

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MARIA FERNANDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO
PERMEADO HIDROLISADO DO SORO DE LEITE**

TOLEDO

2025

MARIA FERNANDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO
PERMEADO HIDROLISADO DO SORO DE LEITE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Priscila Vaz de Arruda.

TOLEDO

2025



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

MARIA FERNANDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO
PERMEADO HIDROLISADO DO SORO DE LEITE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Priscila Vaz de Arruda.

Data de aprovação: 15 de julho de 2025

Priscila Vaz de Arruda
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Cleverson Busso
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Paulo André Cremonez
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

TOLEDO

2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me dar forças, sabedoria e saúde para superar os desafios ao longo desta caminhada.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Priscila Vaz de Arruda, por todo o apoio, dedicação, carinho e paciência. Seus ensinamentos foram essenciais para a minha formação.

Ao meu namorado, João Vitor, pelo apoio, amor, paciência e incentivo, que sempre me motivaram a continuar.

À minha mãe, pelo apoio, carinho e por sempre acreditar em mim. À minha querida irmã, pelo companheirismo e afeto. Ao meu pai, que não está mais presente fisicamente, mas deixou um exemplo a ser seguido e motivação para conquistar os meus objetivos.

Ao meu amigo Cleiton, pela amizade, parceria e por tornar a rotina do laboratório mais leve.

Aos familiares e amigos, que sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial.

Ao corpo docente e à coordenação do curso, pela cooperação.

À UTFPR, pela infraestrutura dos laboratórios.

E à empresa Sooro Renner Nutrição S/A, por fornecer o permeado de soro de leite.

RESUMO

Os probióticos, são microrganismos vivos que trazem benefícios à saúde do hospedeiro, têm um papel essencial na manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal. Entre eles, a levedura *Saccharomyces boulardii*, uma subespécie da *Saccharomyces cerevisiae*, se sobressai, sendo amplamente pesquisada por suas características probióticas. Essa levedura tem se revelado eficiente no tratamento e na prevenção de problemas gastrointestinais, como diarreias relacionadas ao uso de antibióticos, infecções por *Clostridium difficile* e doenças inflamatórias intestinais. Como alternativa para seu cultivo em meios convencionais, estudos têm demonstrado o uso do permeado de soro de leite como substrato promissor, oferecendo uma opção sustentável e de baixo custo, além de agregar valor a um subproduto da indústria de laticínios. O permeado do soro do leite, é rico em lactose e sais minerais, mas apresenta elevado impacto ambiental quando descartado inadequadamente. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o cultivo de *S. boulardii* utilizando o permeado do soro de leite como substrato, por meio da avaliação de diferentes condições de hidrólise enzimática da lactose e do subsequente processo fermentativo. Na etapa de hidrólise da lactose, foram testadas diferentes concentrações da enzima β -galactosidase (Saphera® 2600 L) e temperaturas de processo, com base em um planejamento fatorial 2^2 , visando-se otimizar o processo. De acordo com os resultados, a melhor condição foi observada à 35 °C e 0,15% (p/v) de enzima, com conversão de 31,9% da lactose e liberação de 50,9 g L⁻¹ de glicose. Essa condição foi utilizada na hidrólise do permeado, o qual serviu como meio de cultivo para a levedura, resultando em concentração final de biomassa celular de 6,81 g L⁻¹ após 30 horas de fermentação. Ao final do processo, observou-se os seguintes parâmetros fermentativos: produtividade em biomassa (Q_x) de 0,223 g L⁻¹. h⁻¹, fator de conversão substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) de 0,140 g. g⁻¹ e velocidade específica de crescimento (μ_{max}) de 0,321 h⁻¹. Os resultados obtidos confirmam a viabilidade do uso do permeado como substrato alternativo, de baixo custo e com potencial para valorização de resíduos agroindustriais, evidenciando seu aproveitamento sustentável para a produção de biomassa probiótica.

Palavras-chave: probiótico; biomassa celular; hidrólise enzimática; permeado lácteo.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that provide health benefits to the host and play an essential role in maintaining the balance of the intestinal microbiota. Among them, the yeast *Saccharomyces boulardii*, a subspecies of *Saccharomyces cerevisiae*, stands out and has been widely studied for its probiotic characteristics. This yeast has proven effective in the treatment and prevention of gastrointestinal disorders, such as antibiotic-associated diarrhea, *Clostridium difficile* infections, and inflammatory bowel diseases. As an alternative to conventional cultivation media, studies have demonstrated the use of whey permeate as a promising substrate, offering a sustainable and low-cost option, in addition to adding value to a by-product of the dairy industry. Whey permeate is rich in lactose and mineral salts but poses a significant environmental impact when improperly discarded. In this context, this study aimed to evaluate the cultivation of *S. boulardii* using whey permeate as a substrate, through the assessment of different enzymatic hydrolysis conditions of lactose and the subsequent fermentation process. In the lactose hydrolysis step, different concentrations of the enzyme β -galactosidase (Saphera® 2600 L) and processing temperatures were tested, based on a 2^2 factorial design, with the goal of optimizing the process. According to the results, the best condition was observed at 35 °C and 0.15% (w/v) enzyme concentration, with 31.9% lactose conversion and the release of 50.9 g L⁻¹ of glucose. This condition was used for the hydrolysis of the permeate, which then served as the cultivation medium for the yeast, resulting in a final biomass concentration of 6.81 g L⁻¹ after 30 hours of fermentation. At the end of the process, the following fermentation parameters were observed: biomass productivity (QX) of 0.223 g L⁻¹·h⁻¹, substrate-to-biomass conversion factor (YX/S) of 0.140 g·g⁻¹, and maximum specific growth rate (μ_{max}) of 0.321 h⁻¹. The results confirm the feasibility of using whey permeate as an alternative and low-cost substrate with potential for agro-industrial waste valorization, highlighting its sustainable use for probiotic biomass production..

Keywords: probiotic; cell biomass; enzymatic hydrolysis; whey permeate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de ultrafiltração tangencial de soro de leite para separação de proteína e gordura do permeado.....	15
Figura 2 - Microscopia eletrônica da levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	17
Figura 3 - Hidrólise enzimática da lactose	19
Figura 4 - Imagem do sistema de cultivo empregado nos experimentos.....	23
Figura 5- Gráfico Q-Q resíduos.....	28
Figura 6- Gráfico de superfície da lactose hidrolisada em função da temperatura e da concentração de enzima.....	29
Figura 7 - Curva de massa seca fermentação	31
Figura 8 - Concentração de biomassa e glicose no processo fermentativo de <i>S. boulardii</i>	32
Figura 9 - Meio de cultivo no tempo 0 horas (A) e 30 horas (B).....	33
Figura 10 - Variação do pH durante o processo fermentativo.....	33
.....	33
Figura 11 - Cálculo da velocidade específica máxima do microrganismo <i>S. boulardii</i> durante o processo de cultivo por 30h.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição típica do soro de leite doce e ácido	14
Tabela 2 - Composição média do permeado do soro de leite.....	16
Tabela 3 – Matriz do planejamento 2 ²	22
Tabela 4 – Resultado do planejamento experimental 2 ²	26
Tabela 5 – Efeitos do planejamento experimental	28
Tabela 6 – Análise da variância do modelo linear	29
Tabela 7 – Variação do pH, concentração de biomassa celular (g L ⁻¹) e concentração de glicose (g L ⁻¹) durante 30 horas de cultivo de <i>S. boulardii</i> em meio contendo permeado do soro de leite hidrolisado como substrato.....	30
Tabela 8 - Parâmetros fermentativos obtidos durante o cultivo de <i>S.</i> <i>boulardii</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina trifosfato

DBO - Demanda de oxigênio biológico

DNS - Ácido 3-5 dinitrosalicílico

DQO - Demanda química de oxigênio

GOS - Galactooligossacarídeos

h- horas

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

IQVIA PMB - Pharmaceutical Market Brazil

MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária

nm – Nanômetro

Q_x – Produtividade em biomassa

rpm - Rotações por minuto

UNAL - Universidade Nacional da Colômbia

UV-Vis - Ultravioleta-visível

μL – Microlitro

$\mu\text{x}_{\text{máx}}$ - Velocidade específica de crescimento

YEPD - Yeast Extract-Peptide-Dextrose

$Y_{x/s}$ – Conversão de substrato em biomassa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivos específicos.....	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 Leite e soro do leite.....	13
3.2 Permeado do soro de leite.....	15
3.3 <i>Saccharomyces boulardii</i>	16
3.3.1 Fatores que influenciam o crescimento celular	18
3.5 Hidrólise da lactose.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Permeado do Soro de Leite	21
4.2 Microrganismo.....	21
4.3 Ativação celular	21
4.4 Hidrólise enzimática do permeado.....	21
4.5 Preparo do microrganismo.....	22
4.6 Processo fermentativo	23
4.7 Métodos analíticos	24
4.7.1 Determinação da concentração de biomassa	24
4.7.2 Determinação de glicose.....	24
4.7.3 Determinação do pH	24
4.7.4 Parâmetros fermentativos	24
4.7.5 Análises estatísticas	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Hidrólise enzimática.....	26
5.2 Processo fermentativo	30
5.2.1 Cinética de fermentação	31
5.2.2 Parâmetros fermentativos	34
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO A - CURVA MASSA SECA DO MICRORGANISMO	42
ANEXO B - KIT GLICOSE PP (GOLD ANALISA) REF 434	43
ANEXO C - FICHA TÉCNICA COMPOSIÇÃO DO PERMEADO DO SORO DE LEITE	44

1 INTRODUÇÃO

O termo “probiótico”, de origem grega e com significado “para a vida”, refere-se a microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal (Sturmer *et al.*, 2012; Wendling & Weschenfer, 2013). Esses microrganismos estão presentes em alimentos fermentados, como iogurte, kefir e kombucha, ou na forma de suplementos. As principais espécies probióticas incluem bactérias ácido-láticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Lactococcus*, além de bactérias não ácido-láticas, como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Propionibacterium freudenreichii*, e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* (Sturmer *et al.*, 2012).

O consumo de probióticos está associado a diversos benefícios à saúde, como o controle de infecções intestinais, melhora na absorção de nutrientes, estímulo da motilidade intestinal e fortalecimento da resposta imune (Sturmer *et al.*, 2012; Wendling & Weschenfer, 2013). No Brasil, o mercado de probióticos vem crescendo, com aumento de 22,1% nas vendas entre fevereiro de 2023 e fevereiro de 2024 e projeção de crescimento anual de 11% até 2029 (Portal E-Food, 2024). No entanto, a produção comercial ainda enfrenta desafios, principalmente relacionados ao alto custo dos meios de cultivo utilizados. Como alternativa, subprodutos da indústria de laticínios, como o permeado de soro de leite, vêm sendo estudados por seu potencial como substratos fermentativos de baixo custo, podendo reduzir em até 50% os custos de produção (Milkpoint, 2020). Essa abordagem é especialmente promissora no contexto brasileiro, que ocupa a sexta posição no ranking mundial de produção de leite, com destaque para os estados de Minas Gerais e Paraná (USDA, 2024; Franco, 2024).

O permeado do soro de leite, proveniente da ultrafiltração do soro, é rico em lactose e sais minerais, mas apresenta alta carga orgânica e potencial poluente, o que torna seu descarte um desafio ambiental (Araújo *et al.*, 2018). Por outro lado, suas características o tornam um substrato viável para processos fermentativos com microrganismos, especialmente leveduras com potencial probiótico, como *S. boulardii*, que demonstram boa adaptação e elevada produção de biomassa (Assunção, 2014; Nadai, 2015).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o cultivo da levedura *Saccharomyces boulardii* utilizando o permeado do soro de leite como substrato alternativo, visando à produção de biomassa celular com características probióticas.

2 OBJETIVOS

Avaliar a utilização do permeado do soro de leite como substrato para a obtenção de biomassa de *Saccharomyces boulardii*, previamente hidrolisado, empregando-se diferentes temperaturas e concentrações da enzima lactase.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar a temperatura ótima de atuação da enzima β -galactosidase para aplicação no processo de hidrólise do permeado de soro de leite;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações da enzima lactase na hidrólise do permeado do soro de leite e o efeito sinérgico das duas variáveis, visando sua posterior aplicação no cultivo do microrganismo;
- Avaliar a obtenção de biomassa celular de *S. boulardii* nas condições otimizadas de hidrólise do permeado de soro de leite;
- Determinar os parâmetros cinéticos do processo fermentativo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Leite e soro do leite

O leite é definido pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) como produto obtido da ordenha direta sem interrupções, em condições higiênicas de vacas leiteiras, sadias, alimentadas e descansadas. O mesmo pode ser comercializado na forma líquida integral ou sem gordura, pasteurizado, e também na forma de pó (Araújo *et al.*, 2018).

A composição do leite pode variar de acordo com a alimentação, raça e espécie da vaca. De acordo com o Portal Embrapa (2021) o leite é composto aproximadamente de 12% a 13% de elementos sólidos e 87% de água, sendo os elementos sólidos compostos por gordura, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas.

O setor de laticínios processa o leite, produzindo produtos lácteos como iogurte, queijo, manteiga e doce de leite. A maior parte é direcionada para a produção de queijos, onde 90% dos constituintes do leite não são reaproveitados, gerando em média 10 litros de soro para cada quilograma de queijo produzido (Assunção, 2014; Maestre, 2017).

O soro de leite é um subproduto gerado durante a produção de queijo e caseína, sendo reconhecido como uma fonte de proteínas de alta qualidade, tanto do ponto de vista funcional quanto nutricional. É rico em aminoácidos essenciais, vitaminas do complexo B, lactoferrina, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, glicomacropéptídeos, imunoglobulinas e minerais importantes, como o cálcio (Baldissera *et al.*, 2011).

O mercado mundial de proteína do soro de leite foi estimado em cerca de 10,3 bilhões de dólares em 2021, com previsão de crescimento a uma taxa anual composta de 7,13% entre os anos de 2021 e 2026 (Sebrae, 2025). No Paraná, o soro de leite, matéria-prima do *whey protein*, teve um aumento de 11% na produção, e as sobremesas lácteas tiveram um aumento de 13% na produção (Aen, 2023).

O soro de leite é composto por aproximadamente 50% a 55% dos sólidos totais presentes no leite, incluindo uma mistura de proteínas, lactose, minerais e

uma pequena quantidade de gordura. Existem dois tipos principais de soro: o ácido e o doce, os quais se diferenciam de acordo com o tipo de queijo produzido. O soro ácido é proveniente da fabricação de queijos como ricota e cottage, enquanto o soro doce é obtido durante a produção de queijos que utilizam enzimas, como a mussarela e o cheddar (Araújo *et al.*, 2018). A composição detalhada do soro de leite está presente na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição típica do soro de leite doce e ácido

Componentes (g. L⁻¹)	Soro doce	Soro ácido
Sólidos totais	63-70	63-70
Lactose	46-52	44-46
Proteína	6-10	6-8
Cálcio	0,4-0,6	1,2-1,6
Fosfato	1-3	2-4,5
Lactato	2	6,4
Cloreto	1,1	1,1

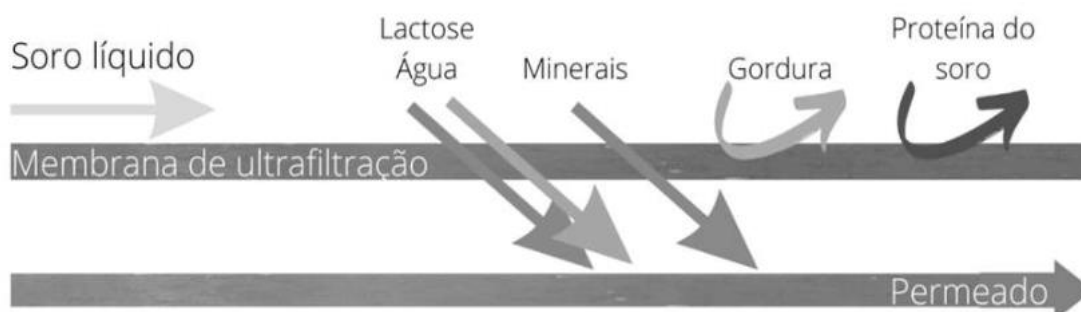
Fonte: Baseado em Araújo *et al.* (2018) e Baldissera *et al.* (2011).

As características do soro do leite como pH, matéria orgânica, nitrogênio total, torna-o um dos efluentes de indústria de maior impacto ambiental, com uma DBO média de 1033 mg de O₂/L, sendo 175 vezes maior que os efluentes comuns de esgoto. Levando as entidades governamentais a proibir o escoamento do soro não tratado (Baldissera *et al.*, 2011; Nadai, 2015).

Pequenas e médias empresas já estão reaproveitando o soro do leite empregando-o na formulação de outros produtos como bebidas lácteas e na produção de ricota. Há também o reaproveitamento utilizando tecnologias avançadas como a técnica de *Spray Drying* (secagem por aspersão), e a técnica de ultrafiltração que separa as moléculas de interesse (Nunes *et al.*, 2018).

A técnica de ultrafiltração demonstrada na Figura 1, consiste em um processo onde o soro de leite líquido passa por uma membrana preenchida com microporos que permitem a separação, obtendo duas frações, o concentrado, rico em proteínas e gorduras; e o permeado rico em lactose e sais minerais (Nadai, 2015; Nunes *et al.*, 2018).

Figura 1 - Processo de ultrafiltração tangencial de soro de leite para separação de proteína e gordura do permeado.



Fonte: Carvalho *et al.*, (2023).

O concentrado possui um valor agregado no mercado devido à sua aplicação definida na produção de concentrado proteico de soro do leite, além de ser empregado em formulações de panificação, biscoitos e sorvetes. Já o permeado não possui valor econômico agregado, mas vem sendo empregado no processo de fermentação como substrato para obtenção de etanol e biomassa devido ao alto teor de lactose, vitaminas e minerais (Araújo *et al.*, 2018; Nadai, 2015; Nunes *et al.*, 2018).

3.2 Permeado do soro de leite

Conforme já apresentado anteriormente, o permeado do soro do leite é a fração líquida obtida do processo de ultrafiltração, sendo muitas vezes tratado como resíduo nas indústrias. A composição média do permeado encontra-se apresentada na Tabela 2. Devido à sua elevada demanda química de oxigênio (DQO) de 3567 mg de O₂/L, o permeado possui um alto potencial poluente, podendo causar significativo impacto ambiental caso seja descartado juntamente com os demais efluentes gerados (Araújo *et al.*, 2018).

Em razão da presença de vários minerais e grande quantidade de lactose, o permeado vem sendo empregado na indústria alimentícia, sendo considerado um componente versátil, agregando sabor ao alimento. Pesquisas vêm sendo realizadas para a utilização do permeado de soro de leite também na indústria farmacêutica como excipiente na produção de medicamentos (Carvalho *et al.*, 2023).

Tabela 2 - Composição média do permeado do soro de leite

Composição	% (p/p)
Lactose	70-85
Minerais	6-20
Proteínas	0,5-3
Gorduras	<0,1 -2

Fonte: Adaptado de Nadai (2015).

Endres (2016) desenvolveu um xarope de glicose e galactose a partir do permeado do soro de leite por meio da hidrólise enzimática, com uma aplicação do produto em bebidas lácteas fermentadas sem lactose, obtendo bons resultados, sendo uma alternativa de reutilização do subproduto permeado da ultrafiltração.

Rosa (2023) utilizou o soro do leite, o permeado do leite e a lactose para a obtenção de um protótipo de produto viável de ingrediente prebiótico enriquecido com galactooligosacarídeos (GOS). O produto final alcançado foi o permeado de soro de leite enriquecido com GOS (33,1% de GOS), um produto com elevado potencial de aceitação no mercado de alimentos funcionais.

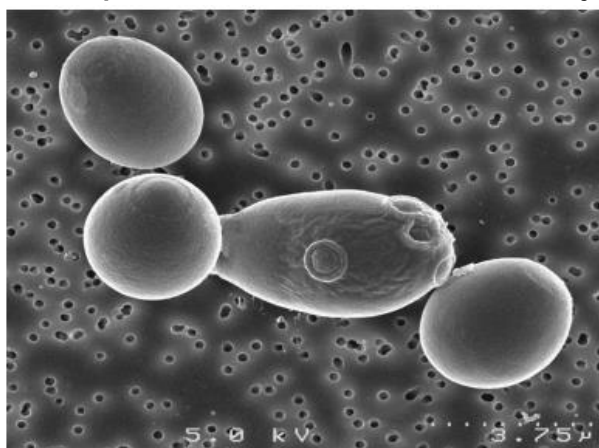
O permeado do soro de leite também foi utilizado como suplemento na produção de biomassa celular da levedura *S. boulardii* durante cultivo em sistema descontínuo (Nadai, 2015). Segundo esse autor, a utilização de permeado de soro de leite, empregando-se condições otimizadas de processo de pH combinada com concentrações de sulfato de amônio e permeado, resultou em massa celular de 40,06 g.L⁻¹. Por fim, o autor concluiu que esse subproduto da indústria de laticínios possui um grande potencial na produção de biomassa celular durante o cultivo da levedura *S. boulardii*.

Reporta-se também a utilização do permeado de soro de leite nos cultivos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces marxianus* para a produção de biomassa, o que resultou em concentrações celulares de 16,54 g L⁻¹, 30,58 g L⁻¹ e 21,12 g L⁻¹, respectivamente (Assunção, 2014).

3.3 *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii (Figura 2) é uma levedura não patogênica e termotolerante, com capacidade de crescimento a 37°C. Essa espécie foi descoberta em 1920 pelo microbiologista francês Henri Boulard, na Indochina, sendo isolada a partir da casca da fruta lichia. Desde então, vem sendo estudada e empregada na medicina como agente preventivo e terapêutico em pacientes com distúrbios gastrointestinais (Dos Santos Martins *et al.*, 2009; Nadai, 2015).

Figura 2 - Microscopia eletrônica da levedura *Saccharomyces boulardii*



Fonte: Pedroso (2011).

A levedura *S. boulardii* é um probiótico utilizado no combate de distúrbios gastrointestinais e algumas doenças como diarreia associada ao uso de antibióticos, diarreia ocasionada por *Clostridium difficile*, doença de Crohn, diarreia em crianças e diarreia em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) mostrando resultados efetivos em todos os casos (Pedroso, 2011). A forma de administração é oral, em cápsulas ou sachês em pó que contêm levedura liofilizada, sendo as principais marcas comerciais o Repoflor[®], Floratil[®], Florent[®] e Flomicin[®] (Consulta Remédio, 2024).

A levedura *Saccharomyces boulardii* tem demonstrado grande capacidade de adaptação a substratos alternativos, evidenciando seu potencial para aplicações sustentáveis em processos fermentativos. Estudos recentes apontam que, ao utilizar extrato do resíduo do beneficiamento da soja como fonte alternativa de nitrogênio, essa levedura apresentou um acréscimo de 11,57% na biomassa celular e de 19,35% na conversão de substrato em células, quando comparada a condições padrão de cultivo (Medeiros, 2019).

Segundo Vargas *et al.* (2014), o crescimento da levedura em efluente da indústria de arroz parboilizado suplementado com 1% de sacarose resultou em uma produção de 3,8 g/L de biomassa e viabilidade celular de $1,8 \times 10^8$ UFC/mL após 48 horas de cultivo. Esses resultados reforçam a adaptabilidade metabólica de *S. boulardii* frente a resíduos agroindustriais, com desempenho comparável ao meio tradicional YEPD, indicando elevado potencial para uso em aplicações biotecnológicas sustentáveis.

Tais resultados indicam que *S. boulardii* consegue manter alta viabilidade e desempenho metabólico mesmo em condições menos convencionais, sendo uma alternativa promissora para indústrias que buscam reduzir custos e aproveitar resíduos agroindustriais como matéria-prima.

3.3.1 Fatores que influenciam o crescimento celular

A utilização de leveduras na produção de biomassa celular depende de diversos fatores nutricionais e físico-químicos que influenciam o seu crescimento, como a concentração do substrato e o pH. Além disso, condições como temperatura e aeração devem ser controladas para alcançar um rendimento ideal (Nadai, 2015; Fang; Zhong, 2002).

Nadai (2015) observou que as concentrações de permeado de soro de leite que facilitam o crescimento de *Saccharomyces boulardii* situam-se na faixa de 180 a 220 g.L⁻¹, enquanto o pH 4,5 e a aeração adequada no processo fermentativo favorecem a produção de biomassa celular.

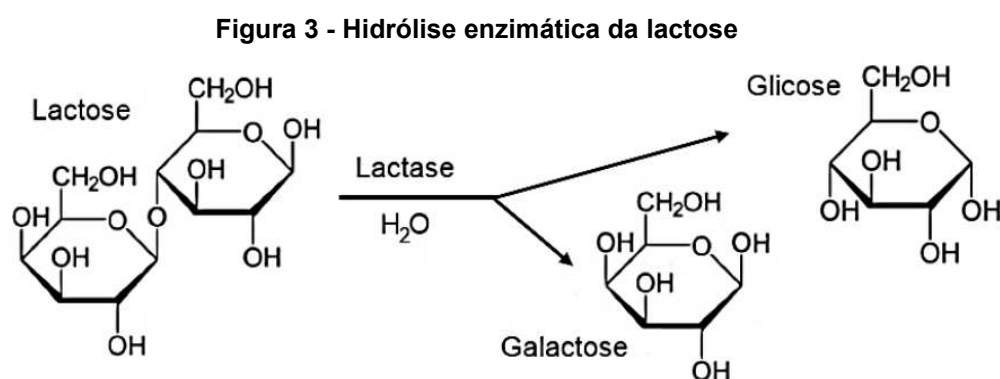
Nos estudos de Assunção (2014), constatou-se que a melhor condição para a hidrólise do permeado do soro de queijo envolveu o uso de 0,125% (p/v) de enzima, temperatura 35 °C e pH 6,5. Essa condição mostrou-se benéfica para o processo, uma vez que o pH é semelhante ao do permeado *in natura*, e a temperatura utilizada é relativamente baixa em comparação à aplicada durante a obtenção do permeado.

3.5 Hidrólise da lactose

As leveduras absorvem fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais em quantidades variadas. A fonte de carbono essencial para a maioria das leveduras é a glicose, na qual é convertida em energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) por meio da via glicolítica em piruvato e pelo ciclo de Krebs (Nadai, 2015). A *S. cerevisiae* não consegue metabolizar diretamente a lactose, sendo fundamental a conversão da lactose em glicose e galactose via enzimas livres ou imobilizadas, também por meio da hidrólise química ou hidrólise enzimática (Trigueiros *et al.*, 2016).

A hidrólise ácida da lactose demanda de uma elevada concentração de ácido sendo o pH entre 1-2, e altas temperaturas de 100-150°C. Os produtos obtidos na hidrólise, glicose e galactose, não são produzidos suficientes em relação à lactose inicial, devido a presença de subprodutos indesejáveis. Esta hidrólise vem sendo empregada principalmente na produção de etanol. (Vieira, 2006).

A hidrólise enzimática é considerada uma alternativa melhor para o aproveitamento da glicose, no qual é realizada com a adição da enzima β -galactosidase conhecida como lactase. A enzima catalisa a hidrólise da lactose originando duas moléculas, uma de glicose e outra de galactose, como mostrado na Figura 3. As enzimas de lactase podem ser de origem bacteriana (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*) ou fúngica (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*) (Giraldi, 2014).



Fonte: Zanuzzo *et al.* (2020).

Diversos estudos demonstram que a eficiência da hidrólise enzimática depende de fatores como temperatura, pH, tempo de reação e concentração enzimática.

Gennari *et al.* (2016) observaram que a enzima de *K. lactis* apresentou maior eficiência a 10 °C, enquanto a de *A. oryzae* atingiu hidrólise completa a 55 °C em 12 h. Vieira (2006) comparou as enzimas comerciais Lactozym® e Prozyn®, destacando a maior estabilidade térmica da Lactozym®, embora a Prozyn® apresentasse conversão mais rápida.

De forma semelhante, Castro *et al.* (2022) utilizaram β -galactosidase de *K. lactis* (Maxilact®) para reduzir a lactose no leite sob diferentes condições operacionais, alcançando até 36,3% de hidrólise em 30 minutos a 40 °C, reforçando a influência significativa dos parâmetros do processo sobre a eficiência da conversão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Permeado do Soro de Leite

O permeado do soro de leite em pó empregado foi gentilmente doado pela empresa Sooro Renner Nutrição/SA, localizada em Marechal Cândido Rondon - PR.

4.2 Microrganismo

A levedura *Saccharomyces boulardii* foi empregada na forma liofilizada e obtida a partir do medicamento comercial Repoflor® (Legrand) 200 mg.

4.3 Ativação celular

As células de *S. boulardii* foram ativadas empregando o meio YEPD (*Yeast Extract-Peptone-Dextrose*), utilizado no crescimento de leveduras, composto por extrato de levedura (5 g L⁻¹), peptona de carne (10 g L⁻¹) e glicose (20 g L⁻¹), de acordo com Casal *et al.* (2004). O meio foi incubado com agitação orbital na temperatura de 30°C, pH 7,0 a 150 rpm, por 24 horas (Assunção, 2014). Após as células foram plaqueadas em meio YEPD contendo ágar 20 g.L⁻¹ e estocadas sob refrigeração para posterior utilização.

4.4 Hidrólise enzimática do permeado

Inicialmente, foi realizado um teste utilizando a enzima lactase Saphera® 2600 L, da marca Novozymes. No processo de hidrólise, foram avaliadas diferentes concentrações da enzima (0,10% e 0,15% p/v) e temperaturas (31 °C e 35 °C), conforme delineamento fatorial 2² (Tabela 3) em duplicata, com o objetivo de analisar o rendimento do processo enzimático. As condições de concentração e temperatura foram baseadas nos trabalhos de Assunção (2014), Muller *et al.* (2007) e Nadai (2015).

O delineamento resultou em quatro ensaios, nos quais cada linha da matriz experimental representa uma combinação dos níveis dos fatores avaliados (temperatura e concentração da enzima). Esse planejamento permitiu identificar a temperatura ótima de atuação da enzima, bem como a concentração mais adequada para o processo de hidrólise.

Tabela 3 – Matriz do planejamento 2²

Ensaio	Temperatura (°C)		Concentração enzima (%)	
	Codificados	Reais	Codificados	Reais
1	-1	31	-1	0,10
2	1	35	-1	0,10
3	-1	31	1	0,15
4	1	35	1	0,15

Fonte: Autor (2025).

A solução de permeado foi feita empregando 180 g.L⁻¹ de permeado do soro de leite em pó diluído em água destilada. O pH da solução foi ajustado com soluções de NaOH 1 mol. L⁻¹ e HCl 1 mol. L⁻¹.

O procedimento de hidrólise enzimática consistiu-se em adicionar na solução de permeado previamente preparada com a concentração fixa de 180 g.L⁻¹ e a concentração de enzima de interesse, conforme já apresentado anteriormente, e incubado em *shaker* a 100 rpm e temperatura controlada de acordo com cada ensaio, com o pH 6,5 durante 3 horas. Após realizou-se a desativação da enzima em banho-maria por 5 minutos a 100 °C e medida a concentração de glicose obtida (Assunção, 2014).

A análise de acompanhamento foi a de glicose, empregando o kit enzimático-colorimétrico, da marca Gold Analisa, para quantificar a quantidade de glicose hidrolisada em cada ensaio. Conforme Giraldi (2014) a quebra de 1 mol de lactose gera 1 mol de glicose e 1 mol de galactose, assim a análise é eficaz para o monitoramento.

4.5 Preparo do microrganismo

Foi realizado um pré-inóculo da levedura cultivada em permeado de soro de leite conforme metodologia adaptada de Assunção (2014). Para isso, adicionou-se 25 mL do meio de ativação de *S. boulardii* cultivadas em um frasco do tipo Erlenmeyer contendo 250 mL do meio YEPD previamente esterilizado. O frasco foi agitado em uma incubadora tipo *shaker* a 150 rpm, 30°C por 24 horas.

O preparo do inóculo foi realizado segundo metodologia adaptada de Nadai (2015), no qual foram adicionados os sais (g.L⁻¹): sulfato de amônio - (NH₄)₂SO₄ (7,50); sulfato de magnésio - MgSO₄ (1,25) e fosfato monobásico de potássio - KH₂PO₄ (1,50) ao permeado previamente hidrolisado, que posteriormente foi pasteurizado a 65°C por 30 minutos. Após, transferiu-se 30 mL do pré-inóculo para frasco do tipo Erlenmeyer contendo 270 mL do inóculo e realizou-se o cultivo sob agitação em shaker a 150 rpm, 30°C por 12 horas.

Foi empregado a técnica de pasteurização do permeado do soro de leite como um tratamento térmico, pois a autoclavagem (121 °C, alta pressão) promove a desnaturação irreversível das principais proteínas do soro em especial β-lactoglobulina e α-lactalbumina, resultando em agregação, perda de solubilidade e alteração de suas propriedades funcionais (Freire *et al*, 2022;Li *et al*, 2021).

4.6 Processo fermentativo

Os cultivos foram realizados empregando-se as mesmas condições já descritas anteriormente, porém em recipientes de 2000 mL contendo 730 mL de meio composto por permeado de leite suplementado com os sais. Após adicionou-se 70 mL do inóculo obtendo-se um volume final de 800mL, conforme ilustra a Figura 4.

Figura 4 - Imagem do sistema de cultivo empregado nos experimentos



Fonte: Autor (2025).

Ressalta-se que a conexão que pode ser visualizada na figura refere-se à saída de amostras que foram retiradas nos respectivos tempos com o auxílio de uma seringa que foi acoplada de forma asséptica a cada amostragem.

O cultivo foi realizado em incubadora tipo *shaker* a 150 rpm e 30°C por 30 horas e os experimentos realizados em triplicata. A quantidade de inóculo adicionada foi calculada a partir da curva de massa seca do microrganismo utilizado (Anexo A).

No acompanhamento do processo fermentativo, retiraram-se amostras nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 30 horas. Por fim, as amostras foram armazenadas sob refrigeração à 10°C para posterior análises de glicose, determinação do pH e concentração celular, conforme descrito nos métodos analíticos a seguir.

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada empregando-se a curva de correlação entre os métodos de espectrofotometria e massa seca com a amostra do tempo de 30 horas de fermentação. A densidade óptica da suspensão celular foi medida em triplicata em espectrofotômetro UV-Vis a 600 nm (Nadai, 2015).

4.7.2 Determinação de glicose

A concentração de glicose na amostra foi feita empregando-se o kit de glicose PP (Gold Analisa), conforme descrito no Anexo B.

4.7.3 Determinação do pH

As leituras de pH das amostras para a determinação da variação de pH do processo foram realizadas por meio da utilização do equipamento pHmetro.

4.7.4 Parâmetros fermentativos

A fim de analisar com mais precisão o desempenho do processo fermentativo nas condições testadas, foram determinados os parâmetros fermentativos descritos a seguir. As Equações 1, 2 e 3 foram definidas de acordo com Schmidell (2001).

A produtividade em biomassa (Q_x), pode ser definida pela Equação 1:

$$Q_x \left(\frac{g}{L h} \right) = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (1)$$

Onde X_m representa a concentração final de biomassa, X_0 a concentração inicial de biomassa, e t_f o tempo final da fermentação.

A conversão de substrato em biomassa foi definida pela Equação 2, onde S_0 é a concentração de substrato inicial e S_f a concentração de substrato final e X a concentração de biomassa.

$$Y_{x/s} = \frac{X_m - X}{S_0 - S_f} \quad (2)$$

Para o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{x\text{máx}}$) foi realizado no instante onde se observou uma linearidade crescente do crescimento celular. Para isso, plotou-se um gráfico $\ln(X/X_0)$ em função do tempo, e a partir da equação da reta, obteve-se o valor de $\mu_{x\text{máx}}$, conforme a Equação 3.

$$\ln \left(\frac{X}{X_0} \right) = \mu_{x\text{max}}(t - t_0) \quad (3)$$

4.7.5 Análises estatísticas

Análise de variância (ANOVA) a nível de 95% de significância e a normalidade do modelo foram realizadas pelo software R versão 4.5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção apresenta os resultados obtidos nos experimentos, que serão discutidos e comparados com dados da literatura, visando avaliar as condições experimentais propostas neste estudo.

5.1 Hidrólise enzimática

Os resultados obtidos no planejamento fatorial 2² estão descritos na Tabela 4 que apresenta os valores médios reais dos ensaios. Fixou-se os valores de concentração de permeado 180 g.L⁻¹ e o pH 6,5 e variou-se a temperatura e a concentração da enzima.

Tabela 4 – Resultado do planejamento experimental 2²

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração enzima (p/v%)	Lactose hidrolisada (g.L ⁻¹)	Conversão da Lactose (%)
1	31	0,10	35,3	22,1
2	35	0,10	41,7	26,1
3	31	0,15	44,8	28,1
4	35	0,15	50,9	31,9

Fonte: Autor (2025).

De acordo com a Ficha Técnica de Composição do Permeado de Soro de Leite (Anexo C), a cada 180 g de permeado, contém 159,5 g de lactose. Assim, os cálculos de conversão foram baseados nesses dados. Pode-se observar que o ensaio 4 obteve a maior quantidade de lactose hidrolisada (50,9 g.L⁻¹), cuja condição foi obtida na temperatura de 35°C e concentração de enzima de 0,15 % (p/v). Assim, estas condições foram empregadas para dar continuidade aos experimentos.

Resultado semelhante foi observado por Carminatti (2001), que verificou melhores conversões de lactose na faixa de temperatura entre 30 °C e 40 °C, com destaque para as temperaturas de 30 °C e 35 °C. Já Vieira (2006) avaliou a hidrólise enzimática utilizando duas enzimas comerciais, Lactozym® e Prozyn®, e observou que a atividade da β-galactosidase é influenciada pelo pH da reação. Em ambos os casos, valores de pH acima de 6,0 demonstraram maior eficiência na atividade

enzimática. Essas condições também foram contempladas nos experimentos realizados neste estudo.

Assunção (2014) avaliaram diferentes temperaturas, pH e concentrações de enzima comercial LactozymPure®TM 6500L, com o valor fixo de substrato inicial de $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A maior conversão de lactose foi nas condições de 35°C , pH 6,5 e 0,125 % (p/v) de enzima, obtendo-se cerca de 75,72% de lactose hidrolisada, valor este superior ao que foi obtido neste trabalho (31,9%). No entanto, o mesmo autor ao empregar a concentração de 0,15% (p/v) de enzima, 30°C e pH de 8,5, obteve 35,75% de conversão de lactose, valor próximo ao obtido no presente estudo, a diferença dos resultados pode ter ocorrido devido a utilização de enzima diferente e também do pH empregado nos trabalhos.

Sandri *et al.* (2014) avaliaram as condições de temperatura, pH e concentração da enzima Lactozym Pure 2600 L na hidrólise enzimática do permeado de soro de leite. De acordo com os autores, o melhor resultado foi obtido utilizando $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de permeado, sob as condições de 35°C , pH 6,5 e concentração enzimática de 0,125% (p/v), alcançando $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose hidrolisada. Os resultados obtidos neste estudo apresentaram valores inferiores aos relatados por Sandri *et al.* (2014), o que pode estar relacionado à diferenças na composição e na atividade específica da enzima utilizada. Neste trabalho, foi empregada a enzima β -galactosidase Saphera® 2600 L, que possui características distintas em relação à Lactozym®, como origem microbiana, perfil de atividade enzimática e sensibilidade a variações de temperatura e pH. Essas diferenças podem ter influenciado negativamente a eficiência da hidrólise da lactose nas condições testadas.

Associado à diferença com relação à composição da enzima empregada neste trabalho, verifica-se a variação das condições de hidrólise que diferem dos outros trabalhos, dificultando a comparação direta dos resultados.

A Tabela 5 mostra os efeitos das variáveis analisadas no planejamento experimental, permitindo observar a influência exercida por cada fator ao nível de significância de 95%.

Analisando os dados da Tabela 5, observa-se que os fatores de temperatura e enzima possuem efeitos positivos ao nível de significância de 95% com o $p\text{-valor} < 0,05$.

Tabela 5 – Efeitos do planejamento experimental

Fator	Coefficientes	Erro padrão	p-valor
Intercepto	43,17375	0,51282	1,193e-07
Temperatura (°C)	3,14125	0,51282	0,003598
Enzima (%)	4,66625	0,51282	0,000809
Interação	-0,10125	0,51282	0,853112

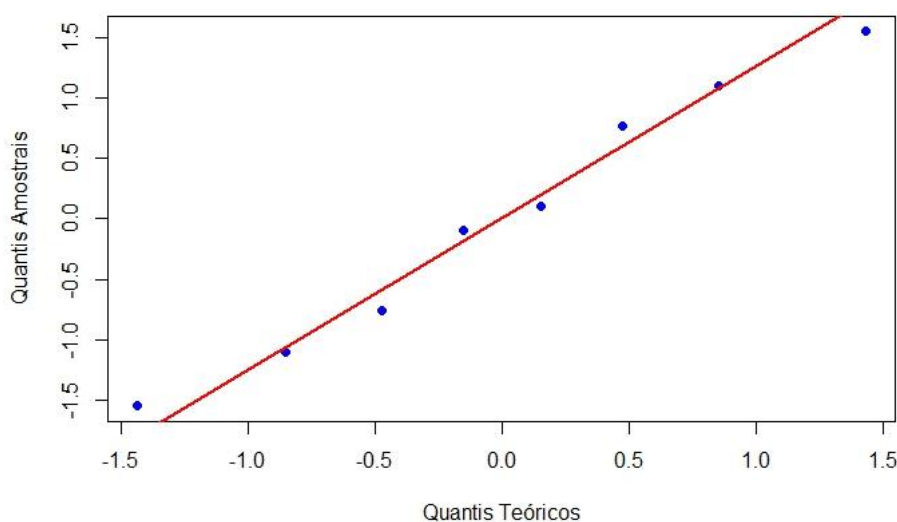
$r^2 = 0,9678$ e $r^2_{ajustado} = 0,9437$

Fonte: Autor (2025).

Já a interação entre os fatores não apresentou efeito positivo sobre a variável resposta. Além disso, o coeficiente de correlação ajustado obtido pelo modelo linear foi $r^2 = 0,9437$, evidencia uma boa representatividade dos dados experimentais pelo modelo.

A normalidade dos resíduos foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, cujo resultado ($W = 0,9657$; p-valor = 0,8624) não indicou evidências estatísticas para rejeição da hipótese nula, assumindo-se um nível de significância de 5%. Isso sugere que os resíduos seguem uma distribuição aproximadamente normal. Além disso, o gráfico de quantis amostrais versus quantis teóricos (gráfico Q-Q, Figura 5) evidenciou que os pontos se alinham de forma satisfatória à linha de referência, corroborando visualmente a suposição de normalidade. Dessa forma, tanto a análise estatística quanto a inspeção gráfica indicam que o pressuposto de normalidade dos resíduos foi atendido, reforçando a validade do modelo ajustado.

Figura 5- Gráfico Q-Q resíduos



Fonte: Autor (2025).

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo linear aos dados experimentais de hidrólise da lactose, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com os dados brutos do experimento, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Análise da variância do modelo linear

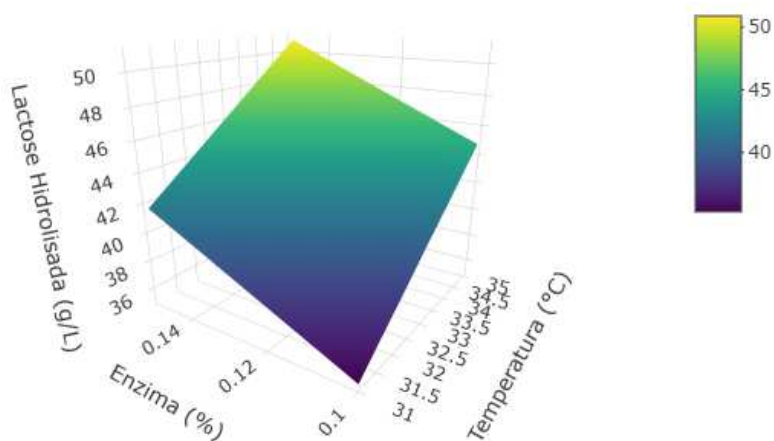
	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média dos quadrados (MQ)	Teste F	Nível de significância (p)
Modelo	253,131	3	127	60,159	0,001035
Resíduo	8,415	4	2		
Total	261,628	7			

Fonte: Autor (2025).

Conforme os dados obtidos pode-se observar que o modelo linear apresentou elevada significância (p valor <0,002), sendo viável afirmar que o modelo proposto é válido e se ajustou aos dados experimentais.

A superfície de resposta do modelo pode ser visualizada na Figura 6, na qual demonstra que tanto a temperatura quanto a concentração de enzima influenciaram positivamente na hidrólise da lactose, resultando em um aumento da resposta com o aumento de ambos os fatores. A superfície inclinada e sem curvaturas acentuadas indica que os efeitos principais foram significativos, enquanto a interação entre as variáveis não teve efeito relevante.

Figura 6 - Gráfico de superfície da lactose hidrolisada em função da temperatura e da concentração de enzima



Fonte: Autor (2025).

A partir dos dados da Tabela 5 foi possível obter a Equação 4, que representa a concentração de lactose hidrolisada em função das variáveis de temperatura e enzima. Onde T representa a temperatura (°C) e E a concentração de enzima em % (p/v).

$$Lactose\ hidrolisada\ \left(\frac{g}{L}\right) = 43,17375 + 3,14125 \cdot T + 4,66625 \cdot E - 0,10125 \cdot TE$$

(4)

5.2 Processo fermentativo

O processo fermentativo foi realizado em triplicata utilizando a melhor condição obtida do item 5.1 da hidrólise enzimática.

A Tabela 7 mostra os valores médios obtidos das principais análises realizadas nos experimentos. Pode-se observar que a concentração de glicose no tempo inicial (0h) foi coerente com o resultado da hidrólise empregada neste experimento. Dado que a condição ótima obtida na fase experimental da hidrólise foi de 50,9 g. L⁻¹ (Tabela 4) e no experimento de cultivo das células de 48,04 g. L⁻¹ (Tabela 7).

Tabela 7 – Variação do pH, concentração de biomassa celular (g L⁻¹) e concentração de glicose (g L⁻¹) durante 30 horas de cultivo de *S. boulardii* em meio contendo permeado do soro de leite hidrolisado como substrato.

Tempo (h)	pH	DP	Biomassa (g. L ⁻¹)	DP	Glicose (g. L ⁻¹)	DP
0	6,0	± 0,03	0,10	± 0,00	48,04	± 3,49
3	5,7	± 0,08	0,25	± 0,05	41,82	± 1,01
6	5,5	± 0,21	1,32	± 0,78	34,34	± 4,51
9	5,1	± 0,27	2,32	± 1,15	20,88	± 12,51
12	5,0	± 0,15	4,06	± 1,22	7,88	± 10,64
18	4,8	± 0,01	5,01	± 0,57	0,34	± 0,02
24	4,7	± 0,07	6,16	± 0,30	0,26	± 0,01
30	4,7	± 0,07	6,81	± 0,49	0,22	± 0,03

DP = Desvio padrão

Fonte: Autor (2025).

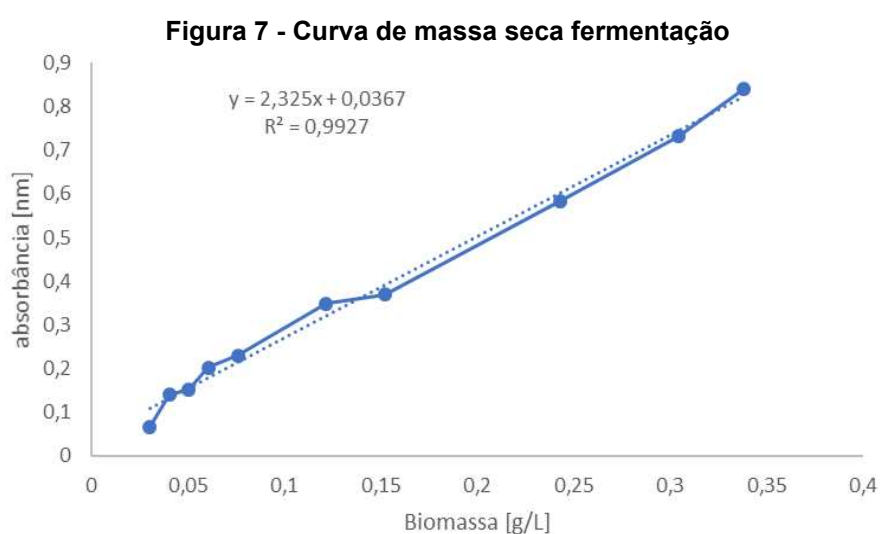
Para uma melhor compreensão e discussão do perfil cinético do cultivo, os dados da Tabela 7 serão apresentados em gráficos no item 5.2.1, permitindo uma visualização do comportamento da levedura durante seu crescimento no meio de cultivo alternativo.

5.2.1 Cinética de fermentação

Foi realizada a curva de massa seca utilizando-se a amostra concentrada do tempo de 30 horas de cultivo para o cálculo de concentração de biomassa. A figura 7 apresenta a correlação entre a biomassa e absorbância, a qual permitiu a obtenção de uma curva de peso seco. De acordo com os resultados, a Biomassa celular pode ser expressa através da Equação (5):

$$Y = 2,325 X + 0,0367 \quad (5)$$

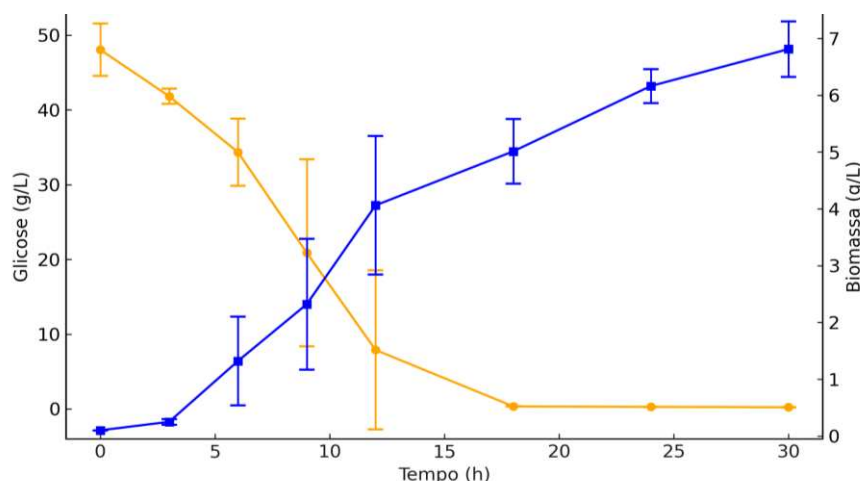
Com $R^2 = 0,9927$, onde, $Y =$ Valor da Absorbância à 600 nm e $X =$ Concentração de biomassas de *S. boulardii*



Fonte: Autor (2025).

A Figura 8 apresenta o perfil cinético do crescimento de *S. boulardii* durante 30h de cultivo.

Figura 8 - Concentração de biomassa e glicose no processo fermentativo de *S. boulardii*



Fonte: Autor (2025).

De acordo com a Figura 8 o crescimento celular nas 6 primeiras horas foi mais lento, esse comportamento pode estar relacionado à fase de latência ou *fase lag*, período em que a célula se adapta às condições do meio, como nutrientes disponíveis e temperatura. Tal fato pode ser explicado em função da concentração inicial de células durante o processo ter sido muito baixa, o que possivelmente levou a esta prolongada fase de latência.

A fase exponencial ou *fase log* pode ser observada do tempo de 6 horas até 12 horas, indicando que neste período as células já estavam adaptadas às condições de cultivo empregadas. Ainda com relação à Figura 8, nota-se que após às 12h de cultivo houve uma desaceleração do crescimento, o que é corroborado com o esgotamento da glicose após este período.

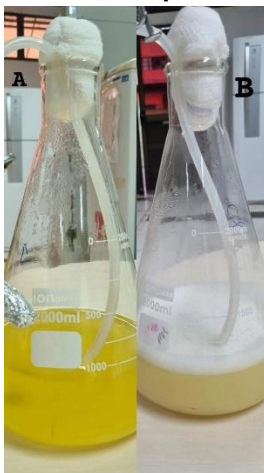
Nota-se que a máxima concentração de biomassa ($6,81 \text{ g.L}^{-1}$) foi atingida no tempo de 30 horas, valor este muito inferior ao observado por Nadai (2015) obteve uma concentração de biomassa de 40 g.L^{-1} , com 180 g.L^{-1} de permeado do soro de leite, em condições de cultivo de 100 rpm e 30°C e mesmo tempo de processo (30 horas). Já Assunção (2014) alcançou $22,85 \text{ g.L}^{-1}$, utilizando 150 g.L^{-1} de permeado do soro de leite, a 100 rpm e 30°C por 24 horas.

Nota-se que a baixa concentração de biomassa obtida em comparação aos valores encontrados na literatura pode estar relacionada com a concentração de células iniciais que foram adicionadas ao meio, sendo estas em torno de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$.

Estudos de Assunção (2014) e Nadai (2015) inocularam uma suspensão celular de *S. boulardii* de aproximadamente 3 g.L⁻¹.

A Figura 9 apresenta a turbidez do meio de cultivo no tempo de 30 horas em relação ao tempo de 0 horas, sendo que a turbidez do meio indica o crescimento de biomassa celular.

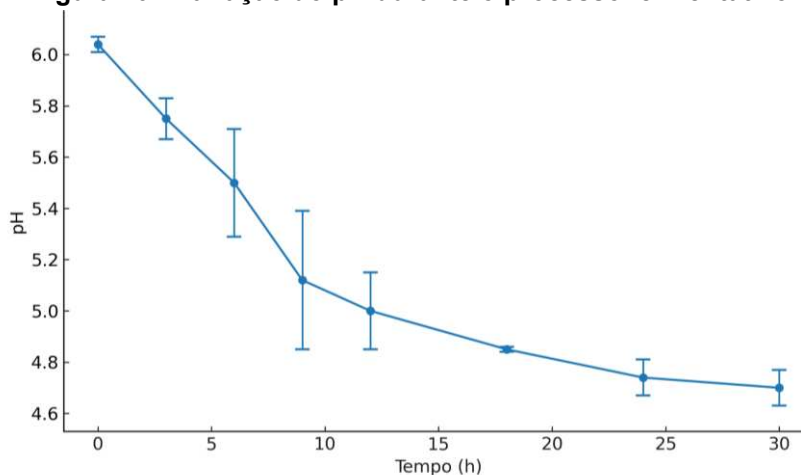
Figura 9 - Meio de cultivo no tempo 0 horas (A) e 30 horas (B)



Fonte: Autor (2025).

A Figura 10 apresenta a variação do pH durante as 30 horas de fermentação, evidenciando um declínio contínuo, com pouca variação, provavelmente devido à produção de ácidos orgânicos pela levedura.

Figura 10 - Variação do pH durante o processo fermentativo



Fonte: Autor (2025).

Esse comportamento também foi observado por Muller *et al* (2007) e Nadai (2015), que associaram a acidificação do meio ao metabolismo de *S. boulardii*, ressaltando a importância de monitorar o pH para evitar efeitos negativos sobre a biomassa.

5.2.2 Parâmetros fermentativos

A Tabela 8 mostra a produtividade em biomassa (Q_x), a conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) no tempo de 30 horas de cultivo da levedura *S. boulardii*.

A produtividade máxima de *S. boulardii* obtida neste trabalho foi de 0,330 g/L.h, valor superior ao registrado por Muller *et al* (2007), que alcançaram produtividades de 0,263 g/L.h e 0,320 g/L.h durante cultivo em fermentadores air-lift com 1,0 e 1,5 vvm, respectivamente, e 0,325 g/L.h em agitador orbital tipo *shaker*. Esses resultados indicam que as condições aplicadas no presente estudo foram eficazes para promover uma boa produção de biomassa.

Em relação ao máximo rendimento em biomassa por substrato consumido ($Y_{x/s}$), este foi de aproximadamente 0,140 g/g, valor este inferior aos relatados por Muller *et al*. (2007), que variaram de 0,334 a 0,417 g/g, e também aos encontrados por Nadai (2015), que obteve rendimentos próximos de 0,75 g/g sob condições otimizadas com suplementação de nutrientes e controle do pH e da aeração.

Tabela 8 - Parâmetros fermentativos obtidos durante o cultivo de *S. boulardii*

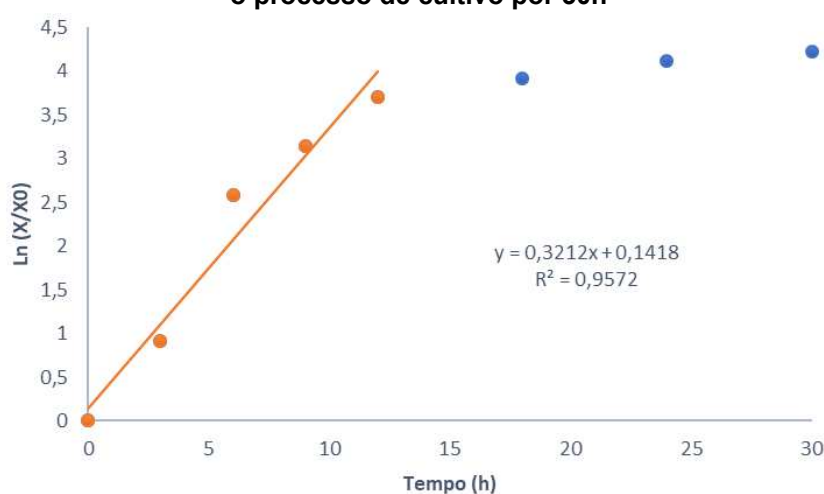
Tempo (h)	Q_x (g/L.h)	$Y_{x/s}$ (g/g)
0	-	-
3	0,050	0,024
6	0,203	0,089
9	0,247	0,082
12	0,330	0,099
18	0,273	0,103
24	0,253	0,127
30	0,224	0,140

Fonte: Autor (2025).

Essa diferença pode estar relacionada ao menor controle de variáveis operacionais no presente estudo, como oxigenação e suplementação nutricional, bem como a concentração de substrato inicial ter sido diferente à reportada nestes estudos. Apesar disso, os resultados obtidos evidenciam a viabilidade do processo e indicam oportunidades para otimização futura.

No presente trabalho, também pode-se obter a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{x\text{máx}}$), através da Equação 3 apresentada no item 4.7.4 no intervalo de tempo de 0-12 horas. De acordo com a Figura 11, a levedura apresenta *S. boulardii* apresentou valor de $0,321 \text{ h}^{-1}$ nas condições de processo avaliadas.

Figura 11 – Cálculo da velocidade específica máxima do microrganismo *S. boulardii* durante o processo de cultivo por 30h



Fonte: Autor (2025).

O valor encontrado foi superior ao de Paula *et al.* (2019), que relataram $\mu_{x\text{máx}}$ em torno de $0,20 \text{ h}^{-1}$ em biorreator de 5 L, sob condições otimizadas com pH 5,5, temperatura de $24 \text{ }^\circ\text{C}$ e teor alcoólico de $5 \text{ }^\circ\text{GL}$. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que, neste estudo, as condições experimentais foram mais favoráveis ao crescimento da levedura, possivelmente devido ao pH inicial mais próximo de 6,0, à temperatura de incubação em torno de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e à ausência de etanol no meio de cultivo.

No estudo realizado por Muller *et al.* (2007), foi avaliado o crescimento de *S. boulardii* em biorreatores do tipo air-lift, com taxas específicas de crescimento variando entre $0,350$ e $0,382 \text{ h}^{-1}$, utilizando-se pH inicial de 6,0 e temperatura de

30 °C, sendo este intervalo mais condizente com o valor encontrado neste estudo. Assim, os resultados obtidos evidenciam a importância de ajustar adequadamente as condições do meio e os parâmetros operacionais para maximizar a cinética de crescimento desta levedura.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o permeado do soro de leite, subproduto da indústria de laticínios frequentemente tratado como resíduo, pode ser reaproveitado como substrato para o cultivo da levedura *Saccharomyces boulardii*. A condição ótima para a hidrólise enzimática da lactose foi alcançada na temperatura de 35 °C e com concentração de enzima de 0,15% (p/v), resultando em uma conversão de 31,9% da lactose presente em glicose.

Ao longo dos experimentos de cultivo de *S. boulardii* na condição otimizada de hidrólise do permeado, foi possível observar o crescimento da biomassa celular e o consumo de glicose, indicando que as condições estabelecidas foram favoráveis ao desenvolvimento do microrganismo. No processo fermentativo, a levedura demonstrou crescimento adequado, uma vez que o valor da velocidade específica máxima de crescimento encontrada foi de 0,32 h⁻¹, atingindo máxima concentração de biomassa (6,81 g L⁻¹) em 30 horas, com praticamente toda glicose consumida.

De modo geral, os resultados obtidos confirmam o potencial biotecnológico do permeado do soro de leite como uma alternativa sustentável para processos fermentativos, destacando-se como uma estratégia promissora para a produção de biomassa probiótica e para o aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios.

REFERÊNCIAS

- ABILHÔA, Hélen Caroline Zonta *et al.* Influência de parâmetros nutricionais na produção de biomassa em cultivo submerso de *Saccharomyces boulardii*-17. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 38183-38198, 2020.
- AEN - Agência Estadual de Notícias. **Industrialização e tecnologia no campo impulsionam a cadeia do leite no Paraná**. 2023. Disponível em: <<https://www.aen.pr.gov.br/Noticia/Industrializacao-e-tecnologia-no-campo-impulsionam-cadeia-do-leite-no-Parana>>. Acesso em: 17 nov. 2024.
- ARAÚJO, Taynara Braga de *et al.* **Reaproveitamento do permeado do soro de leite**. 2018. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
- ASSUNÇÃO, Grettya Maria. **Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de queijo**. 2014. Dissertação (Mestre em Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2014.
- BALDISSERA, Ana Carolina; BETTA, Fabiana Della; PENNA, Ana Lúcia Barretto; LINDNER, Juliano De Dea. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 1497–1526, 2011. DOI: 10.5433/1679-0359.2011v32n4p1497. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/5094>. Acesso em: 01 dez. 2024.
- CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001
- CARVALHO, Elis Regina Pastre; PENSIN, Carín Fabíola. Avaliação da Performance do Permeado do Soro do Leite para a Fabricação de Comprimidos na Indústria Farmacêutica. **Revista Científica de Alto Impacto**, v. 1, p. 1-16, 2023.
- CASAL, Margarida *et al.* Métodos convencionais em microbiologia. 2004. In: CASAL, Margarida, coord. – **Microbiologia e genética molecular microbiana: manual de laboratório**. [S.l.]: Copissaurio, 2004.
- CASTRO, Valentina Ribeiro *et al.* Monitoração da hidrólise enzimática pela beta-galactosidase em leite in natura. In: **CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: PESQUISA E PRÁTICAS CONTEMPORÂNEAS-VOLUME 3**. Editora Científica Digital, 2022. p. 172-178.
- CONSULTA REMÉDIOS. ***Saccharomyces boulardii* - 17 liofilizado**. Disponível em: <<https://consultaremedios.com.br/saccharomyces-boulardii-17-liofilizado/pa>>. Acesso em: 27 nov. 2024.

DOS SANTOS MARTINS, Flaviano; BARBOSA, Flávio Henrique Ferreira; NICOLI, Jacques Robert. O probiótico *Saccharomyces boulardii*. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 9, n. 2, p. 171-181, 2009.

ENDRES, Creciana Maria. **Produção de xarope hidrolisado de lactose do permeado de soro de leite e aplicação em bebida láctea fermentada**. 2016. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

FANG, Q; ZHONG, J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochem.**, v. 37, p. 769-774. 2002.

FRANCO, L. Quem são os maiores produtores de leite do Brasil. **Globo Rural**. Disponível em: <<https://globorural.globo.com/pecuaria/leite/noticia/2024/08/quem-sao-os-maiores-produtores-de-leite-do-brasil.ghtml>>. Acesso em: 16 nov. 2024.

FREIRE, Paulina *et al.* Thermal denaturation of milk whey proteins: A comprehensive review on rapid quantification methods being studied, developed and implemented. **Dairy**, v. 3, n. 3, p. 500-512, 2022.

GENNARI, Adriano *et al.* Estudo da Hidrólise Enzimática da Lactose em Soros Lácteos Utilizando β -galactosidasas Microbianas. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, 2016.

GIRALDI, Catiucia. **Aplicação de concentrado proteico de soro de leite com lactose hidrolisada em iogurte com baixo teor de lactose**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2014.

LI, Hongbo *et al.* Effect of heat treatment on the property, structure, and aggregation of skim milk proteins. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 714869, 2021.

MAESTRE, Keiti Lopes. **Estudo de condições de fermentação alcoólica e acética utilizando subproduto lácteo e diferentes leveduras**. 2017. Dissertação (Mestre em Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2017.

MEDEIROS, Letícia Schmidt. **Resíduo do beneficiamento da soja: uma alternativa para suplementação nutricional de meio de cultivo para crescimento de microrganismo probiótico**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019.

MILKPOINT. Soro de leite é opção barata para cultivos de probióticos. 2020. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/soro-de-leite-e-opcao-barata-para-cultivos-de-probioticos-218962/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MULLER, José Luis *et al.* Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 688-693, 2007.

NADAI, Barbara Lepretti. **Efeito da suplementação de nutrientes e da concentração de permeado de soro de leite no crescimento de *Saccharomyces boulardii* em sistema descontínuo**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2015.

NUNES, Luane Alcântara *et al.* O soro do leite, seus principais tratamentos e meios de valorização. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 301-326, 2018.

PEDROSO, Sílvia Helena Sousa Pietra. **Ação probiótica da levedura *Saccharomyces boulardii***. 2011. Monografia (Especialista em Microbiologia aplicada às Ciências Ambientais e Industriais) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

PORTAL E-FOOD. Pesquisa brasileira aponta aumento na demanda de probióticos com novas fórmulas - **Portal e-food | Tudo sobre Segurança de Alimentos**. Disponível em: <<https://portalefood.com.br/noticias/pesquisa-brasileira-aponta-aumento-na-demanda-de-probioticos-com-novas-formulas/>>. Acesso em: 17 nov. 2024.

PORTAL EMBRAPA. **Qualidade**. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade>. Acesso em: 16 nov. 2024.

ROSA, Carolina Flores. **Desenvolvimento de ingredientes prebióticos (galactooligosacarídeos) a partir de lactose, soro de leite e permeado de soro de leite**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2023.

SANDRI, J. P. *et al.* Hidrólise enzimática do permeado de soro de queijo. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 613-617, 2014.

SEBRAE. **Soro de Leite: Oportunidade Sustentável na Indústria Láctea**. Disponível em: <https://sebraepr.com.br/impulsiona/soro-de-leite-oportunidade-sustentavel-na-industria-lactea/?srsltid=AfmBOorTMqFfXc-mBqVSwpL12ZKh4RDx47qNJCENjqEml1X45nfU9STe>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SCHMIDELL, Willibaldo. **Biотecnologia Industrial - Vol. 2: Engenharia Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2021. E-book. pág.14. ISBN

9786555060195. Disponível em:
<https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786555060195/>.

STÜRMER, Elisandra Salete *et al.* A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 27, n. 4, p. 264-72, 2012.

TRIGUEIROS, D. E. G.; FIORESE, M. L.; KROUMOV, A. D.; HINTERHOLZ, C. L.; NADAI, B. L.; ASSUNÇÃO, G. M. Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Biochemical Engineering Journal**, 110, 71–83. 2016.

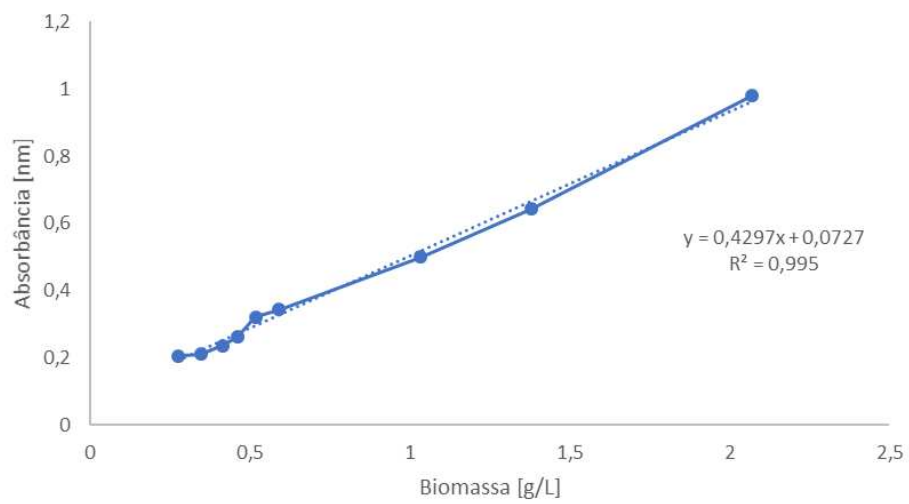
USDA. Foreign Agricultural Service. **Fluid Milk**. Disponível em: <<https://fas.usda.gov/data/production/commodity/0223000>>. Acesso em: 16 nov. 2024.

VARGAS, Katiane; FERNANDES, Josiane Lima; MACHADO, Adriano Cesar; WOLFF, Débora Bonatto; DIAS, Adriano. Crescimento da levedura *Saccharomyces boulardii* em efluente da indústria de arroz parboilizado com sacarose. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 63–78, jan./jun. 2014.

VIEIRA, Aline Alves Melo Tostes. **Estudo da hidrólise enzimática do soro de queijo utilizando as lactases Lactozym® e Prozyn®**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

WENDLING, L. K.; WESCHENFER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados - uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49–57, 2013.

ZANUZZO, Mariéle; FRIEDRICH, Maria Tereza. Determinação de lactose em achocolatados. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 98825-98833, 2020.

ANEXO A - CURVA MASSA SECA DO MICRORGANISMO

ANEXO B - KIT GLICOSE PP (GOLD ANALISA) REF 434

O procedimento foi seguido pelo protocolo disponibilizado no kit.

Foi identificado 3 tubos de ensaios o teste, branco e padrão, a composição em cada tubo foi:

- Branco: 2000 uL reagente de cor (2)
- Padrão: 2000 uL reagente de cor (2) + 20 uL padrão (1)
- Teste: 2000 uL reagente de cor (2) + 20 uL da amostra

Em seguida os tubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. O nível de água do banho-maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos. Após foi realizada a leitura da absorbância do Padrão (AP) e do Teste (AT), zerando o aparelho com o Branco em 505 nm. A cor é estável por 30 minutos.

A metodologia obedece a lei de Lambert-Beer, e calculou-se a concentração do teste através do Fator de Calibração (FC). Seguindo as equações 1 e 2

$$FC = CP \div AP \quad (1)$$

$$CT \text{ em mg/dL} = FC \times AT \quad (2)$$

Sendo que: CP = Concentração do Padrão, AP = Absorbância do Padrão, CT = Concentração do Teste e AT = Absorbância do Teste

ANEXO C - FICHA TÉCNICA COMPOSIÇÃO DO PERMEADO DO SORO DE LEITE

Especificação Técnica



P1-ET-CQ-011 Revisão: 00
Data: 28/02/2024 Pág. 3/3

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL	
	100g
Valor energético (Kcal)	375
Carboidratos (g)	90,4
Açúcares totais (g)	90,4
Açúcares adicionados (g)	0
Maltose (g)	0
Lactose (g)	88,6
Sacarose (g)	0
Frutose (g)	0
Glicose (g)	0,4
Galactose (g)	1,4
Amido (g)	0
Proteínas (g)	2,49
Ácido Aspártico (mg)	53
Ácido Glutâmico (mg)	174
Alanina (mg)	34
Arginina (mg)	15
Cisteína (mg)	9
Fenilalanina (mg)	20
Glicina (mg)	64
Histidina (mg)	15
Isoleucina (mg)	34
Leucina (mg)	62
Lisina (mg)	53
Metionina (mg)	11
Prolina (mg)	58
Serina (mg)	31
Tirosina (mg)	10
Treonina (mg)	30
Triptofano (mg)	0
Valina (mg)	37
Gorduras totais (g)	0,4
Gorduras saturadas (g)	0,1
Gorduras trans (g)	0
Gorduras monoinsaturadas (g)	0
Ômega 9 (g)	0
Gorduras poli-insaturadas (g)	0
Ômega 6 (g)	0
Ômega 3 (g)	0
Colesterol (mg)	<2,0
Fibras alimentares (g)	ND*
Sódio (mg)	689
Cálcio (mg)	513
Ferro (mg)	0,25
Potássio (mg)	1489
Zinco (mg)	<0,5

*Análises realizadas de acordo com a RDC 429/2020
ND - Não Detectável
*Não é possível quantificar fibras na Matriz Soro de Leite em Pó e derivados com vistas sua natureza e composição.

Condições de Transporte e Armazenamento:

Armazenamento à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e calor, em local seco e arejado. O produto pode absorver odores, importante armazenar em um ambiente livre de odores fortes e outros contaminantes.

Transportar protegido contra umidade e calor, não devendo ser transportado com outros materiais que possam de alguma forma contaminar o produto.

Produto é paletizado em pallet de madeira descartável tipo PBR (1,00 x 1,20 metros), peso de 20 kg.

Cada pallet fechado de produto configura as quantidades citadas na tabela. A altura do pallet pode variar de 1,50 a 1,80 m de altura.

Peso/Unidade	Peso/Paleta	Distribuição dos Sacos	Total Sacos
25 kg	1.125 kg	5 por lastro em 9 camadas	45
1.000 kg	1.020 kg	01	01

