

# Produção Inovadora de Etanol e de Ácido Acético a partir de Permeado de Soro de Queijo por Fermentação Sequencial Integrada

## *Innovative Production of Ethanol and Acetic Acid From Cheese Whey Permeate by Integrated Sequential Fermentation*

Keiti Lopes Maestre<sup>1</sup>, Juliana Cristina Chiamenti<sup>1</sup>, Edson Antonio da Silva<sup>1</sup>, Mônica Lady Fiorese<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, PR, Brasil

### Resumo

A matéria-prima secundária do permeado de soro de queijo é rica em lactose e sais minerais. Embora tenha aplicações comerciais restritas, destaca-se pelo elevado potencial como substrato biotecnológico de baixo custo. Este estudo propôs e avaliou um processo inovador de fermentação sequencial, utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* e a bactéria acética *Acetobacter aceti* para produção integrada de etanol e de ácido acético em um único sistema fermentativo. Experimentos foram realizados com diferentes temperaturas (26, 29, 32, 35 e 37 °C) e condições controladas de oxigênio. Os resultados mais promissores foram obtidos a 35 °C e 37 °C, com produção de 5,96 g L<sup>-1</sup> e 4,63 g L<sup>-1</sup> de etanol e de 0,28 g 100 mL<sup>-1</sup> e 0,38 g 100 mL<sup>-1</sup> de ácido acético, respectivamente. A inovação tecnológica demonstrou viabilidade para a produção integrada de ambos os compostos, destacando o potencial de valorização do permeado de soro de queijo. Estudos futuros devem focar no aprimoramento do processo para otimizar a produção e ampliar sua aplicabilidade em larga escala.

**Palavras-chave:** Fermentação Sequencial; Biotecnologia; Etanol; Ácido Acético; Permeado de Soro de Queijo.

**Áreas Tecnológicas:** Propriedade Intelectual. Inovação e Desenvolvimento.

### Abstract

The secondary raw material, cheese whey permeate, is rich in lactose and mineral salts. Although it has limited commercial applications, it stands out for its high potential as a low-cost biotechnological substrate. This study proposed and evaluated an innovative sequential fermentation process using the yeast *Kluyveromyces marxianus* and the acetic bacterium *Acetobacter aceti* for the integrated production of ethanol and acetic acid in a single fermentation system. Experiments were carried out at different temperatures (26, 29, 32, 35 and 37 °C) and controlled oxygen conditions. The most promising results were obtained at 35 °C and 37 °C, with production of 5.96 g L<sup>-1</sup> and 4.63 g L<sup>-1</sup> of ethanol and 0.28 g 100 mL<sup>-1</sup> and 0.38 g 100 mL<sup>-1</sup> of acetic acid, respectively. Technological innovation demonstrated feasibility for the integrated production of both compounds, highlighting the potential for valorization of cheese whey permeate. Future studies should focus on improving the process to optimize production and expand its applicability on a large scale.

**Keywords:** Sequential Fermentation; Biotechnology; Ethanol; Acetic Acid; Cheese Whey Permeate.

## 1 Introdução

As indústrias lácteas produzem grandes volumes de subprodutos e/ou coprodutos, que são frequentemente pesquisados para encontrar aplicações diretas ou desenvolver produtos inovadores com o intuito de agregar valor a esses resíduos. Esse material residual lácteo é rico em proteínas, carboidratos, lipídeos, sais minerais, lactose e vitaminas, mantendo cerca de 55% da composição original do leite (Hadiyanto *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2015). Atualmente, o valor agregado do soro é maximizado principalmente por meio da extração de suas proteínas, com a ultrafiltração sendo o método mais comum para separar e concentrar essas proteínas (Ozturk *et al.*, 2022). Esse processo gera uma matéria-prima secundária, rica em água, sais minerais e altos níveis de lactose. Essa substância é conhecida como permeado de soro de leite, permeado de soro de queijo ou soro de leite desproteínizado (Sooro Ingredientes Ltda., 2024).

A matéria-prima secundária do permeado de soro de queijo é constituída por nutrientes como lactose, minerais e proteína (Moulin; Galzi, 1984; Hu; Dickson, 2015; Sooro Ingredientes Ltda., 2024), vitaminas e outros macro e micronutrientes (Hu; Dickson, 2015; Maestre *et al.*, 2021). O permeado possui uma alta carga orgânica, tornando-se um resíduo extremamente poluente e exigindo investimentos significativos em tratamento pelas empresas que o geram. Na produção de queijo, além do grande volume de soro gerado, o processo de concentração de proteínas resulta em aproximadamente 17 quilogramas de permeado de soro de queijo para cada quilograma de proteína concentrada obtida, o que representa um desafio constante para a indústria (Sooro Ingredientes Ltda., 2024).

Diante desse cenário, estudos e pesquisas estão buscando formas inovadoras para o desenvolvimento de novas tecnologias com o intuito de valorizar as matérias-primas secundárias em processos biotecnológicos. O potencial dos resíduos da indústria de laticínios para aplicações fermentativas tem sido destacado por pesquisadores para diversas finalidades. A pesquisa de Das *et al.* (2016) investigou a produção de etanol a partir de permeado de soro de queijo rico em lactose, utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus*, pois, segundo Das *et al.* (2016), essa levedura metaboliza diretamente a lactose. Os pesquisadores apresentaram que esse processo é extremamente relevante, já que oferece uma fonte alternativa de biocombustível, contribuindo para a redução da poluição e da degradação ambiental.

Maestre *et al.* (2021) publicaram uma pesquisa, “Valorização do permeado de soro de queijo aplicando fermentações sequenciais: estudo de caso realizado na Região Oeste do Paraná”, e nela os autores apresentaram estratégias para uso do permeado de soro em processos

fermentativos, buscando a produção de etanol, biomassa celular probiótica, galacto-oligosacarídeos prebióticos e ácidos orgânicos.

As pesquisas de Gabardo *et al.* (2014) e de Hadiyanto *et al.* (2014) indicam a capacidade de a levedura *K. marxianus* converter a lactose presente no soro em etanol, sem haver a necessidade da etapa processual de hidrólise enzimática da lactose. Esse processo biológico quebra a lactose, um tipo de açúcar encontrado no leite, em seus componentes mais simples, glicose e galactose, e é facilitado devido ao uso de enzimas. Nesse sentido, o produto dessa fermentação ainda pode ser fermentado novamente, adicionando outro microrganismo, no intuito de produzir ácido acético ou vinagre, podendo ter usos diversos na indústria.

No que se refere aos processos tecnológicos, realizou-se uma busca de anterioridade nos bancos de patentes nacionais e internacionais, usando as palavras-chave fermentação mista; processo fermentativo misto; cultura mista; mixed fermentation; mixed fermentation process; mixed culture. Na busca, verificou-se que existem patentes que envolvem processos de fermentação alcoólica ou acética pelos métodos tradicionais, ou seja, realizam os processos produtivos de modo separados e por processos convencionais. Logo, nada consta para os processos empregando os microrganismos citados acima com a mesma aplicação, tendo como diferencial a unificação das etapas de fabricação de fermentado alcoólico e acético durante uma única fermentação, visando a produção de etanol e de ácido acético, além do produto secundário biomassa com características simbiótica (prebiótica e probiótica).

A patente registrada sob o número US 3 888 737, intitulada “Process of producing L-LYSINE using mixed microorganisms”, datada de 10 de junho de 1975, encontra-se expirada, tinha como intuito obter L-lisina com cultivo aeróbico e cultura mista de bactérias que assimilam carbonos a partir de uma mistura de hidrocarbonetos. A invenção empregou somente bactérias fermentativas, diferentemente da presente pesquisa que usou leveduras e bactérias associadas em um mesmo processo. Enquanto a patente nomeada “Mixed cultures for improved fermentation and aerobic stability of silage”, e registrada sob o número US 6 403 084 B1, de 11 de junho de 2002, objetivou empregar cultura mista (hetero fermentação de bactérias produtoras de ácido láctico) em composições para o tratamento de alimentos para animais ou silagem com o intuito de promover a estabilidade aeróbica do produto. Os inventores empregaram bactérias lácticas homofermentativa do tipo *Lactobacillus plantarum* e heterofermentativa do tipo *Lactobacillus buchneri* ou *Lactobacillus brevis* como inoculantes na produção de silagem, essas bactérias são diferentes das empregadas na requerida produção. A patente registrada sob o número WO200053791-A1 de 14/09/2000 “Process for producing etanol” desenvolveu um processo de fermentação alcoólica com rendimento maior aos métodos

convencionais, e, durante sua produção, identificou como produto intermediário o ácido acético. Segundo os inventores o carboidrato milho, após o processo enzimático e durante a fermentação, converte a fonte de carboidrato em ácido láctico, lactato ou misturas destes e ácido acético, pela fermentação homoacética com bactérias do gênero *Clostridium*, da espécie *Clostridium thermoaceticum* ou *Clostridium formicoaceticum*, ou seja, cepas microbianas distintas das usadas no processo em estudo que consiste no uso de leveduras e de bactérias num processo integrado.

Diante dessa realidade, verifica-se que o diferencial dessa inovação são as duas vias fermentativas distintas (alcoólica e acética) desenvolvidas em uma única etapa processual, ou seja, a fermentação ocorre em um único fermentador com as cepas microbianas associadas entre si. Conforme aponta o levantamento científico realizado, não há registros na literatura sobre essa tecnologia. Além disso, a busca de anterioridade revelou que essa inovação não foi patenteada ou protegida por nenhum outro grupo de pesquisadores, por isso, os autores deste artigo realizaram o depósito da patente sob o número BR 10 2020 011157 4, em 3 de junho de 2020 no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

As composições químicas dessas matérias-primas secundárias permitem sua valorização em processos biotecnológicos e bioquímicos, sendo os processos fermentativos para a produção de etanol os mais pesquisados (Gabardo *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2015; Gabardo *et al.*, 2016; Maestre *et al.*, 2021). Além desses bioprodutos, é possível produzir biopolímeros, hidrogênio, metano, proteína unicelular (Yadav *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2015), oligossacarídeos de lactose (Dos Passos *et al.*, 2021), biomassa microbiana probiótica (Trigueiros *et al.*, 2016), fermentado acético e vinagre (Maestre *et al.*, 2021).

A levedura empregada nesta pesquisa, *Kluyveromyces marxianus*, apresenta bom crescimento e, portanto, é vantajoso utilizá-la devido à sua capacidade de suportar altas temperaturas, sendo conhecida como uma levedura termotolerante (Heidtmann *et al.*, 2012). Essa levedura é anaeróbia facultativa e apresenta melhores resultados quando em meio acrescido de oxigênio de forma moderada, logo os fatores aeração e agitação são essenciais para o bom desempenho do seu metabolismo (Hadiyanto *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2015).

No método tradicional de produção de vinagre, após a obtenção do fermentado alcoólico, realiza-se a refermentação do mosto alcoólico com as bactérias acéticas, conhecida como fermentação acética, com o objetivo de converter o etanol em ácido acético. Conforme estabelecido pela legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2024), fermentados acéticos são aqueles produzidos a partir da fermentação acética do fermentado alcoólico com acidez volátil mínima de 4,0

gramas por 100 mililitros, correspondente a 4% de ácido acético. A legislação brasileira define o vinagre, como aquele “[...] produto obtido a partir da fermentação acética do vinho, de acordo com o artigo 24 da Lei n. 7.678/1988” (MAPA, 2024).

A fermentação acética pode ser realizada por diferentes gêneros de bactérias acéticas, sendo os mais comuns *Acetobacter* ou *Gluconobacter* (Embrapa, 2006). Essas bactérias acéticas requerem oxigênio para fermentarem e, predominantemente, se multiplicam na parte superior do meio, formando uma película chamada de mãe do vinagre, e sua espessura varia de acordo com o microrganismo acético utilizado (Palma *et al.*, 2001).

No estudo de Yadav *et al.* (2014), foram investigadas fermentações associadas utilizando cultivos mistos das leveduras *K. marxianus* e *Candida krusei* em soro de leite, com o objetivo de avaliar o potencial de produção de proteína microbiana e a eficiência na remoção da carga orgânica do substrato. Após seis horas de fermentação, constataram uma remoção de 34% da demanda química de oxigênio. Em 24 horas processual, alcançaram uma produtividade máxima de 0,38 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de proteína microbiana, em temperaturas superiores a 40 °C e pH abaixo de 3,5.

Kondo e Kondo (1996) estudaram a produção de ácido acético em cultura mista de *Zymomonas mobilis* e *Acetobacter* sp., empregando a glicose como substrato fermentativo e fonte de carbono para o seu metabolismo. Os cultivos foram realizados com baixa aeração e agitação a 250 rpm, resultando em 45,3 g L<sup>-1</sup> de etanol após 18 horas. De acordo com os estudos desses autores, a melhor condição processual para a produção de ácido acético ocorreu com 800 rpm de agitação e aeração de 1 vvm, obtendo ao final do processo, 60 horas, 62,3 g L<sup>-1</sup> de ácido acético. Os autores destacaram que o controle adequado das condições aeróbicas durante a fase inicial é crucial para a produção eficiente de ácido acético em culturas microbianas mistas.

Casagrande (2010) destaca que é essencial para as indústrias aprimorar os métodos e as técnicas que eliminem os resíduos gerados, convertendo-os em matérias-primas úteis para outros processos de maneira integrada, sustentável e ambientalmente correta. Segundo Paschoaline e Alcarde (2009), a análise do processo fermentativo visa a aprimorar suas etapas, com o objetivo de reduzir os custos industriais e propor melhorias nos processos produtivos. Para alcançar esses objetivos, é crucial identificar as etapas e as interações relevantes ao sistema, descobrir novas estratégias que ajudem a descrever o comportamento do processo sob condições específicas e compreender as características qualitativas importantes dele.

Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma inovação tecnológica sustentável por meio de um processo

fermentativo sequencial associado. A abordagem combina a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* com a bactéria acética *Acetobacter aceti*, utilizando o permeado de soro de queijo como substrato fermentativo. A introdução de oxigênio por agitação orbital permite a produção simultânea de etanol e de ácido acético. Até o momento, não há relatos na literatura sobre o uso combinado desses microrganismos com o permeado como fonte de carbono.

## 2 Metodologia

A parte experimental deste estudo foi conduzida de forma a integrar etapas de fermentação alcoólica e acética utilizando o permeado de soro de queijo como substrato. As condições de cultivo, a seleção das cepas e a caracterização dos processos estão detalhadas a seguir.

### 2.1 Microrganismos Fermentativos

As fermentações foram conduzidas com a levedura *Kluyveromyces marxianus* (CCT 4086, referência ATCC 46537) e a bactéria acética *Acetobacter aceti* (CCT 2565, referência ATCC 15973). Ambas as cepas foram adquiridas liofilizadas da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello. Os meios de cultivo utilizados foram YMA (*Yeast Malt Extract Agar*) para a levedura e MA (Manitol Ágar) para a bactéria, esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

### 2.2 Processos Fermentativos

Os processos fermentativos sequenciais associados foram compostos de fermentação alcoólica (*K. marxianus*) e de fermentação acética (*A. aceti*), realizadas ao mesmo tempo num reator de vidro com volume útil de 3 L, com a inclusão de oxigênio por agitação orbital a 120 rpm. A tampa dos reatores possui dois orifícios na parte superior, um para coleta de amostra e outro para a redução da pressão provocada pelo processo. Os reatores foram previamente esterilizados a 65 °C por 30 minutos em estufa bacteriológica (New lab, modelo NL-81-42). Os meios de cultivos possuem um volume final de 2 L e meio a fermentar, este foi composto de 100 g L<sup>-1</sup> de permeado, e isso equivalente a 88 g L<sup>-1</sup> de lactose esterilizando em estufa bacteriológica (New lab, modelo NL-81-42), suplementados com sais autoclavados a 121 °C por 15 minutos (autoclave Prismatec, modelo CS-30) contendo ureia (6 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (1,5 g L<sup>-1</sup>), fosfato monobásico de potássio (1,5 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (6 g L<sup>-1</sup>) a formulação do meio e as condições processuais foram baseados em estudos de Maestre (2017) e Maestre *et al.* (2021). O pH foi fixado em 4,5, e a temperatura de cada ensaio fermentativo encontra-se na Tabela 1.

**Tabela 1** – Temperaturas utilizadas nas fermentações associadas

| ENSAIO | TEMPERATURA (°C) |
|--------|------------------|
| 1      | 26               |
| 2      | 29               |
| 3      | 32               |
| 4      | 35               |
| 5      | 37               |

Fonte: Elaborada pelos autores deste artigo (2024)

Cada reator recebeu um inóculo composto de 100 g L<sup>-1</sup> de permeado esterelizado, e ureia (6 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (1,5 g L<sup>-1</sup>), fosfato monobásico de potássio (1,5 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (6 g L<sup>-1</sup>) autoclavados, correspondente a 5% do volume total do meio, ou seja, 100 mL de cada inóculo, resultando em um total de 10% de inóculo misto (levedura + bactéria) no reator. Todos os ensaios foram em duplicata e incubados de acordo com a respectiva temperatura e fermentados por 43 horas.

### 2.3 Caracterização dos Processos Fermentativos

A densidade óptica das amostras de fermentado foi medida utilizando um espectrofotômetro UV-VIS da marca Shimadzu (modelo 1800) em comprimento de onda de 600 nm. A curva de crescimento microbiano foi gerada com base na densidade óptica, expressa na forma logarítmica Ln(DO/DO<sub>0</sub>), em que DO<sub>0</sub> representa a leitura da densidade óptica no tempo inicial e DO, a leitura da densidade óptica no tempo t, conforme descrito por Müller *et al.* (2016) e Trigueiros *et al.* (2016). E a biomassa microbiana foi quantificada pela metodologia de Trigueiros *et al.* (2016).

O etanol e o consumo de lactose foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo Shimadzu® Proeminence equipado com coluna Aminex® HP-87 Biorad (300 mm x 7,8 mm), forno CTO-20A mantido a 64 °C, bomba LC-20AT, controlador CBM-20<sup>a</sup> e detector por índice de refração RID-10<sup>a</sup>. Já a quantificação do ácido acético foi realizada com um detector UV SPD-20A, dotado de arranjo de diodos, operando a 208 nm. O rendimento do ácido acético foi calculado a partir da resposta do teor do produto.

## 3 Resultados e Discussão

Os resultados referentes aos processos fermentativos associados estão apresentados na Tabela 2, em termos de biomassa celular mista, etanol, ácido acético e rendimento em ácido acético. Na sequência, a Figura 1 (a até e)

explicam o comportamento cinético dos ensaios associados de *K. marxianus* e de *A. aceti*.

Na sequência, as imagens da Figura 1 e a Tabela 2 indicam que o ensaio 4, realizado a 35 °C, obteve a maior produção de etanol, com uma concentração de 5,96 g L<sup>-1</sup>, e a segunda maior concentração de ácido acético, de 0,28 g 100 mL<sup>-1</sup>, após 43 horas de fermentação associada. O rendimento em ácido acético foi de 98,38%, representando o segundo melhor resultado em termos de rendimento. Por outro lado, o ensaio 5 produziu 4,63 g L<sup>-1</sup> de etanol e 0,38 g 100 mL<sup>-1</sup> de ácido acético, sendo a maior concentração de ácido acético e o maior rendimento observado, de 39,55%. O ensaio 2, conduzido a 29 °C, apresentou a menor concentração de ácido acético, de 0,06 g L<sup>-1</sup>, possivelmente essa temperatura desfavoreceu o crescimento e o metabolismo das cepas microbianas, resultando em menor produção de biomassa e, consequentemente, em um menor rendimento de ácido acético, fatores como uma taxa de oxigenação insuficiente, uma possível competição metabólica ou uma inibição cruzada também podem ter contribuído para esse resultado.

Os ensaios 1, 2 e 3 (Tabela 2) demonstraram que essas condições processuais utilizadas nas fermentações associadas não foram favoráveis para a produção de biomassa em comparação com a fermentação alcoólica tradicional para o substrato aqui estudado (Maestre *et al.*, 2021). Contudo, para a produção de etanol e, consequentemente, para a produção também de ácido acético, é essencial uma alta produção de células tanto de levedura quanto de bactérias acéticas.

Na Figura 1, observa-se que no ensaio 4 (35 °C), a partir de 15 horas de processo, a velocidade de produção de etanol aumenta, enquanto a produção de ácido acético diminui até o final do processo (43 horas). Isso pode ser atribuído ao consumo de etanol pelas bactérias acéticas, sem que haja uma oxidação completa do etanol para ácido acético, podendo produzir por essa via metabólica outros compostos voláteis. A Figura 1 mostra o ensaio realizado a 37 °C (ensaio 5), o etanol continua sendo produzido de forma exponencial até 43 horas, e a formação de ácido acético começa a ser aumentada a partir desse ponto. A inclinação da curva indica um comportamento também propenso a um aumento exponencial.

Fermentações mistas foram estudadas por outros pesquisadores, porém não com as cepas microbianas e fonte de carbono aqui investigadas. Wang *et al.* (2013) conduziram uma fermentação utilizando uma cultura mista de *Saccharomyces cerevisiae* e *Acetobacter pasteurianus* em um meio de cultivo com glicose como fonte de carbono. O processo foi iniciado com 4% de etanol e 90 g L<sup>-1</sup> de glicose, sob temperatura de 32 °C e taxa de aeração de 0,2

vvm. Os volumes de inóculo utilizados foram 16% para *A. pasteurianus* e 0,06% para *S. cerevisiae*. Durante o processo, o mosto foi suplementado com 120 g L<sup>-1</sup> de glicose após 20 e 40 horas de fermentação. O rendimento médio de ácido acético obtido foi de 66,0 g L<sup>-1</sup>, valor inferior ao obtido na presente pesquisa.

Embora Wang *et al.* (2013) tenham utilizado um monossacarídeo diretamente assimilável, a glicose, como fonte de carbono, o presente estudo obteve resultados superiores em rendimento de ácido acético (% v/v). Ressalta-se que a glicose não necessita de enzimas adicionais para sua quebra e utilização pelos microrganismos. Em contraste, a lactose, um dissacarídeo, exige que a levedura *K. marxianus* produza inicialmente a enzima  $\beta$ -galactosidase para degradar a lactose em glicose e galactose. A glicose é consumida preferencialmente, e, após seu esgotamento, a fase exponencial desacelera antes de retomar com o consumo da galactose, a nova fonte de carbono.

Apesar de as condições experimentais serem distintas entre a presente pesquisa e o estudo de Wang *et al.* (2013), acredita-se que alguns fatores utilizados pelos autores poderiam ter favorecido os ensaios realizados. Esses fatores seriam uma maior concentração de etanol presente no início da fermentação, maior volume de inóculo, aeração do meio (O), além de alimentação em fonte de carbono no decorrer do processo.

Wang *et al.* (2013) identificaram que o emprego de culturas mistas apresenta vantagens como a redução do tempo de fermentação, a minimização de perdas no processo e o aumento da produção de ácido acético. Logo, esse tempo economizado poderia ser utilizado para prolongar o processo, realizar outros processos em batelada ou no caso de aplicações industriais promover a renovação de ciclos fermentativos, com o propósito de aumentar a produção tanto de etanol quanto de ácido acético. Também é importante destacar que o fator temperatura, que foi o parâmetro avaliado nesta pesquisa para a formação do ácido acético, não deve ser desconsiderado.

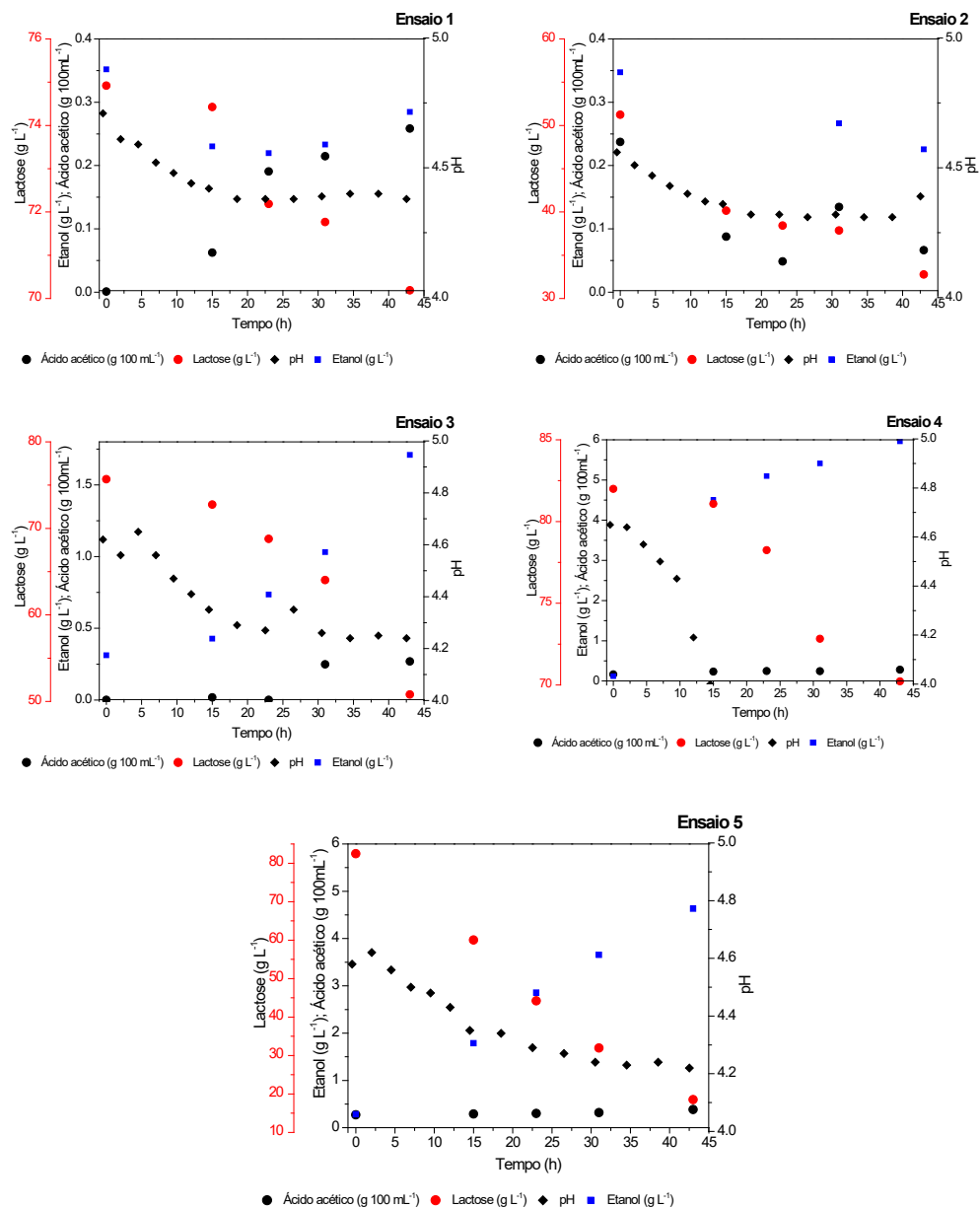
As reações devem ocorrer sob condições processuais ideais, que incluem pH, temperatura, agitação, aeração, concentração e tipo de substrato. Esse substrato pode ser uma fonte açucarada proveniente de frutas, cereais, vegetais, mel, misturas de vegetais, xaropes, vinhos, subprodutos ou coprodutos industriais, entre outras matérias-primas. É essencial minimizar os interferentes no processo para garantir a multiplicação e o crescimento celular, e, assim, obter os produtos desejáveis (Palma *et al.*, 2001; Gava; Silva; Frias, 2008; Hadiyanto *et al.*, 2014).

**Tabela 2** – Resultados para a cinética dos processos fermentativos associados em 43 horas

| ENSAIO | TEMPERATURA (°C) | BIOMASSA (g L <sup>-1</sup> ) | ETANOL (g L <sup>-1</sup> ) | ÁCIDO ACÉTICO (g 100 mL <sup>-1</sup> ) | RENDIMENTO EM ÁCIDO ACÉTICO (%) |
|--------|------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|
| 1      | 26               | 0,51±0,01                     | 0,28±0,04                   | 0,26±0,12                               | 70,18±0,04                      |
| 2      | 29               | 0,42±0,10                     | 0,23±0,01                   | 0,06±0,07                               | 49,29±0,03                      |
| 3      | 32               | 0,78±0,05                     | 1,71±0,11                   | 0,27±0,08                               | 85,83±0,05                      |
| 4      | 35               | 1,43±0,07                     | 5,96±0,01                   | 0,28±0,05                               | 98,37±0,11                      |
| 5      | 37               | 2,17±0,13                     | 4,63±0,09                   | 0,38±0,04                               | 39,55±0,01                      |

Fonte: Elaborada pelos autores deste artigo (2024)

**Figura 1** – Cinética do processo fermentativo associado para os ensaios (1), (2), (3), (4) e (5)



Fonte: Elaborada pelos autores deste artigo (2024)

Para Palma *et al.* (2001) e Parrondo *et al.* (2003), a fermentação acética é um processo oxidativo realizado por bactérias estritamente aeróbias, ou seja, que necessitam da presença de oxigênio. Nesta pesquisa, apesar da incorporação de oxigênio por meio de agitação, a quantidade fornecida pode ter sido insuficiente, o que pode ter resultado na baixa formação de ácido acético observada.

Conforme mencionado por Hadiyanto *et al.* (2014), a temperatura desempenha um papel fundamental como variável que afeta significativamente a produção de etanol, o que foi confirmado na presente pesquisa. Ressalta-se que, para se obter bons rendimentos de etanol, as temperaturas não devem ser muito elevadas, pois isso pode causar a evaporação do etanol e afetar as fermentações paralelas que produzem compostos secundários. Por outro lado, temperaturas muito baixas resultam em baixa produção de etanol. Os melhores resultados foram observados nos ensaios 4 e 5 (Figura 1), realizados a 35 °C e 37 °C, respectivamente, que favoreceram o crescimento da levedura *K. marxianus* (termotolerante) e da bactéria *A. aceti*.

Observou-se que em todos os ensaios fermentativos associados houve formação de ácido acético, embora em concentrações que possam ser aumentadas. Isso pode ter sido influenciado pelo método de inserção de oxigênio por agitação orbital, que pode ter facilitado a movimentação do fermentado, promovendo a evaporação do etanol e/ou inibindo a produção de ácido acético devido à ruptura do véu formado pelas bactérias acéticas. Durante as fermentações, notou-se uma alta produção de gás, mesmo com alívio de pressão no reator, o que sugere perdas por evaporação do etanol, um composto volátil.

No que se refere ao desenvolvimento tecnológico aqui apresentado, destaca-se que os processos tradicionais para a produção de ácido acético, ácido acético fermentado ou produto acético requerem convencionalmente duas fermentações distintas: uma alcoólica e outra acética. A inovação consiste em promover o processo fermentativo em um único fermentador e durante o mesmo tempo. Em vez de conduzir uma fermentação para a produção de etanol e outra subsequente para a conversão desse etanol em ácido acético, o novo método permite a produção simultânea de etanol e de ácido acético. O processo tem início com a fermentação para a geração de etanol. Após alcançar uma quantidade suficiente desse composto, introduz-se um microrganismo capaz de convertê-lo em ácido acético, iniciando, assim, sua produção. Além disso, dependendo do objetivo do bioprocesso, é possível direcionar a conversão para a obtenção de outros ácidos orgânicos.

Em comparação com os métodos atualmente disponíveis na indústria, o novo sistema de produção de ácido acético proposto busca implementar um processo inovador que se diferencia dos sistemas convencionais pela redução dos custos e do tempo de operação. Além disso, não

há documentação pública que permita inferir essa solução específica, que também contempla a produção simultânea de etanol e de ácido acético (fermentado acético ou produto acético). O processo ainda gera, como subproduto, biomassa com características simbióticas, incluindo propriedades prebióticas e probióticas.

A biomassa microbiana proteica formada como produto secundário nessa fermentação associada pode ser denominada simbiótica devido às suas propriedades prebióticas e probióticas. Trata-se de uma proteína unicelular alimentar obtida a partir de fontes de proteína não convencionais, e que pode ser utilizada como alimento para humanos ou animais. É importante destacar que os prebióticos estimulam o crescimento de bactérias benéficas no organismo, promovendo melhorias no sistema imunológico. Por outro lado, os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em concentrações adequadas, oferecem benefícios à saúde do hospedeiro (Maestre *et al.*, 2021).

O desenvolvimento tecnológico impacta a sociedade do ponto de vista econômico, ambiental e social. Assim, com relação às questões econômicas, o presente processo impacta na sociedade quando se refere à redução de custos operacionais e processuais, à diminuição dos períodos ociosos na produção, como os relacionados à carga e a descarga dos reatores, e à lavagem e secagem dos equipamentos entre as etapas de fermentação, assim como a minimização dos problemas decorrentes de dois processos sequenciais e a melhoria no tempo de processamento resultarão em um aumento dos lucros. Isso ocorre porque os produtos de interesse mencionados já têm uma aplicação consolidada no mercado global.

Os aspectos ambientais são influenciados pela eliminação de uma etapa fermentativa, além de a produção de resíduos sólidos, líquidos e gasosos ser reduzida para tornar mínimo os impactos ambientais e os custos associados ao tratamento desses resíduos. Isso promove a qualidade de vida, preserva os recursos naturais para as futuras gerações e busca alternativas viáveis e seguras para práticas de produção sustentáveis e conscientes, sem comprometer o meio ambiente.

Por fim, no âmbito social, a aprimoração dos processos impacta na geração de empregos devido à criação de empregos diretos e indiretos, desde a operação das instalações até a manutenção e o transporte, além de fomentar o desenvolvimento comunitário, destaca-se a importância de impulsionar a criação de infraestruturas locais, como estradas, serviços de saúde e educação. A saúde também é influenciada por contribuir para a produção de alimentos e de bebidas que têm benefícios para a saúde, como os probióticos ou os prebióticos, que promovem a saúde digestiva, atuando também na segurança alimentar ou, ainda, na seguridade do alimento.

E o desenvolvimento econômico, em detrimento da presença de instalações de fermentação, pode estimular a economia local ao aumentar a demanda por matérias-primas e serviços, beneficiando fornecedores e empresas locais.

## 4 Considerações Finais

O objetivo deste estudo foi desenvolver um processo fermentativo sequencial combinado que integra a levedura termotolerante *K. marxianus* com a bactéria acética *A. aceti*, utilizando o permeado de soro de queijo como substrato fermentativo. O intuito foi estabelecer um processo sustentável e ambientalmente correto para a produção simultânea de etanol e de ácido acético, preenchendo uma lacuna na área de processos microbianos associados na literatura.

Os resultados indicam a necessidade de testar diferentes condições experimentais e métodos de produção para atingir um teor de ácido acético igual ou superior a 4%, conforme exigido pela legislação brasileira para a classificação do fermentado acético como vinagre. Recomenda-se, portanto, a realização de ensaios fermentativos iniciais utilizando apenas a cepa de levedura para promover a produção de etanol antes da introdução da bactéria acética. Essa abordagem pode potencialmente melhorar a conversão de etanol em ácido acético de forma a atender o que é previsto na legislação.

Observou-se que, no ensaio com a maior produção de ácido acético, o ácido continuava a ser liberado no meio reacional até o final do processo, após 43 horas. Isso sugere que um prolongamento da fermentação poderia ter aumentado a quantidade de ácido acético produzido.

No geral, mesmo que os resultados não tenham sido altamente expressivos, o estudo demonstra o potencial do permeado de soro de queijo como um substrato de valor agregado para a indústria láctea, promovendo a redução dos custos de tratamento desse resíduo. Adicionalmente, a combinação das etapas de fermentação alcoólica e acética em um único processo, junto com a produção de biomassa com características simbióticas (prebiótica e probiótica) em um único fermentador, representa uma abordagem inovadora e promissora para processos fermentativos integrados.

## 5 Perspectivas Futuras

Com base nos resultados obtidos, diversas direções de pesquisa e de desenvolvimento são sugeridas para o aprimoramento do processo fermentativo sequencial utilizando *Kluyveromyces marxianus* e *Acetobacter aceti* com permeado de soro de queijo. Essas perspectivas visam a superar as limitações observadas, otimizar a eficiência

do processo e expandir suas aplicações em contextos industriais e sustentáveis.

### 1) Otimização das condições experimentais.

Estudos futuros devem explorar variações nos parâmetros operacionais, como pH, temperatura, agitação e aeração, com o objetivo de identificar as condições ideais que maximizem a produção de etanol e de ácido acético. Além disso, é fundamental avaliar a influência desses fatores na taxa de conversão e no rendimento global dos produtos.

### 2) Prolongamento da fermentação.

A continuidade da produção de ácido acético até 43 horas sugere a possibilidade de prolongar o tempo de fermentação. Ensaios adicionais devem investigar o impacto do aumento do tempo de processo no rendimento final de ácido acético, buscando maximizar sua concentração.

### 3) Uso de substratos alternativos.

A incorporação de fontes alternativas de substrato de baixo custo, em combinação com o permeado de soro de queijo, pode trazer benefícios econômicos e ambientais. Estudos devem focar na análise das concentrações e das interações desses substratos, avaliando sua contribuição para a viabilidade do processo.

### 4) Caracterização da biomassa simbiótica.

A biomassa simbiótica gerada merece uma caracterização detalhada, especialmente no que diz respeito às suas propriedades prebióticas e probióticas. Esses estudos podem abrir caminhos para o uso dessa biomassa como ingrediente alimentar ou suplemento, ampliando as aplicações do processo para diferentes setores industriais.

### 5) Escalonamento e viabilidade industrial.

A integração das etapas de fermentação alcoólica e acética em um único fermentador representa uma abordagem inovadora. No entanto, testes em escalas maiores são essenciais para avaliar a viabilidade técnica e econômica do processo em condições industriais, permitindo sua eventual implementação em larga escala.

### 6) Avaliação de impactos ambientais e econômicos.

É importante realizar uma análise abrangente dos impactos ambientais e econômicos do processo proposto. Isso inclui a redução dos custos associados ao tratamento de resíduos e a sustentabilidade geral do uso de permeado de soro de queijo como substrato. Tais avaliações ajudarão a validar os benefícios desse processo no contexto da economia circular.

Por fim, essas direções futuras têm o potencial de resolver limitações existentes e promover práticas mais eficientes e sustentáveis na produção de ácido acético e de etanol. A implementação das melhorias sugeridas pode

impulsionar a adoção do processo em diferentes setores, contribuindo para uma produção industrial mais inovadora e alinhada às demandas ambientais.

## Referências

- CASAGRANDE, Luiz Fernando. Avaliação de desempenho e sustentabilidade na suinocultura. **CAP Accounting and Management**, v. 1, n. 1, p. 68-76, 2010.
- CHAN, Russell Kuo-fu *et al.* (Inventores). **Mixed cultures for improved fermentation and aerobic stability of silage**. Estados Unidos US, 6403084-B1, 2002.
- DAS, Bipasha *et al.* Studies on production of ethanol from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, n. 10, p. 3253-3257, 2016.
- DOS PASSOS, Fernanda Rengel *et al.* Production of a synbiotic composed of galacto-oligosaccharides and *Saccharomyces boulardii* using enzymatic-fermentative method. **Food Chemistry**, v. 353, p. 129486, 2021.
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema de Produção de Vinagres**. [S.l.]: Embrapa, 2006.
- FERREIRA, Priscila Gonçalves *et al.* Optimizing ethanol production by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 in a mixture of sugarcane bagasse and ricotta whey. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, p. 1421-1427, 2015.
- GABARDO, Sabrina *et al.* Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89-96, 2014.
- GABARDO, Sabrina *et al.* Dynamics of yeast immobilized-cell fluidized-bed bioreactors systems in ethanol fermentation from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 141-150, 2016.
- GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. [S.l.]: Brasil Franchising Participações S.A. 2008. 511p.
- HADIYANTO, Dessy *et al.* Optimization of ethanol production from whey through fed-batch fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. **Energy Procedia**, v. 47, p. 108-112, 2014.
- HEIDTMANN, Renata Bemvenuti *et al.* Caracterização cinética e termodinâmica de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 41-49, 2012.
- HU, Kang; DICKSON, James (ed.). **Membrane processing for dairy ingredient separation**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2015.
- KONDO, Tetsuya; KONDO, Masao. Efficient production of acetic acid from glucose in a mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Acetobacter* sp. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 1, p. 42-46, 1996.
- MAESTRE, Keiti Lopes *et al.* (Inventores). **Tecnologia de Fabricação de Fermentado Alcoólico e Ácido Acético com Cultura Mista em um Único Processo Fermentativo**. Brasil BR, 102020011157-4. 2020.
- MAESTRE, Keiti Lopes *et al.* Cheese whey permeate valorization using sequential fermentations: case study performed in the Western Region of Paraná. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e212101321082-e212101321082, 2021.
- MAESTRE, Keiti Lopes. **Estudo de condições de fermentação alcoólica e acética utilizando subproduto lácteo e diferentes leveduras**. 2017. 139p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, PR, 2017.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Anexo à Instrução Normativa DAS/MAPA n. 140/2024. **Cartilha de Bebidas**. Consolidação das Normas de Bebidas, Fermentado Acético, Vinho e Derivados da Uva e do Vinho. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2024.
- MOULIN, G.; GALZY, P. Whey, a potential substrate for biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 1, n. 1, p. 347-374, 1984.
- MÜLLER, José Luis *et al.* **Cultivo de *Saccharomyces boulardii* em Biorreator Air-Lift e em Frascos Agitados Mecanicamente**. 2006. 92p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 2006.
- OZTURK, Gulustan *et al.* Glycoproteomic and lipidomic characterization of industrially produced whey protein phospholipid concentrate with emphasis on antimicrobial xanthine oxidase, oxylipins and small milk fat globules. **Journal Dairy**, v. 3, p. 277-302, 2022.
- PALMA, M. S. A. *et al.* **Biotechnologia industrial: Biotechnologia da Produção de Alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2001. v. 4.
- PARASHAR, Archana *et al.* Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1.859-1.867, 2016.

PARRONDO, Javier *et al.* A note-production of vinegar from whey. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, n. 4, p. 356-358, 2003.

PASCHOALINI, Glaucé; ALCARDE, Valmir Eduardo. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 32, p. 59-68, 2009.

SOORO INGREDIENTES LTDA. **Ficha técnica permeado de soro em pó**. 2024. (Ficha técnica impressa que acompanha a matéria-prima).

TRIGUEIROS, D. E. G. *et al.* Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 110, p. 71-83, 2016.

WANG, Zhi *et al.* Mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus* for acetic acid production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 79, p. 41-45, 2013.

WATANABE, Kiyoshi *et al.* (inventores). **Process of producing l-lysine using mixed microorganism**. Estados Unidos, US 3888737. 1975.

YADAV, Jay Shankar Singh *et al.* Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756-774, 2015.

YADAV, Jay Shankar Singh *et al.* Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 119-127, 2014.

## Sobre os Autores

---

### Keiti Lopes Maestre

*E-mail:* keiti\_maestre@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5759-4597>

Doutora em Engenharia Química pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná em 2020.

Endereço profissional: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Guaíra, n. 3.141, Toledo, PR. CEP: 85903-000.

---

### Juliana Cristina Chiamenti

*E-mail:* juli\_cristinac@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-1548-5463>

Especialista em Gestão de Projetos pela Centro Universitário Univel em 2022.

Endereço profissional: Itaipu Parquetec, Av. Tancredo Neves, n. 6.731, Foz do Iguaçu, PR. CEP: 85867-900.

---

### Edson Antonio da Silva

*E-mail:* edsondeq@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3978-5346>

Doutor em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas em 2001.

Endereço profissional: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Guaíra, n. 3.141, Toledo, PR. CEP: 85903-000.

---

### Mônica Lady Fiorese

*E-mail:* mlfiorese@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5250-7178>

Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal de Santa Catarina em 2008.

Endereço profissional: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Guaíra, n. 3.141, Toledo, PR. CEP: 85903-000.