in immobilized bioreactors

O primeiro artigo intitulado “Determination of lactose and ethanol diffusion coefficients in calcium alginate gel spheres: predicting values to be used in immobilized bioreactors” consiste no estudo da difusividade da lactose e do etanol no interior de esferas de alginato de cálcio através do cálculo do coeficiente de difusão baseado na Segunda Lei de Fick. Este artigo foi inicialmente submetido ao periódico Journal of Chemical & Engineering Data.

**Determination of lactose and ethanol diffusion coefficients in calcium alginate gel
spheres: predicting values to be used in immobilized bioreactors**

Sabrina Gabardo, Rosane Rech, Marco Antônio Záchia Ayub*

BiotecLab, Food Science and Technology Institute (ICTA), Federal University of Rio Grande do Sul State (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 6685; fax: +55 51 3308 7048.

* Corresponding author. E-mail address: mazayub@ufrgs.br (MAZ Ayub)

Abstract

The diffusion coefficients (D) for lactose and ethanol through calcium alginate gel beads were determined based on the mathematical approach of Fick's second Law. Different experimental conditions were tested to evaluate the behavior of the diffusion coefficient of different concentrations of lactose and ethanol in Ca-alginate (3, 4, and 6%) at varying temperatures (25, 30, and 35 °C). Results showed that diffusion coefficients were independent from the concentration of lactose and ethanol, as well as from the concentration of Ca-alginate. Diffusion coefficients were affected by temperature, increasing from $4.67 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ to $6.96 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for lactose, and from $1.46 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ to $2.68 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for ethanol. These results can be used for the project and scaling up of immobilized bioreactors for the conversion of lactose into ethanol.

Keywords: Fick's Law ; Ca-alginate ; diffusion coefficient ; lactose ; ethanol.

NOMECLATURE

C	solute concentration (g L^{-1})
C_0	initial solute concentration (g L^{-1})
C_∞	maximum solute concentration in bulk solution (g L^{-1})
C_t	solute concentration in the gel bead as function of time (g L^{-1})
D	diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)
D_0	pre-exponential factor ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)
D_{EtOH}	ethanol diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)
D_{lact}	lactose diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)
E	activation energy of diffusion (kJ mol^{-1})
R	gas constant ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
R	radius of the gel bead (m)
r	radial distance from the centre of the bead (m)
T	Kelvin temperature (K)
t	time (s)

1. Introduction

Among the numerous techniques for microbial cell immobilization, entrapment in polysaccharide gels of natural origin such as Ca-alginate, is one of the most largely used and studied,¹⁻³ reflecting the importance and impact of this technology for bioprocesses. Entrapment gel techniques present several interesting features including non-toxicity, readiness to form hydrogels under very mild conditions, low cost and stability even at high temperatures.^{4,5} Additionally, cell immobilization in alginate systems enables high cell density and biocatalytic activity, high conversion rates and smaller reaction time compared to free-cell systems.^{6,7} Its main limitation resides in the diffusional barrier of substrates and products through the gel matrix and the spherical particles resulting from the process of entrapment will pose a mass transfer resistance through the matrix that can lead to ill-diffusion of substrates and/or the building-up of inner concentrations of toxic metabolic products such as ethanol.⁷⁻¹³ Therefore, the understanding of the transport properties of gel matrixes is important in order to predict whether substrates can freely enter the sphere and products can be permeated to the medium.¹⁴

The influence of diffusion velocity, or diffusivity, on the rate of reactions of the biocatalyst will affect its efficiency and should be known to assist the optimization of the bioprocesses and it is important to know how the properties of the immobilizing material affect the transport of various solutes.⁴

Immobilized bioreactors are gaining importance in industrial applications, especially in those where aeration is not required, substrates are soluble sugars such as lactose, and products are excreted as primary metabolites as ethanol. For these processes, the diffusion coefficient, or diffusivity, (D), is the fundamental parameter required for the quantitative analyses of mass transfer for a successful microbial cell immobilization.¹⁵

The literature has reported on the diffusion of small molecules such as glucose, lactose, and ethanol, when in solutions surrounding several gel supports.^{2,5,9,11} In this work we proposed a more refined and precise investigation of the diffusion coefficient of such molecules measuring them from within Ca-alginate beads, which closely resembles the mechanisms of mass transfer in immobilized bioreactors. We measured the diffusion coefficient (D) for lactose and for ethanol in Ca-alginate gel beads using a methodology based on the Fick's Law, and evaluated the effects of solute concentration, Ca-alginate concentration, and temperature on the diffusion coefficients. These variables were chosen because they are important when devising a process to convert lactose into ethanol in immobilized bioreactors.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of gel beads

Alginate gel beads were formed by dripping sodium alginate solution (3%, 4%, or 6% w/v) through a needle with 2.1 mm of diameter (14 G) using a peristaltic pump into a flask containing 0.1 M CaCl₂ solution at 35 °C. The beads were gently agitated for 30 minutes and washed twice with distilled water at 4 °C. The diameter of 100 randomly selected beads were measure using a caliper rule. The mean volume of the beads was calculated as the mean of the arithmetic diameter considering a perfect sphere.

2.2. Diffusivity tests

Diffusivity experiments were carried out in two steps. In the first, different solutions of lactose (25, 50, or 75 g L⁻¹) and ethanol (25 or 50 g L⁻¹) were used to evaluate the impact of the solution concentration over the diffusion coefficient (D) of these molecules within 4% Ca-alginate beads at 30 °C. In a second set of experiments, the influence of the temperature (25 °C, 30 °C or 35 °C) and alginate concentration (3%, 4% or 6%) were evaluated over the diffusion coefficient, while fixing lactose and ethanol concentrations at 50 and 25 g L⁻¹, respectively. For each test, five beads with a diameter of 3.8 mm were placed into lactose (250 mL) or ethanol (10 mL) solutions. The spheres were maintained at constant and gentle agitation to avoid external mass transfer resistance. Spheres samples were taken along the duration of the experiments (1,200 sec) to calculate the diffusion coefficient, and the spheres were dissolved into 1 mL of sodium citrate buffer 0.1 M (pH 6.2) into microcentrifuge tubes and vortex agitated by 5 mim to accelerate their breakup. All experiments were run in duplicates.

2.3. Diffusion coefficients calculation

In this research the Fick's second law was used for the calculation of diffusivity assuming that the Ca-alginate beads are perfectly spherical and homogeneous with radial diffusion of solute in the particle.

Fick's second law for the case of diffusion through a particle is given by:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \quad (1)$$

For a spherical geometry (gel particle of radius R), equation (1) leads to:¹⁶

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \left[D \cdot r \cdot \frac{\partial C}{\partial r} \right] \quad (2)$$

If D is assumed to be constant and also assuming that the mass transfer resistance through the film surrounding the beads is negligible, the transient concentration change of the solute in the gel sphere can be expressed as:¹⁷

$$\frac{C_t - C_\infty}{C_0 - C_\infty} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \left[\frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{n^2 \cdot \pi^2 \cdot D \cdot t}{R^2}\right) \right] \quad (3)$$

For sufficiently large values of time “ t ”, equation (3) can be approximated by the first term of the series:

$$\frac{C_t - C_\infty}{C_0 - C_\infty} = \frac{6}{\pi^2} \exp\left(-D \left(\frac{\pi}{R}\right)^2 t\right) \quad (4)$$

The diffusion coefficient D , is obtained by plotting the natural logarithm of the first term of Eq. (4) against t , with $D \left(\frac{\pi}{R}\right)^2$ as the slope.

Statistics of results were analyzed with ANOVA using the software *Statistica* 7.0 (StatSoft, USA).

2.4. Analytical determinations

Lactose concentration was determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) method for reducing sugars described by Chapplin and Kennedy.¹⁸ Ethanol concentration was determined by gas chromatography using a gas chromatograph (CG-14B Shimadzu, Tokyo, Japan) with a FID detector using a capillary column DB-1 with 30 m length and 0.25 mm internal diameter. The column temperature was constant at 40 °C, and temperature of both injector and detector were 250 °C. To quantify the amount of ethanol, a calibration curve was constructed varying ethanol concentration and using a fixed amount of *n*-propanol as internal standard.

3. Results and Discussion

3.1 Effects of the concentration solution on the diffusion of lactose and ethanol

There are few studies evaluating the effect of solution concentrations in diffusion coefficients of molecules into gel beads such as spheres of calcium alginate. In this study, diffusion coefficients for lactose (D_{lact}) and ethanol (D_{EtOH}) were calculated for different solution concentrations, and the results are presented in Table 1.

Despite the fact that values of the diffusion coefficients show small increments with lactose and ethanol concentrations, the statistical analysis shows that diffusion coefficients of lactose and ethanol are not affected by solution concentration in 4% Ca-alginate beads at 30 °C (Table 1). These results are in agreement with studies performed with different molecules and supports for which no influence of the solute concentration on the diffusion coefficient were found: glucose and maltose in polyacrilamide gels;² glucose and ethanol in calcium alginate gels;¹⁹ and lactose in K-carragen gels.⁹

The profiles of the lactose and ethanol concentration in the gel beads are presented in Figs. 1 and 2 respectively. Due to the great concentration gradient, mass transfer was faster at the beginning of the process and then reaching equilibrium after 1,000 seconds (22.0, 46.7, and 64.7 g L⁻¹ for lactose solutions of 25, 50, and 75 g L⁻¹; 15.5 and 27.6 g L⁻¹ for 25 and 50 g L⁻¹ of ethanol solutions). Dembczynski and Jankowski,¹⁴ studied diffusion coefficients for different sugars, among then lactose, in Ca-alginate membrane liquid-core capsules at temperature of 30 °C, using the model described by Crank²⁰ and obtained values between 4.51 and $4.64 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Chai et al.,⁵ using a different mathematical approach than the one used in this research, reported a diffusion coefficient of $5.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for lactose in 1.2% intra-hollow calcium alginate microcapsules at temperature of 25 °C. For ethanol, diffusion coefficients amounted to $1.46 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Fig. 2). This value is lower than those reported by other authors.^{11,19,21,22} This can be explained by the different methodology used in our work, where the ethanol concentration was measured inside de Ca-alginate beads, while in the cited studies the ethanol concentration was measured in the solution surrounding the beads. During preliminary experimentations it was noticed that there is a quick and substantial loss of ethanol from the solution by evaporation. Therefore, in our research, tests to determine ethanol diffusion coefficient were made in closed systems to prevent this problem. This fact might account for the differences of results from other studies, in which the portion of the ethanol evaporated in the diffusivity were included in the calculations. In our work, the values of the diffusion coefficient for ethanol represent the real amount of ethanol through the sphere, and might be considered as a more realistic figure.

3.2. Effects of the concentration alginate and variation of temperature on the diffusivity of lactose and ethanol

To investigate the effects of gel concentration and temperature on the diffusion coefficients of lactose and ethanol experiments were carried out using Ca-alginate beads with 3%, 4% or 6% alginate concentration and temperature of 25 °C, 30 °C or 35 °C. The solutions of lactose and ethanol were constant, at 50 g L⁻¹ and 25 g L⁻¹, respectively, and the results can be seen in Table 2. For lactose, the ANOVA shows that diffusion coefficients values were significantly affected by temperature, while alginate concentration had no influence in D_{lact} : a small variation of D_{lact} ($6.32 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ to $6.96 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) was observed when increasing the concentration of Ca-alginate beads from 3% to 6% at 35 °C, but a significant variation ($4.67 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ to $6.96 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) being verified with increasing temperatures from 25 to 35 °C in gel beads of 6%, for instance. The same behavior was observed for other temperatures and gel concentration (Table 2). Meanwhile, for ethanol, the ANOVA showed that neither alginate concentration nor temperature had any significant effects on D_{EtOH} . These results are contrasting with findings from other authors, who generally reported reducing diffusivities for increasing concentrations of Ca-alginate. For instance, Hacimusalar and Mehmetoglu²² investigated the ethanol diffusion at 25 °C in different concentrations of Ca-alginate (2, 3, and 4%) and found that diffusivity decreased inversely with gel concentration (8.6 to $10.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$); likewise, Hannoun and Stephanopolous,¹⁹ reported that the diffusion coefficient of ethanol in 1, 2, and 4% Ca-alginate decreased in the same way. Their calculations were based on lag-time analysis. Although statistically not significant according to ANOVA, there can be seen a small positive influence of temperature on diffusion coefficients, when temperature goes from 25 to 35 °C (Fig. 4). These fact could suggest that a higher range in temperature might had indicated significant variations on diffusivity, which is, however, of less relevance since microbial cultivations are always run in the range of the tested temperature, specially for yeasts in the case of ethanol production (25-30 °C).

The kinetics of lactose diffusion as a function of calcium alginate concentration and temperature are presented in Fig. 3. Profiles of lactose diffusion at different Ca-alginate concentrations were similar, showing that this variable did not affect the diffusion of this sugar within the gel beads. However, the influence of temperature over lactose diffusion clearly shows a direct effect on mass transfer, increasing accordingly the diffusivity. Chai et al.⁵ studied the diffusivity of several substances, including lactose, in Ca-alginate microcapsules of 0.8, 1.0, and 1.2%, and concluded that the concentration of the gel beads did not affect the diffusivity, with very similar diffusion coefficients for any tested gel

concentration. Dembczynski and Jankowski,¹⁴ investigated diffusion coefficients of glucose, fructose, sucrose, and lactose in a Ca-alginate membrane liquid-core capsules and verified that diffusivities were not influenced by the variation in alginate concentration. In contrast, Oyaas et al.,²³ observed a decrease in lactose diffusivity when increasing alginate concentrations from 1 to 4%. Hacimusalar and Mehmetoglu²² reported a similar behavior for glucose diffusion coefficients for different alginate concentrations (2 and 3%) at 25 °C. These authors also investigated the influence of temperature (20 to 35 °C) on glucose diffusion in 3% Ca-alginate beads showing increased diffusion coefficients, with values changing from 4.52 to 7.38×10⁻⁶ cm² s⁻¹, respectively. According to Amsden and Turner,⁴ the sequence of the monomers in the molecule (mannuronic and guluronic acid), and the composition of the alginate gel (low or high content of these different monomers), determines the properties of the gel formed, consequently affecting the diffusion of solutes. This author suggested that gels with higher guluronic acid will impose greater diffusivity barrier than those of higher contents of mannuromic acid.

The kinetics of ethanol diffusivity in calcium alginate beads at different gel concentrations and temperatures is presented in Fig. 4. It appears that diffusion of ethanol is not affected by either gel concentration or temperature.

Diffusion mechanisms depend on energy of activation (E), which are molecular specific, to allow diffusion, and this can be achieved with increasing temperature. The effect of temperatures on diffusion coefficients of small molecules at constant pressure can be represented by an Arrhenius-type equation:^{23,24}

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) \quad (4)$$

The values of the activation energy calculated for lactose and ethanol were 21.8 kJ mol⁻¹ and 28.5 kJ mol⁻¹, respectively. Oyaas et al.²³ found that the energy of activation for lactose in 2% Ca-alginate beads was approximately 20.0 kJ mol⁻¹. Hacimusalar and Mehmetoglu²² investigated diffusion coefficient of glucose in Ca-alginate gel beads varying temperatures of 20 °C to 35 °C and observed that an increase in temperature led to increments of the diffusion rate and calculated the activation energy for glucose as 24 kJ mol⁻¹. Yankov² observed the behavior of diffusion coefficient for glucose and maltose in polyacrylamide gels at different temperatures (20 °C to 60 °C), and found activation energies of 14.7 kJ mol⁻¹ and 13.8 kJ mol⁻¹ for glucose and maltose respectively.

4. Conclusions

Mass transfer mechanisms are the core issue in the design of bioprocesses using immobilized cell bioreactors. With the increasing interest in the conversion of agro-industrial residues, such as whey, into ethanol, the comprehension of diffusivity characteristics of lactose and ethanol in Ca-alginate matrixes could help to develop efficient bioreactor systems. In this work it was evaluated the diffusion coefficients (D) of small molecules, such as lactose and ethanol, from within Ca-alginate gel beads based on the Fick's second Law. Important variables for bioprocesses such as temperature, gel and solution concentrations were tested, with the only first being of importance for diffusivity.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq and CAPES (Brazil) for the financial support of this research and scholarships (first author).

References

- (1) Garbayo, I; León, R.; Vígara, J; Vílches, C. Diffusion characteristics of nitrate and glycerol in alginate, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **2002**, 25 (1), 1-9.
- (2) Yankov, D. Diffusion of glucose and maltose in polyacrylamide gel. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, 34 (6), 603–610.
- (3) Lewandowska, M; Kujawski, W. Ethanol production from lactose in a fermentation/pervaporation system. *J. Food Eng.* **2007**, 79 (2), 430-437.
- (4) Amsden, B; Turner N. Diffusion characteristics of calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 65 (5), 605-610.
- (5) Chai, Y ; Mei L.H, Lin D.Q, Yao, S.J. Diffusion coefficients in intrahollow calcium alginate microcapsules. *J. Chem. Eng. Data.* **2004**, 49 (3), 475-478.
- (6) Pilkington, P.H; Margaritis, A; Mensour, A. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1998**, 18 (2&3), 237-255.
- (7) Barranco-Florido, E; García-Garibay, M; Gomez-Ruiz, L; Azaola, A. Immobilization sistem of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. *Process Biochem.* **2001**, 37 (5), 513-519.
- (8) Mehmetoglu, U. Effective difusion coefficient of sucrose in calcium alginate gel. *Enzyme Microb. Technol.* **1990**,12 (2), 124-126.

- (9) Arnaud, J.P.; Lacroix, C. Diffusion of lactose in κ -carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped growing lactic acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, 38 (9), 1041-1049.
- (10) Quirós, C; Rendueles, M; García, L.A; Díaz, M. Diffusion of microorganisms in calcium alginate beads. *Biotechnol. Tech.* **1995**, 9 (11), 809-814.
- (11) Estapé, D; Gòdia, F; Solà, F. Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 14 (5), 396-401.
- (12) Fontana, A; Chraibi M.; Guiraud J.P. Diffusivity measurement in a flocculating yeast layer. *Biotechnol. Tech.* **1991**, 5 (2), 133-138.
- (13) Grunwald, P.; Hansen K.; Gunsser W. The determination of effective diffusion coefficients in a polysaccharide matrix used for the immobilization of biocatalysts. *Solid State Ion.* **1997**, 101, 863-867.
- (14) Dembczynski, R ; Jankowski, T. Characterization of small molecules diffusion in hydrogel-membrane liquid-core capsules. *Biochem. Eng. J.* **2000**, 6 (1), 41-44.
- (15) Itamunoala, G.F. Effective diffusion coefficients in calcium alginate gel. *Biotechnol. Prog.* **1987**, 3 (2), 115-120.
- (16) Favre, E; Leonard, M; Laurent, A; Dellacherie, E. Diffusion of polyethyleneglycols in calcium alginate hydrogels. *Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Aspects.* **2001**, 194 (1-3), 197-206.
- (17) Hauffe, K; Jost,W. *Fortschritte der Physikalischen Chemie*, Vol. 1: Diffusion, Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt.**1972**.
- (18) Chapplin, M.F.; Kennedy, J.F. *Carbohydr.Anal: A Pratical Approach*. 2 ed. IRL. 1994.
- (19) Hannoun, B.J.M.; Stephanopolous, G. Diffusion-coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. *Biotechnol. Bioeng.***1986**, 28 (6), 829-835
- (20) Crank, J. *The Mathematics of Diffusion*, Oxford University Press, Oxford, **1989**.
- (21) Axelsson, A; Persson, B. Determination of the effective diffusion coefficient in calcium alginate gel plates with varying yeast cell content. *Appl. Biochem. Biotechnol.***1988**, 18, 231-250.
- (22) Hacimusalar, M; Mehmetoglu, U. Determination of the effective diffusion coefficients of glucose and ethanol in calcium alginate gel by the moment analysis method. *Chem. Eng. Sci.* **1995**, 50 (18), 3001-3004.

- (23) Oyaas, J; Storro I; Svendsen H.; Levine, D.W. The effective diffusion-coefficient and the distribution constant for small molecules in calcium-alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, 47 (4), 492-500.
- (24) Muhr, A. H; Blanshard, J. M. Diffusion in gels. *Polymer.* **1982**, 23 (7), 1012-1026.

Tables

Table 1. Diffusion coefficients for lactose and ethanol as a function of solution concentration in 4% Ca-alginate beads at 30 °C.

Solution concentration (g L ⁻¹)	$D_{lact} \times 10^{10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	$D_{EtOH} \times 10^{10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
25	6.32	1.46
50	4.84	1.28
75	4.62	--

-- solution concentration was not tested.

Table 2. Calculated diffusion coefficients for lactose ($D_{lact} \times 10^{10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) and ethanol ($D_{EtOH} \times 10^{10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) in Ca-alginate beads, and as a function of alginate concentration and temperature.

Molecule	Ca-alginate (%)	Temperature (°C)		
		25	30	35
Lactose	3	5.16	5.52	6.32
Ethanol		1.99	2.13	2.68
Lactose	4	4.73	4.84	6.10
Ethanol		1.84	1.46	2.67
Lactose	6	4.67	5.19	6.96
Ethanol		1.53	2.25	2.44

Figures

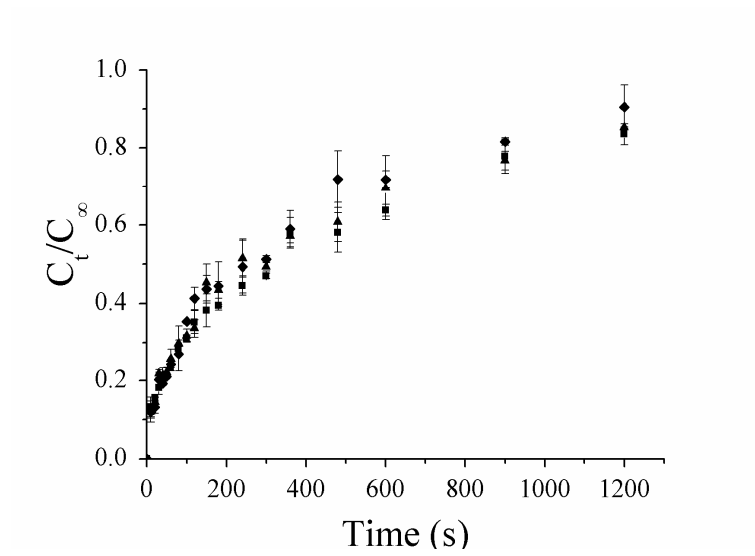


Fig.1. Lactose diffusion in calcium alginate beads as a function of time. Conditions were Ca-alginate 4% at 30 °C. Lactose concentration solutions of 25 (◆); 50 (■); and 75 g L⁻¹ (▲).

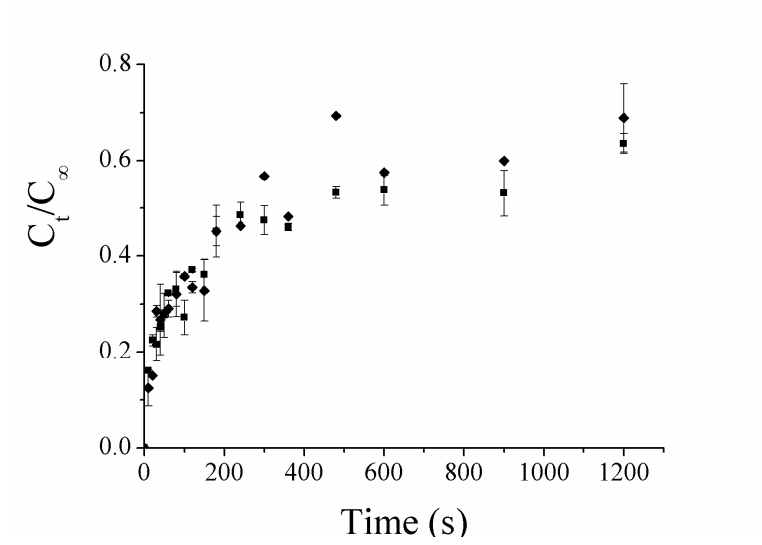


Fig.2. Ethanol diffusion in calcium alginate beads as a function of time. Conditions were Ca-alginate 4% at 30 °C. Ethanol concentration solutions of 25 (◆) and 50 g L⁻¹ (■).

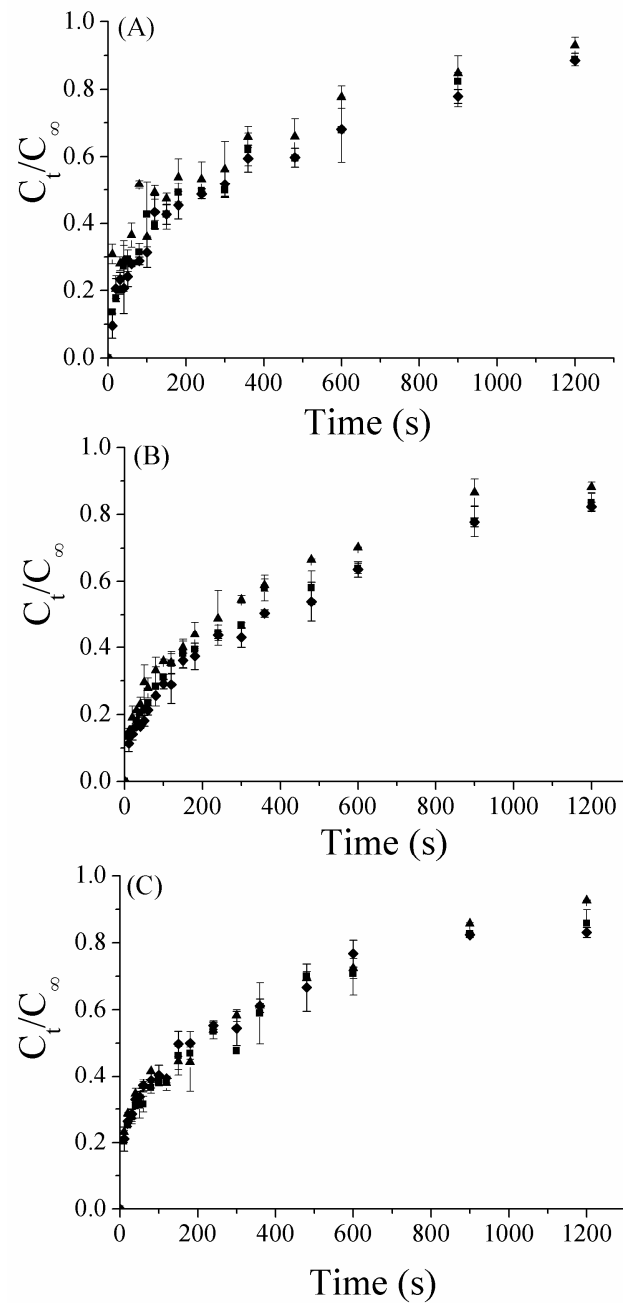


Fig.3. Lactose diffusion in calcium alginate beads of (A) 3%, (B) 4%, and (C) 6% at different temperatures: 25 °C (◆), 30 °C (■), 35 °C (▲).

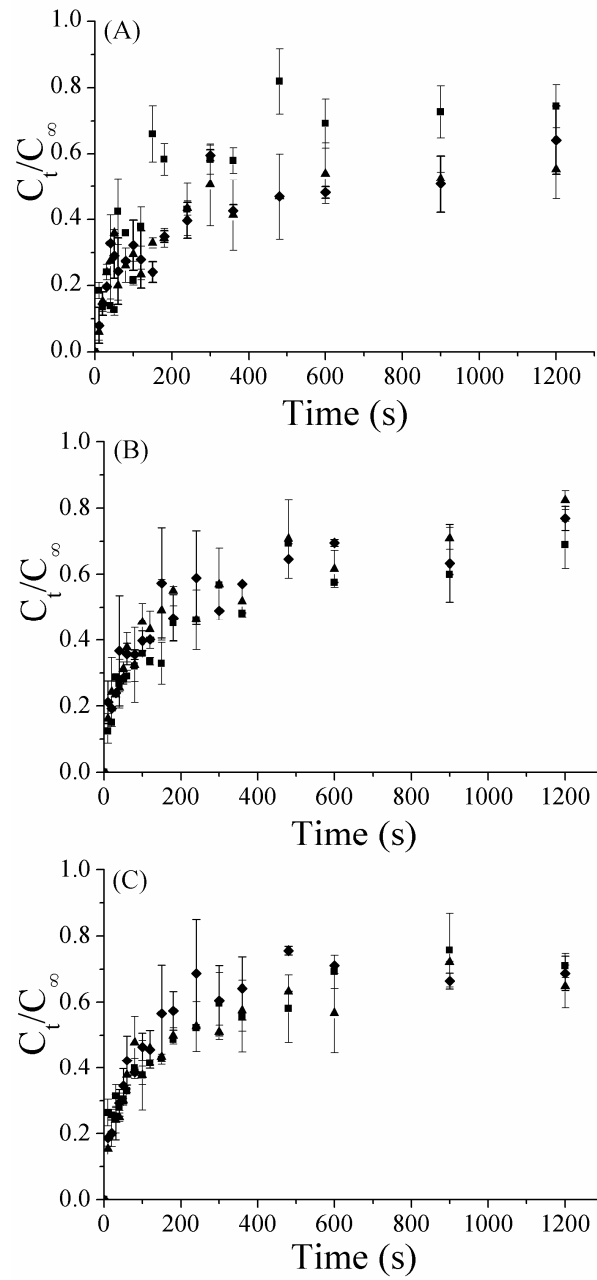


Fig.4. Ethanol diffusion in calcium alginate beads of (A) 3%, (B) 4%, and (C) 6% at different temperatures: 25 °C (◆), 30 °C (■), 35 °C (▲).

3.2 Resultados II – Performance of different immobilized-cells systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed and fluidized continuous bed bioreactors

O segundo artigo intitulado “Performance of different immobilized-cells systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed and fluidized continuous bed bioreactors” avalia a bioconversão da lactose do soro de queijo em etanol em biorreatores imobilizados de leito fixo e fluidizado em regime batelada e contínuo. Este artigo foi inicialmente submetido ao periódico *Biochemical Engineering Journal*.

Performance of different immobilized-cells systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed and fluidized continuous bed bioreactors

Sabrina Gabardo, Rosane Rech, & Marco Antônio Záchia Ayub*

BiotechLab, Food Science and Technology Institute (ICTA), Federal University of Rio Grande do Sul State (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 6685; fax: +55 51 3308 7048.

* Corresponding author. E-mail address: mazayub@ufrgs.br (MAZ Ayub)

Abstract

The bioconversion of cheese whey into ethanol by Ca-alginate immobilized *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors is described. Three different strains of *K. marxianus* (CBS 6556, CCT 4086, and CCT 2653) were grown on batch fluidized bed bioreactor at 30 °C, producing similar yields of ethanol (0.44 ± 0.01 g EtOH g sugar⁻¹). *K. marxianus* CBS 6556 was used to study the effects of temperature and significant reductions on conversion efficiencies (83.3 to 66.1%) and ethanol productivities (0.96 to 0.78 g L⁻¹ h⁻¹) were observed with increasing temperatures. This strain was further studied in continuous fluidized and packed bed bioreactors at different dilution rates (0.1 to 0.3 h⁻¹) and high yields of ethanol were obtained. The highest ethanol productivity (3.5 g L⁻¹ h⁻¹) was observed for a dilution rate of 0.3 h⁻¹ in the fluidized bed bioreactor (87% of the maximal theoretical conversion), whereas the highest ethanol concentration in the streaming effluent (28 g L⁻¹) was obtained for the dilution rate of 0.1 h⁻¹. Electronic micrographs of gel beads showed efficient cell immobilization. This is the first report comparing fluidized and packed bed bioreactors for the conversion of lactose into ethanol.

Keywords: Whey; ethanol; *Kluyveromyces marxianus*; Ca-alginate immobilized cells; continuous fluidized and packed bed bioreactors.

1. Introduction

Cell-immobilized bioreactors have contributed to bioprocesses optimization due to their unique characteristics such as high volumetric productivity, small volumes, cell protection against inhibitory products, and smaller reaction times when compared with free-cells bioreactors [1,2]. Ethanol production in cell-immobilized bioreactors has been studied using different supports as entrapment systems, such as cellulose beads [3], agar [4], delignified cellulosic materials [5], alginate [6-8], sorghum bagasse [9], and olive pits [10], among others. However, alginate gels are widely used because they are non-toxic, inexpensive, and easy to prepare [2,11,12].

Several works have investigated the production of ethanol in batch cultivation and have found the total costs of using this process to be quite high compared with continuous operations. In continuous cultivation, factors such as cell concentration and product formation rate can be controlled and maintained at desired levels [13]. Packed bed bioreactor has been extensively studied and used in continuous immobilized yeast fermentation systems, but only a few studies were reported with fluidized bed bioreactors. Different approaches have been described for continuous ethanol production in immobilized cell bioreactor systems. Continuous fermentation in a packed bed bioreactor using Ca-alginate as support for cell immobilization has been reported with various degrees of success, but still lacking commercial viability [7]. Agro-industrial residues have also been reported as support for cell immobilization for ethanol production as, for instance, sorghum bagasse in a continuous packed bed column reactors operating at different dilution rates [9]. Continuous ethanol production was also investigated using a packed column bioreactor employing olive pits as support particles for cell attachment operated at different hydraulic residence time and sugar concentrations [10,14]. However, these configurations where cells are not entrapped often release cells to the medium, losing productivity.

The use of industrial by-products to obtain ethanol is being extensively studied in order to increase the production of this important biofuel, whilst reducing the costs and the environmental impacts. Cheese whey, a by-product of the dairy industry, is an inexpensive and abundant substrate, rich in nutrients that could be used for ethanol production, which is a significant source of environmental pollution, representing a major disposal problem because of its high volumes of production and high organic load, with approximately 50% of the total worldwide production disposed of in wastewater treatment plants or on farm [15-19].

The aims of this research were to investigate several aspects of the bioconversion of cheese whey into ethanol by Ca-alginate immobilized strains of *K. marxianus* as influenced by operation mode (batch and continuous cultivation, packed and fluidized bed bioreactors), temperature, and dilution rates. Electronic microscopic scanning of beads was also carried out in order to show cell distributions and colonization of supports.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

Three strains of *Kluyveromyces marxianus* were used in this work. *K. marxianus* CBS6556 was obtained from Centraalbureau voor Schimmel-Cultures (Amsterdam, The Netherlands); *K. marxianus* CCT 4086 and *K. marxianus* var. *lactis* CCT 2653 were provided by Tropical Culture Collection of André Tosello Foundation (Campinas, Brazil). The strains were maintained on agar slants at 4 °C, as previously described [20].

2.2. Immobilization technique

For the immobilization technique, the yeasts were grown in 2 L flasks containing 800 mL of YEP-lactose medium (yeast extract, 10 g L⁻¹; bactopectone, 20 g L⁻¹; lactose, 20 g L⁻¹), pH 7.0 and 30 °C, in an orbital shaker at 180 rpm for 15 h in order to obtain exponential-phase

cells. At the end of cultivation, cells were harvested by centrifugation (3,000 g, 15 minutes), washed and resuspended in 10 mL of sterile distilled water at 4 °C. A sterile solution of 4% sodium alginate (w/v) was added to the cell suspension (20 mg dry biomass/mL alginate solution) and the mixture was immediately dropped through a 14 G needle (2.1 mm of diameter) using a peristaltic pump into a flask containing 0.1 M CaCl₂ sterile solution at 35 °C, gently agitated for 30 minutes to stabilize the system. The beads formed were washed thrice with distilled water at 4°C. Average alginate beads of 3.8 mm in diameter were obtained. Yeasts growth were determined by absorbance at 600 nm and correlated with dry cell weight (g L⁻¹) using a calibration curve.

2.3. Bioreactor cultivations

The medium used in the bioreactor experiments was reconstituted cheese whey (70 g L⁻¹ of cheese whey powder; Elegê Laticínios S.A., Teotônia, Brazil), which is the equivalent of 60 g L⁻¹ of lactose, 9 g L⁻¹ of protein, and 1 g L⁻¹ of minerals. To avoid protein precipitation during the sterilization process (121 °C, 15 min), cheese whey proteins were hydrolyzed with a commercial protease (Alcalase 2.4L, Novozymes, Araucária, Brazil) at pH 8.5, 55 °C for 3 h. Bioreactor experiments were performed in glass column bioreactors projected in our group with total volume of 370 mL, which were filled with 85 mL of alginate beads and 250 mL of fermentation medium. Fig. 1 depicts the bioreactor, with its constructive details. Temperature was kept constant in the water jacket coupled to a thermostat bath.

Batch fluidized bed fermentations were carried out for 24 h at 30°C with medium recirculation through the column by a peristaltic pump promoting the fluidization of the system (upward flow). Initially, the three strains of *K. marxianus* were grown at 30 °C to evaluate whether they differ in the ability of lactose consumption and ethanol production.

Then, *K. marxianus* CBS 6556 was chosen to test the three temperatures (30, 35, and 40 °C) on ethanol production.

Continuous fluidized bed and packed bed fermentations were performed using three dilution rates of 0.1, 0.2, and 0.3 h⁻¹ at 30°C for 128 hours with *K. marxianus* CBS 6556. The fluidization was carried out by medium recirculation through the bioreactor using a peristaltic pump at 150 mL min⁻¹ rate. Bioreactors started as batch cultures in order to accumulate cells in the system and then feeding started at 10 hours for the fluidized bed bioreactor, and after 24 hours for the packed bed bioreactor. All experiments were made in duplicates.

2.4. Analytical determinations

Sampling was from top of bioreactors in batch fermentations, and as the out stream of the continuous bioreactors. Samples were centrifuged at 3,000 g for 15 min and the supernatant was analyzed for sugar and ethanol concentrations. Cell concentration was estimated as dry weight as described before. Lactose concentration was determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) method for reducing sugars described by Chapplin e Kennedy [21]. Ethanol concentration was determined by gas chromatography using a gas chromatograph (CG-14B Shimadzu, Tokyo, Japan) with a FID detector using a capillary column DB-1 with 30 m length and 0.25 mm internal diameter. The column temperature was constant at 40 °C, and temperature of both injector and detector were 250 °C. To quantify the amount of ethanol, a calibration curve was constructed, varying ethanol concentration and using a fixed amount of *n*-propanol as internal standard.

2.5. Electronic microscopic scanning of beads with immobilized cells

The distribution and colonization of beads by yeast cells was investigated by scanning electron microscopy (SEM), using an electronic microscope (JSM-6060, Tokyo, Japan). Bead

samples were collected from 0 and 128 h of fermentation from bioreactors. The spheres were dipped into liquid nitrogen for 15 min and immediately freeze-dried for 48 h. The sample were fixed on aluminum stubs and coated with gold before being analyzed.

3. Results and Discussion

3.1. Immobilized batch fluidized bed bioreactors with three different strains of *K. marxianus*

This set of experiments was carried out in order to determine the capacity of whey bioconversion to ethanol by the three different strains of *K. marxianus* immobilized in Ca-alginate beads. This was done so to compare the widely used CBS 6556 with strains CCT 2653 and 4086, which were never tested in this type of bioprocess.

The profiles of lactose consumption and ethanol production for the three strains in batch fluidized bed bioreactor are presented in Fig. 2. All strains completely depleted lactose after only 9 hours of cultivation, with strain CCT 2653 showing a slower sugar consumption rate than other two (Fig. 2 A). The highest ethanol concentration was produced by strain CBS 6556 (Fig. 2 B), reaching 25.2 g L^{-1} at 7.5 hours of fermentation. This strain also showed the highest ethanol productivity (Q_P) of $0.96 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, compared to $0.81 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for CCT 4086 and $0.84 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for CCT 2653 (Table 1). Nevertheless, high yields of ethanol ($Y_{EtOH/S}$) were obtained for all three strains, varying from 0.43 to $0.45 \text{ g EtOH g sugar}^{-1}$, with conversion efficiencies (η) ranging from 79.1% to 83.3% of the maximal theoretical conversion (Table 1). These results compare well with those reported in the literature. Lins and Leão [12] studied ethanol production from skimmed milk with *K. marxianus* CBS 6164 immobilized in 2% Ca-alginate at 30 °C in batch cultivations, and obtained a conversion efficiency of 80%. Gunasekaran and Kamini [11], used 3.5% Ca-alginate gel to immobilize *K. fragilis* NRRL 665 to produce ethanol in batch cultivation with synthetic medium containing 200 g L^{-1} of lactose, reported a productivity of $0.88 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and an yield of $0.44 \text{ g EtOH g sugar}^{-1}$. Guo et

al. [22] co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in Ca-alginate gel beads to obtain ethanol from whey (100 g L⁻¹ of lactose) and obtained a maximal conversion of 79.9% with ethanol productivity of 0.88 g L⁻¹ h⁻¹. All these works were shaker flask experiments, while in our research, more realistic representation of a producing system, the bioreactor, was used.

Comparatively to cultures with free suspended cells, the entrapped systems used in this research performed much better. Cultures of free cells of *K. marxianus* MTCC 1288 on whey (35 g L⁻¹) in shaker flask produced only 2.10 g L⁻¹ of ethanol over 22 h of cultivation [16]. For free suspend cells of *K. marxianus* NRRL 1195 growing on whey (70 g L⁻¹), best yields of ethanol were 0.36 g g⁻¹ after 48 h of cultivation [23].

3.2. Effects of temperature on ethanol production in batch fluidized bed bioreactors

Since *K. marxianus* CBS 6556 produced the best results in the first set of experiments, it was chosen to test the effects of temperature on the batch fluidized bed bioreactors system. Three temperatures of fermentation were tested in order to determine the highest ethanol production. This was an important investigation, since some authors reported that *K. marxianus* strains were capable of growing and producing ethanol at elevated temperatures, using different carbon sources, such as molasses [6], sucrose [24], glucose [25,26], and lactose [27,28]. Fig. 3 shows the profile of lactose consumption and ethanol production at temperatures of 30, 35, and 40 °C in the batch fluidized bed bioreactor. Although the kinetics of lactose consumption was somewhat slower at 30 °C, at this temperature the highest ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$) and productivity (Q_P) were obtained, as can be seemed in Table 2. This was also true for the conversion efficiency (η), reaching 83.3% of the maximal theoretical conversion at 30°C, compared to 76.3% and 66.1% for 35 and 40 °C, respectively.

Kourkoutas et al. [5] investigated the influence of temperature (37°C, 45°C, and 50 °C) on cultures of immobilized *K. marxianus* IMB3 in delignified cellulosic material growing in

synthetic medium and lactose, and reported a significant decrease in ethanol production above 45 °C. The maximal conversion efficiency reported by these authors were approximately 27%. Limtong et al. [29] investigated the effects of temperature (30 to 45 °C) on ethanol production from sucrose by free cells of several strains of *K. marxianus* (DMKU 3-1042, DMKU 3-118, DMKU 3-p106, and DMKU 3-p1042), and reported best ethanol productivities at 30 and 37 °C (0.99 and 1.06 g L⁻¹ h⁻¹), representing around 60 and 77% of the theoretical maximal conversion in shake flask, which dropped to only 57% in bioreactor cultures at 37°C. Banat and Marchant [30] investigated the ethanol production by free suspended cells of several *Kluyveromyces* strains (IBM1, IBM2, IBM3, IBM4, and IBM5) at 45 °C, using synthetic medium with different carbon sources (lactose, whey permeate, cellobiose, and xylose) and observed the highest ethanol concentration of 17 g L⁻¹ for whey permeate (40 g lactose L⁻¹), representing 83% of the maximal theoretical conversion by strain IBM2. Finally, Nolan et al. [25] studied ethanol production by in Ca-alginate immobilized *K. marxianus* IMB3 at 45°C in synthetic medium containing glucose as carbon source and reported efficiency conversion of 70 to 80% of the maximal theoretical.

3.3. Continuous fluidized and packed beds bioreactor cultivations

Cell immobilization is an interesting technology in order to improve the operation of continuous culture (CC) bioreactors, since the biocatalyst can be kept at high concentrations in the system. In this set of experiments, we tested the effects of different dilution rates (0.1, 0.2, and 0.3 h⁻¹) in both fluidized and packed bed bioreactor with *K. marxianus* 6556 at 30°C. Fig. 4 shows the kinetics of these experiments. The lactose utilization and the mean ethanol concentration decreased inversely with dilution rates, with the fluidized bed bioreactors performing better than packed bed bioreactors, as it is shown in Table 3. The better performance of fluidized bed bioreactor should be reflecting the superior mass transfer

mechanisms of this system over the packed bed configuration, since homogenization of the medium is provided by recirculation. Lactose was totally consumed at dilution rate of 0.1 h^{-1} in fluidized bed bioreactor. Nevertheless, true steady state was achieved for all dilution rates tested (Fig. 4). These are very good results when compared to other researches using the *Kluyveromyces* yeasts on whey in continuous cultivation. *K. marxianus* DSMZ-7239 immobilized in olive pits was grown using whey (50 g L^{-1} of total sugar) in a packed bed bioreactor, with ethanol production varying from 10.5 to 19.8 g L^{-1} and sugar consumption from 63 to 70% when increasing the hydraulic residence time ($\text{HRT} = 1/D$) from 17.6 to 50 h [14]. In contrast, in this work, the bioreactors operated with much shorter HRT, which varied from 3.3 to 10 h . Research with other yeasts and systems could also be compared.

Immobilized *S. cerevisiae* growing on glucose and sucrose from sorghum bagasse varied its ethanol production from 62 to 38 g L^{-1} when increasing dilution rates from 0.2 to 0.4 h^{-1} [9]. The experimental validation of the mathematical model for predicting sugar and ethanol concentrations during the continuous fermentation of whey by *Candida pseudotropicalis* showed the highest ethanol production of 58 g L^{-1} with the highest hydraulic residence time of 42 h , with 150 g L^{-1} of lactose in the feeding medium [13]. Finally, Nigam [31], investigated the ethanol production from pineapple cannery waste (82.3 g L^{-1} of total sugars) with *S. cerevisiae* ATCC 24553 immobilized in k-carrageenan in a packed-bed tapered glass column reactor at 30°C and observed the highest sugar consumption and ethanol production of 37 g L^{-1} for the lowest dilution rate tested (0.2 h^{-1}), with performances sharply decreasing up to $D = 2.5 \text{ h}^{-1}$.

Fig. 4 (C) shows the concentration of free cells in the fluidized bed bioreactor showing that it decreased inversely with the dilution rate. These results reflect the fact that at dilution rates higher than the critical value, where $D > \mu_m$, which for *K. marxianus* growing under anaerobiosis has been reported to vary from 0.16 to 0.25 h^{-1} [16,32], there is a cell washout.

At $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$ the free suspended cells in the fluidized bioreactor was negligible, compared to lower dilution rates, with approximately 25 and 5 g L^{-1} at 0.1 and 0.2 h^{-1} , respectively.

Comparatively, Ozmihci and Kargi [14] reported a concentration of free suspended cells varying from 7.8 g L^{-1} to 4 g L^{-1} when decreasing the HRT from 50 to 17.6 h in packed bed bioreactor with immobilized *K. marxianus* DSMZ-7239 growing on whey. Some other works also showed similar profiles of reduction of free suspended cells in continuous cultivations with increasing dilution rates, all attributing this fact to the washout of cells from the system [13,31,33]. As can be seen in the electronic micrographies (Fig. 5), *K. marxianus* CBS 6556 entirely colonized the Ca-alginate matrix, saturating the beads at the end of the runs, suggesting a vigorous growth under the conditions of this work and further supporting the findings of free suspended cells in the liquid medium.

Fig. 6 shows the variation of ethanol productivity (Q_P), yields ($Y_{EtOH/S}$), and concentration with dilution rate. Ethanol productivity increased with the dilution rate for both fluidized and packed bed bioreactors, with the first system showing higher productivities, probably due to better homogenization of the fermentation medium. The highest ethanol productivity (3.5 $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$; fluidized bed bioreactor) reached 87% of theoretical conversion. The yields of ethanol ($Y_{EtOH/S}$) were also affected by the bioreactor system and the dilution rates (Fig. 6), ranging from 0.40 and 0.48 $\text{g EtOH g sugar}^{-1}$. Ghaly and El-Taweel [13] reported similar ethanol yields (0.44 to 0.47 $\text{g EtOH g sugar}^{-1}$) in continuous cultivations using different concentrations of lactose and HRTs using *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619. Although not directly comparable with our results, other yeasts and substrates were also investigated by several authors in packed bed immobilized continuous cultures and results showed the same profile of ethanol productivities and yields depending on the dilution rates [7,26,34].

4. Conclusions

Immobilized cell bioreactors hold good potential for ethanol production from whey, since the biocatalyst can be managed to high densities, increasing the overall system productivity. It was compared in this research the batch and continuous cultivations of Ca-alginate immobilized cells of *K. marxianus* strains, testing the influence of temperature and dilution rates in both fluidized and packed bed bioreactors. High yields of ethanol were obtained with high ethanol productivities. Fluidized bed bioreactors could be operated at dilution rates higher than the critical value for this strain when growing in anaerobiosis. The scanning electronic microscopy of the support showed that the cell immobilization in the alginate gel was effective. Further research is granted in order to scale-up this process.

Acknowledgements

The authors wish to thank to CNPq and CAPES (Brazil) for the financial support of this research and scholarships (first author).

References

- [1] Y. Kourkoutas, A. Bekatorou, I.M. Banat, R. Marchant, A. A. Koutinas, Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, *Food Microbiol.* 21 (2004) 377-397.
- [2] P.J. Verbelen, D.P. Schutter, F.P. Delvaux, K.J. Vertrepen, Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications, *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 1515-1525.

- [3] B. Szajáni, Z. Buzás, K. Dallmann, I. Gimesi, J. Krisch, M. Tóth, Continuous production of ethanol using yeast cells immobilized in preformed cellulose beads, *Appl. Microbiol. Technol.* 46 (1996) 122-125.
- [4] J.N. Nigam, B.K. Gogoi, R.L. Bezbaruah, Alcoholic fermentation by agar-immobilized yeast cells, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14 (1998) 457-459.
- [5] Y. Kourkoutas, S. Dimitropoulou, M. Kanellaki, R. Marchant, P. Nigam, I.M. Banat, A.A. Koutinas, High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material, *Bioresource Technol.* 82 (2002) 177-181.
- [6] S. Gough, D. Brady, P. Nigam, R. Marchant, A.P. McHale, Production of ethanol from molasses at 45 °C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* imb3, *Bioprocess Eng.* 16 (1997) 389-392.
- [7] G. Najafpour, H. Younesi, K. Syahidah, K. Ismail, Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresource Technol.* 92 (2004) 251–260.
- [8] M. Lewandowska, W. Kujawski, Ethanol production from lactose in a fermentation/pervaporation system, *J. Food Eng.* 79 (2007) 430-437.
- [9] J. Yu, X. Zhang, T. Tan, An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production, *J. Biotechnol.* 129 (2007) 415–420.
- [10] S. Ozmihci, F. Kargi, Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in packed-column bioreactor: effects on feed sugar concentration, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 106-111.
- [11] P. Gunasekaran, N.R. Kamini, High ethanol productivity from lactose by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7 (1991) 551-556.

- [12] A.C. Lins, M.H.M.R. Leão, 2002. Removal of skim milk lactose by fermentation using free and immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (3), 187-192.
- [13] A.E. Ghaly, A.A. EL-TaweL, Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey, *Biomass Bioenergy* 12 (1997) 461-472.
- [14] S. Ozmihci, F. Kargi, Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times, *Biochem. Eng. J.* 42 (2008) 180-185.
- [15] M. I. G. Siso, The biotechnological utilization of cheese whey: a review, *Bioresource Technol.* 57 (1996) 1-11.
- [16] S. Zafar, M. Owais, Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*, *Biochem. Eng.* 27 (2006) 295-298.
- [17] R. Rech, M.A.Z. Ayub, Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey, *Process Biochem.* 42 (2007) 873–877.
- [18] M.R. Kosseva, P.S. Panesar, G.Kaur, J. F. Kennedy, Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey, *Internati. J. Biol. Macromol.* 45 (2009) 437–447.
- [19] P.M.R. Guimarães, J.A. Teixeira, L. Domingues, Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey, *Biotechnol. Advances.* 28 (2010) 375–384.
- [20] S.A. Furlan, M.F. Carvalho-Jonas, R. Merkle, G.B. Bértoli, R. Jonas, Aplicação do sistema Microtiter Reader na seleção de microrganismos produtores de β galactosidase, *Arch Biol Technol* 38 (1995) 1261–1268.
- [21] M.F. Chapplin, J.F. Kennedy, *Carbohydr. Anal.: A Pratical Approach.* 2 ed. IRL., 1994
- [22] X. Guo, J. Zhou, D. Xiao, Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010) 532–538.

- [23] F. Kargi, S.Ozmihci, Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 711-718.
- [24] C. Riordan, G. Love, N. Barron, P.Nigam, R. Marchant, L. McHale, A.P. McHale, Production of ethanol from sucrose at 45 °C by alginate-immobilized preparations of the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IBM3, *Bioresource Technol.* 55 (1996) 171-173.
- [25] A.M. Nolan, N. Barron, D. Brady, T. McAree, D. Smith, L. McHale, A.P. McHale, Ethanol production at 45 °C by an alginate-immobilized. thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* following growth on glucose- containing media, *Biotechnol. Lett.* 16 (1994) 849-852.
- [26] P. Nigam, I.M. Banat, D. Singh, A.P.,McHale, R. Marchant, Continuous ethanol production by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized on mineral Kissiris at 45 °C, *World J. Microbiol.Biotechnol.* 13 (1997) 283-288.
- [27] D. Brady, R. Marchant, L. McHale, A.P. McHale, Production of ethanol by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media, *Biotechnol. Lett.* 16 (1994) 737–740.
- [28] D.Brady, P. Nigam, R. Marchant, A.P McHale, Ethanol production at 45°C by alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media, *Bioprocess Eng.* 16 (1997) 101–104.
- [29] S. Limtong, C. Sringiew, W.Yongmanitchai, Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*, *Bioresource Technol.* 98 (2007) 3367–3374.
- [30] I.M.Banat, R. Marchant, Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11 (1995) 304–306.

- [31] J.N. Nigam, Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells, *J. Biotechnol.* 80 (2000) 189–193.
- [32] W. B. Silveira, F. J. Passos, H. C. Mantovani, F.M. Passos, Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen level, *Enzyme Microb. Technol.* 46 (2005) 141-209.
- [33] C.J. Hack, R. Marchant, Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process, *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.* 20 (1998) 323–327.
- [34] T. Lebeau, T. Jounne, G-A. Junter, Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50 (1998) 309-313.

Tables

Table 1. Ethanol yield ($Y_{EtOH/S}$), conversion efficiency (η) and ethanol productivity (Q_P) by three strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch fermentation.

Yeast	$Y_{EtOH/S}$ (g EtOH g sugar ⁻¹)	Conversion efficiency (%)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
CBS 6556	0.45	83.3	0.96
CCT 4086	0.43	79.1	0.81
CCT 2653	0.45	83.3	0.84

Table 2. Ethanol yield ($Y_{EtOH/S}$), conversion efficiency (η) and ethanol productivity (Q_P) by *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 in batch fermentation at three temperatures.

Temperature (°C)	$Y_{EtOH/S}$ (g EtOH g sugar ⁻¹)	Conversion efficiency (%)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
30	0.45	83.3	0.96
35	0.41	76.3	0.82
40	0.36	66.1	0.78

Table 3. Comparison of lactose utilization (%) and ethanol concentration (g L^{-1}) as a function of dilution rates, in the fluidized and packed bed bioreactors. Results are the mean of duplicates.

Dilution rate (h^{-1})	Lactose consumption (%)		Ethanol production (g L^{-1})	
	Fluidized	Packed	Fluidized	Packed
0.1	95.6	78.4	25.3	22.1
0.2	83.8	51.5	19.7	13.3
0.3	48.8	33.5	12.9	9.3

Figures

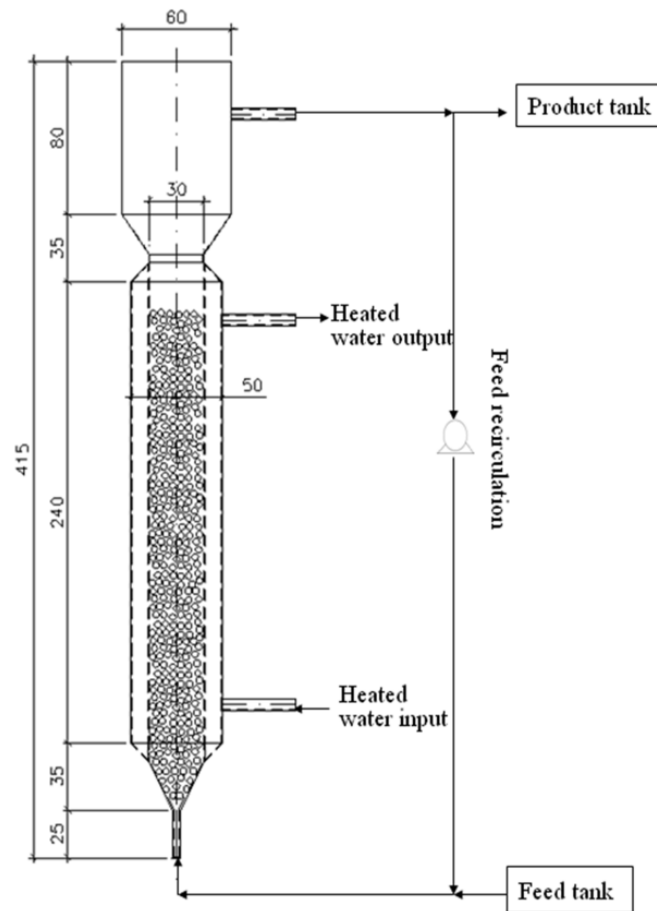


Fig. 1. Schematic diagram of continuous fluidized bed bioreactor.

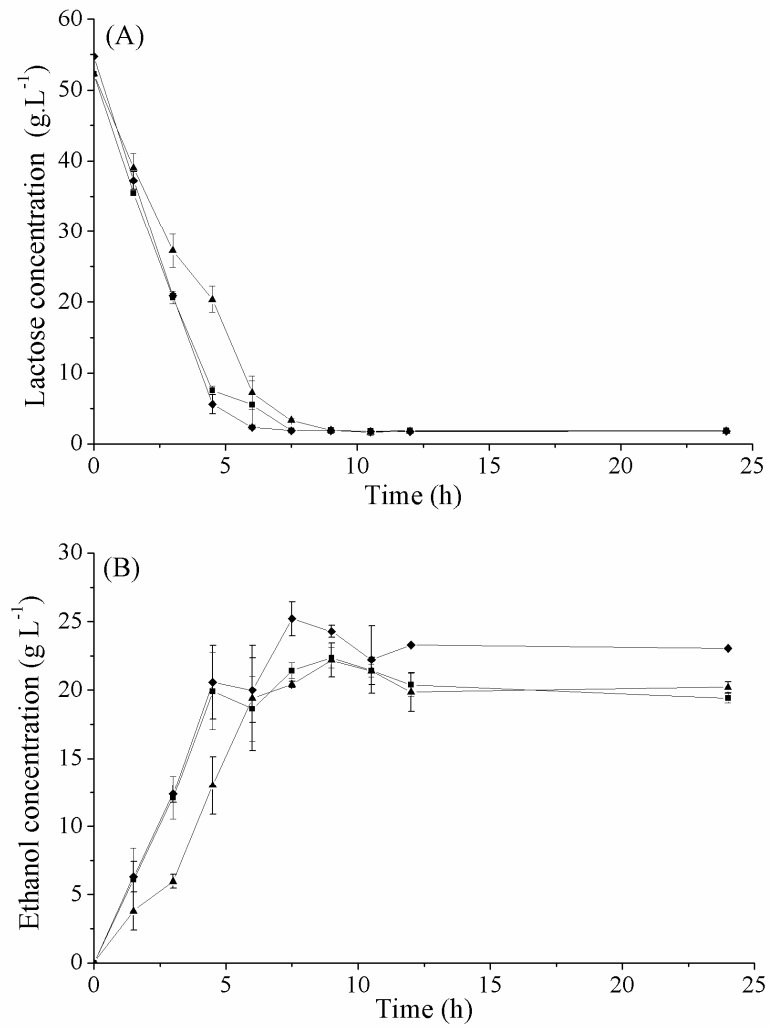


Fig. 2. Kinetics of lactose consumption (A), and ethanol production (B) of the three strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch fluidized bioreactor at 30°C. (◆) CBS 6556, (■) CCT 4086, (▲) CCT 2653.

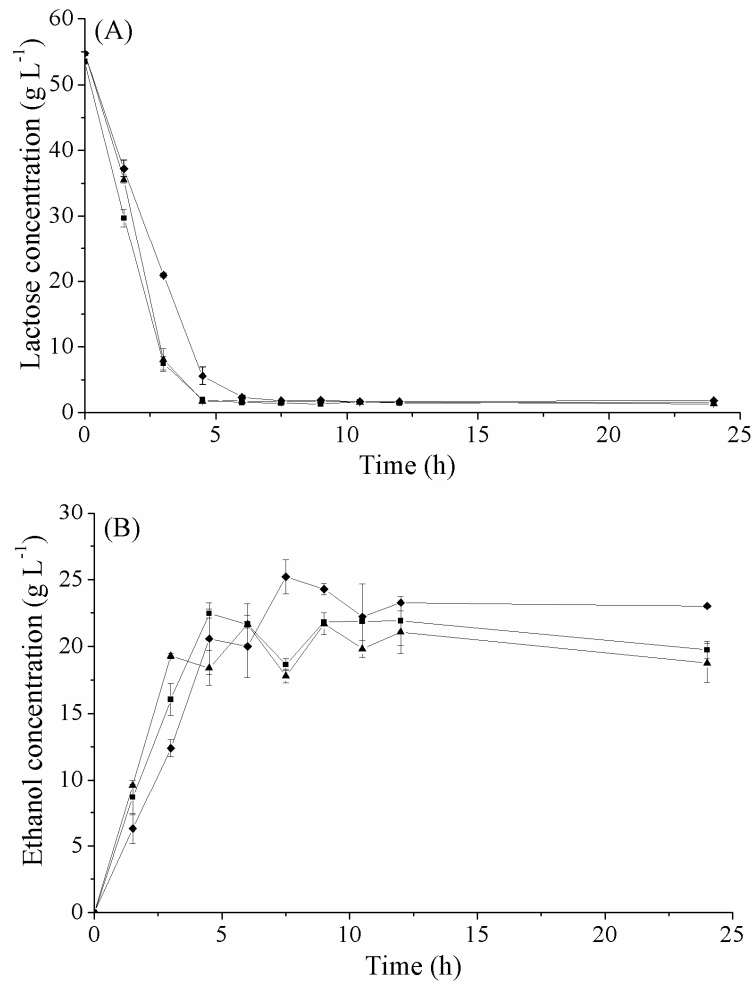


Fig. 3. Kinetics of lactose consumption (A), and ethanol production (B) by *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 in the batch fluidized bed bioreactor as a function of temperature: (◆) 30°C, (■) 35°C, and (▲) 40°C.

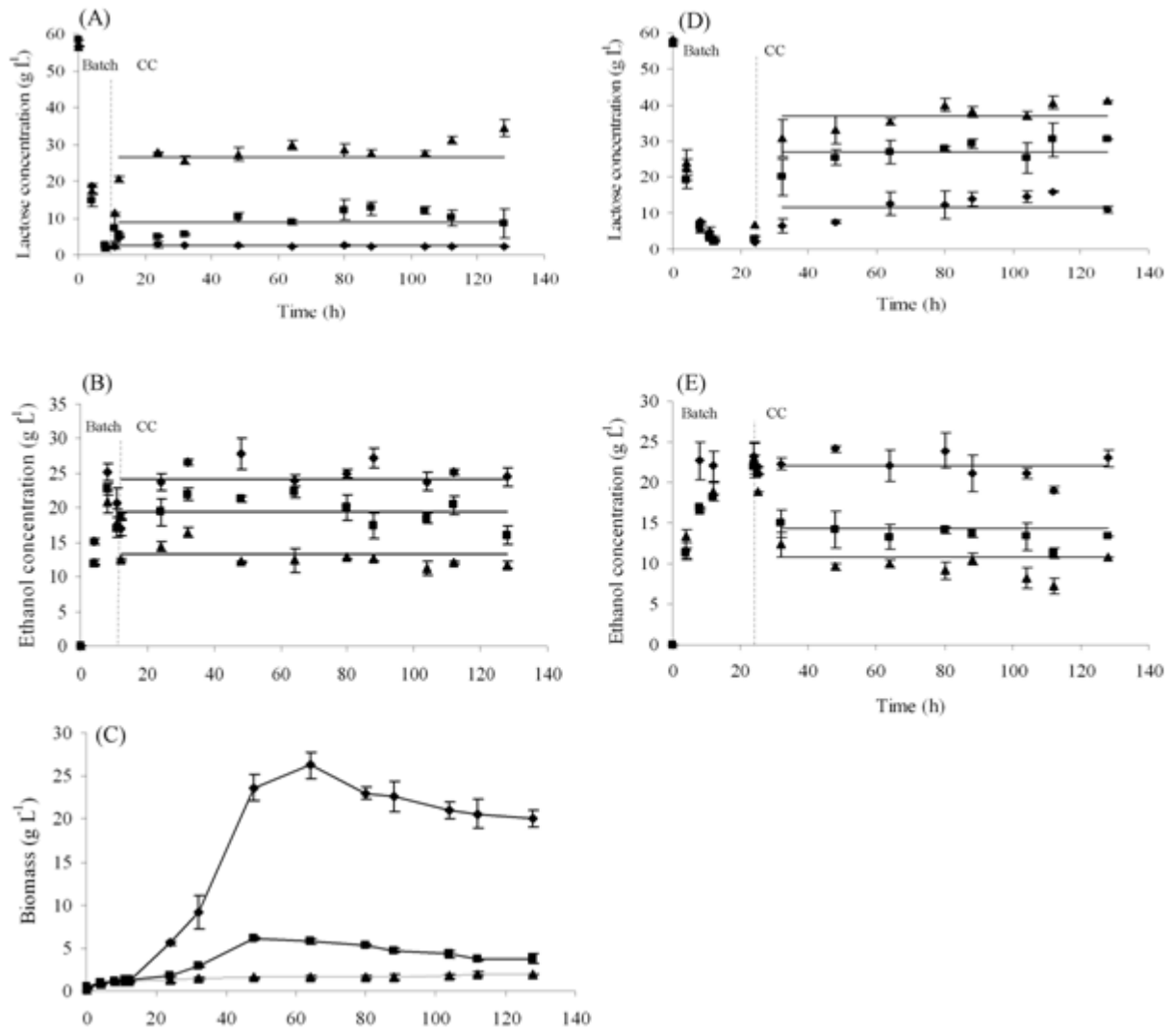


Fig. 4. Kinetics of lactose consumption (A), ethanol production (B), and free biomass (C) in the continuous fluidized bed bioreactor at three dilution rates; kinetics of lactose consumption (D) and ethanol production (E) in the continuous packed bed bioreactor at three dilution rates. 0.1 h⁻¹ (◆), 0.2 h⁻¹ (■), 0.3 h⁻¹ (▲).

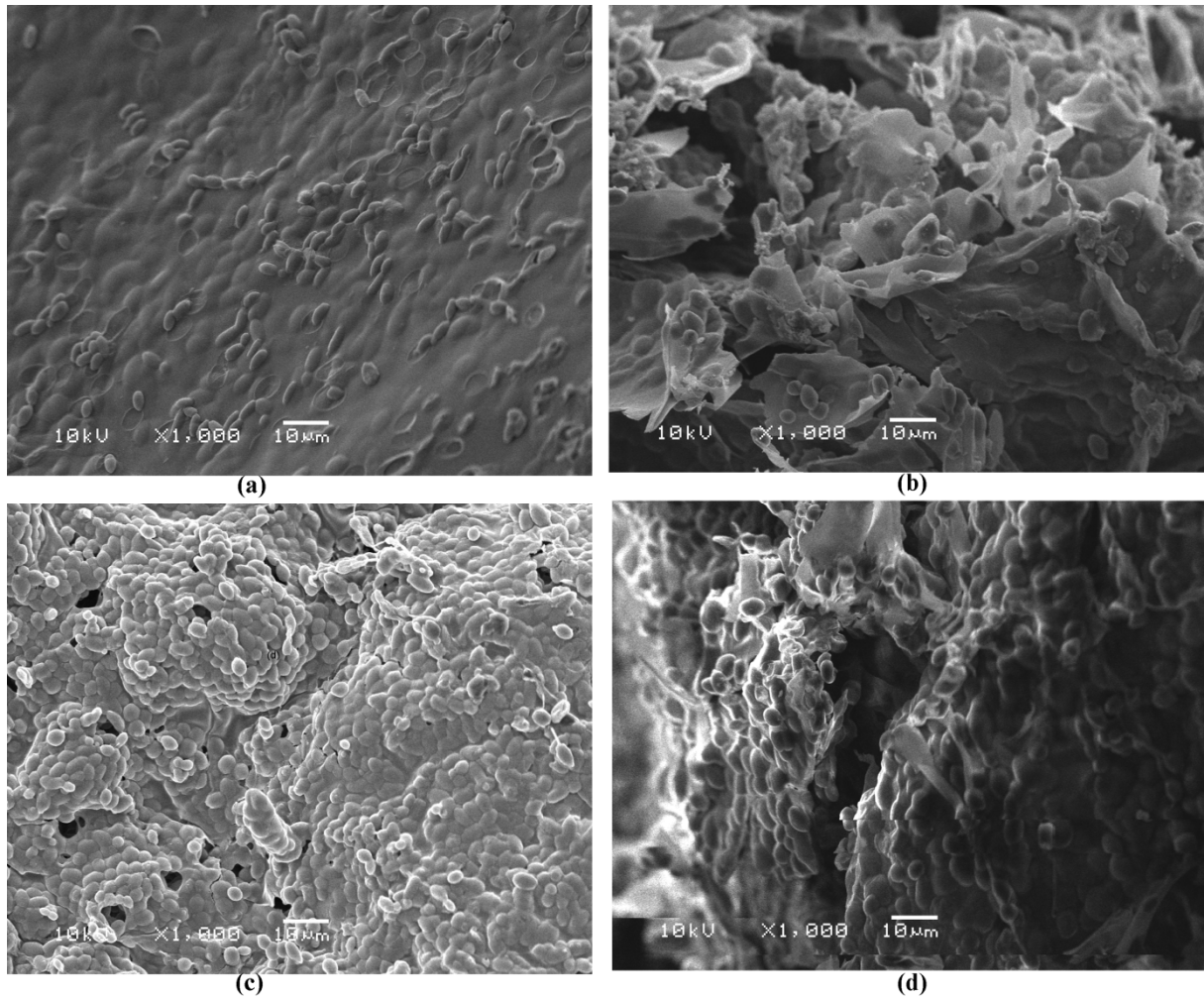


Fig. 5. Scanning electron micrography showing the colonization profile of Ca-alginate beads by *K. marxianus* CBS 6556: (a) outer surface of beads at time 0 h; (b) inner surface of beads at time 0 h; (c) outer surface of beads at cultivation time 128 h; (d) inner surface of beads at cultivation time 128 h. Magnification of 1,000.

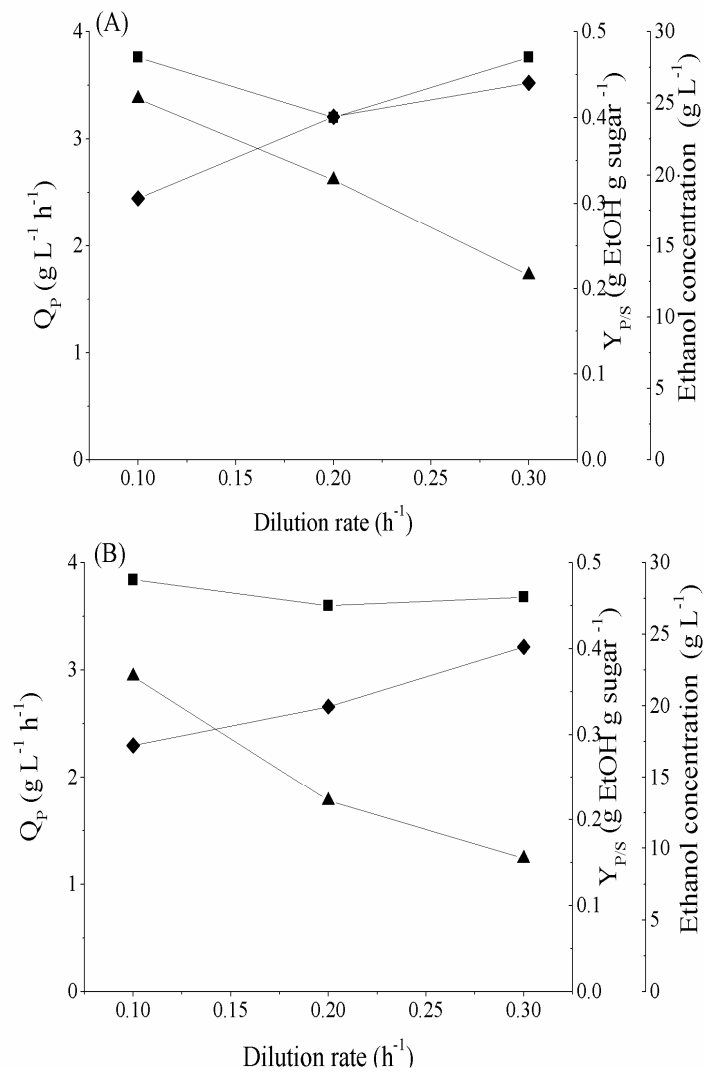


Fig. 6. Variation of ethanol productivity (Q_P), ethanol yields ($Y_{EtOH/S}$), ethanol concentration ($g L^{-1}$) with dilution rate (D) by fluidized bed bioreactor (A) and packed bed bioreactor (B). Q_P (\blacklozenge), $Y_{EtOH/S}$ (\blacksquare), ethanol concentration (\blacktriangle).

4. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foi estudada a otimização do aproveitamento biotecnológico do soro de queijo para a produção de etanol em biorreatores imobilizados através da técnica de aprisionamento em alginato de cálcio. Para tanto, em um primeiro momento buscou-se avaliar a difusividade da lactose e do etanol no interior de esferas de alginato de cálcio através do cálculo do coeficiente de difusão baseado na Segunda Lei de Fick. Fatores como concentração das soluções e do gel de alginato, assim como a temperatura foram avaliados. O estudo da difusividade de substratos e produtos em compartimentos sólidos, como as esferas de alginato, é importante por ser limitante do sistema de células imobilizadas. Além disso, o seu entendimento pode auxiliar em melhorias de eficiência de processos biotecnológicos, visto que altas taxas de conversão podem ser alcançadas desde que o substrato consiga atravessar a partícula até chegar às células e o produto seja liberado desse sistema para o meio externo sem nenhuma resistência. Problemas na transferência de massa de substratos e produtos podem levar a alterações fisiológicas e prejudicar o crescimento celular e conseqüentemente, à viabilidade do processo como um todo.

De acordo com os resultados apresentados no primeiro artigo “Determination of lactose and ethanol diffusion coefficients in calcium alginate gel spheres: predicting values to be used in immobilized bioreactors”, verifica-se que o coeficiente de difusão da lactose e do etanol não é afetado pelas diferentes concentrações das soluções (lactose e etanol) em esferas de alginato de cálcio 4% a uma temperatura de 30 °C. O fato do coeficiente de concentração não ter variado com as diferentes soluções testadas consiste em um resultado importante, já que a metodologia proposta por este estudo é diferenciada da descrita em trabalhos anteriores. Sendo o coeficiente de difusão um parâmetro que permite avaliar a transferência de massa interna em sistemas de imobilização e que depende da facilidade com a qual uma molécula é capaz de se mover a uma distância em determinado tempo, fica evidenciado aqui, que essa capacidade de movimentação depende das propriedades de cada molécula, como por exemplo, do tamanho molecular, mas não da concentração em que o soluto se encontra.

Os valores do coeficiente de difusão da lactose mostraram-se similares ao reportados em literatura, enquanto que um menor coeficiente de difusão do etanol foi obtido. No presente estudo a concentração da lactose e etanol foi medida dentro da própria esfera de alginato, enquanto em outros trabalhos a concentração de solutos foi medida a partir da solução que

envolve as partículas. Essa disparidade encontrada nos valores do coeficiente de difusão do etanol pode ser devido ao fato de outras pesquisas possivelmente incluírem no cálculo de obtenção desse parâmetro, o etanol que foi perdido por evaporação, já que no presente trabalho, os experimentos de difusividade do etanol foram conduzidos em sistemas fechados e com medições na própria esfera, representando dessa forma, a real quantidade de etanol que difundiu para o interior da partícula, sem maiores perdas por evaporação.

Ainda, com, relação à influência da concentração do gel de alginato e da temperatura sobre a difusividade da lactose e do etanol, se verifica que a concentração do gel de alginato não exerce influência sobre a difusividade dessas moléculas. Diferentes trabalhos têm sido realizados na tentativa de avaliar a influência da concentração da matriz de imobilização sobre a difusão de diferentes moléculas, contudo os resultados são bastante contraditórios. De acordo com Amsden e Turner (1999), a seqüência dos monômeros na molécula do alginato e a sua composição determinam as propriedades do gel formado, e conseqüentemente, afetam a difusão. Efeitos da temperatura sobre a difusividade da lactose demonstraram que esta exerce influência na transferência de massa, onde o aumento da temperatura leva a um aumento do coeficiente de difusão. Já para o etanol, não foram encontradas influências significativas, muito embora um efeito positivo tenha sido verificado com o aumento da temperatura. Esses últimos dados são interessantes na tentativa de prever a melhor temperatura para a transferência de massa de substratos e produtos em um biorreator com aquela em que ocorrem as melhores condições fisiológicas das células. Diante do exposto até o momento, fica explícita a necessidade do conhecimento dos mecanismos de transferência de massa em sistemas de células imobilizadas, de forma a contribuir positivamente para o a otimização de processos e no desenvolvimento de biorreatores mais eficientes.

Em um segundo momento desta pesquisa, buscou-se otimizar a bioconversão da lactose presente no soro de queijo pela utilização de biorreator de coluna com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, testando-se primeiramente a bioconversão por diferentes linhagens de *K. marxianus* em leito fluidizado em regime batelada, em seguida, foram testadas diferentes temperaturas de fermentação por *K. marxianus* CBS 6556 nas mesmas condições de operação do experimento citado anteriormente, e em uma terceira etapa, a bioconversão foi analisada em operação contínua, com alimentação em diferentes taxas de diluição em biorreator de leito fixo e fluidizado.

Os dados apresentados no segundo artigo “Performance of different immobilized-cells systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed and fluidized continuous bed bioreactors”, mostram que as três linhagens de *K. marxianus*, CBS 6556, CCT

4086 e CCT 2653 têm a capacidade de metabolizar a lactose presente no soro de queijo e fermentar a etanol, apresentando um fator de conversão de lactose em etanol bastante similar ($0,44 \pm 0,01 \text{ g g}^{-1}$) e uma eficiência de conversão (83,3%) um pouco superior a encontrada em trabalhos anteriores. De acordo com a literatura, a maior parte das linhagens de *K. marxianus* são capazes de utilizar a lactose como fonte de energia (codificação dos genes LAC12 e LAC4), fato evidenciado neste estudo. Adicionado a isso, na segunda parte experimental deste artigo, se verifica que o aumento da temperatura levou à diminuição da eficiência de conversão (83,3 a 66,1%), assim como da produtividade volumétrica ($0,96$ a $0,78 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$). Contudo, sugere-se que as menores concentrações de etanol encontradas para as maiores temperaturas devem-se às perdas por evaporação durante o processo, já que a lactose foi praticamente consumida em 7 horas de fermentação para as três temperaturas testadas. A construção de um biorreator que prevenisse esse tipo de problema seria importante na tentativa de aumentar as taxas de conversão em maiores temperaturas, isso porque a levedura apresentou similar capacidade de crescimento e consumo de lactose para as diferentes temperaturas testadas, podendo ainda, com isso, melhorar as características de difusividade já que o aumento da temperatura exerce influências positivas.

Os resultados apresentados até o momento demonstram claramente o potencial de aproveitamento que o soro de queijo apresenta como um meio rico em nutrientes na produção de etanol, podendo solucionar simultaneamente com isso, os problemas ambientais decorridos de seu inadequado descarte e da alta carga orgânica. Ainda, na tentativa de otimizar o aproveitamento deste subproduto nobre, e portanto, melhorar a eficiência do bioprocessamento, foram realizados experimentos em biorreatores contínuos com células imobilizadas, visto as diversas vantagens que estes sistemas conferem, como por exemplo, o aumento da produtividade e das taxas de conversão.

As vantagens do sistema contínuo foram evidenciadas neste trabalho, já que maiores produtividades volumétricas foram alcançadas com o aumento da taxa de diluição ($0,1$ a $0,3 \text{ h}^{-1}$), tanto para biorreator de leito fixo ($2,3$ a $3,2 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) quanto de leito fluidizado ($2,5$ a $3,5 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$). A maior produtividade volumétrica foi obtida para a taxa de diluição de $0,3 \text{ h}^{-1}$ em biorreator de leito fluidizado, alcançando 87% da conversão teórica, e a maior concentração de etanol ($27,9 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida com a taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$, onde a lactose foi totalmente consumida. O fator de conversão de lactose em etanol ($Y_{EtOH/S}$) não sofreu influência nem pela taxa de diluição e nem dos dois sistemas de biorreatores empregados (fixo e fluidizado). Muito embora a taxa de diluição de $0,3 \text{ h}^{-1}$ tenha apresentado maiores produtividades volumétricas, a concentração de etanol é menor do que para a taxa de diluição

de $0,1 \text{ h}^{-1}$. Dessa forma, a operação em $0,3 \text{ h}^{-1}$ se torna menos interessante, já que maiores gastos seriam necessários para concentrar a amostra, além da maior quantidade de soro de queijo necessária para alimentar o sistema.

Nesse contexto, a utilização do soro de queijo, como fonte alternativa de carbono para a produção de etanol, revela-se uma opção bastante vantajosa, apresentando grande potencial de aproveitamento, e representando uma alternativa interessante tanto do ponto de vista técnico, ambiental quanto econômico. O aproveitamento do soro de queijo não apenas acarreta na diminuição do custo final do etanol como também propicia a minimização dos custos de tratamento de águas residuais por parte das indústrias de laticínios, visto que o volume é reduzido, além de levar à benefícios ao meio ambiente, uma vez que o seu descarte como subproduto industrial não reaproveitado pode ser diminuído ou mesmo evitado. Desse modo, a utilização deste subproduto industrial, ainda pouco explorado, pode minimizar o seu potencial poluidor, além de tornar a produção de etanol um processo menos oneroso e bastante vantajoso em termos produtividade e taxas de conversão.

PERSPECTIVAS

O presente trabalho demonstrou o potencial biotecnológico do aproveitamento do soro de queijo para a produção de etanol por meio de biorreatores imobilizados. Comprovou ainda, as vantagens conferidas pelos sistemas de células imobilizadas em alginato de cálcio, assim como os aspectos positivos que os sistemas de alimentação contínua proporcionam, além da importância dos mecanismos de transferência de massa em sistemas de imobilização.

Melhorias na eficiência de biorreatores de células imobilizadas ainda fazem-se necessárias, possibilitando o uso de diferenciados materiais de suporte, assim como diferentes técnicas de imobilização celular, na tentativa de se obter uma grande retenção de células e estabilização perante as condições de operação estabelecidas e às características do meio de cultivo. O aproveitamento de resíduos agroindustriais como matriz-suporte de imobilização tem se mostrado uma alternativa bastante interessante. Além disso, biorreatores mais eficazes podem ser projetados e construídos para se obter um maior controle do processo e das variáveis que envolvem a fermentação. Ainda, na tentativa de aperfeiçoar o bioprocessamento, faz-se necessário ampliar os conhecimentos dos efeitos da concentração de células sobre a difusividade da lactose e do etanol em suportes de imobilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTERIIS, E; SILVESTRO, G; POLETTOM, M; ROMANO, V; CAPITANIO, D; COMPAGNO, C; PARASCANDOLA, C. *Kluyveromyces lactis* cells entrapped in Calcium alginate beads for the continuous production of a heterologous glucoamylase. **Journal of Biotechnology**, v.109, p. 83–92, 2004

AMSDER, B; TURNER, N. Diffusion Characteristics of Calcium Alginate Gels. **Biotechnology and Bioengineering**, v.65, n. 5, p. 605-610, 1999.

ANDRADE, R.L.P.; MARTINS, J.F.P. Influência da adição da fécula da batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 249-253, 2002.

ANTONOPOULOU, G; STAMATELATOU, K; VENETSANEAS, N; KORNAROS, M; LYBERATOS G. Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 5227-5233, 2008.

BAI, F.W; ANDERSON, W.A; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 14, p. 89-105, 2008.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. 1992. Isolation of thermotolerant fermentative yeast capable of growth at 52°C and ethanol production at 48 °C e 50 °C. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p. 259-263, 1992.

BANAT IM, MARCHANT R. Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.11, p. 304–306, 1995.

BARRANCO-FLORIDO, E; GARCÍA-GARIBAY, M; GOMEZ-RUIZ, L; AZAOLA, A. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 37, p.513-519, 2001.

BARON, G.V; WILLAERT, R.G; BACKER, L.U.C. Immobilized cell reactors. In: WILLAERT, R.G. **Immobilized living cells systems: Modelling and experimental methods**. London: John Wiley & Sons, p. 67-95, 1996.

BECERRA, M; BAROLI, B; FADDA, A.M; MENDEZ, J.B; SISO, M.I.G. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v 29, p. 506–512, 2001.

BEINUM, W. V.; MEEUSSEN, J. C.L; EDWARDS, A. C; RIEMSDIJK W. H. V. Transport of ions in physically heterogeneous systems; convection and diffusion in a column filled with alginate gel beads, predicted by a two-region model. **Water Research**, v.34, p.2043-2050, 1999.

BRADY D., MARCHANT R, MCHALE L., MCHALE A.P. Production of ethanol by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 737–740, 1994.

BRAILE, P.M; CAVALCANTI, J.E.W.A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1993. 764 p.

COVIZZI, L.G. GIESE, E.C; GOMES, E; DEKKER, R.F.H; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.28, p. 143-160, 2007.

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

DE AMORIM, E.L.C; BARROS, A.R; DAMIANOUIC, M.H.R.Z, et al. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p. 783-790, 2009.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 33, p. 1-18, 2007.

DOMINGUES, L; TEIXEIRA, J.A; LIMA, N. 1999. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51 (5), 621-626.

DOMINGUES, L; LIMA, N; TEIXEIRA, J.A. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. **Biotechnology Bioengineering**, v. 72, p. 507-514, 2001.

ESTAPÉ, D; GÒDIA, F; SOLÀ, F. Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 396-401, 1992.

FAVRE, E; LEONARD, M; LAURENT, A.; DELLACHERIE, E. Diffusion of polyethyleneglycols in calcium alginate hydrogels, *Colloids and Surfaces A. Physicochemical Engineering Aspects*, v. 194, p. 197-206, 2001.

FREY, P.A. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB Journal*, v.10, p. 461-470, 1996.

FONSECA, G.G; HEINZLE, E; WITTMANN, C; GOMBERT, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.79, p.339-354, 2008.

FUKUDA, H. Immobilized microorganism bioreactor. In: ANSEJO, J.A; MERCHUK, J.C. *Bioreactor system design*. New York: Marcel Dekker, p.339-375, 1994.

GARBAYO I, VILCHEZ C, VEGA JM, et al. Influence of immobilization parameters on growth and lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* co-immobilized in calcium alginate gel beads. **Biotechnology Letters**, v. 26, p.1825-1827, 2004.

GHALY, A.E; EL-TAWEL, A.A. Effect of micro-aeration on the growth of *Candida pseudotropicalis* and production of ethanol during batch fermentation of cheese whey. **Bioresource Technol**, v.52, p. 203-217, 1995.

GHALY, A.E; EL-TAWEL, A.A. Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. **Biomass and Bioenergy**, v. 12, p. 461-472, 1997.

GIVRY, S.; PREVOT, V.; DUCHIRON, F. Lactic acid production from hemicellulosic hydrolyzate by cells of *Lactobacillus bifementans* immobilized in Ca-alginate using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 745-752, 2008.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14 (2), p. 75-107, 1994.

GUIMARÃES, P.M.R; TEIXEIRA, J.A; DOMINGUES, L. Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p.1953-1958, 2008.

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

GUNASEKARAN, P; KAMINI, N.R. High ethanol productivity from lactose by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.7, p. 551-556, 1991.

GUO X., ZHOU J, XIAO D. Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p. 532–538, 2010.

JUNTER, G; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse. **Biotechnology advances**, v. 22, p. 633-658, 2004.

KAREL, S.F., LIBICKI, S.B., ROBERTSON, C.R. The immobilization of whole cells-engineering principles. **Chemical Engineering. Science**, v. 40, p.1321–1354, 1985.

KIM, H.O; WEE, Y.J; KIM, J.N; YUN, J.S; RYU, H.W. Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus* sp RKY2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 131, p. 694-704, 2006.

KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. **Journal Dairy Science.**, v.62, p.1149-1160, 1979.

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

KOSSEVA, M.R; BESCHKOV, V.N; PILAFOVA, E.I. Bulg. Chemical Communication, v. 28, p.690–702, 1995.

KOURKOUTAS, Y.; DIMITROPOLOU, S; KANELLAKI, M; MARCHANT, R; NIGAM, P; BANAT, I.M; KOUTINAS, A.A. High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. **Bioresource Technology**, v. 82, p.177-181, 2002.

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

KOUTINAS, A.A. High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. **Bioresource Technology**, v.82, p. 177-181, 2002.

KOUTINAS, A.A; PAPAPOSTOULOU, H; DIMITRELLOU, D; KOPSAHELIS, N; KATECHAKI, E; BEKATOROU, A; BOSNEA, L.A. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. **Bioresource Technology**, v. 100, p.3734–3739, 2009.

KRISHNAN, M.S, NGHIEM, N.P, DAVISON, B.H. Ethanol production from corn starch in a fluidized-bed bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, p.359-372, 1999.

LAL, R. Crop residues as soil amendments and feedstock for bioethanol production. **Waste Management**, v. 28, p. 747-758, 2008.

LEWADOWSKA, M. e KUJAWSKI, W. Ethanol production from lactose in a fermentation/pervaporation system. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p.430-437, 2007.

LINS, A.C; LEÃO, M.H.M.R. Removal of skim milk lactose by fermentation using free and immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.187-192, 2002.

LIU, C.H; WU, J.Y; SHANG, J.S. Diffusion characteristics and controlled release of bacterial fertilizers from modified calcium alginate capsules. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1904–1910, 2008.

MADRID, A; CENZANO, I VICENTE J.M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p.147-168, 1995.

Manual de referência para produtos de soro dos EUA. US Dairy Export Council. São Paulo, 1997.

MAPA/SPA – Secretaria de Política Agrícola. **Sumário Executivo: Complexo Leite**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 7 p. 2010.

MARWAHA, S.S; KENNEDY, J.F. Whey - Pollution problem and potential utilization. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 23, p.323–336, 1988.

MELZOCH, K; RYCHTERA, M; HABOVA. V. Effect of immobilization upon the properties and behavior of *Saccharomyces-cerevisiae* cells. **Journal of Biotechnology**, v. 32, p.59–65, 1994.

MENDES, A.A; PEREIRA, E.B; CASTRO, H.F. Biodegradação de águas residuárias de laticínios previamente tratados por lipases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 2, p. 143-149, 2006.

MESOMO, M; SILVA, M.F; BONI, G, et al. Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* from cheese whey: production optimisation and rheological characterisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2440-2445, 2009.

NAJAFPOUR G. YOUNESI H., SYAHIDAH K.; ISMAIL, K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 251–260, 2004.

NAJAFPOUR, G.D; KOMEILI, M.; TAJALLIPOUR, M.; ASADI, M. Bioconversion of Cheese Whey to Methane in an Upflow Anaerobic Packed Bed Bioreactor. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 24, p. 111-117, 2010.

NIGAM, J.N; GOGOI, B.K; BEZBARUAH, R.L. Alcoholic fermentation by agar-immobilized yeast cells. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 457-459, 1998.

NIGAM, J.N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. **Journal of Biotechnology**, v.80, p.189–193, 2000.

NITSCHKE, M; RODRIGUES, V; SCHINATTO, L.F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. Campestris* C₇L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 82-85, 2001.

ORNELAS, A.P; SILVEIRA, W.B; SAMPAIO, F.C; PASSOS, F. M. L. The activity of beta-galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 4, p. 1008-1013, 2008.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 169–174, 2007a.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 876-880, 2007b.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2978–2984, 2007c.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. **Biochemical Engineering Journal**, v.42, p. 180-185, 2008.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in packed-column bioreactor: effects on feed sugar concentration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 106-111, 2009.

PANESAR, P.S; KENNEDY, J.F; GANDHI, D.N; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 2, p. 1-14, 2007.

PILKINGTON, P.H; MARGARITIS, A; MENSOUR, A. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18 (2 e 3), p. 237-255, 1998.

PONSANO, E.G; CASTRO-GÓMES, R.J.H. Fermentação de soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa para redução de sua capacidade poluente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n. 1, p. 170-173, 1995.

PORTO, L.M; SANTOS, R.D; MIANDA, T.L. Determinação das melhores condições operacionais do processo de produção da ricota. **Boletim CEPPA (UFPR)**, v. 23, n. 1, p. 173-182, 2005.

PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.A; AQUARONE, E; BORZANI,W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., v. 2, p. 355-372, 2001.

QUIRÓS, C; RENDUELES, M; GARCÍA, L.A; DÍAZ, M. Diffusion of microorganisms in calcium alginate beads. **Biotechnology Techniques**, v. 9, n. 11, p. 809-814, 1995.

RECH, R; CASSINI, C.F; SECCHI, A.R; AYUB, M.A.Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 91-96, 1999.

RECH, R; AYUB, M.A.Z. Fed-batch bioreactor process with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* growing on cheese whey. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 435-442, 2006.

RECH, R; AYUB, M.A.Z. 2007. Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. **Process Biochemistry**, v. 42, p.873–877, 2007.

RICHARDS, N.S.P.S. Soro Lácteo: Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente. **Food Ingredients**, v. 3, n. 17, p. 20-27, 2002.

RIVALDI, J.D; SARROUH, B.F; da SILVA, S.S. An Evaluation of Different Bioreactor Configurations with Immobilized Yeast for Bioethanol Production. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 6, A 115, 2008.

RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnology Advances**, v.24, p.212–25, 2006.

SANSONETTI, S; CURCIO, S; CALABRO, V; IORIO, G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p.1687–1692, 2009.

SANTIAGO, P.A; MARQUEZ, L.D.S; CARDOSO, V.L; RIBEIRO, E.J. Estudo da produção da β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SAUCEDO, j. E.; AUDRAS B.; ANDRAS J.; BASINET J.; BARBOTIN, N. **FEMS Microbiology Review**. v.14, p. 93, 1994.

SCHMIDELL, E; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.A; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biocologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., v. 2, p. 355-372, 2001.

SERP, D; CANTANA, E; HEINZEN, C; STOCKAR, U.V; MARISON, I.W. Characterization of an Encapsulation Device for the Production of Monodisperse Alginate

Beads for Cell Immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n.1, p.41-53, 2001.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

SILVA, J.A; DAMASCENO, B.P.G.L; SILVA, F.L.H; MADRUGA, M.S; SANTANA, D.P. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Revista Química Nova**, v. 31, n.5, p.1073-1077, 2008.

SILVA, M.F; FORNARI, R.C.G; MAZUTTI, M.A; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F; CICHOSKI, A.J.; CANSIAN, R.L; DI LUCCIO, M; TREICHEL, H. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 119-123, 2009.

SILVEIRA W. B.; PASSOS, F. J.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen level. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 141-209, 2005.

SINGH, N.L; SRIVASTAVA, P; MISHRA, P.K. Studies on ethanol production using immobilized cells of *Kluyveromyces thermotolerans* in a packed bed reactor. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 7, p. 617-623, 2009.

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

STANISZEWSKI M, KUJAWSKI W, LEWANDOWSKA M. Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product - Kinetic model predictions considering glucose repression. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 240-249, 2009.

SWAROOPA, R.A; ANNAPURNA, J; RAMAKRISHNA, S.V. Penicillin production in continuous stirred tank reactor by *Penicillium chrysogenum* immobilized in agar. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 17, p. 119-112, 2003.

VELINGS, N.M e MESTDAGH, M.M. Physico-Chemical properties of alginate gel beads. **Polymers gels and Networks**, v. 3, p. 311-330, 1995.

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

ZAFAR, S.; MOHAMMAD, O.; MOHAMMED, S.; HUSAIN, S. Batch Kinetics and modeling of ethanolic fermentation of whey. **International Journal of Food Science and Technology**, v.40, p. 597-604, 2005.

ZAFAR, S; OWAIS, M. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. **Biochemistry Engineering**, v. 27, p. 295-298, 2006.

ZHANG, W.; FRANCO, C. Characterizing the heterogeneity of an immobilized cell gel matrix. **Engineering in Life Science**, v. 2, p. 409-414, 2002.