

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NICOLY KAROLINE KLEIN

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO LEITELHO DE MANTEIGA E DA ÁGUA DE  
FILAGEM PARA A PRODUÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE E ÁCIDO LÁTICO

PALOTINA

2025

NICOLY KAROLINE KLEIN

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO LEITELHO DE MANTEIGA E DA ÁGUA DE  
FILAGEM PARA A PRODUÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE E ÁCIDO LÁTICO

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Raquel Ströher

Coorientador: Prof. Dr. Luis Fernando Souza Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel

PALOTINA

2025

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

- K64 Klein, Nicoly Karoline  
Potencial biotecnológico do leite de manteiga e da água de filagem para a produção de  $\beta$ -galactosidase e ácido láctico / Nicoly Karoline Klein. – Palotina, PR, 2025.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Raquel Ströher.  
Coorientador: Prof. Dr. Luis Fernando Souza Gomes.  
Coorientador: Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel
1. Atividade enzimática. 2. Fermentação. 3. Substrato.  
I. Ströher, Raquel. II. Gomes, Luis Fernando Souza. III. Stremel, Dile Pontarolo. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDU 60

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NICOLY KAROLINE KLEIN**, intitulada: **Potencial biotecnológico do leiteiro de manteiga e da água de filagem para produção de  $\beta$ -galactosidase e ácido láctico**, sob orientação da Profa. Dra. RAQUEL STROHER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 25 de Fevereiro de 2025.

Assinatura Eletrônica

28/02/2025 13:25:24.0

RAQUEL STROHER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/02/2025 11:11:16.0

ELIANE HERMES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/02/2025 15:32:48.0

TANIA SILA CAMPIONI MAGON

Avaliador Externo

*Dedico este trabalho aos meus pais e irmã,  
por todo o exemplo, incentivo, amor e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me conceder força, sabedoria e perseverança para alcançar esta conquista.

Aos meus pais Teresa Reckzieguel Klein e Jacinto Zeferino Klein e minha irmã Michely Karine Klein, cuja dedicação e apoio incondicional tornaram possível a realização deste sonho.

Aos amigos, pelo suporte constante e pela compreensão nos momentos de ausência.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Raquel Ströher, pelo incentivo contínuo e pelas valiosas sugestões que não apenas enriqueceram este trabalho, mas também contribuíram para minha formação como estudante e pesquisadora.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luis Fernando Souza Gomes, pelo suporte e orientação.

Às Professoras Adriana Fiorini e Eliane Hermes por terem permitido o uso dos laboratórios e fornecido suporte para a realização de algumas das análises.

Ao Professor Dile Pontarolo Stremel pelas orientações e apoio na realização da análise estatística.

Às Professoras Tania Sila Campioni Magon e Eliane Hermes, por se disponibilizarem a avaliar e contribuir com este trabalho.

Aos colegas Mariana Nascimento Martins e Gabriel Luca de Lima e pelo apoio nas atividades laboratoriais, e a Gabrielli Maria Huff, pelo auxílio na identificação do microrganismo.

Agradeço também à Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, pelo ambiente enriquecedor e pelos recursos disponibilizados ao longo da minha pesquisa.

À cooperativa que forneceu o material essencial para a realização dos experimentos.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, muito obrigada.

"A verdadeira viagem do descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ver com novos olhos. "

**Marcel Proust**

## RESUMO

A água de filagem e o leite de manteiga são subprodutos agroindustriais gerados em volumes consideráveis durante a fabricação de manteiga e queijos de massa filada. A possibilidade de aproveitamento desses materiais está relacionada ao elevado valor nutricional de ambos, e além de promover a sustentabilidade ambiental, permite a obtenção de produtos de interesse, como o ácido láctico e a  $\beta$ -galactosidase, insumos essenciais das indústrias alimentícia e farmacêutica. Ambos são comumente obtidos através de fermentação microbiana. Nesse sentido, o estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico da água de filagem e do leite de manteiga como substratos para fermentação submersa utilizando uma bactéria da espécie *Leuconostoc lactis* como inóculo para a produção de ácido láctico e  $\beta$ -galactosidase. Para isso, inicialmente os subprodutos foram avaliados quanto à composição química. Diluições seriadas foram inoculadas em meio Man, Rogosa & Sharpe (MRS) para o isolamento microbiano e o isolado foi identificado através do sequenciamento da região 16S rRNA. Os produtos de interesse foram avaliados como variáveis resposta de um planejamento experimental do tipo fatorial  $2^3$  com quadruplicata no ponto central, tendo como variáveis independentes a composição do substrato (água de filagem e leite de manteiga), a temperatura (30 e 40 °C) e a suplementação com extrato de levedura (2 e 6 %), os frascos foram incubados sob agitação a 150 rpm, por 48 h e as amostras foram retiradas para quantificação da atividade enzimática, através do método Orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG), e produção de ácido láctico pela determinação da acidez titulável. Os melhores resultados para a atividade de  $\beta$ -galactosidase foram verificados nos ensaios 1 ( $1,64 \pm 0,06 \text{ U mL}^{-1}$ ) e 3 ( $1,34 \pm 0,17 \text{ U mL}^{-1}$ ), que correspondem as condições de ensaio, água de filagem a 30 °C com 2% de extrato de levedura e água de filagem a 30 °C com 6 % de suplementação. Enquanto para o ácido láctico as maiores produções foram verificadas nos ensaios 2 ( $5,43 \pm 0,23 \text{ g L}^{-1}$ ) e 4 ( $4,63 \pm 0,47 \text{ g L}^{-1}$ ) constituídos por leite de manteiga a 40 °C, com 6% de extrato de levedura e água de filagem a 40 °C com 2% de extrato de levedura. Adicionalmente, os dados experimentais foram submetidos a tratamentos estatísticos por meio de análise de variância (ANOVA) e regressão linear múltipla, possibilitando a obtenção de modelos matemáticos ajustados que descrevem significativamente a variabilidade observada nos intervalos avaliados. A abordagem também permitiu a detecção de possíveis curvaturas na relação entre as variáveis e a verificação da significância da falta de ajuste dos modelos aos dados observados. Desse modo, o estudo possibilitou o conhecimento das principais características da água de filagem e leite de manteiga, o isolamento e identificação da bactéria ácido láctica *Leuconostoc lactis*, e a avaliação da atividade enzimática e síntese do ácido láctico através da fermentação dos subprodutos de laticínio inoculados com a bactéria isolada.

Palavras-chave: *Leuconostoc lactis*; subproduto; substrato; fermentação; atividade enzimática.

## ABSTRACT

Stretching water and buttermilk are agroindustrial byproducts generated in considerable volumes during the production of butter and stretched-curd cheeses. The potential use of these materials is linked to their high nutritional value, which, in addition to promoting environmental sustainability, enables the production of value-added compounds such as lactic acid and  $\beta$ -galactosidase key inputs in the food and pharmaceutical industries. Both products are commonly obtained through microbial fermentation. Accordingly, this study aimed to evaluate the biotechnological potential of stretching water and buttermilk as substrates for submerged fermentation using a *Leuconostoc lactis* strain as inoculum for the production of lactic acid and  $\beta$ -galactosidase. To this end, the byproducts were initially analyzed for their chemical composition. Serial dilutions were inoculated into Man, Rogosa & Sharpe (MRS) medium for microbial isolation, and the isolate was identified through sequencing of the 16S rRNA region. The target products were evaluated as response variables in a full  $2^3$  factorial experimental design with four replicates at the central point. The independent variables considered were substrate composition (stretching water and buttermilk), temperature (30 °C and 40 °C), and yeast extract supplementation (2% and 6%). The flasks were incubated under agitation at 150 rpm for 48 hours, and samples were collected for enzymatic activity quantification using the ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) method, and lactic acid production was determined via titratable acidity. The best results for  $\beta$ -galactosidase activity were observed in assays 1 ( $1.64 \pm 0.06 \text{ U mL}^{-1}$ ) and 3 ( $1.34 \pm 0.17 \text{ U mL}^{-1}$ ), corresponding to stretching water at 30 °C supplemented with 2% and 6% yeast extract, respectively. Regarding lactic acid production, the highest values were obtained in assays 2 ( $5.43 \pm 0.23 \text{ g L}^{-1}$ ) and 4 ( $4.63 \pm 0.47 \text{ g L}^{-1}$ ), which used buttermilk at 40 °C with 6% yeast extract and stretching water at 40 °C with 2% yeast extract, respectively. Additionally, the experimental data were subjected to statistical analysis through analysis of variance (ANOVA) and multiple linear regression, allowing for the development of fitted mathematical models that significantly described the variability observed within the evaluated ranges. This approach also enabled the detection of potential curvature in the relationship between variables and the assessment of the significance of model lack-of-fit. Thus, the study provided insights into the main characteristics of stretching water and buttermilk, enabled the isolation and identification of the lactic acid bacterium *Leuconostoc lactis*, and assessed both enzymatic activity and lactic acid synthesis through the fermentation of dairy byproducts inoculated with the isolated strain.

Keywords: *Leuconostoc lactis*; byproduct; substrate; fermentation; enzymatic activity.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA DE FILAGEM.....	24
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DO LEITELHO DE MANTEIGA.....	27
TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO LEITELHO DE MANTEIGA E ÁGUA DE FILAGEM.....	42
TABELA 4 - PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> .....	46
TABELA 5 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2 <sup>3</sup> COM QUADRUPLICATA DO PONTO CENTRAL.....	46
TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA DE FILAGEM.....	52
TABELA 7 - CARACTERIZAÇÃO DO LEITELHO DE MANTEIGA.....	54
TABELA 8 - RESULTADO DO BLAST PARA O SEQUENCIAMENTO.....	57
TABELA 9 - RESULTADOS PARA A PRODUÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE E ÁCIDO LÁTICO, VARIAÇÃO DE pH E CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES DE ACORDO COM A MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2 <sup>3</sup> ..	63
TABELA 10 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES À ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO DE DIVERSOS SUBSTRATOS, COM DIFERENTES INÓCULOS MICROBIANOS COMPARADOS AOS OBTIDOS NESTE ESTUDO.....	65
TABELA 11 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES À SÍNTESE DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO DE DIVERSOS SUBSTRATOS, COM DIFERENTES INÓCULOS MICROBIANOS COMPARADOS AOS OBTIDOS NESTE ESTUDO.....	67
TABELA 12 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADOS COM <i>Leuconostoc lactis</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	69
TABELA 13 - ANOVA PARA ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM <i>Leuconostoc lactis</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	73
TABELA 14: ESTIMATIVA DOS EFEITOS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDAS PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE	

LATICÍNIO INOCULADOS COM <i>Leuconostoc lactis</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	75
TABELA 15 - ANOVA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDOS PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM <i>Leuconostoc lactis</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	80

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁTICO.....	35
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA LACTOSE.....	38
FIGURA 3 - GERAÇÃO DA ÁGUA DE FILAGEM DURANTE O PROCESSO PRODUTIVO DE QUEIJO MUSSARELA.....	41
FIGURA 4 - GERAÇÃO DO LEITELHO DURANTE A BATEÇÃO DO CREME PARA A PRODUÇÃO DE MANTEIGA.....	41
FIGURA 5 - PLACA DE ÁGAR CLED IMEDIATAMENTE APÓS A INOCULAÇÃO (A) E APÓS 48 HORAS DE CRESCIMENTO (B).....	58
FIGURA 6 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASE EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	59
FIGURA 7 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO ( $\text{g L}^{-1}$ ) E CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES ( $\text{g L}^{-1}$ ) EM FUNÇÃO DO TEMPO NOS SUBSTRATOS CONSTITUÍDOS POR A) MRS, B) LM, C) AF E D) AFLM.....	60
FIGURA 8 - AVALIAÇÃO DO pH EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA OS SUBSTRATOS A) MRS, B) LM, C) AF E D) AFLM.....	62
FIGURA 9 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DA ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM <i>Leuconostoc lactis</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	70
FIGURA 10 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM <i>Leuconostoc lactis</i> EM FUNÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO E SUBSTRATO INCUBADOS A) 30, B) 35 E C) 40 °C.....	71
FIGURA 11 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM <i>Leuconostoc lactis</i> EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E SUBSTRATO, COM SUPLEMENTAÇÃO EM A) 2, B) 4 E C) 6%..	72
FIGURA 12 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE	

LATICÍNIO INOCULADO COM <i>Leuconostoc lactis</i> EM FUNÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO E TEMPERATURA, NOS SUBSTRATOS A) AF, B) AFLM E C) LM.....	72
FIGURA 13 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDAS PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM <i>Leuconostoc lactis</i> CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES.....	76
FIGURA 14 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDO PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADOS COM <i>Leuconostoc lactis</i> EM FUNÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO E TEMPERATURA, NOS SUBSTRATOS A) AF, B) AFLM E C) LM.....	78
FIGURA 15 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDO PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADOS COM <i>Leuconostoc lactis</i> EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E SUBSTRATO, SUPLEMENTADOS COM A) 2, B) 4 E C) 6%.....	78
FIGURA 16 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDO PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADOS COM <i>Leuconostoc lactis</i> EM FUNÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO E SUBSTRATO, EM TEMPERATURAS DE A) 30, B) 35 E C) 40 °C.....	79

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.1.1 Objetivos geral.....	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
1.2 JUSTIFICATIVA.....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1 PRODUÇÃO E INDUSTRIALIZAÇÃO DE LEITE NO BRASIL.....	21
2.2 QUEIJOS.....	22
2.2.1 Queijos de massa filada.....	23
2.2.2 Água de filagem.....	23
2.3 MANTEIGA.....	25
2.3.1 Leitelho de manteiga.....	26
2.4 EFLUENTES DE LATICÍNIOS E SEUS IMPACTOS AMBIENTAIS.....	27
2.5 PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	29
2.6 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	32
2.6.1 <i>Leuconostoc</i> .....	33
2.7 ÁCIDO LÁTICO.....	34
2.8 ENZIMA LACTASE.....	38
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	40
3.2 COLETA E ACONDICIONAMENTO DO LEITELHO DE MANTEIGA E ÁGUA DE FILAGEM.....	40
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO LEITELHO DE MANTEIGA E ÁGUA DE FILAGEM....	42
3.4 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS.....	42
3.5 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO.....	43
3.6 TESTE DE PRODUÇÃO DE LACTASE.....	44
3.7 PROCESSO FERMENTATIVO.....	45
3.7.1 Preparo do inóculo.....	45

3.7.2 Substratos e condições de cultivo para a produção de $\beta$ -galactosidase e ácido láctico.....	45
3.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	46
3.9 ANÁLISES DAS VARIÁVEIS RESPOSTA.....	47
3.9.1 Atividade enzimática.....	47
3.9.2 Ácido Láctico.....	50
3.10 AVALIAÇÃO DOS DADOS ESTATÍSTICOS.....	50
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO.....	52
4.1.1 Caracterização da água de filagem.....	52
4.1.2 Caracterização do leite de manteiga.....	54
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO.....	56
4.3 PRODUÇÃO DE LACTASE.....	58
4.4 OBTENÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE E ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DA ÁGUA DE FILAGEM E LEITELHO DE MANTEIGA.....	58
4.4.1 Cinética da fermentação.....	58
4.4.2 Obtenção da $\beta$ -galactosidase, ácido láctico e consumo de açúcares redutores por meio do planejamento experimental fatorial $2^3$ com quadruplicata no ponto central.....	63
4.4.3 Variação de pH.....	68
4.4.4 Análise estatística dos dados.....	68
4.4.4.1 Obtenção da $\beta$ -galactosidase.....	69
4.4.4.2 Obtenção de ácido láctico.....	75
4.4.5 Avaliação do potencial de produção de $\beta$ -galactosidase e ácido láctico através da fermentação de leite de manteiga e água de filagem inoculados com <i>Leuconostoc lactis</i> .....	82
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>84</b>
5.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	85
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICE 1 – METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO</b>	

<b>LEITELHO DE MANTEIGA E ÁGUA DE FILAGEM.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE 2 – ANOVA - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2<sup>3</sup>.....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICE 3 – ANOVA - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2<sup>3</sup> COM 4 REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL.....</b>	<b>105</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro desempenha papel essencial na economia, destacando-se na produção global, no setor leiteiro. A taxa média anual de desenvolvimento na bovinocultura de leite é 4 %, responsável pela produção de mais de 34 bilhões de litros de leite anualmente (Oliveira, 2024).

No que se refere à indústria de laticínios, além da matéria prima ser líquida, o beneficiamento do leite exige elevado consumo de água, resultando na geração de grandes volumes de efluentes. O efluente gerado pelo setor é considerado um dos principais responsáveis pela poluição ao meio ambiente (Silva, 2024).

Os impactos ambientais negativos observados em função dos processos industriais e das etapas de tratamento de efluentes, quando não realizados de forma adequada, são variados, e podem influenciar nas esferas terrestre, através da contaminação do solo, aquática, ao degradar corpos hídricos receptores afetando os ecossistemas e a qualidade da água, e atmosférica, pela emissão de gases (Silva, 2024; Souza, 2021).

Em muitos laticínios a grande maioria dos subprodutos são descartados junto aos demais efluentes, sendo um forte agravante às condições do tratamento, como também ao meio ambiente. Tal fato é devido ao seu elevado potencial poluidor que está relacionado às altas concentrações de matéria orgânica, elevada carga de nutrientes e grandes concentrações de sólidos (Oliveira, 2022).

Além disso, o soro, o leitelho, a água de filagem e o leite ácido, em função de suas características químicas, não devem ser misturados aos demais efluentes provenientes da industrialização do leite. Eles devem ser captados e conduzidos separadamente, de modo a viabilizar seu aproveitamento na planta ou para outra finalidade, com ou sem beneficiamento (Oliveira, 2022).

Dentre os subprodutos citados, a água de filagem é obtida na produção de queijos de massa filada, como a mussarela e o provolone. Esses queijos passam por uma etapa de filagem, em que a massa é esticada em água sob altas temperaturas, entre 65 e 75 °C. Neste procedimento, ocorre a perda de vários constituintes como gordura, proteínas e nutrientes (Oliveira, 2022). Já o leitelho é resultante da fabricação de manteiga, gerado durante a etapa de bateção do creme. Nele, os glóbulos de gordura se agrupam, separando a fase líquida, leitelho, da fase sólida, gordura (Pereira, 2022).

Ambos os subprodutos possuem grande potencial para reutilização e reaproveitamento, reduzindo o impacto ambiental das indústrias de laticínios, contribuindo para sua eficiência econômica, e promovendo a economia circular. Alguns autores citam suas aplicações no preparo de alimentos, formulação e incorporação em derivados lácteos, panificação, nutrição animal, produção de biogás, além de outras utilizações biotecnológicas (Oliveira, 2022; Machado; Ramos; Antunes, 2022; Pereira, 2022).

Apesar de seu potencial, esses efluentes são pouco aproveitados pelas indústrias de laticínios no Brasil, possivelmente em função das restrições, ou falta de clareza, impostas pelas legislações, pela falta de regulamento técnico de identidade e qualidade desses itens, assim como, pela escassez de publicações científicas sobre seu reaproveitamento, composição e propriedades físico-químicas (Pereira, 2022).

Diante desse cenário, evidencia-se a necessidade de estratégias de gestão desses subprodutos, que garantam a sustentabilidade do setor e otimizem a utilização de recursos, reduzindo desperdícios e impactos negativos ao meio ambiente. Nesse contexto, sua utilização como substrato para o desenvolvimento de microrganismos, visando a obtenção de produtos de interesse industrial ou biotecnológico, emerge como uma alternativa altamente promissora.

Dentre os microrganismos com potencial biotecnológico para a transformação desses subprodutos estão as bactérias ácido-lácticas (BAL's) que são classificadas como Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS - Generally Recognized as Safe), pela Food and Drug Administration (FDA), destacando sua relevância e segurança para a obtenção de produtos de interesse (Lahtinen *et al.*, 2012).

Além disso, elas fazem parte da microbiota natural do leite, o que significa que são bem adaptadas a esse ambiente, e podem ser obtidas de derivados, subprodutos e efluentes de laticínios. São capazes de utilizar a lactose como principal fonte de carbono, viabilizando a metabolização de compostos como o ácido láctico (principal metabólito proveniente da fermentação de carboidratos), além de enzimas como proteases, amilases e lipases (Vieira *et al.*, 2022).

O ácido láctico é um líquido viscoso que possui dois isômeros ópticos. O isômero L tem diversas aplicações nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de polímeros. A produção do isômero de interesse é frequentemente realizada por meio da rota fermentativa, que proporciona maior seletividade para a produção do

isômero. Entretanto, uma das principais desvantagens desta rota é o alto custo em matérias primas, como a glicose. Nesse contexto, a utilização de resíduos de baixo valor, provenientes da agroindústria, surge como uma alternativa promissora, proporcionando a sustentabilidade ambiental e econômica (Conrad, 2023; Silva, 2020).

Assim como o ácido láctico, a enzima  $\beta$ -galactosidase apresenta grande potencial de aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica, além de ser útil na remediação. Essa enzima catalisa a hidrólise da lactose, convertendo-a em glicose e galactose, e pode ser obtida a partir de diversas espécies de microrganismos, como fungos, leveduras, bactérias, bem como de fontes animais, frutos e plantas. As  $\beta$ -galactosidases de origem microbiana são as mais valorizadas a nível industrial, devido à sua segurança para o consumo e maior rendimento. Nesse contexto, pesquisas voltadas à redução de custos de produção da enzima, assim como à viabilização de meios alternativos, livres de patógenos e outras limitações, são essenciais para o avanço no cenário atual (Murador, 2020).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivos geral

Avaliar a produção de  $\beta$ -galactosidase e ácido láctico utilizando água de filagem e leiteiro de manteiga como meio de cultivo para o crescimento de microrganismo isolado do próprio subproduto.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar caracterização do leiteiro de manteiga e da água de filagem quanto à sua composição e potencial poluidor;
- Isolar e identificar bioquímica e geneticamente microrganismos do leiteiro de manteiga e água de filagem;
- Avaliar o tempo de fermentação através do acompanhamento da cinética de consumo de açúcares redutores e produção de ácido láctico;
- Avaliar a produção de  $\beta$ -galactosidase e ácido láctico, utilizando água de filagem e leiteiro de manteiga na composição do meio de cultura, inoculado

com microrganismo isolado do próprio subproduto;

- Avaliar a influência da composição do meio de cultivo, temperatura e suplementação com extrato de levedura, através de um planejamento experimental fatorial  $2^3$  com 4 repetições no ponto central, na produção enzimática e de ácido láctico.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A cadeia produtiva do leite e derivados é uma das principais atividades econômicas do Brasil, posicionando o país como um dos maiores produtores do mundo. Nas últimas décadas, a produção de leite cresceu cerca de 80 %, e, em consequência da produção e industrialização, houve aumento significativo dos efluentes gerados no processo, que são considerados potenciais poluidores quando descartados no ambiente sem o tratamento adequado (Rocha; Carvalho; Rezende, 2020; Viana *et al.*, 2021).

Por outro lado, esses efluentes possuem elevado teor nutricional em sua composição, podendo ser considerados subprodutos, interessantes para aplicações no desenvolvimento de novos produtos. Nesse contexto, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para comprovar sua aplicabilidade, mas ainda assim, comparado ao volume gerado, seu aproveitamento e valorização são insignificantes (Lira; Chinelate, 2020).

A produção de ácido láctico e  $\beta$ -galactosidase usando substratos alternativos, como o leiteiro e água de filagem, não só reduz custos e minimiza desperdícios, como também promove o reaproveitamento dos mesmos, alinhando-se com as práticas de economia circular e sustentabilidade ambiental. Além disso, essa abordagem pode resultar em produtos de alto valor agregado, com amplo potencial de aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e biotecnológica, impulsionando a inovação e a eficiência no setor de laticínios (Lauffer, 2019; Murador, 2020).

Atualmente, no Brasil, o ácido láctico 85 % é comercializado a valores entre R\$ 40,00 e R\$ 200,00 o litro, e a  $\beta$ -galactosidase com atividade de 5.000 unidades por grama possui valor de aproximadamente R\$ 1.000,00. A precificação desses produtos varia conforme a origem, grau de pureza, apresentação, fornecedor e quantidades adquiridas (Indupropil, 2025; Synth, 2025; Sinapse Biotecnologia,

2025).

Em contra partida, os subprodutos de laticínios demandam investimentos, relacionados ao seu frete e destinação, representando despesas elevadas as indústrias geradoras, especialmente considerando que a proporção de leiteiro gerado em relação a manteiga é de aproximadamente 50 % (Teixeira *et al.*, 2020) e de água de filagem são gerados ao menos 2,5 vezes o peso da coalhada produzida (Sabioni, 2018; Zisu; Shah, 2007).

Nesse contexto, é possível afirmar que o estudo do emprego desses subprodutos para obtenção de produtos de interesse é de grande relevância e contribui com vários dos objetivos do desenvolvimento sustentável, estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU) através da Food and Agriculture Organization (FAO, 2021), dentre os quais saúde e bem estar (ODS 3), água potável e saneamento (ODS 6), consumo e produção responsáveis (ODS 12), ação contra a mudança global do clima (ODS 13), vida na água e terrestre (ODS 14 e 15).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUÇÃO E INDUSTRIALIZAÇÃO DE LEITE NO BRASIL

O Brasil ocupa a terceira posição mundial na produção de leite, com mais de 34 bilhões de litros produzidos anualmente, o que faz desse setor uma das principais atividades econômicas do país (Brasil, 2025). Em 2024, o valor bruto da produção leiteira alcançou R\$ 65,8 bilhões, ocupando a sétima posição referente ao valor bruto da produção agropecuária nacional, correspondendo a 5,4 % do valor total do país. Na indústria de laticínios, o faturamento líquido mais do que dobra esse valor (O Presente Rural, 2025).

Dentro desse contexto, Minas Gerais se destacou como o maior produtor de leite do país, com um valor bruto de produção de R\$ 16,8 bilhões. O Paraná, um dos principais pólos leiteiros, seguiu em segundo lugar, com R\$ 9,7 bilhões, sendo reconhecido, especialmente, por seus investimentos em avanços e práticas sustentáveis. Em terceiro lugar, Santa Catarina contribuiu com R\$ 8,2 bilhões, seguida pelo Rio Grande do Sul (R\$ 7,3 bilhões) e São Paulo (R\$ 5,6 bilhões), que também figuraram entre os maiores produtores de leite no país (O Presente Rural, 2025).

O setor tem impacto considerável na geração de empregos e renda. A produção de leite envolve mais de um milhão de produtores rurais, além de proporcionar milhões de empregos nos diferentes segmentos que integram a cadeia produtiva (Brasil, 2025; Rocha; Carvalho; Rezende, 2020).

A cadeia produtiva do leite abrange desde a produção do leite no campo, passando pelo processamento e industrialização para a transformação em diversos produtos lácteos, até a sua distribuição aos consumidores finais (Gonçalves; Montebello; Santos, 2023). O leite é uma matéria prima extremamente versátil, podendo ser utilizado na forma fluida ou em pó, pasteurizado, ultrapasteurizado, fermentado, na produção de queijos e requeijões, sorvetes, doces de leite, leite condensado, creme de leite, iogurtes, manteigas, e outros (Siqueira, 2021).

Dada a versatilidade do leite e o crescimento expressivo em sua produção, empresas e cooperativas de laticínios, como Laticínios Bela Vista, Nestlé, Aurora, Lactalis e outros, têm ampliado a captação de leite e suas operações, contribuindo para a consolidação da cadeia produtiva de leite e derivados (Vasconcelos, 2024).

Esses laticínios desempenham papel fundamental na indústria alimentícia, atendendo tanto o mercado interno quanto o externo, com uma vasta gama de produtos lácteos como o leite condensado, que é um dos mais exportados, os queijos, sendo os produtos mais consumidos no mercado interno, e a manteiga, cujo consumo tem aumentado, especialmente em função de mudanças nos hábitos alimentares e percepção sobre saúde dos consumidores (Embrapa, 2020; Siqueira, 2021).

## 2.2 QUEIJOS

O Brasil é um dos maiores produtores de queijo do mundo, com uma produção anual que supera 1,5 milhão de toneladas (Sugestão nº 34, 2023).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, 1952) do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), queijos são produtos frescos ou maturados obtidos pela separação parcial do soro do leite, leite reconstituído ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas, ácidos orgânicos, com ou sem agregação de substâncias alimentícias, especiarias, condimentos, substâncias aromatizantes e corantes.

A legislação complementa essa definição, reservando o nome queijo exclusivamente aos produtos cuja base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de outra origem (Brasil, 1996).

Segundo o Grupo Bela Vista (2024), existem mais de mil variedades de queijos. Conforme a Portaria nº 146, de 7 de março de 1996, eles podem ser classificados de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, o conteúdo de umidade e a submissão ou não a tratamento térmico logo após a fermentação, não impedindo classificações mais específicas, conforme as características de cada variedade de queijo, como textura, tipo de leite/matéria prima utilizada, maturação, entre outras (Brasil, 1996).

De acordo com as texturas dos queijos, eles podem ser classificados em queijos frescos, queijos de massa mole, mofo branco, croûte fleurie ou natural lavada, queijos de massa mole, casca natural lavada, queijos de massa prensada não cozida, queijos de massa prensada cozida, queijos de mofo azul, queijos de massa filada, queijos fundidos ou processados, além dos queijos produzidos com leite de ovelha ou cabra (Furtado, 2016; Grupo Bela Vista, 2024).

### 2.2.1 Queijos de massa filada

A mussarela é um exemplo clássico de queijo de massa filada, sendo um dos queijos mais produzidos e consumidos no Brasil e no mundo. Ela possui teor relativamente alto de gordura e proteínas, apresenta massa macia, elástica e suave, textura cremosa e sabor ligeiramente ácido com uma leve doçura. É amplamente utilizada em pratos quentes, pois apresenta boa capacidade de derretimento e elasticidade quando aquecida, mas também é consumida como aperitivo, em saladas e pratos frios (Furtado, 2016; Monteiro, 1999).

O derretimento e elasticidade desse tipo de queijo, quando aquecido, é resultado do processo de filagem. A fabricação da mussarela envolve várias etapas, dentre as quais a filagem, que é um tratamento térmico, normalmente realizado em água, após a fermentação da massa (Furtado, 2016).

Para a produção da mussarela, inicialmente, o leite é pasteurizado a 75 °C por 15 segundos e a gordura é padronizada para 2,9 a 3,1%. A temperatura do leite é então ajustada para em torno de 37 °C a fim de estimular o desenvolvimento dos cultivos termofílicos, e o fermento é adicionado. O cloreto de cálcio e o coalho, geralmente contendo quimosina, são incorporados coagulando o leite em 25 a 35 minutos. Em seguida, a massa é cortada em cubos, aquecida até 43 °C e agitada até a obtenção do ponto desejado (Furtado, 2016; Monteiro, 1999; Silva, 2016).

Dado o ponto da massa, ela é transferida para a drenoprensa, onde é pré-prensada por aproximadamente 15 minutos. Seguindo para a fermentação que ocorre até que a massa atinja pH de 5,05 a 5,15. Na sequência a massa é filada em temperatura de aproximadamente 58 °C (Furtado, 2016; Silva, 2016).

Posteriormente, é moldada e resfriada em água gelada, seguida por imersão em salmoura a 20% de sal, onde permanece por em torno de 20 horas. Após a salmoura, o queijo é seco e embalado, para finalmente ser distribuído aos consumidores (Furtado, 2016).

### 2.2.2 Água de filagem

Nas grandes indústrias de laticínios, na etapa de filagem, são utilizadas filadeiras automáticas, que combinam a aplicação de força mecânica com o uso de água para facilitar o estiramento da massa de queijo (Oliveira, 2022).

Essa etapa é primordial para a produção de queijos de qualidade. Nesse sentido, a temperatura da água deve ser suficiente para que a transferência do calor da água para a massa proporcione ao queijo as características desejadas. Além disso, é fundamental manter um equilíbrio osmótico entre a massa e a água, para que a massa não perca seus constituintes, em função da saturação da água. Portanto, é necessário realizar trocas periódicas da água (Oliveira, 2022; Furtado, 2016).

As perdas de gordura, proteínas, sais minerais e vitaminas, para a água de filagem dependem de diversos fatores, como o teor de gordura da massa, o grau de acidificação e desmineralização, a temperatura de filagem, a intensidade do trabalho mecânico, e o volume e regime da água quente utilizada. Nesse contexto, sempre que há acúmulo considerável de gordura no tanque de recirculação, a água é renovada. Conseqüentemente, nesse processo, gera-se um subproduto ou efluente, de elevada carga orgânica (Furtado, 2016; Monteiro, 1999).

A variabilidade do volume de água do tanque de recirculação, associado ao porte e volume de produção do laticínio, são alguns dos principais fatores relacionados à quantidade de água de filagem gerada, bem como à composição da mesma. Em função dos processos em que a água de filagem é gerada, sua composição pode ser comparada à composição do soro (Oliveira, 2022; Pizaia *et al.*, 2003).

Na Tabela 1 encontram-se algumas das principais características relacionadas à composição da água de filagem.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA DE FILAGEM

Parâmetros	Ferreira, (2004)	Pizaia <i>et al.</i> , (2003)	Oliveira, (2022)
pH	-	4,62	4,63
Acidez (°D)	-	6,15	4,77
Teor de gordura (%)	0,37	0,90	14,25
Teor de proteínas (%)	0,0,9	0,4	1,15
Sólidos totais (%)	0,755 ± 0,041	-	-

FONTE: A autora (2025).

Embora o volume de água utilizado no processo de filagem seja variado em função das particularidades dos processos e variabilidade das matérias primas, normalmente são empregados em torno de 2,5 vezes o peso da coalhada em volume de água (Sabioni, 2018; Zisu; Shah, 2007).

O estado do Paraná é o segundo maior produtor de leite, sendo responsável

pela produção de mais de 14 % do volume total produzido no país. Atualmente são processados mais de 12 milhões de litros por dia em território estadual, dos quais 5 milhões são destinados à fabricação de queijos. Considerando que quase 50 % do mix de produtos lácteos do Estado correspondem à mussarela, é razoável estimar que ao menos 2,5 milhões de litros são destinados diretamente à produção de queijos de massa filada, gerando aproximadamente 250 mil kg de queijo e mais de 50 mil litros de água de filagem (CNA, 2024; IDR-Paraná, 2024).

Atualmente, em função do volume gerado desse subproduto e seu impacto no sistema de tratamentos, laticínios de médio e grande porte destinam o mesmo especialmente para a alimentação animal *in natura*, enquanto os pequenos laticínios que geram volumes menores destinam juntamente aos efluentes gerados no processo produtivo (Pizaia *et al.*, 2003).

Considerando suas características associadas aos seus efeitos prejudiciais ao ambiente, e tendo em conta os volumes gerados do efluente, evidencia-se o potencial competitivo como subproduto para aplicações que minimizem seus impactos ambientais, promovendo a obtenção de produtos de interesse. De acordo com sua composição, a água de filagem pode ter aplicações similares às do soro, a exemplo na produção de bebidas lácteas e produtos de panificação (Oliveira, 2022).

### 2.3 MANTEIGA

A manteiga é um derivado lácteo gerado do processamento do creme de leite. Trata-se do produto gorduroso obtido exclusivamente da bateção e malaxagem, com ou sem modificação biológica do creme pasteurizado derivado exclusivamente do leite de vaca, por processos tecnologicamente adequados. Nesse caso, a matéria gorda da manteiga deverá estar composta exclusivamente por gordura láctea (Brasil, 1996).

Além da gordura como principal componente da manteiga, há outros componentes como água, proteínas, vitaminas, ácidos, lactose e cinzas, e pode ou não conter sal. Portanto, trata-se de um produto versátil e de alto valor nutritivo (Silva, 1996).

Para produção da manteiga, o creme, obtido do desnate do leite, é padronizado para que apresente 35 a 40 % de gordura, neutralizado para 15 a 20 °D de acidez e pasteurizado a temperaturas de 75 a 80 °C por 10 a 15 segundos (Silva,

1996).

Posteriormente, o creme é armazenado e pode ou não ser maturado através da adição de fermentos. O creme é então resfriado para a batidura, etapa esta que ocorre em temperatura de 8 a 13 °C durante 20 a 40 minutos. Nela ocorre a união dos glóbulos de gordura, formando os grãos de manteiga, e a separação da fase líquida, o leitelho (Silva, 1996).

O leitelho, efluente líquido gerado do processo, é então descartado por uma tela localizada no inferior da bateadeira. Comumente faz-se duas lavagens da manteiga com água gelada para a remoção completa do leitelho, e, opcionalmente realiza-se a adição de sal (Silva, 1996).

Em seguida, ocorre a etapa de malaxagem, em que os grãos de manteiga são amassados até formar uma massa elástica, homogênea e uniforme, e, posteriormente, a manteiga é embalada e armazenada (Silva, 1996).

### 2.3.1 Leitelho de manteiga

Considerando os processos industriais de produção de manteiga, o leitelho gerado pode ser doce proveniente da bateção do creme de leite, sem esse passar por um processo de maturação biológica, ou ácido, oriundo da bateção de creme de leite maturado por bactérias ácido lácticas (Pereira, 2022).

Na indústria de laticínios a proporção de leitelho gerado em relação a manteiga é de aproximadamente 50 % (Teixeira *et al.*, 2020), o que significa que, para cada 1000 litros de creme processados são produzidos aproximadamente 500 litros de manteiga e gerados em torno de 500 litros de leitelho. Além disso, posteriormente à retirada do leitelho, são realizadas ao menos duas lavagens, empregando aproximadamente 1000 litros de água, que também são descartados.

Em 2023, o Brasil produziu aproximadamente 113 mil toneladas de manteiga, representando 2,3 % da produção mundial e posicionando o país como o 17º maior produtor do mundo. Considerando que apenas de 50 % do volume de creme batido é transformado em manteiga, volume similar foi gerado de leitelho (Atlasbig, 2023).

O leitelho é um efluente líquido rico em carga orgânica, com valores de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de em torno de 80.450,00 mg L<sup>-1</sup> e Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 120.900,00 mg L<sup>-1</sup>, que, se descartado de forma inadequada, pode ser considerado um importante poluidor hídrico (Freixo,

2011; Teixeira *et al.*, 2020).

No entanto, trata-se de um subproduto de alto valor nutricional, cuja composição centesimal é similar à do leite desnatado. Além disso, o material possui a vantagem de ser rico em fosfolipídios e proteínas provenientes das membranas dos glóbulos de gordura liberados durante a coalescência induzida no processo de bateção, o que pode torná-lo atrativo dependendo da aplicação (Machado; Ramos; Carvalho-Antunes, 2022; Santa-Rosa; Pires, 2021).

Na Tabela 2 a seguir encontram-se dados referentes à composição do leiteiro de manteiga.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DO LEITELHO DE MANTEIGA

Parâmetros	Lemos; Melo; Santos, (2018)	Monteiro; Gomes (2018)
pH	6,81 ± 0,15	6,51 ± 0,01
Umidade (%)	93,95 ± 0,03	-
Cinzas (%)	0,34 ± 0,13	-
Densidade (g/mL)	1,02 ± 0,23	1,016
Acidez titulável (ácido láctico - g/100g)	1,04 ± 0,01	-
Açúcares totais (%)	7,43 ± 0,45	-
Açúcares redutores (%)	2,61 ± 0,19	-
Lactose (g L <sup>-1</sup> )	16,13 ± 2,32	-
Carboidratos (%)	1,70 ± 0,47	-
Lipídios (%)	0,67 ± 0,28	0,4
Proteínas (%)	3,39 ± 0,28	1,76
Sólidos Totais (%)	6,04 ± 0,12	4,34
Fosfolipídios (g L <sup>-1</sup> )	0,14 ± 0,65	-

FONTE: A autora (2025).

Nesse sentido, a aplicação do leiteiro de manteiga para a obtenção de novos produtos na indústria alimentícia, como leites fermentados, bebidas lácteas, iogurtes, queijos fundidos, ricotas, sorvetes, na panificação, produção de biscoitos, panquecas, *waffles*, bolos, além da aplicação para obtenção de bioprodutos, como amidos, maltodextrinas, gelatinas, goma arábica e na microencapsulação de óleos e gorduras, é uma maneira de contribuir com a sustentabilidade ambiental, reduzir gastos com tratamentos de efluentes e ainda aumentar o faturamento das indústrias (Barukčić; Jakopović; Božanić, 2019; Teixeira *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

## 2.4 EFLUENTES DE LATICÍNIOS E SEUS IMPACTOS AMBIENTAIS

A indústria de laticínios é responsável por consumir grandes volumes de água em suas operações, em torno de 4,4 litros de água por litro de leite processado.

Além disso, cada litro de leite transformado em queijo produz, em média, 900 mL de soro, portanto, um litro de leite processado gera em torno de 5,3 litros de efluente contendo resíduos de leite e seus derivados, além de produtos de limpeza (Silva; Siqueira; Nogueira, 2018).

Os efluentes líquidos gerados nos laticínios possuem elevados teores de matéria orgânica, gorduras, lactose, proteínas, sólidos suspensos e nutrientes. Para mais, alguns laticínios optam pelo descarte de subprodutos (soro, leitelho e água de filagem) diretamente no sistema de tratamento de efluentes. Tal prática sobrecarrega o sistema e conseqüentemente gera ineficiência e encarece o processo de tratamento, dificultando o atendimento aos padrões legais para o lançamento de efluentes no corpo receptor (Santos; Silva; Santos, 2022; Silva; Siqueira; Nogueira, 2018).

No Brasil, a Resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) normatiza o lançamento de efluentes nos rios (Brasil, 2011), sendo estabelecido pH do efluente tratado entre 5 e 9, temperatura inferior a 40 °C, concentração de materiais sedimentáveis de no máximo até 1 mL L<sup>-1</sup>, e Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO<sub>5</sub> a 20 °C no máximo de 120 mg L<sup>-1</sup>.

Os lançamentos também devem atender a Resolução CONAMA nº 357 que dispõe sobre a classificação dos corpos d'água (Brasil, 2005), bem como, a respectiva resolução estadual, considerando o local de instalação da planta, e Outorga de lançamento, seguindo sempre os valores mais restritivos. No estado do Paraná, a resolução SEMA n ° 021/09 estabelece os padrões de lançamento e do automonitoramento, sendo a DBO<sub>5</sub> até 90 mg L<sup>-1</sup>, a DQO até 225 mg L<sup>-1</sup>, óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg L<sup>-1</sup> e óleos minerais até 20 mg L<sup>-1</sup> (SEMA, 2009).

Quando não respeitados os limites estabelecidos pelas legislações vigentes, para o lançamento de efluentes líquidos, os mesmos são responsáveis por alterar a qualidade das águas, causando danos como a eutrofização e perda de biodiversidade aquática, podendo inclusive inviabilizar o uso múltiplo da água a jusante do lançamento, comprometer a qualidade do solo e ainda causar prejuízos à saúde pública (Azzolini; Fabro, 2013).

Nesse cenário, evidencia-se a necessidade de redução do volume de efluentes gerados por indústrias de laticínios, bem como, de estudos que contribuam com o reaproveitamento dos subprodutos e tratamento de seus despejos. Apesar da

iniciativa dessas indústrias de transformar o soro de leite em ingredientes de valor agregado, que são aproveitados na indústria alimentícia, em produtos lácteos, cárneos, de bebidas e panificação, e em outras indústrias por seus atributos nutricionais e funcionais, o leite e a água de filagem ainda são pouco explorados, sendo frequentemente destinados *in natura* à nutrição animal (Sousa; Borges, 2023).

Nesse contexto, a utilização desses subprodutos como substratos em processos fermentativos para a produção de produtos de interesse às indústrias alimentícia e farmacêutica, surge como uma estratégia para agregar valor aos mesmos e para reduzir os impactos ambientais associados ao descarte inadequado deles (Cancellata *et al.*, 2024; Camêlo, 2021; Oliveira, 2022).

## 2.5 PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos consistem na transformação do substrato, através de microrganismos e suas atividades metabólicas, objetivando a obtenção de biomassa microbiana, bioprodutos, dentre os quais enzimas, antibióticos, pigmentos, e outros biocompostos, ou ainda a conversão de um substrato em outro (Della-Flora; Dupont, 2024; Malajovich, 2016; Schmidell *et al.*, 2021).

Para esses processos, é essencial que os substratos possuam os nutrientes requeridos e que estes estejam em concentrações apropriadas, considerando as necessidades metabólicas dos microrganismos e os objetivos específicos do processo (Schmidell *et al.*, 2021).

A composição do meio de cultura, em geral deve conter: água; fonte de energia e carbono, podendo ser glicose, amido, ou outra; fonte de nitrogênio, que pode ser inorgânica (sulfato de amônia, nitrato de potássio, e outros), orgânica (asparagina, succinato de amônia, glutamato, ureia, entre outros) ou complexa, (farinha de soja, peptona, etc); sais minerais, tais como fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, e demais; além de elementos como ferro, zinco, manganês, cobre, cobalto, molibdênio, e outras (Malajovich, 2016).

Os substratos convencionais, contendo fontes de carbono como glicose, sacarose e amido, podem representar até 70% do custo do produto final do processo fermentativo. Em função disso, fontes alternativas têm sido investigadas, com o objetivo de substituir ou complementar esses substratos (Woiciechowski *et al.*, 2013).

Nesse contexto, resíduos agroindustriais como soro de leite, melaço de cana ou de beterraba, amido de milho, entre outros, podem ser aproveitados, viabilizando a obtenção de etanol, biodiesel, cogumelos comestíveis, aditivos alimentares, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, aromas, pigmentos, espessantes, conservantes, antimicrobianos, antitumorais, antioxidantes, enzimas com aplicações em indústria de alimentos, química, farmacêutica, têxtil, de papel e celulose, e outras (Malajovich, 2016; Woiciechowski *et al.*, 2013).

Para o processo de fermentação, é possível utilizar tanto um único substrato quanto substratos complexos, ou suplementados. Estes substratos podem ser fermentados por um único microrganismo ou por um consórcio de microrganismos de diferentes espécies, dependendo das condições e do objetivo da fermentação (Della-Flora; Dupont, 2024).

A suplementação dos substratos entra como uma ferramenta para otimizar o crescimento dos microrganismos, por proporcionar o aumento da disponibilidade de nutrientes, além de maximizar a produção dos compostos desejados, inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis, aprimorar a resposta ao estresse e ainda melhorar a eficiência dos processos, reduzindo os tempos de fermentação (Êxodo Científica, 2020).

A escolha do microrganismo leva em consideração suas vias metabólicas, e as condições de cultivo. Para garantir a viabilidade econômica do processo, o microrganismo deve ser capaz de se multiplicar rapidamente, produzindo uma grande quantidade do produto desejado a partir de matérias-primas de baixo custo (Malajovich, 2016).

Para atender a esses critérios, bancos e coleções de culturas vendem linhagens de microrganismos puros e geneticamente estáveis, adequados para cultivo em grande escala. Nas linhagens industriais, algumas vias metabólicas são alteradas com o intuito de otimizar a produção do produto desejado, ao mesmo tempo em que se minimiza a formação de substâncias indesejadas (Malajovich, 2016).

Além do substrato e do microrganismo a ser inoculado, o biorreator deve ser propício ao crescimento celular e a síntese do bioproduto de interesse. Ele deve garantir aeração e homogeneização adequadas do meio, além de ser passível de esterilização. Também é fundamental que o biorreator possibilite a manutenção de condições ideais, como pH, temperatura e outras variáveis do processo, e assegure

a adição de nutrientes e aditivos, de modo a otimizar a eficiência da fermentação (Malajovich, 2016; Schmidell *et al.*, 2021).

Nos processos fermentativos, o pH é uma variável importante pois está intimamente relacionada ao desenvolvimento de microrganismos que possuem faixas de pH ideal para o seu crescimento e atividade metabólica. A maioria dos microrganismos tem seu ótimo em torno da neutralidade. Muitos processos fermentativos, entretanto, são executados por microrganismos que se desenvolvem melhor em valores de pH ácido, em torno de 5 (Aquarone *et al.*, 2001).

O pH, quando fora da faixa ótima, pode desacelerar ou inibir o crescimento microbiano e inclusive afetar a estrutura de proteínas, sendo responsável pela desnaturação e perda de atividade enzimática. Além disso, o pH em faixas adequadas ajuda a inibir o crescimento de microrganismos indesejados, atua sobre a solubilidade de nutrientes e substâncias, e pode interagir com outros parâmetros do processo. Seu controle é importante, pois a diminuição do pH pode inibir o crescimento das células microbianas limitando a reação (Della-Flora; Dupont, 2024).

A temperatura, assim como o pH, é um parâmetro fundamental para o desenvolvimento dos microrganismos em processos fermentativos. Para os microrganismos, existe a temperatura mínima, abaixo da qual não há crescimento, a temperatura máxima, acima da qual não há crescimento e a temperatura ótima, em que o crescimento é máximo. Microrganismos mesófilos, como as BAL, são capazes de crescer em temperaturas moderadas, geralmente entre 20 e 40 °C (Aquarone *et al.*, 2001).

A temperatura ainda tem impacto direto na velocidade das reações enzimáticas. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade de reação. No entanto, quando muito elevadas, podem resultar na desnaturação das enzimas, prejudicando sua estrutura tridimensional, tornando-as inativas e incapazes de catalisar reações (Della-Flora; Dupont, 2024).

A agitação também desempenha papel crucial nos processos fermentativos, sendo responsável pela homogeneização dos nutrientes no meio de cultura e dispersão dos produtos metabólicos e microrganismos. Contribui ainda para a aeração do meio, favorecendo a troca de gases (Aquarone *et al.*, 2001). Em contrapartida, a agitação excessiva pode ocasionar a formação excessiva de espuma, comprometendo a eficiência do processo e ocasionando perdas de produto, além de gerar estresse mecânico para os microrganismos, afetando negativamente seu

crescimento e a produção dos produtos de interesse (Della-Flora; Dupont, 2024).

Desse modo, os parâmetros de operação devem ser rigorosamente controlados para assegurar a eficiência do processo e obtenção dos produtos de interesse, sem prejudicar as condições ideais para o desenvolvimento dos microrganismos (Schmidell *et al.*, 2021).

Os processos fermentativos podem ser conduzidos de maneira descontínua (batelada), contínua, ou descontínua-alimentada, bem como por variações destes, sendo realizados de acordo com os objetivos da fermentação e considerando a inibição pelo substrato e produto, bem como a manutenção da assepsia. Em sistemas descontínuos, os fermentadores são carregados com matéria-prima e inóculo e a fermentação prossegue até o esgotamento dos nutrientes. Finalmente os produtos são extraídos, os fermentadores são esvaziados, limpos e esterilizados. Já em processos contínuos, ocorre o acréscimo de nutrientes e a retirada de produtos no decorrer do processo de forma ininterrupta (Malajovich, 2016).

Frequentemente, após a fermentação são necessárias etapas de *downstream* que visam recuperar, purificar e concentrar os produtos de interesse. Se o produto for secretado pela célula, estará disperso em água sendo necessário separá-lo. Se for intracelular, as células terão que ser rompidas, para a extração dos produtos de interesse (Malajovich, 2016; Woiciechowski *et al.*, 2013).

Normalmente são utilizadas operações como sedimentação, precipitação, filtração, centrifugação, extração por solventes, destilação, evaporação de solvente e secagem, para a concentração dos produtos, e procedimentos, como a cristalização e os métodos cromatográficos para a purificação. Essas etapas representam uma fração considerável do custo de um processo fermentativo (Woiciechowski *et al.*, 2013).

## 2.6 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) pertencem a um vasto grupo de microrganismos, amplamente utilizadas em processos fermentativos, representados por cerca de 530 espécies e subespécies. Elas normalmente apresentam-se na forma de cocos ou bastonetes, gram positivas, catalase negativa, aeróbias, microaerófilas ou anaeróbias facultativas, não esporuladas, geralmente sem motilidade e produzem ácido láctico como principal produto final da fermentação de

carboidratos (Freire *et al.*, 2021; Lima, 2019).

A maioria das BAL estão compreendidas no Reino *Bacteria*, Filo *Firmicutes*, Classe *Bacilli* e Ordem *Lactobacillales*, que é subdividida nas Famílias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae* (Schoch, 2020).

Dentre os principais gêneros de BAL estão *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Vagococcus* (Lahtinen *et al.*, 2012). As bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* (filo *Actinomycetota*), e *Sporolactobacillus* (filo *Firmicutes*), embora não estejam associados à Ordem *Lactobacillales*, também produzem ácido láctico como o principal produto do metabolismo de carboidratos, pertencendo ao grupo de BAL (Guo *et al.*, 2024).

As BAL são amplamente encontradas na natureza, podendo estar presentes em diversos meios ricos em nutrientes, como nos tratos gastrointestinal e urogenital de animais e seres humanos, leite e derivados, carnes, grãos, e alimentos fermentados em geral, também em silagens, utilizadas na alimentação animal, e até mesmo em esgotos sanitários e efluentes industriais (Freire *et al.*, 2021).

Essas bactérias são classificadas como Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS) (Lahtinen, *et al.*, 2012), e possuem significativa importância para as indústrias de alimentos e bebidas, uma vez que são amplamente utilizadas na produção de leites fermentados, iogurtes e queijos, bem como no processamento de carnes e bebidas alcoólicas. Elas possuem vasta aplicabilidade nesse ramo, posto que comumente estão presentes, podendo ser isoladas desses produtos. Além disso, contribuem para a extensão da vida útil de alimentos, através da diminuição do pH, bem como, pela produção de peptídeos antagonistas a outras bactérias, e ainda podem modificar propriedades sensoriais de produtos, interferindo em características como intensidade do sabor e aroma. Para mais, atuam como probióticos conferindo benefícios à saúde dos consumidores (Bordini *et al.*, 2018; Freire *et al.*, 2021).

### 2.6.1 *Leuconostoc*

O gênero *Leuconostoc* é constituído por células gram positivas, catalase e oxidase negativas, imóveis, não esporulantes, anaeróbias facultativas, com

morfologia de cocos irregulares, geralmente dispostas em pares ou cadeias curtas (Mcsweeney, 2007).

Os microrganismos pertencentes a esse gênero tendem a se desenvolver melhor em condições ácidas e em temperaturas moderadas, na faixa de 30 °C. Embora compartilhem muitas características com o *Lactococcus*, o *Leuconostoc* fermenta açúcares pela via heterofermentativa, produzindo ácido láctico, etanol, ácido acético e dióxido de carbono (Mcsweeney, 2007). Os principais habitats das bactérias do gênero *Leuconostoc* são plantas, carnes, leite e derivados (Ogier *et al.*, 2008).

O gênero pertence à família *Lactobacillaceae* (Schoch, 2020), contém 31 espécies e 8 subespécies (Euzéby, 2025). Dentre as espécies mais comuns, destacam-se a *Leuconostoc mesenteroides* e a *Leuconostoc lactis* (Ogier *et al.*, 2008).

Ambas as espécies desempenham papel importante na indústria alimentícia, na formação de aroma, sabor e textura por produzirem compostos aromáticos como diacetil e cetonas (Ogier *et al.*, 2008). O *Leuconostoc lactis* tem sido amplamente utilizado na fermentação de laticínios e vegetais, para a obtenção de produtos acidificados e aromatizados (Gumustop; Ortakci, 2022).

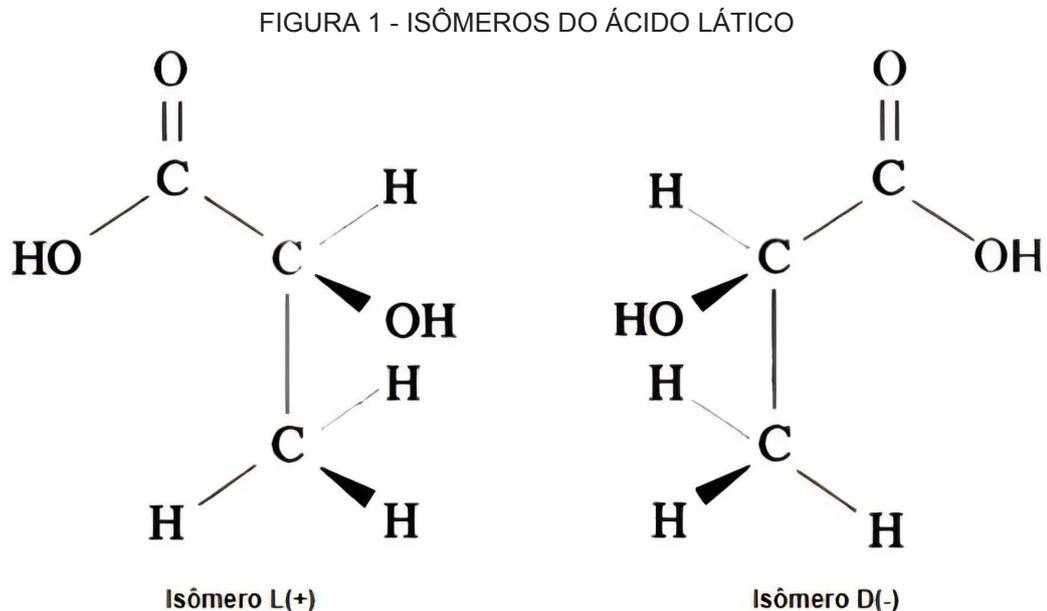
O *Leuconostoc lactis* pode ser encontrado em vários nichos ecológicos, dentre os quais laticínios, como soro, leite, queijos e salmoura, vegetais como pepinos fermentados, e também no sistema gastrointestinal de seres humanos (Gumustop; Ortakci, 2022).

## 2.7 ÁCIDO LÁTICO

O ácido 2-hidroxiopropanóico (ácido láctico) foi descoberto em 1780 pelo químico Scheele, sendo introduzido como um componente ácido do leite e foi produzido comercialmente pela primeira vez por Charles Avery em Massachusetts, em 1881 (Narayanan; Roychoudhury; Srivastava, 2004).

Trata-se de uma molécula, com a fórmula química  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ , massa molar de 90,078 g mol<sup>-1</sup>, ponto de fusão de 16,8 °C e de ebulição de aproximadamente 122 °C, solúvel em água e em solventes orgânicos miscíveis em água, de baixa volatilidade e reconhecido como seguro (Lauffer, 2019; Martinez *et al.*, 2013; Narayanan; Roychoudhury; Srivastava, 2004).

Ele possui um carbono assimétrico, podendo ser encontrado na forma de dois isômeros ópticos, o L(+) ácido láctico ou S-ácido láctico e o D(-) ácido láctico ou R-ácido láctico, conforme disposto na Figura 1 (Castro, 2024).



FONTE: Traduzido de Martinez *et al.*, (2013).

É um composto orgânico muito versátil, de grande valor para a indústria, em função de suas propriedades, como leve acidez, biocompatibilidade e presença de grupos carboxílico e hidroxílico, que possibilitam sua aplicação em diversas áreas (Pereira, 2019; Pinho *et al.*, 2019).

O valor do mercado do ácido láctico, de US\$ 532,01 milhões em 2024, com previsão de crescimento para US\$ 624,54 milhões até 2029, reflete o impacto significativo desse produto e a expectativa de investimentos futuros. Crescimento este, justamente impulsionado pela sua ampla gama de aplicações (Mordor Intelligence, 2024).

Na indústria alimentícia, é utilizado como conservante e acidulante, nas indústrias farmacêutica e cosmética, empregado na formulação de loções e pomadas, na indústria têxtil aplicado em processos de tingimento e estamparia, e na indústria química, como matéria-prima para a fabricação do ácido polilático (*Poly Lactic Acid* - PLA), biopolímero explorado como substituto de polímeros derivados do petróleo (Lauffer, 2019).

O mercado de ácido láctico é altamente consolidado (Mordor Intelligence,

2024). Sua produção pode ser realizada por meio de síntese química ou fermentação microbiana. Na síntese química, ocorre a formação de uma mistura racêmica dos isômeros L(+) ácido láctico e D(-) ácido láctico, enquanto nos processos fermentativos, normalmente, é obtida apenas uma das formas opticamente ativas (Castro, 2024).

O processo comercial para síntese química do ácido láctico ocorre, por exemplo, através da adição do cianeto de hidrogênio ao acetaldeído na presença de uma base para produzir lactonitrila. Esta reação ocorre em fase líquida em altas pressões atmosféricas (Narayanan; Roychoudhury; Srivastava, 2004).

A lactonitrila bruta é então recuperada e purificada por destilação. Em seguida, é hidrolisada em ácido láctico, por ácido clorídrico concentrado, ou ácido sulfúrico, para produzir o ácido láctico e o sal de amônio correspondente (Narayanan; Roychoudhury; Srivastava, 2004).

O ácido láctico é então esterificado com metanol para produzir lactato de metila, que é removido e purificado por destilação e hidrolisado por água sob catalisador ácido para finalmente produzir ácido láctico e o metanol, que é reciclado (Narayanan; Roychoudhury; Srivastava, 2004).

Outras rotas possíveis são a degradação de açúcares catalisada por bases, a oxidação do propilenoglicol, a reação de acetaldeído, monóxido de carbono e água em temperaturas e pressões elevadas, a hidrólise do ácido cloropropiônico e a oxidação do propileno com ácido nítrico (Narayanan; Roychoudhury; Srivastava, 2004).

A síntese química exige elevadas temperaturas, além de matérias-primas de origem fóssil, que contribuem para a emissão de gases de efeito estufa e degradação ambiental. Por outro lado, a produção do ácido láctico por via fermentativa utiliza matéria-prima de fonte renovável, além de ser realizada em condições de baixas temperaturas e pressões, exigindo menor consumo energético, o que a torna uma rota alternativa sustentável (Castro, 2024; Lauffer, 2019).

Além disso, o custo da matéria-prima representa um grande obstáculo para a produção econômica de ácido láctico. Nesse contexto, as vias fermentativas possibilitam o uso de subprodutos agroindustriais de baixo valor agregado, em substituição aos açúcares refinados, de modo que vários materiais como biomassas, subprodutos, resíduos e efluentes agroindustriais podem ser utilizados como substratos para a fermentação microbiana, promovendo uma economia circular

(Castro, 2024; Lauffer, 2019; Ojo; Smidt, 2023; Pereira, 2019; Pinho *et al.*, 2019).

Para mais, as indústrias, de um modo geral, priorizam a utilização de isômeros puros. Nesse contexto, cepas microbianas, dentre as quais algumas BAL, têm se destacado por produzir o ácido láctico como o principal produto metabólico (Lauffer, 2019).

A obtenção do ácido láctico através da fermentação microbiana ocorre por meio das rotas metabólicas, homoláticas ou homofermentativa e heteroláticas ou heterofermentativa (Pereira, 2019).

Na via homolática ocorre a glicólise, onde a glicose é fosforilada pela enzima hexoquinase ou glicocquinase para gerar glicose-6-fosfato, sendo essa reação dependente de ATP e  $Mg^{2+}$ . Em seguida, a glicose-6-fosfato é isomerizada a frutose-6-fosfato pela enzima fosfoglicocquinase na presença de  $Mg^{2+}$ . Então, a frutose-6-fosfato é fosforilada por ATP, na presença da enzima fosfofrutoquinase, para produzir frutose-1,6-bisfosfato. A frutose-1,6-bisfosfato é dividida em gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato, em reação catalisada pela enzima frutose-bisfosfato aldolase. Na sequência, a enzima triose-fosfato-isomerase catalisa a interconversão reversível de gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona fosfato. Então, pela ação subsequente de diversas enzimas, o gliceraldeído-3-fosfato é convertido a piruvato. Sob condições anaeróbias, o NADH gerado na glicólise não pode ser reoxidado pelo oxigênio, mas é reoxidado a  $NAD^+$  pelo próprio piruvato, convertendo piruvato a lactato (Lauffer, 2019).

A via heterolática possui eficiência de produção de ácido láctico de cerca de 50% em relação a via homofermentativa. Nela, a glicose-6-fosfato é oxidada a ácido-6-fosfoglicônico, que é então oxidado e descarboxilado para formar pentose-fosfato. A pentose-fosfato é clivada a gliceraldeído-3-fosfato e acetilfosfato. Em seguida, o gliceraldeído-3-fosfato é convertido a ácido láctico pelas enzimas da via metabólica Embden-Meyerhof. Nesse ramo da via ocorre a oxidação acoplada à redução, enquanto 2 ATP são produzidos por fosforilação a nível do substrato. O acetilfosfato é então reduzido em dois passos a etanol, balanceando as duas oxidações anteriores à clivagem, sem liberar ATP (Lauffer, 2019).

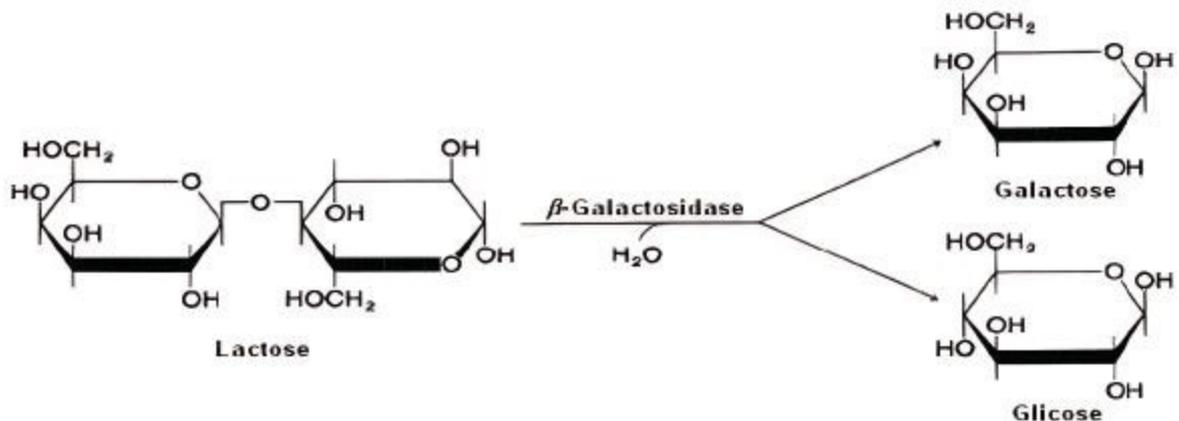
A nível industrial, para favorecer os processos fermentativos e a obtenção do ácido estereoespecífico, são adicionados carbonato ou hidróxido de cálcio ao fermentador para manutenção do pH em torno de 5-6, produz-se então, o lactato de cálcio. O caldo contendo o lactato é filtrado, evaporado e acidificado com ácido

sulfúrico para converter o lactato em ácido láctico e sulfato de cálcio. O sulfato de cálcio é insolúvel, podendo ser removido por filtração. Por fim, o filtrado é purificado em coluna de troca iônica para a obtenção do ácido láctico (Laufer, 2019).

## 2.8 ENZIMA LACTASE

A lactase, também conhecida como  $\beta$ -galactosidase (E. C. 3.2.1.108), é uma proteína com função enzimática. Ela pertence ao grupo de enzimas hidrolíticas e é responsável pela hidrólise  $\beta(1-4)$  da molécula de lactose, resultando em seus monômeros glicose e galactose, conforme a Figura 2 (Gekas; Lopez, 1985; Rodrigues *et al.*, 2019; Xavier; Ramana; Sharma, 2018). Além disso, dependendo das condições de reação, ela é capaz de catalisar reações de transgalactosilação, produzindo galactooligosarídeos (GOS) (Jesus, 2020).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA LACTOSE



FONTE: Fischer (2010).

A  $\beta$ -galactosidase é composta por quatro cadeias de polipeptídeos idênticas, cada uma com 1023 aminoácidos, formando um domínio estrutural bem definido (Saqib *et al.*, 2017).

Produzida naturalmente no intestino delgado de mamíferos, a enzima desempenha um papel crucial no catabolismo da lactose, dissacarídeo presente em abundância em produtos lácteos, convertendo-o em seus monossacarídeos, que são facilmente utilizados em processos metabólicos e para a geração de energia celular. A deficiência na produção dessa enzima em seres humanos leva a distúrbios orgânicos, sendo a principal causa da intolerância à lactose (Rodrigues *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo na demanda por alimentos que atendam às necessidades específicas, sem comprometer suas características sensoriais, como é o caso dos produtos alimentícios sem lactose (Rodrigues *et al.*, 2019).

A lactase desempenha papel fundamental em diversas aplicações industriais, especialmente na alimentícia e farmacêutica, atendendo à demanda por produtos lácteos adaptados às necessidades de indivíduos com deficiências metabólicas ou restrições dietéticas, permitindo a produção de alimentos com baixo teor de lactose ou completamente isentos do açúcar (Rodrigues *et al.*, 2019).

Além disso, a enzima é empregada no tratamento de efluentes de laticínios, que são ricos em lactose. Para aumentar o prazo de validade de produtos lácteos, que contém o dissacarídeo, bem como na produção de laxantes e adoçantes (Xavier; Ramana; Sharma, 2018).

Para suprir a demanda pela enzima, a indústria biotecnológica desenvolveu métodos para a obtenção e isolamento da enzima  $\beta$ -galactosidase, possibilitando sua produção em larga escala (Rodrigues *et al.*, 2019).

A enzima pode ser obtida de fontes de origem animal, microbiana ou vegetal. A nível industrial preferencialmente são empregadas enzimas obtidas de fontes microbianas, empregando bactérias, fungos ou leveduras, pois apresentam diversas vantagens como alta atividade e estabilidade, além da facilidade na sua obtenção através dos processos fermentativos (Rodrigues *et al.*, 2019; Saqib *et al.*, 2017).

As  $\beta$ -galactosidasas derivadas de bactérias ácido lácticas, têm se mostrado eficazes na hidrólise da lactose e adequadas para a produção de galacto-oligossacarídeos (Carević *et al.*, 2015). Desse modo, caracterizam-se como alternativa promissora para a produção da enzima em meios de baixo custo, como subprodutos agroindustriais.

Para sua produção, inicialmente é realizada a seleção do microrganismo, em seguida a escolha do substrato e composição nutricional. Posteriormente são determinados os parâmetros temperatura, pH, tempo de fermentação, aeração e agitação, para a condução do processo. Finalmente são avaliadas as etapas de *downstream* (Aquarone *et al.*, 2001).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Cinética e Biorreatores e de Bioprodutos da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina. Também foram realizadas análises pontuais nos laboratórios de Química Analítica e Análises Ambientais e no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA), UFPR - Setor Palotina.

#### 3.2 COLETA E ACONDICIONAMENTO DO LEITELHO DE MANTEIGA E ÁGUA DE FILAGEM

O leite de manteiga e água de filagem utilizados nos experimentos foram obtidos de um laticínio pertencente à uma cooperativa, localizado na região oeste do Paraná. A cooperativa tem capacidade de industrializar mais de um milhão de litros de leite diariamente, sendo responsável pela produção de queijos, manteiga, doce de leite, produtos UHT, entre outros.

No laticínio, a cada três ou quatro lotes produzidos (de aproximadamente 1300 kg de queijo cada), realiza-se a troca da água de filagem em função da perda de constituintes da massa para a água. Portanto, considerando a capacidade do tanque de recirculação de aproximadamente 300 litros de água e produção de 12 lotes por dia, são gerados entre 900 e 1200 L do efluente diariamente (Figura 3).

FIGURA 3 - GERAÇÃO DA ÁGUA DE FILAGEM DURANTE O PROCESSO PRODUTIVO DE QUEIJO MUSSARELA



FONTE: A autora (2025).

Para mais, no laticínio, em média, são produzidas 6 bateladas de manteiga diariamente. Considerando a capacidade da bateadeira de 1000 L, são gerados em torno de 3000 L de leiteiro (Figura 4).

FIGURA 4 - GERAÇÃO DO LEITELHO DURANTE A BATEÇÃO DO CREME PARA A PRODUÇÃO DE MANTEIGA



FONTE: A autora (2025).

As amostras de leite e água de filagem utilizadas nesse trabalho foram coletadas em frascos plásticos sanitizados com álcool 70 °INPM e, até o momento de sua utilização ficaram armazenados sob refrigeração a -20 °C.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DO LEITELHO DE MANTEIGA E ÁGUA DE FILAGEM

Os subprodutos de laticínios foram caracterizados quanto ao pH, teor açúcares redutores, proteínas, lipídios, carboidratos, umidade, cinzas, concentração de sólidos suspensos totais, sólidos suspensos voláteis, sólidos suspensos fixos e DQO, de acordo com as citadas na Tabela 3, descritas no Apêndice 1.

TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO LEITELHO DE MANTEIGA E ÁGUA DE FILAGEM

Parâmetros	Metodologia	Referência
pH	Potenciometria	Instituto Adolfo Lutz (1985)
Açúcares redutores (g L <sup>-1</sup> )	Espectrofotometria	Bernfeld (1955)
Lipídios (%)	Gravimetria	Bligh e Dyer (1959)
Proteínas (%)	Espectrofotometria	Bradford (1976)
Carboidratos (%)	Diferença	Instituto Adolfo Lutz (1985)
Umidade (%)	Gravimetria	Instituto Adolfo Lutz (1985)
Cinzas (%)	Gravimetria	Instituto Adolfo Lutz (1985)
Teor de ácido láctico (m/v)	Titulometria	Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006
Sólidos suspensos totais (mg L <sup>-1</sup> )	Gravimetria	Standard Methods For Examination of Water and Wastewater 23 <sup>a</sup> ed.
Sólidos suspensos voláteis (mg L <sup>-1</sup> )	Gravimetria	Standard Methods For Examination of Water and Wastewater 23 <sup>a</sup> ed.
Sólidos suspensos fixos (mg L <sup>-1</sup> )	Gravimetria	Standard Methods For Examination of Water and Wastewater 23 <sup>a</sup> ed.
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	Espectrofotometria	Standard Methods For Examination of Water and Wastewater 21 <sup>a</sup> ed.

FONTE: A autora (2025).

### 3.4 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

A seleção dos microrganismos foi realizada, seguindo o procedimento realizado por Wilke (2021).

Inicialmente foram realizadas diluições em série de amostras de leite e água de filagem, em água destilada. Alíquotas de 100 µL das diluições com concentrações 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> foram inoculadas, em placas de Petri contendo o meio de cultura MRS, em triplicatas, utilizando-se o método de espalhamento.

As placas foram mantidas a 37 °C por até 7 dias para o crescimento dos microrganismos. As culturas com crescimento evidenciado foram plaqueadas por

estriamento e incubadas sob as mesmas condições. Sucedeu-se com o esgotamento até a obtenção de placas com culturas puras.

### 3.5 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

A identificação do microrganismo foi realizada seguindo o protocolo estabelecido pela Qiagen (2023) e pelo Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (Huff, 2024).

Uma alçada do único isolado bacteriano obtido foi cultivada em caldo Brain Heart Infusion (BHI), incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 96 horas. Após o período de incubação, a amostra foi armazenada a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de DNA.

Para a extração de DNA o caldo contendo o isolado foi centrifugado a 7500 rpm por 10 minutos até formar um pellet celular e o sobrenadante foi descartado.

A partir do *pellet* formado, foi realizada a extração do DNA com kit comercial, Qiagen® DNeasy® Blood & Tissue. O procedimento técnico foi realizado de acordo com o fabricante, seguindo as especificações para bactérias Gram-Positivas.

Inicialmente o pellet foi ressuspendido em 180  $\mu\text{L}$  do tampão de lise enzimático que contém lisozima e incubado por 30 minutos em banho-maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Após a incubação, 25  $\mu\text{L}$  de proteinase K e 200  $\mu\text{L}$  do tampão AL foram adicionados na amostra e homogeneizados em vórtex. Em seguida a amostra foi incubada a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  em banho-maria por 30 minutos. Após, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol 100% e novamente homogeneizados em vórtex. A mistura foi então adicionada em um sistema de coluna com filtração e um tubo de coleta, fornecida pelo kit, e centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, o sobrenadante que passa pelo filtro foi descartado e o DNA permaneceu fixo na membrana de filtração.

Para as etapas de lavagem, cerca de 500  $\mu\text{L}$  tampão AW1 foi adicionado e centrifugado mais 1 minuto a 8000 rpm. Novamente o sobrenadante foi descartado e 500  $\mu\text{L}$  do tampão AW2 foi adicionado e centrifugado por 3 minutos a 12000 rpm. Por fim, o tubo de coleta foi descartado e adicionado um novo tubo de 1,5 mL no sistema de filtração, onde o DNA foi ressuspendido em 200  $\mu\text{L}$  do tampão AE. O tubo foi mantido em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto para completa eluição do DNA.

O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000®

(ThermoScientific®) e a integridade da amostra foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1.5% com tampão TBE 1x (Tris-base 90 mM; Ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0).

A amplificação da região 16S foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os primers Y1 forward (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') (Young *et al.*, 1991) e Y3 reverse (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3') (Cruz, 2001) que produzem uma região de amplicon com cerca de 1500 pb.

A amplificação foi realizada com o kit da Promega Corporation (GoTaq® DNA Polymerase) constituído de 50 ng de DNA genômico, tampão de PCR 1x contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 40 mM do mix de dNTP, 1 unidade de Taq DNA Polimerase e 10 µM de cada primer, em um volume final de 25 µL.

As condições de ciclagem foram: 2 min iniciais a 95 °C, e 30 ciclos de 1 min a 95 °C, de 1 min a 57 °C e de 1 min a 72 °C, com extensão final de 5 min a 72 °C.

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X utilizando padrão de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotecnologia) com 1 µL de Safer e visualizado em transiluminador LED da Kasvi®.

Após essa quantificação, 100 ng do produto de PCR juntamente com 7,5 µM dos primers forward e reverse foram enviados para a empresa Ludwig Biotecnologia (Alvorada, RS), para a realização do sequenciamento, usando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas foram analisados utilizando o *software* BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2013) e utilizando o BLASTn (versão 2.215 do BLAST 2.0) os resultados do sequenciamento foram comparados com as sequências depositadas nos bancos de dados.

### 3.6 TESTE DE PRODUÇÃO DE LACTASE

A produção da enzima lactase foi testada qualitativamente, antes de seguir para as demais etapas.

Uma alçada do microrganismo isolado foi transferida para uma placa de Petri contendo ágar de cistina lactose deficiente em eletrólitos (do inglês *Cystine Lactose Electrolyte Deficient Agar* - CLED) e incubada a 37 °C por 48 horas.

O método é recomendado pela ANVISA (2004) para o isolamento e quantificação de microrganismos presentes em amostras de urina. Nele, microrganismos que fermentam lactose baixam o pH alterando a coloração do meio de verde para amarelo, permitindo confirmar se o microrganismo é lactose negativa ou positiva.

### 3.7 PROCESSO FERMENTATIVO

#### 3.7.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com o realizado por Wilke (2021), com modificações. O microrganismo isolado e identificado foi repicado em placas de Petri com meio MRS e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por até 7 dias para o desenvolvimento de colônias microbianas frescas.

Duas alçadas das colônias foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL com caldo MRS. Os Erlenmeyers foram colocados em shaker a 50 rpm, rotação suficiente para gerar leve agitação, sem provocar aeração (Dourado *et al.*, 2024), e temperatura de 37 °C, ótima para o desenvolvimento de microrganismos mesofílicos (Freire *et al.*, 2021), por 24 horas.

Em seguida, o inóculo foi adicionado aos meios de cultivo, em erlenmeyers de 125 mL, em uma proporção de 5 % (v/v), para 60 mL do respectivo meio.

#### 3.7.2 Substratos e condições de cultivo para a produção de $\beta$ -galactosidase e ácido láctico

Inicialmente foram utilizados como substrato a água de filagem (AF), o leite de manteiga (LM), uma mistura 1:1 de água de filagem e leite de manteiga (AFLM), e caldo MRS, com os valores de pH ajustados em 6,2, conforme Dourado *et al.* (2024). Os meios de cultivo foram dispostos em erlenmeyers de 125 mL, esterilizados por autoclavagem, a 121 °C por 15 minutos a 1 atm, resfriados a temperatura ambiente, inoculados, e incubados.

A princípio, os substratos inoculados foram incubados a 150 rpm, 37 °C, conforme Wilke (2021) por 96 horas, para a determinação do melhor tempo para a condução dos experimentos e análise cinética da reação. A cada 24 horas amostras

dos caldos fermentados, de cada um dos meios de cultivo, foram retiradas para a determinação de pH, açúcares redutores, acidez titulável e atividade enzimática.

Posteriormente, para a avaliação da produção de  $\beta$ -galactosidase e ácido láctico foi utilizado um delineamento experimental fatorial  $2^3$  com repetição no ponto central, empregando os meios de cultivo AF e LM. Além disso, foram testadas as temperaturas de 30 e 40 °C, e a suplementação dos meios de cultivo com extrato de levedura em 2 e 6 %, além das repetições dos centrais preparadas com AFLM, incubadas a 35 °C, com 4 % de extrato de levedura, seguindo o proposto por Pinho *et al.* (2019), que verificou efeito positivo da suplementação com extrato de levedura em soro.

### 3.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental para a produção de  $\beta$ -galactosidase e ácido láctico baseou-se no modelo fatorial  $2^3$  com 4 repetições no ponto central, avaliando a influência nas variáveis resposta (atividade de  $\beta$ -galactosidase e concentração de ácido láctico), da variação da composição dos substratos, da temperatura, e da suplementação com extrato de levedura, em dois níveis +1 e -1 (Tabela 4):

TABELA 4 - PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^3$

Parâmetros	+1	-1
Composição do substrato	LM	AF
Temperatura (°C)	40	30
Suplementação com extrato de levedura (%)	6	2

FONTE: A autora (2025).

Considerando a variação dos 3 fatores, foram realizados ao todo 12 experimentos, sendo 8 determinados pela variação dos valores extremos, e 4 em função das condições dos pontos centrais. A matriz obtida para o planejamento experimental fatorial está representada na Tabela 5.

TABELA 5 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL  $2^3$  COM QUADRUPLICATA DO PONTO CENTRAL

Experimento	Composição do substrato	Temperatura (°C)	Continua
			Suplementação com Extrato de Levedura
1	AF (-1)	30 (-1)	2 (-1)
2	LM (+1)	40 (+1)	6 (+1)

FONTE: A autora (2025).

TABELA 5 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2<sup>3</sup> COM QUADRUPPLICATA DO PONTO CENTRAL

Experimento	Composição do substrato	Temperatura (°C)	Conclusão
			Suplementação com Extrato de Levedura
3	AF (-1)	30 (-1)	6 (+1)
4	AF (-1)	40 (+1)	2 (-1)
5	AF (-1)	40 (+1)	6 (+1)
6	LM (+1)	30 (-1)	2 (-1)
7	LM (+1)	40 (+1)	2 (-1)
8	LM (+1)	30 (-1)	6 (+1)
9	AFLM (0)	35 (0)	4 (0)
10	AFLM (0)	35 (0)	4 (0)
11	AFLM (0)	35 (0)	4 (0)
12	AFLM (0)	35 (0)	4 (0)

FONTE: A autora (2025).

### 3.9 ANÁLISES DAS VARIÁVEIS RESPOSTA

As variáveis respostas avaliadas dos produtos da fermentação submersa dos efluentes de laticínios foram a atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase e teor de ácido láctico, obtido através da acidez titulável.

Ademais foram acompanhadas as variáveis pH, pelo método potenciométrico conforme o proposto por Adolfo Lutz (1985), e teor de açúcares redutores, através de espectrofotometria de acordo com Bernfeld (1955).

#### 3.9.1 Atividade enzimática

Como a  $\beta$ -galactosidase não é secretada pelo microrganismo selecionado para a obtenção dos produtos de interesse, foi necessário realizar etapas de rompimento celular e extração enzimática, para posteriormente quantificar a atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase.

Inicialmente, sucedeu-se com o rompimento celular de acordo com a metodologia utilizada por Wilke (2021), com adaptações. Foram centrifugados 15 mL dos caldos fermentados a 6000 rpm por 11 minutos. Em seguida, os *pelletes* foram lavados com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) e centrifugados novamente. Os *pelletes* foram ressuspensos em 5 mL de tampão fosfato e armazenados para análises subsequentes.

Para a extração da enzima, 10 g de pérolas de vidro de 2 mm foram adicionadas aos tubos de centrífuga contendo as suspensões celulares. As

amostras foram agitadas em agitador tipo vórtex por 10 ciclos, sendo cada ciclo correspondente a 1 minuto de agitação e 30 segundos em banho de gelo para evitar a desnaturação das enzimas. As soluções foram então centrifugadas a 6000 rpm a temperatura ambiente por 11 minutos, de acordo com a metodologia proposta por Sangwan *et al.* (2014) com modificações.

Finalmente os sobrenadantes contendo as suspensões celulares foram utilizados para a realização dos testes de atividade enzimática, através do método Orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) (Lederberg, 1950).

A metodologia de quantificação de atividade enzimática através do método ONPG descrita por Lederberg (1950), é fundamentada na hidrólise do ONPG. O ONPG, que possui estrutura semelhante à da lactose, quando hidrolisado, forma galactose e orto-nitrofenol (ONP), composto de coloração amarela que, ao contrário do ONPG, absorve a luz em 420 nm, de modo que, alterações no valor da absorbância da amostra, comparada com o padrão, indicam a variação na atividade enzimática.

Para a obtenção da curva de calibração, foi preparada uma solução padrão de o-nitrofenol, seguindo a metodologia proposta pelo Food Chemicals Codex (1981). 139 mg de ONPG foram transferidos para um frasco volumétrico de 1000 mL, onde foi dissolvido em 10 mL de álcool 95% em água. Volumes de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 mL dessa solução foram pipetadas e transferidas para balões volumétricos de 100 mL, e diluídas até o volume, com solução de bicarbonato de sódio a 1%. Assim, as diluições continham, respectivamente, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10, 0,12 e 0,14  $\mu$ mol de ONPG por mL. Foi determinada a absorbância de cada diluição a 420 nm em uma célula de 1 cm em espectrofotômetro, usando água como branco. Foi plotado um gráfico de absorbância versus  $\mu$ mol de ONPG, e obteve-se a linha e a equação da reta.

A fim de encontrar o coeficiente de extinção das diluições, foi feita a divisão da absorbância de cada diluição por  $\mu$ mol de o-nitrofenol, e calculada a média dos valores obtidos.

Para a determinação da absorbância, das amostras, fez-se uma solução de ONPG 35 mM em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Em seguida, foram pipetados em microtubos 780  $\mu$ L de tampão fosfato e 110  $\mu$ L dos extratos enzimáticos. As amostras foram deixadas em banho termostático a 30 °C para equilibrar a temperatura. Então adicionou-se 110  $\mu$ L da solução de ONPG. Após 1 minuto as

reações foram interrompidas adicionando 220  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 1 M. A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro Uv/Visível com  $\lambda = 405 \text{ nm}$ . Para o branco, foi feito o mesmo procedimento colocando-se água destilada no lugar da amostra.

As atividades enzimáticas foram calculadas seguindo a lei de Lambert-Beer, conforme apresentado na Equação 1:

$$A = \varepsilon_{ONPG} * L * C_{ONPG} \quad (1)$$

Em que:

A = absorbância da amostra;

$\varepsilon_{ONPG}$  = coeficiente de extinção molar do ONPG ( $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ );

L = caminho ótico (cm);

$C_{ONPG}$  = concentração de ONPG ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ).

Como houve diluição dos extratos enzimáticos em relação ao volume final da reação, considerou-se o fator de diluição. Sendo assim, pode-se encontrar as concentrações de ONPG através da Equação 2:

$$C_{ONPG} = \frac{A * V_f}{\varepsilon_{ONPG} * L * V_a} \quad (2)$$

Onde:

$C_{ONPG}$  = concentração de ONPG ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ );

A = absorbância da amostra;

$\varepsilon_{ONPG}$  = coeficiente de extinção molar do ONPG ( $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ );

L = caminho ótico (cm);

$V_f$  = volume final do teste;

$V_a$  = volume inicial da amostra.

As atividades volumétricas puderam então ser calculadas por meio da Equação 3:

$$A_v = \frac{C_{ONPG}}{t} \quad (3)$$

Sendo:

$A_v$  = Atividade volumétrica;

$C_{\text{ONPG}}$  = concentração de ONPG ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ );

$t$  = tempo (min.)

Uma unidade de atividade enzimática ( $U_{\text{ONPG}}$ ) foi definida como a quantidade de  $\mu\text{mols}$  de ONPG que reagem em 1 minuto nas condições ensaiadas.

### 3.9.2 Ácido Lático

A produção de ácido lático foi determinada considerando a acidez titulável das amostras. A análise foi realizada com base na metodologia para a determinação da acidez titulável, de leite fluido, em percentual de ácido lático (m/v), disposta na Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. 10 mL de cada amostra foram dispostos em erlenmeyers de 125 mL. Os 10 mL foram então diluídos em 20 mL de água destilada, e posteriormente, adicionou-se 1 mL de solução alcoólica de fenolftaleína 1 %. As amostras foram tituladas com hidróxido de sódio 0,1 N até o surgimento de uma coloração rósea (Instrução Normativa nº 68, 2006).

A acidez titulável em percentual de ácido lático (m/v) de cada amostra foi obtida através da Equação 4:

$$\text{Acidez titulável, \% de ácido lático (m/v)} = \frac{V * f * 0,09 * N * 100}{v} \quad (4)$$

Onde,

$V$  = volume em mL de hidróxido de sódio 0,1 N gastos na titulação;

$f$  = fator de correção da solução de hidróxido de sódio;

0,09 = miliequivalente grama do ácido lático;

$N$  = Normalidade da solução de hidróxido de sódio;

$v$  = volume da amostra em mL.

### 3.10 AVALIAÇÃO DOS DADOS ESTATÍSTICOS

O *software* Statistica (versão 10) foi utilizado para determinar o efeito das

variáveis independentes, bem como, o efeito de suas interações através do cálculo dos coeficientes de regressão e a análise de variância (ANOVA), além da obtenção dos gráficos de superfícies de resposta e Pareto.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO

#### 4.1.1 Caracterização da água de filagem

A água de filagem é um subproduto da indústria de laticínios de composição variável, dependente das condições do processo produtivo. Alguns autores, como Pizaia *et al.* (2003), relacionam sua composição com a do soro, uma vez que, compostos como lactose, sais minerais, proteínas solúveis e aminoácidos presentes no queijo se dissolvem na água durante a filagem.

Na Tabela 6 encontram-se os valores obtidos na caracterização da água de filagem.

TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA DE FILAGEM

Parâmetros	Água de filagem
pH	4,84 ± 0,02
Açúcares redutores (g L <sup>-1</sup> )	12,67 ± 0,48
Lipídios (%)	3,40 ± 0,58
Proteínas (%)	2,50 ± 0,01
Carboidratos (%)	9,91
Umidade (%)	83,49 ± 0,7
Cinzas (%)	0,70 ± 0,09
Teor de ácido láctico (m/v)	0,18 ± 0,00
Sólidos suspensos totais (mg L <sup>-1</sup> )	169.211,125 ± 580,12
Sólidos suspensos voláteis (mg L <sup>-1</sup> )	167.671,10 ± 648,50
Sólidos suspensos fixos (mg L <sup>-1</sup> )	1.540,00 ± 120,00
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	18.138,89 ± 157,13

FONTE: A autora (2025).

A caracterização do subproduto revelou um pH de 4,84 ± 0,02, alinhado com os valores observados por Pizaia *et al.* (2003) e Oliveira (2022), expostos na Tabela 1. O pH da água de filagem é ácido, pois durante o processo produtivo, a combinação da alta temperatura e da força mecânica aplicada à massa, que deve apresentar pH entre 4,8 e 5,5, favorece a liberação de ácido láctico, soro residual, gordura e proteínas (Furtado, 2016).

Os açúcares redutores presentes na água de filagem em concentração de 12,67 ± 0,48 g L<sup>-1</sup>, se mostraram inferiores quando comparados aos resultados obtidos por Dourado *et al.* (2024), de 31,68 ± 3,45 g L<sup>-1</sup> para o soro de leite. Essa diferença pode ser explicada pois grande parte da lactose contida no leite, em torno

de 70% a 80 %, permanece no soro após a coagulação do queijo, enquanto a água de filagem contém apenas a lactose dissolvida da massa (Bonfim *et al.*, 2015).

O teor de proteínas de  $2,5 \pm 0,01$  %, observado neste trabalho, se mostrou superior aos teores observados por Ferreira (2004), Pizaia *et al.* (2003) e Oliveira (2022), de 0,09, 04 e 1,15 % respectivamente, conforme expostos na Tabela 1, no entanto, é comparável ao observado por Dourado *et al.* (2024), de  $2,09 \pm 0,32$  % para soro.

No que diz respeito ao teor de lipídios, Oliveira (2024) observou teor superior, de 14,25 %, quando comparado com o identificado na pesquisa de  $3,4 \pm 0,58$  %, enquanto Ferreira (2004) e Pizaia *et al.* (2003), obtiveram resultados inferiores de 0,37 e 0,90 %, respectivamente, (Tabela 1). Por outro lado, Silva *et al.* (2017) observaram 2,61% de lipídios em soro, valor próximo ao verificado no presente trabalho.

O teor de carboidratos obtido por diferença, representa os teores de lactose, glicose, galactose e oligossacarídeos provenientes da massa de queijo, além de exopolissacarídeos, glucanas e peptidoglicanos microbianos oriundos da fermentação da massa (Brito *et al.*, 2020; Oliveira, 2022). O teor de 9,91 % verificado neste trabalho, se mostrou superior ao constatado por Silva *et al.* (2017), de 4,87 %, para soro de leite, no entanto, semelhante ao verificado por Kurnick, Michellim e Tribst (2023) de 9,4 a 10 %, também para amostras de soro.

A umidade da água de filagem de  $83,49 \pm 0,7$  % observada no presente estudo é menor que a umidade do soro de 93,65 %, conforme Libório *et al.* (2017). O teor de umidade está associado aos demais constituintes do subproduto, como proteínas, carboidratos e lipídios, que, conforme mencionado anteriormente, se mostram ligeiramente superiores quando confrontados com os resultados expostos na literatura para o soro.

As cinzas, por sua vez, se assemelham às dos estudos de Kurnick, Michellim e Tribst (2023), que observaram teor de 0,6 % em soro de queijo e ricota, enquanto os obtidos na pesquisa foram de 0,7%.

O teor de ácidos em efluentes industriais é uma variável importante no que diz respeito à destinação do subproduto. Ela está intimamente relacionada ao custo do tratamento, sendo assim, normalmente quanto mais gorduras e ácidos presentes na água de filagem, mais dispendioso é o seu tratamento (Mendes *et al.*, 2015). Este estudo demonstrou concentração de ácido láctico de 0,18 % (m/v), superior

comparada ao teor de acidez de 0,13 % apresentado por Kurnick, Michellim e Tribst (2023) para amostras de soro. Espera-se que a água de filagem demonstre teores de acidez e ácido láctico superiores em relação ao soro, posto que na retirada do soro a coalhada ainda não passou pelo processo fermentativo, enquanto na água de filagem estão presentes parcela dos ácidos dissolvidos da massa de queijo (Furtado, 2016).

Em relação ao potencial poluidor, o subproduto foi avaliado quanto às concentrações de sólidos suspensos e DQO. As concentrações de sólidos observados foram ligeiramente elevadas, especialmente quando comparadas ao exposto na literatura para soro de queijo. Enquanto a concentração de sólidos suspensos totais verificada no trabalho foi de  $169,21 \pm 0,58 \text{ g L}^{-1}$ , a literatura sugere valores em torno de  $22 \text{ g L}^{-1}$  (Santos, 2022). Já a DQO da água de filagem, de  $18,13 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$ , se mostrou inferior ao relatado na literatura que varia entre 50 e  $102 \text{ g L}^{-1}$  (Bosso *et al.*, 2019).

A avaliação da composição da água de filagem e sua similaridade com o soro observadas no presente estudo, reafirmam o potencial desse subproduto para o reaproveitamento na obtenção de produtos de interesse. Além disso, as características em relação ao potencial poluidor evidenciam a necessidade de sua destinação adequada.

#### 4.1.2 Caracterização do leitelho de manteiga

O leitelho é um subproduto da produção de manteiga que vem ganhando reconhecimento na indústria de bioprocessos em função de seu relevante valor nutricional e propriedades funcionais, além disso, suas características são frequentemente relacionadas às do leite desnatado (Oliveira, 2021).

Na Tabela 7 estão dispostos os resultados obtidos para a caracterização do leitelho de manteiga.

TABELA 7 - CARACTERIZAÇÃO DO LEITELHO DE MANTEIGA

Parâmetros	Leitelho de manteiga
pH	$5,36 \pm 0,02$
Açúcares redutores ( $\text{g L}^{-1}$ )	$24,13 \pm 0,99$
Lipídios (%)	$1,46 \pm 0,23$
Proteínas (%)	$2,48 \pm 0,00$

FONTE: A autora (2025).

Continua

TABELA 7 - CARACTERIZAÇÃO DO LEITELHO DE MANTEIGA

Parâmetros	Leitelho de manteiga	Conclusão
Carboidratos (%)	0,23	
Umidade (%)	94,54 ± 0,11	
Cinzas (%)	1,29 ± 0,09	
% ácido láctico (m/v)	0,06 ± 0,00	
Sólidos suspensos totais (mg L <sup>-1</sup> )	56.946,00 ± 342,00	
Sólidos suspensos voláteis (mg L <sup>-1</sup> )	55.779,33 ± 346,69	
Sólidos suspensos fixos (mg L <sup>-1</sup> )	1.166,67 ± 325,32	
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	36.111,11 ± 39,28	

FONTE: A autora (2025).

É possível verificar que o pH ( $5,36 \pm 0,02$ ) obtido no presente estudo é inferior ao disposto na literatura. Lemos, Melo e Santos (2018) e Monteiro e Gomes (2018) verificaram pH de 6,81 e 6,51, respectivamente (Tabela 2). Isso se dá especialmente em função da acidez e maturação do creme utilizado na produção da manteiga.

Em relação aos açúcares redutores, o teor é minimamente inferior considerando o valor de 2,61 % observado por Lemos, Melo e Santos (2018) e o valor obtido no estudo de  $2,41 \pm 0,09$  %.

A comparação entre o resultado obtido pelos mesmos autores, expostos na Tabela 2, e o presente estudo, demonstrou teor de lipídios ligeiramente maior,  $1,46 \pm 0,23$  % contra 0,67 %, mas inferior ao verificado por Santos *et al.* (2023) de 2,78 %. Contrariamente, os teores observados para proteínas e carboidratos se mostraram inferiores. Enquanto neste trabalho foram verificados 2,48 e  $0,23 \pm 0,11$  %, para proteína e carboidratos, respectivamente, Lemos, Melo e Santos (2018) verificaram teores de 3,39 e 1,70 % e Santos *et al.* (2024) de 4,58 e 2,91 %. Por outro lado, Monteiro e Gomes (2018), obtiveram valor menor para proteína, de apenas 1,76%.

A umidade ( $94,54 \pm 0,11$  %) se mostrou semelhante aos dados observados por Lemos, Melo e Santos (2018) (Tabela 2), no entanto, bastante superior ao verificado por Santos *et al.* (2024) de 89,23 %.

O teor de cinzas ( $1,29 \pm 0,09$  %) obtido no estudo foi superior se comparado ao valor de 0,34 % verificado por Lemos, Melo e Santos (2018). Enquanto a acidez titulável (0,06 %), comparada aos resultados dos mesmos autores (1,04) foi bastante inferior.

Além disso, de acordo com a literatura, o leitelho pode apresentar carga poluidora elevada, em função do seu teor de matéria orgânica (Freixo, 2011; Teixeira *et al.*, 2020). Corroborando com o exposto, para DQO, sólidos suspensos totais, voláteis e fixos foram verificados, respectivamente, os seguintes valores:  $36,11 \pm$

0,03 g L<sup>-1</sup>, 56,95 ± 0,34 g L<sup>-1</sup>, 55,78 ± 0,34 g L<sup>-1</sup> e 1,17 ± 0,35 g L<sup>-1</sup>.

As diferenças observadas entre os resultados verificados neste trabalho em relação a literatura podem ser consequência das características do próprio processo produtivo de manteiga, que é fortemente influenciado pelo teor de gordura e acidez do creme, nível de creme na bateadeira, velocidade e temperatura de bateção (Cunha *et al.*, 2022). Ademais, as propriedades da matéria prima utilizada também influenciam fortemente os resultados, como variações de acordo com a genética dos animais, a fase de lactação, o tipo de dieta, sazonalidade, dentre outros fatores. (Cassol *et al.*, 2021).

Os resultados expostos evidenciam que o leiteiro de manteiga possui composição centesimal interessante, podendo ser empregado para a obtenção de bioprodutos, entretanto sua composição pode ser variável dependendo das condições produtivas da manteiga e da qualidade da matéria prima utilizada.

#### 4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

Caracterizados o leiteiro de manteiga e água de filagem, e considerando que em efluentes e subprodutos é comum encontrar microrganismos naturalmente adaptados, capazes de tolerar as condições extremas presentes nesses ambientes, e com capacidade de bioconversão da matéria orgânica em produtos de interesse industrial (Poletto, 2014), sucedeu-se com o isolamento e identificação de microrganismos presentes nos subprodutos.

Para tanto, procedeu-se com a utilização de meio MRS, que favorece o crescimento abundante de *Lactobacillus*, e tem em sua constituição de glucose como fonte de carbono, peptona como fonte de nitrogênio e acetato de sódio, que suprime o crescimento de bactérias competidoras, além de outros componentes. No entanto, além de *Lactobacillus*, outras bactérias ácido lácticas que compartilham características semelhantes, como *Leuconostoc* e *Pediococcus*, conseguem se desenvolver nele (Man; Rogosa; Sharpe, 1960).

As placas inoculadas com as diluições da água de filagem não demonstraram desenvolvimento de culturas microbianas, possivelmente em função da temperatura da água no decorrer do processo de filagem da massa de queijo, que ocorre na faixa de 75 a 80 °C, suficiente para reduzir significativamente a carga microbiana da água e inclusive da massa (Furtado, 2016).

A colônia isolada do leiteiro de manteiga foi identificada como *Leuconostoc lactis* através da amplificação por PCR e sequenciamento da região 16S rRNA. O Blast, associado à análise de sequenciamento, revelou uma correspondência de 98,57 % de identidade com sequência de referência da espécie *Leuconostoc lactis*, confirmando a identidade da bactéria isolada. Os resultados da análise de sequenciamento estão detalhados na Tabela 8.

TABELA 8 - RESULTADO DO BLAST PARA O SEQUENCIAMENTO

Espécie	Cobertura da sequência	E-value	Identidade de Sequência	Número de acesso NCBI
<i>Leuconostoc lactis</i>	94 %	0,0	98,57 %	OM267729.1

FONTE: A autora (2025).

Essas informações confirmam a identidade do isolado, uma vez que 98,57% dos nucleotídeos da sequência isolada são idênticos aos da sequência de referência e 94% da sequência do isolado foi coberta pela sequência de referência. Além disso, o E-value indica que a probabilidade de a semelhança ser apenas uma coincidência é extremamente baixa.

O resultado vai de encontro com a literatura, especialmente considerando que, de acordo com Silva (2022) e Cancelli *et al.* (2024), culturas microbianas contendo bactérias do gênero *Leuconostoc lactis* são utilizadas como culturas iniciadoras (*starter*) para a produção de derivados lácteos, incluindo a manteiga, por conferir características sensoriais como aroma, sabor e textura a esses produtos, além de suas características funcionais como probióticos, e sua capacidade de reduzir o pH e inibir a multiplicação de microrganismos indesejáveis.

Para mais, a presença de *Leuconostoc lactis* foi verificada em derivados lácteos, como bebidas fermentadas, grãos de kefir (Fang *et al.*, 2020; Frenzel, 2020; Gao *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2012), queijos (Lopes *et al.*, 2011), e em idili, prato indiano fermentado (Saravanan; Shetty, 2016), entre outros.

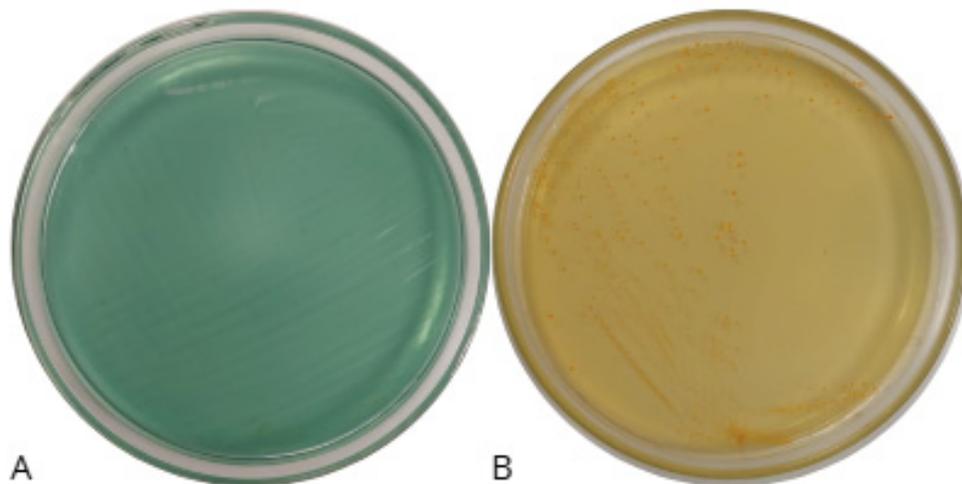
Apesar de sua vasta aplicação na área de alimentos, por sua capacidade de produzir enzimas, bacteriocinas, diacetil, citrato e dextranas (Cancelli *et al.*, 2024; Vedamuth, 1994), poucos são os trabalhos dispostos na literatura que utilizam o *Leuconostoc lactis* para obtenção do ácido láctico e  $\beta$ -galactosidase.

### 4.3 PRODUÇÃO DE LACTASE

Anteriormente aos ensaios de produção de  $\beta$ -galactosidase e ácido láctico, o microrganismo isolado foi testado quanto à sua capacidade de produção de lactase, através de teste bioquímico utilizando o meio ágar CLED.

A *Leuconostoc Lactis*, isolada do leite de manteiga, foi capaz de fermentar a lactose baixando o pH e proporcionando a mudança de cor, de verde para amarelo, demonstrando ser lactose positiva, conforme observado na Figura 5.

FIGURA 5 - PLACA DE ÁGAR CLED IMEDIATAMENTE APÓS A INOCULAÇÃO (A) E APÓS 48 HORAS DE CRESCIMENTO (B)



FONTE: A autora (2025).

Corroborando com esse resultado, autores relatam que, em determinadas condições, a *Leuconostoc lactis* é capaz de produzir lactase, no entanto, sua produção pode não ser tão significativa quanto a bactérias específicas para essa função (Alonso *et al.*, 2023; Ogier *et al.*, 2008; Kot *et al.*, 2014).

### 4.4 OBTENÇÃO DE $\beta$ -GALACTOSIDASE E ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DA ÁGUA DE FILAGEM E LEITELHO DE MANTEIGA

#### 4.4.1 Cinética da fermentação

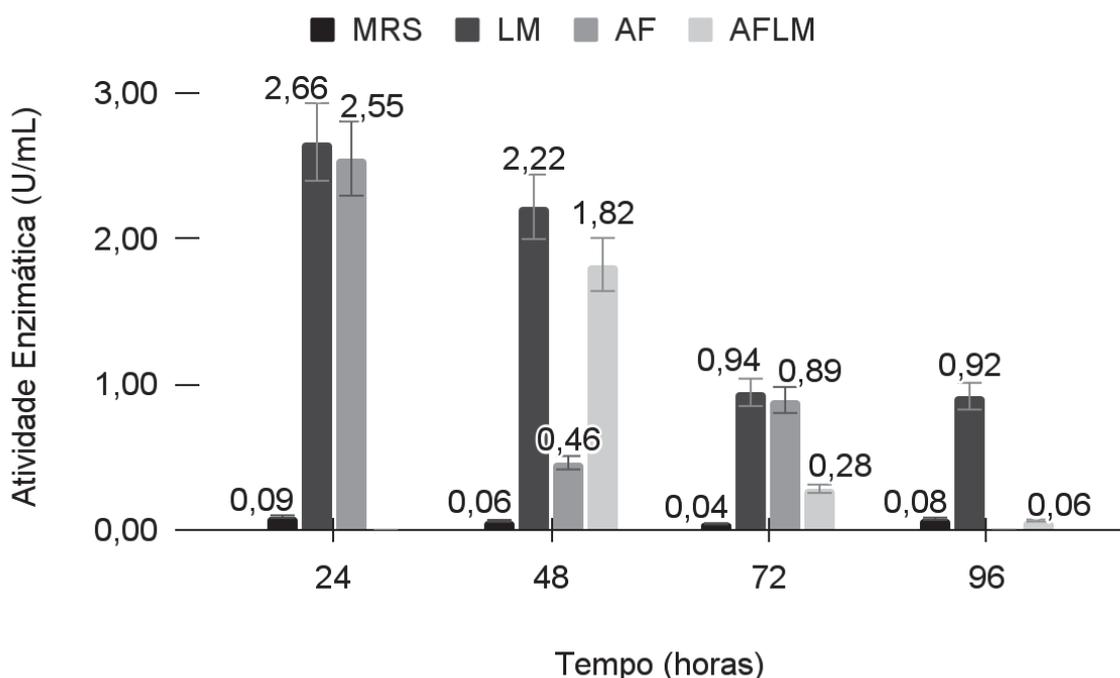
Para avaliar o tempo de fermentação empregado no estudo, inicialmente foram realizados ensaios com amostras coletadas a cada 24 horas por um período

total de 96 horas, utilizando os meios de cultivo MRS, AF, LM e AFLM inoculados com o *Leuconostoc lactis*.

Nesse ensaio o meio MRS foi utilizado como comparativo positivo para a produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores, no entanto, não foi suplementado com lactose.

Na Figura 6, é possível observar a produção de  $\beta$ -Galactosidase em U mL<sup>-1</sup>.

FIGURA 6 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE EM FUNÇÃO DO TEMPO



FONTE: A autora (2025).

Avaliando a atividade enzimática para os diferentes meios de cultivo em função do tempo, comparados ao tempo 0, evidencia-se que, na ausência da lactose, como é o caso do meio MRS, a enzima  $\beta$ -galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose, não é ativada ou expressa, pois a sua síntese geralmente é induzida na presença do carboidrato (Jesus, 2020).

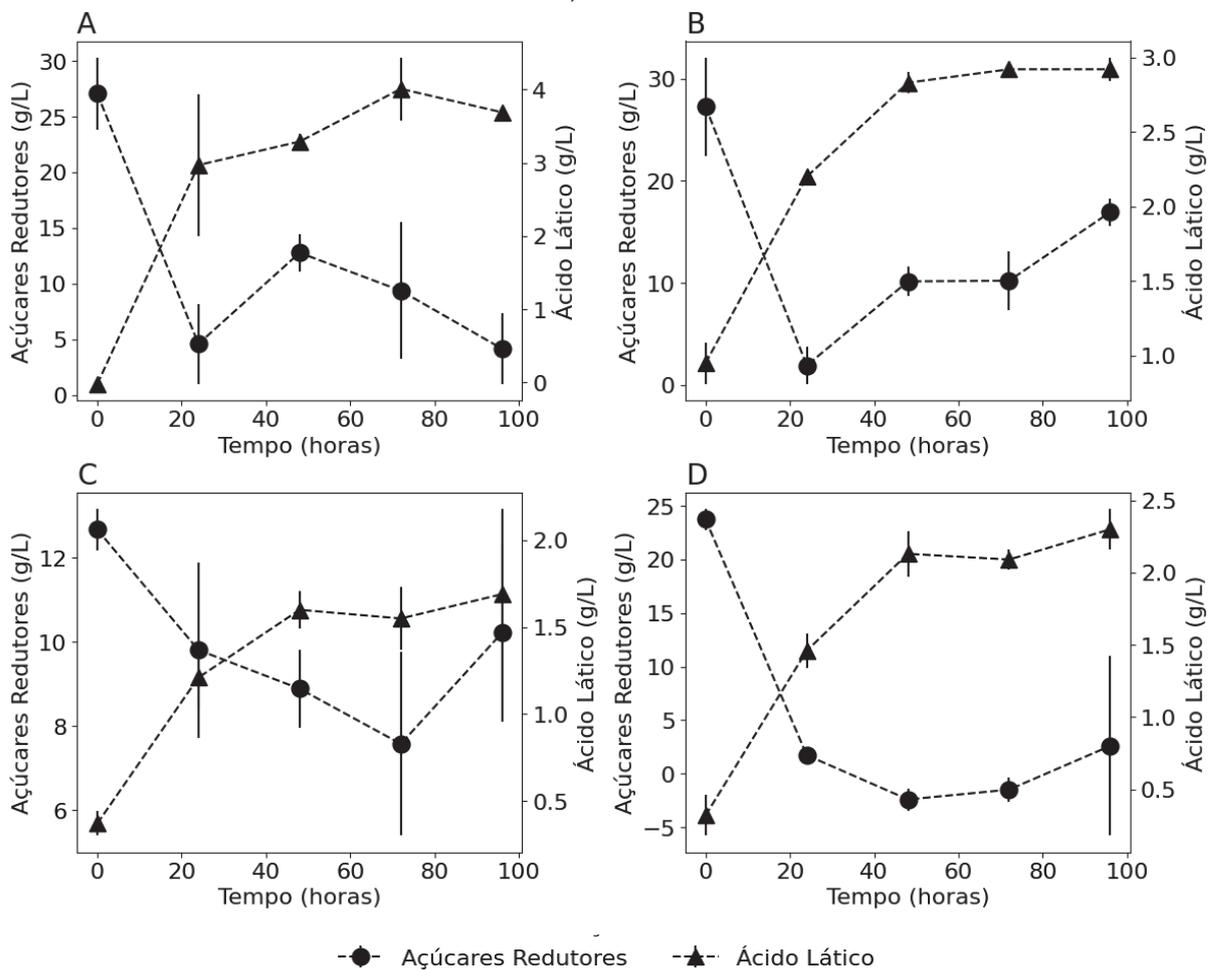
Por outro lado, na presença do carboidrato nos meios constituídos pelos efluentes de laticínios foram observadas atividades máximas de  $2,66 \pm 1,17$  U mL<sup>-1</sup> no substrato LM fermentado por 24 horas,  $2,55 \pm 0,31$  U mL<sup>-1</sup> na AF também após 24 horas de incubação e  $1,82 \pm 0,19$  U mL<sup>-1</sup> no meio AFLM após 48 horas de fermentação.

O estudo permitiu ainda observar a variação da atividade enzimática em função do tempo, sendo que, para o LM a maior atividade enzimática foi verificada

após 24 horas, seguida por uma diminuição, especialmente a partir de 72 horas de fermentação. Para a AF essa diminuição na atividade é observada imediatamente após as primeiras 24 horas, enquanto para a AFLM o maior valor da atividade enzimática foi observado para as amostras analisadas com 48 horas de fermentação, também seguida por um declínio.

Para a produção de ácido lático e consumo de açúcares redutores, os resultados estão contemplados nas Figura 7.

FIGURA 7 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO ( $\text{g L}^{-1}$ ) E CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES ( $\text{g L}^{-1}$ ) EM FUNÇÃO DO TEMPO NOS SUBSTRATOS CONSTITUÍDOS POR A) MRS, B) LM, C) AF E D) AFLM



FONTE: A autora (2025).

Analisando os gráficos para os diferentes meios de cultivo, observa-se aumento considerável no teor de ácido lático, especialmente nas primeiras 48 horas, com produções de até  $1,6 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$  para a AF,  $2,8 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$  para o LM e  $2,13 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1}$  no meio AFLM, com exceção, para o meio MRS, sintético, que demonstrou maior concentração de  $4,01 \pm 0,43 \text{ g L}^{-1}$  com 72 horas de fermentação.

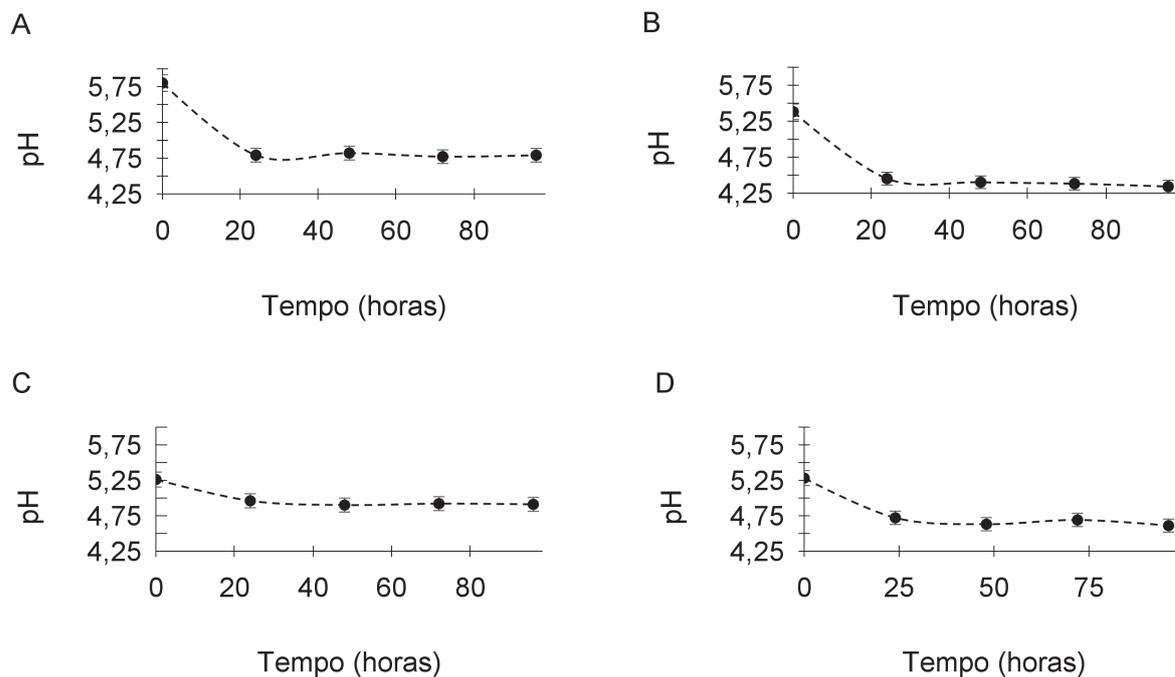
Posteriormente, a conversão dos substratos nos produtos biotecnológicos se estabiliza. No curso da fermentação, o ácido lático vai acumulando no meio enquanto o carboidrato é consumido, o que também pode ser observado através dos gráficos, quando os açúcares são exauridos, a concentração de ácido lático passa a diminuir (Lauffer, 2019).

O consumo de açúcares redutores é evidenciado pela diminuição nas concentrações dos mesmos quando comparados os valores iniciais e finais. No entanto, no decorrer da fermentação, as concentrações de açúcares variam, possivelmente em função da hidrólise da lactose em seus monômeros, da formação de intermediários metabólicos e da lise celular em estágios avançados da fermentação que proporcionam o incremento de açúcares redutores aos substratos (Alves *et al.*, 2020).

Esse fenômeno pode ser observado, levando em consideração os picos de maior concentração de ácido lático ( $2,13 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1}$ ), ou seja, conversão do substrato no bioproduto, concentração de açúcares redutores ( $26,14 \pm 1,05 \text{ g L}^{-1}$ ) maior do que no horário anterior ( $22,01 \pm 0,22 \text{ g L}^{-1}$ ) indicando à hidrólise da lactose presente no meio AFLM, associado a maior atividade enzimática observada para esse substrato no período ( $1,82 \pm 0,19 \text{ U mL}^{-1}$ ).

A formação do ácido também foi confirmada pela diminuição do pH no decorrer do tempo, observada principalmente nas primeiras horas de fermentação, conforme exposto no gráfico da Figura 8. À medida que os açúcares são fermentados, e o ácido lático produzido, a acidez aumenta e o pH diminui em função da dissociação do ácido (González; Silva, 2022).

FIGURA 8 - AVALIAÇÃO DO pH EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA OS SUBSTRATOS A) MRS, B) LM, C) AF E D) AFLM



FONTE: A autora (2025).

Desse modo, o estudo permitiu observar que os meios compostos por subprodutos de laticínio caracterizam-se como uma possibilidade na substituição do meio sintético, apesar de suas limitações e consequente produção inferior. Quando comparada a relação entre as concentrações de ácido láctico obtido pela fermentação dos meios alternativos e do meio sintético, os valores representam em torno de 60 %. Nesse aspecto, a caracterização e suplementação dos subprodutos surge como uma ferramenta valiosa para obtenção de produtos de interesse através de meios com baixo valor agregado.

Considerando os melhores resultados apresentados para a produção de ácido láctico e consumo de açúcares, associado a baixa atividade enzimática observada a partir da fermentação dos subprodutos de laticínio inoculados com o *Leuconostoc lactis*, para este estudo, optou-se pela fermentação dos substratos pelo período de 48 horas. Além disso, para o meio AFLM, foi observada maior atividade enzimática nesse mesmo período de fermentação.

#### 4.4.2 Obtenção da $\beta$ -galactosidase, ácido láctico e consumo de açúcares redutores por meio do planejamento experimental fatorial $2^3$ com quadruplicata no ponto central

Foram então realizados os ensaios de fermentação dos subprodutos inoculados com o *Leuconostoc lactis*, quantificando a atividade de  $\beta$ -galactosidase e o ácido láctico produzido. Além disso foi acompanhado o consumo de açúcares redutores e o pH. Os resultados estão dispostos na Tabela 9.

TABELA 9 - RESULTADOS PARA A PRODUÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE E ÁCIDO LÁCTICO, VARIAÇÃO DE pH E CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES DE ACORDO COM A MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL  $2^3$

Experimento	Atividade de $\beta$ -galactosidase (U mL <sup>-1</sup> )	Ácido Láctico (g L <sup>-1</sup> )	Consumo de açúcares redutores (g L <sup>-1</sup> )	pH
1 (AF; 30°C; 2%)	1,64 ± 0,06	3,53 ± 0,15	8,20 ± 0,11	4,50 ± 0,02
2 (LM; 40°C; 6%)	0,89 ± 0,03	5,43 ± 0,23	2,65 ± 0,58	4,59 ± 0,01
3 (AF; 30 °C; 6%)	1,34 ± 0,17	3,73 ± 0,15	3,81 ± 0,74	4,50 ± 0,05
4 (AF; 40 °C; 2%)	0,58 ± 0,07	4,63 ± 0,47	2,71 ± 0,02	4,66 ± 0,05
5 (AF; 40 °C; 6%)	0,49 ± 0,15	3,20 ± 0,17	10,22 ± 0,12	4,83 ± 0,03
6 (AF; 30 °C; 2%)	0,29 ± 0,02	3,03 ± 0,12	6,15 ± 0,28	4,84 ± 0,03
7 (LM; 40 °C; 2%)	0,50 ± 0,15	2,43 ± 0,29	8,11 ± 0,38	5,00 ± 0,05
8 (LM; 30 °C; 6%)	0,23 ± 0,06	2,20 ± 0,00	1,92 ± 0,38	5,08 ± 0,02
9 (AFLM; 35 °C; 4%)	0,13 ± 0,03	4,27 ± 0,38	1,53 ± 0,92	4,79 ± 0,01
10 (AFLM; 35 °C; 4%)	0,15 ± 0,04	4,27 ± 0,23	1,59 ± 0,98	4,78 ± 0,01
11 (AFLM; 35 °C; 4%)	0,18 ± 0,02	4,33 ± 0,06	2,33 ± 0,58	4,78 ± 0,01
12 (AFLM; 35 °C; 4%)	0,23 ± 0,03	4,50 ± 0,10	2,55 ± 0,98	4,75 ± 0,01

FONTE: A autora (2025).

As melhores condições de ensaio para a atividade de  $\beta$ -galactosidase foram observadas nos tratamentos 1 e 3, ambos compostos por AF e incubados a 30 °C, sendo o primeiro suplementado com 2 % de extrato de levedura e o segundo com 6 % de extrato, com resultados de 1,64 ± 0,06 e 1,34 ± 0,17 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Nesse aspecto, evidencia-se que o substrato composto por AF favorece a atividade enzimática.

Além disso, para esses mesmos ensaios compostos por AF, evidencia-se que a suplementação com extrato de levedura influencia negativamente a atividade enzimática. Em contrapartida, a comparação entre os ensaios 7 (0,50 ± 0,15 U mL<sup>-1</sup>) e 2 (0,89 ± 0,03 U mL<sup>-1</sup>), constituídos por LM incubados a 40 °C, com 2 e 6% de extrato de levedura respectivamente, permite observar que a suplementação desse substrato, com maior percentual de extrato de levedura, tem efeito positivo.

Nesse aspecto, o substrato para o crescimento microbiano tem papel

fundamental na atividade da  $\beta$ -galactosidase, pois ele fornece os nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano e a expressão enzimática. A suplementação com extrato de levedura pode estimular o crescimento celular, bem como a atividade enzimática, pois é uma fonte rica em aminoácidos, vitaminas e cofatores essenciais. Além disso, pode minimizar efeitos inibidores ao fornecer estabilidade à enzima e atuar como modulador da sua expressão. No entanto, a suplementação do meio deve ser otimizada, pois o excesso do extrato de levedura pode causar repressão catabólica ou desbalanço nutricional (Malajovich, 2016).

Corroborando com esse estudo, a capacidade de produção da  $\beta$ -galactosidase, por isolados de bactérias ácido lácticas, foi verificada por Bellaver (2017) avaliando 19 isolados bacterianos selecionados quanto a produção da enzima, utilizando o cromógeno X-gal. Os melhores resultados obtidos pelo autor demonstraram mensurações de em torno de  $0,066 \text{ U mL}^{-1}$ , comprovando a capacidade dos isolados em produzir a enzima .

Bosso *et al.* (2019) observaram atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase de  $1,19 \text{ U mL}^{-1}$ , semelhante aos melhores resultados verificados no presente estudo. O autor trabalhou com a produção da enzima por *Aspergillus oryzae*, sob condições de cultivo de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  em meio composto por soro de queijo 10% (p/v) reconstituído em água destilada, desproteínizado com adição de ácido láctico e pH ajustado em 4.

Em contrapartida, os resultados observados por Jesus (2020) para a atividade de  $\beta$ -galactosidase ( $28 \text{ U L}^{-1}$ ) obtida da fermentação submersa de meio Nakao-lactose modificado, adicionado de 3% (v/v) de soro de leite, utilizando fungos filamentosos, foram bem superiores ao evidenciados no presente estudo.

Conforme o observado neste estudo, vários fatores podem influenciar na atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase, tais como o microrganismos, o substrato, as condições de reação, conforme demonstrado na Tabela 10.

TABELA 10 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES À ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO DE DIVERSOS SUBSTRATOS, COM DIFERENTES INÓCULOS MICROBIANOS COMPARADOS AOS OBTIDOS NESTE ESTUDO

Referência	Substrato	Inóculo	Condições de fermentação	Atividade de $\beta$ -galactosidase
Martarello (2016)	Meio mínimo complementado 2% casca de soja enriquecido com 2% de lactose	<i>Aspergillus foetidus</i>	pH 7 28 °C 120 rpm 7 dias	26,4 U mL <sup>-1</sup>
Pereira (2014)	Soro de leite suplementado com extrato de levedura	<i>Kluyveromyces lactis</i>	pH 6 30 °C 200 rpm 5 horas	1,009 U mL <sup>-1</sup>
Bosso <i>et al.</i> (2019)	Soro de leite 10% (p/v) reconstituído em água destilada	<i>Aspergillus oryzae</i>	pH 4 28 °C 100 rpm 7 dias	1,19 U mL <sup>-1</sup>
Jesus (2020)	Nakao-lactose + 3% (v/v) de soro de leite	<i>Trichoderma sp.</i>	30 °C 120 rpm 13 dias	28.000 U mL <sup>-1</sup>
Este estudo	AF com 2 % de extrato de levedura	<i>Leuconostoc lactis</i>	pH 6,2 30 °C 150 rpm 48 horas	1,64 U mL <sup>-1</sup>
Este estudo	LM com 6% de extrato de levedura	<i>Leuconostoc lactis</i>	pH 6,2 40 °C 150 rpm 48 horas	0,89 U mL <sup>-1</sup>

FONTE: A autora (2025).

O efeito da temperatura também foi observado para a produção de ácido láctico. O maior valor de produção de ácido láctico foi observado no experimento 2 (LM; 40 °C; 6 % de extrato de levedura), com produção de  $5,43 \pm 0,23 \text{ g L}^{-1}$  seguido pelo ensaio 4 (AF; 40 °C; 2 % de extrato de levedura), com  $4,63 \pm 0,47 \text{ g L}^{-1}$ . Resultados semelhantes foram observados para os ensaios de repetição do ponto central, 9, 10, 11 e 12, compostos por AFLM, incubados a 35 °C, com 4 % de extrato de levedura, com produções variando entre  $4,27 \pm 0,38$  e  $4,5 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ .

Os tratamentos 1 (AF; 30 °C; 2 % de extrato de levedura) e 3 (AF; 30 °C; 6 % de extrato de levedura) demonstraram que a suplementação do substrato, constituído por água de filagem, com 6 % de extrato de levedura, tem efeito positivo sobre a produção de ácido láctico, sendo que o resultado obtido foi melhor para substrato com maior suplementação. Semelhantemente, a suplementação com extrato de levedura a 6 % demonstrou impacto favorável para o substrato constituído por LM.

Essa contribuição também foi observada tendo em consideração os ensaios 8, 7 e 6, que demonstraram, respectivamente, os menores resultados ( $2,20 \pm 0,00$ ,

2,43 ± 0,29 e 3,03 ± 0,12 g L<sup>-1</sup>). Os experimentos 6 e 7, compostos por LM suplementado com apenas 2 % de extrato de levedura, e o experimento 8, com 6 % de suplementação, incubado a 30 °C. O experimento 2 (5,43 ± 0,23 g L<sup>-1</sup>), por outro lado, permitiu a obtenção de concentrações maiores de ácido láctico, sendo realizado a 40 °C e suplementado com 6% do extrato.

Reforçando esses resultados, alguns autores citam que a produção de ácido láctico é fortemente influenciada pela concentração inicial de nitrogênio. Sendo assim, a utilização do extrato de levedura adicionalmente ao nitrogênio presente nos derivados lácteos (oriundo da hidrólise da caseína, que é a proteína do leite), pode ser uma opção para garantir o suprimento de nutrientes essenciais para o processo fermentativo (Lauffer, 2019).

De acordo com Lauffer (2019), menores produções de ácidos podem ser observadas em fermentação de meios alternativos quando comparados a meios sintéticos, o que pode estar relacionado à presença de compostos inibitórios nos meios de cultivos. Esses efeitos podem ser contornados a partir da escolha adequada do microrganismo, bem como dos substratos a serem utilizados na fermentação.

Além do efeito inibitório, o substrato utilizado no processo fermentativo tem papel importante considerando que espécies de *Leuconostoc* spp. se desenvolvem melhor em meios com alta atividade proteolítica, utilizando metabólitos peptídicos provenientes de outros microrganismos para prosperarem e produzirem compostos de importância tecnológica como o acetaldeído, o acetato e o lactato (Issa; Tahergorabi, 2019).

Dourado *et al.* (2024) avaliando influência de diferentes meios de cultura, dos quais soro de leite coagulado e soro de leite coagulado, além de meio MRS, inoculados com *Lactococcus lactis*, verificaram a produção respectiva de 1,64 ± 0,05, 1,51 ± 0,13 e 7,63 ± 0,84 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico.

Semelhantemente, Lauffer (2019) ao realizar a comparação cinética de produção de ácido láctico em diferentes meios, observou concentração máxima de 6,05 g L<sup>-1</sup> do ácido em 10 horas de fermentação do meio MRS, e 3,98 g L<sup>-1</sup> do ácido, obtidos da fermentação do hidrolisado de casca soja em 32 horas.

Os resultados disposta na literatura estão confrontados aos obtidos no presente estudo na Tabela 11:

TABELA 11 - TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTES À SÍNTESE DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO DE DIVERSOS SUBSTRATOS, COM DIFERENTES INÓCULOS MICROBIANOS COMPARADOS AOS OBTIDOS NESTE ESTUDO

Referência	Meio de cultivo	Inóculo	Condições	Ácido Lático g L <sup>-1</sup>
Dourado <i>et al.</i> (2024)	Soro coagulado	<i>Lactococcus lactis</i>	30 °C; 150 rpm; 48 h	1,64 ± 0,05
Dourado <i>et al.</i> (2024)	Soro filtrado	<i>Lactococcus lactis</i>	30 °C; 150 rpm; 48 h	1,51 ± 0,13
Dourado <i>et al.</i> (2024)	MRS	<i>Lactococcus lactis</i>	30 °C; 150 rpm; 48 h	7,63 ± 0,84
Lauffer (2019)	MRS	<i>Lactobacillus sp.</i>	37 °C; 150 rpm; 10 h	6,05
Lauffer (2019)	Casca de soja	<i>Lactobacillus sp.</i>	37 °C; 150 rpm; 32 h	3,98
Este estudo	LM + 6 % de EL	<i>Leuconostoc lactis</i>	40 °C; 150 rpm; 48 h	5,43 ± 0,23
Este estudo	AF + 2 % de EL	<i>Leuconostoc lactis</i>	40 °C; 150 rpm; 48 h	4,63 ± 0,47
Este estudo	AFLM + 4 % de EL	<i>Leuconostoc lactis</i>	35 °C; 150 rpm; 48 h	4,50 ± 0,10

FONTE: A autora (2025).

Os maiores rendimentos observados no presente estudo se mostraram superiores aos verificados pelos autores para os diferentes subprodutos agroindustriais, no entanto, inferiores quando comparados aos meios sintéticos.

A disponibilidade de açúcares é essencial para a produção do ácido lático. Durante o processo fermentativo, a quebra da lactose proporciona o incremento de açúcares fermentescíveis como glicose e galactose, graças à ação da  $\beta$ -galactosidase. Posteriormente, esses açúcares são convertidos em ácido lático e energia, o que leva à diminuição dos mesmos no meio (Alves *et al.*, 2020).

A avaliação da diferença de açúcares redutores presentes no início e final da fermentação, corrobora com os resultados avaliados para a atividade enzimática considerando a predominância da lactose nos subprodutos de laticínios.

A diminuição na concentração de açúcares redutores foi substancialmente menor nos ensaios 8, 9, 10, 11 e 12, compostos por AFLM, incubados a 35 °C, com 4 % de extrato de levedura, que também demonstraram as menores atividades enzimáticas. Contrariamente, os mesmos ensaios apresentaram bons resultados para a produção de ácido lático.

Nesse aspecto, o acúmulo do ácido lático no meio, pode estar relacionado a inibição da atividade da  $\beta$ -galactosidase (Dourado *et al.*, 2024). Para além, o inverso foi observado no ensaio 1 (AF; 30 °C; 2 % de extrato de levedura), que apresentou maior atividade enzimática associada a um consumo maior de açúcares redutores e menor produção de ácido.

Os valores mais elevados para a conversão de carboidratos foram observados nos ensaios 5 (10,22 ± 0,12 g L<sup>-1</sup>) e 1 (8,20 ± 0,38 g L<sup>-1</sup>), realizados em AF contendo 6% de extrato de levedura. Esses resultados foram sucedidos pelos observados para os ensaios 6 (6,15 ± 0,28 g L<sup>-1</sup>) e 7 (8,11 ± 0,38 g L<sup>-1</sup>), constituídos

por LM suplementados a 2% com extrato de levedura.

#### 4.4.3 Variação de pH

O maior valor de pH foi constatado para o ensaio 8 realizado em LM com 6 % de extrato de levedura, fermentado a 30 °C. O ensaio também demonstrou menor consumo de açúcares e conversão dos mesmos em ácido lático. Além disso, foi um dos que apresentou menor atividade enzimática.

Em contrapartida, os ensaios 1 e 3, ambos constituídos por AF e fermentados a 30 °C, demonstraram os melhores resultados para atividade enzimática e também os menores valores de pH ( $4,5 \pm 0,05$ ). Tais resultados vão de encontro com valores ótimos da atividade enzimática, observado por Jesus (2020), que verificou que  $\beta$ -galactosidases produzidas por *Trichoderma* sp. em fermentação submersa e em estado sólido possuem atividade ótima em pH de 4,2 e 4,5, respectivamente.

Considerando o exposto, evidencia-se que a utilização de água de filagem e leite de manteiga para a obtenção de produtos de interesse apresenta uma possibilidade para o reaproveitamento desses subprodutos, sendo necessários novos estudos a fim de aprimorar a eficiência do processo.

#### 4.4.4 Análise estatística dos dados

A fim de avaliar os efeitos da composição do substrato, temperatura e suplementação com extrato de levedura, sobre a atividade de  $\beta$ -galactosidase e o rendimento da reação de síntese de ácido lático, adotou-se o delineamento fatorial  $2^3$  com 4 repetições no ponto central. O delineamento permitiu estudar os três fatores, cada um em dois níveis (+ e -), capturando não apenas os efeitos principais de cada fator, mas também suas interações de primeira e segunda ordem.

Para avaliar quais fatores influenciaram mais as variáveis respostas estudadas e se há interações significativas entre eles os dados foram submetidos à ANOVA, posteriormente à regressão, para a construção de um modelo matemático capaz de quantificar a relação entre os fatores, bem como, foram avaliados indícios de não linearidade no sistema através da verificação da curvatura.

#### 4.4.4.1 Obtenção da $\beta$ -galactosidase

Os resultados para a ANOVA, tomando a  $\beta$ -galactosidase como variável resposta, estão dispostos na Tabela 1 do Apêndice 2.

As estimativas dos efeitos principais e de interação entre as variáveis estão apresentadas na Tabela 12, juntamente com os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, valores dos coeficientes das variáveis no modelo e coeficiente de determinação do modelo ( $R^2$ ) com um nível de significância ( $\alpha=0,05$ ). Nessa tabela os valores destacados em itálico evidenciam os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

TABELA 12 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADOS COM *Leuconostoc lactis* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

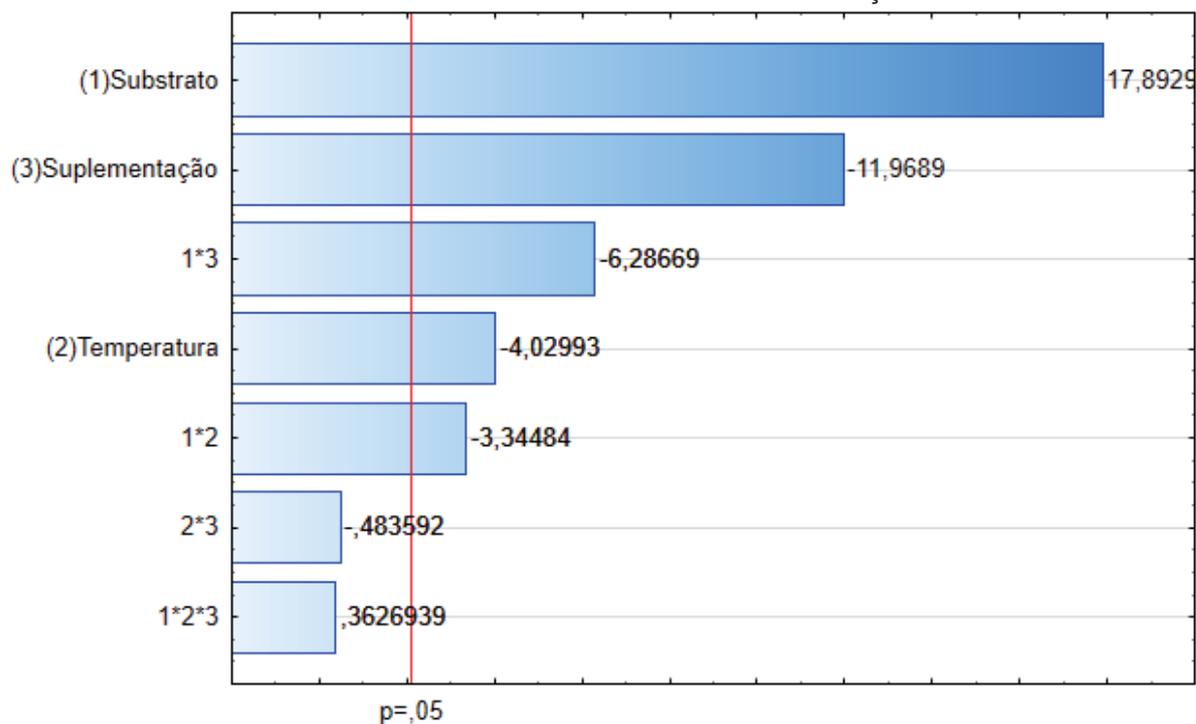
Fator	p-valor	Coefficiente	Erro
<i>Intercepto</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,7458</i>	<i>0,0207</i>
<i>(1) Substrato</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,7400</i>	<i>0,0413</i>
<i>(2) Temperatura</i>	<i>0,0010</i>	<i>-0,1667</i>	<i>0,0413</i>
<i>(3) Suplementação</i>	<i>0,0000</i>	<i>-0,4950</i>	<i>0,0413</i>
<i>1*2</i>	<i>0,0041</i>	<i>-0,1383</i>	<i>0,0413</i>
<i>1*3</i>	<i>0,0000</i>	<i>-0,2600</i>	<i>0,0413</i>
<i>2*3</i>	<i>0,6352</i>	<i>-0,0200</i>	<i>0,0413</i>
<i>1*2*3</i>	<i>0,7216</i>	<i>0,0150</i>	<i>0,0413</i>

$R^2 = 0,9707$ .

FONTE: A autora (2025).

Os níveis de significância dessas variáveis podem também ser observados através do gráfico de Pareto indicado na Figura 9, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão. Nele, os valores que se encontram à direita da linha vermelha, demonstram significância sobre a variável resposta.

FIGURA 9 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DA ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM *Leuconostoc lactis* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES



FONTE: A autora (2025).

A análise dos coeficientes da regressão, associada ao gráfico de Pareto, permite observar que os fatores substrato, suplementação extrato de levedura e temperatura, bem como a interação entre o substrato e a suplementação, e o substrato e a temperatura, são influenciadores da atividade enzimática, apresentando p-valores significativos.

O coeficiente positivo do substrato (0,7400) indica que um aumento na proporção de leite de manteiga tende a proporcionar o aumento da atividade de  $\beta$ -galactosidase, enquanto os coeficientes negativos da temperatura (-0,1667) e suplementação (-0,4950) sugerem que quanto maior a temperatura e a concentração de extrato de levedura menor a resposta de atividade enzimática.

Da mesma forma, as interações entre os fatores substrato e temperatura e substrato e suplementação apresentaram efeitos significativos, indicando que quando combinados impactam estatisticamente a atividade enzimática, de modo que o efeito da temperatura depende do tipo de substrato, e o efeito da suplementação também varia em função do substrato utilizado.

A interação entre temperatura e suplementação, assim como a interação tripla entre os fatores, por outro lado, não impactam de forma relevante a atividade de

$\beta$ -galactosidase.

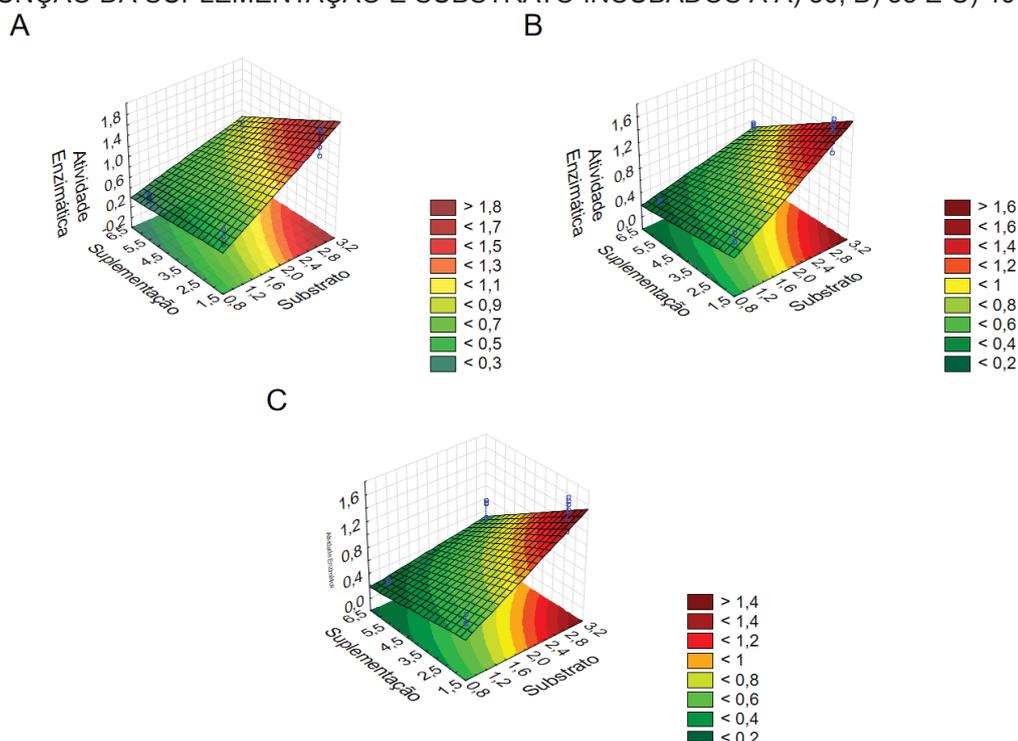
Para a melhor visualização do efeito das interações dos fatores sobre a atividade enzimática, foram dispostas a seguir as superfícies de resposta para cada combinação entre fatores.

No comparativo entre suplementação e substrato, é possível observar que a maior produção enzimática foi obtida para o leite de manteiga e que a suplementação com extrato de levedura tem leve efeito negativo sobre a atividade nas três temperaturas avaliadas em A) 30, B) 35 e C) 40 °C dispostas na Figura 10.

Para mais, as superfícies de resposta da temperatura em relação ao substrato, apresentada na Figura 11 em A) 2, B) 4 e C) 6%, demonstram que o aumento de temperatura também tende a ocasionar uma diminuição na atividade de  $\beta$ -galactosidase.

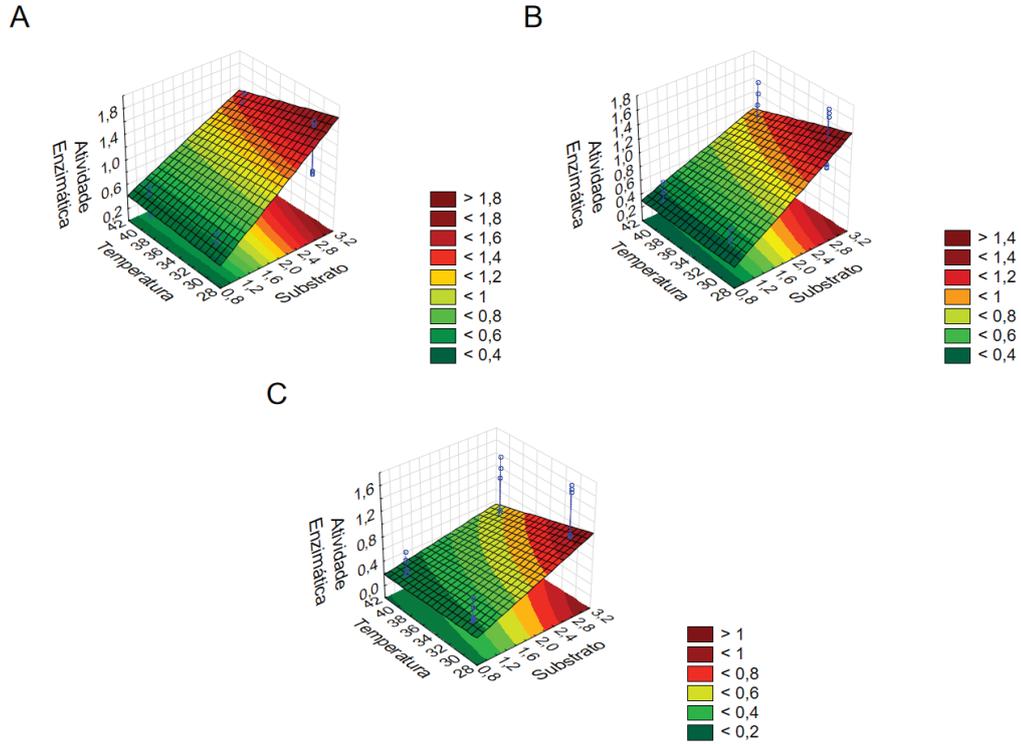
Já as interações entre suplementação e temperatura, apesar de não significativas, permitem verificar o efeito negativo da suplementação, bem como, que o aumento de temperatura implica na redução da atividade enzimática, especialmente, para os meios que contém leite de manteiga em sua composição (Figura 12) A) AF, B) AFLM e C) LM.

FIGURA 10 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM *Leuconostoc lactis* EM FUNÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO E SUBSTRATO INCUBADOS A A) 30, B) 35 E C) 40 °C



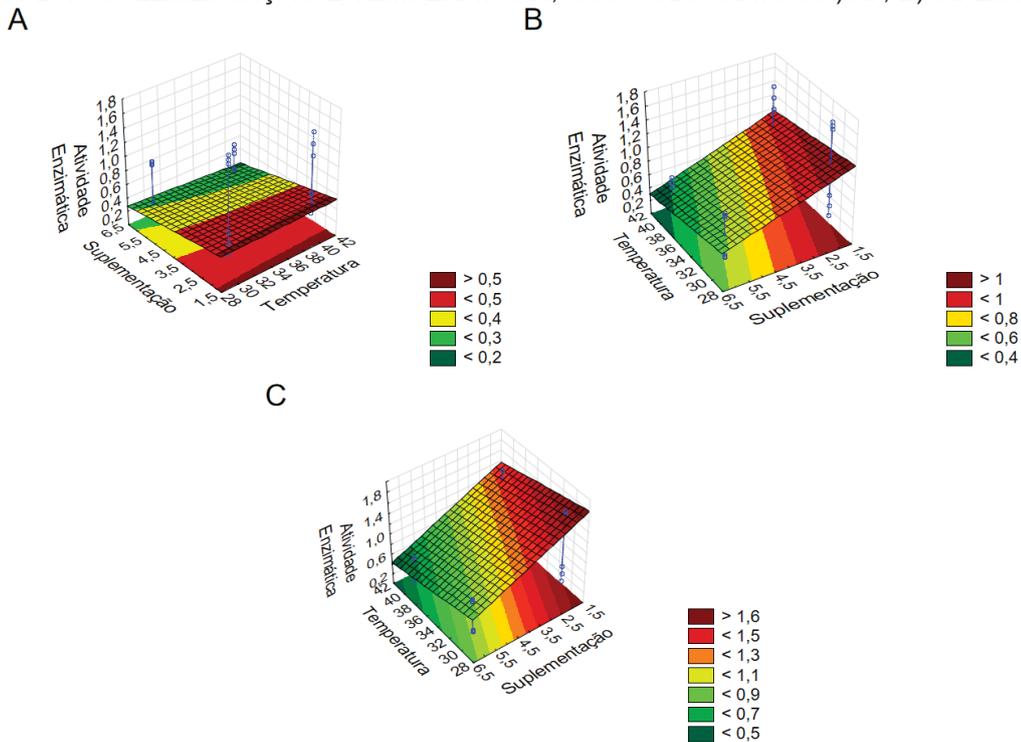
FONTE: A autora (2025).

FIGURA 11 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM *Leuconostoc lactis* EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E SUBSTRATO, COM SUPLEMENTAÇÃO EM A) 2, B) 4 E C) 6%



FONTE: Autora (2025).

FIGURA 12 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM *Leuconostoc lactis* EM FUNÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO E TEMPERATURA, NOS SUBSTRATOS A) AF, B) AFLM E C) LM



FONTE: A autora (2025).

Os erros padrão observados são relativamente homogêneos, em torno de 0,04 para a maioria dos coeficientes, sugerindo que a variabilidade das estimativas é consistente. E o intercepto, de 0,7458, representa o valor médio estimado da atividade enzimática quando todos os fatores estão no nível base.

A partir da estimativa dos efeitos da ANOVA obteve-se a equação que representa o modelo, conforme demonstrado pela Equação 5, considerando as variáveis reais.

$$AE = 1,22S + 0,02T + 0,09EL - 0,02S * T - 0,09S * EL - 0,002T * EL - 0,001S * T * EL - 0,75 \quad (5)$$

Em que,

AE = atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase;

S = substrato;

T = temperatura;

EL = suplementação com extrato de levedura.

Para mais, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9707, permite afirmar que cerca de 97 % da variação na atividade de  $\beta$ -galactosidase pode ser explicada pelos fatores analisados.

A análise de regressão linear, para a atividade de  $\beta$ -galactosidase, considerando os dados referentes ao planejamento experimental  $2^3$ , estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 - ANOVA PARA ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE OBTIDA PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM *Leuconostoc lactis* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Regressão</i>	<i>4,9224</i>	<i>3</i>	<i>1,6408</i>	<i>47,6724</i>	<i>0,0000</i>
Resíduo	0,6884	20	0,0344		
Total	5,6108				

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

$R^2=0,8773$ .

FONTE: A autora (2025).

O modelo de regressão ajustado com as três variáveis independentes demonstrou significância estatística global (p-valor < 0,0001) ao nível de 5%, indicando que pelo menos uma das variáveis independentes contribui de forma

relevante para explicar a variabilidade da variável resposta. A soma de quadrados da regressão ( $SQ = 4,9224$ ), associada a 3 graus de liberdade, resultou em um quadrado médio ( $QM = 1,6408$ ) e estatística F igual a 47,67.

A soma de quadrados do resíduo ( $SQ = 0,6884$ ) com 20 graus de liberdade resultou em um quadrado médio residual de 0,0344, representando a variabilidade não explicada pelo modelo. Enquanto a proporção de variância foi explicada pelo coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,8773$ ), que indica que aproximadamente 87 % da variação da resposta foi explicada pelo modelo, evidenciando um bom ajuste.

Embora o valor indique um ajuste bom, um  $R^2$  mais próximo de 1 demonstraria um modelo que explicaria uma maior proporção da variação observada. Desse modo, para uma conclusão mais precisa sobre a influência das variáveis independentes, sobre a variável resposta, sucedeu-se com a ANOVA levando em consideração o planejamento experimental  $2^3$  com quadruplicatas no ponto central, visando observar a não linearidade ou presença de curvatura nos dados. Os valores estão representados na Tabela 1 do Apêndice 3.

A adoção de um modelo que avalia a curvatura mostrou-se mais adequada para representar a atividade de  $\beta$ -galactosidase, uma vez que foi observada significância estatística do termo de curvatura ( $p = 0,0000$ ) com  $R^2$  igual a 0,9769. A significância estatística do termo de curvatura indica que a relação entre os fatores substrato, temperatura e suplementação frente a atividade de  $\beta$ -galactosidase é não linear, revelando a presença de um ponto ótimo dentro da faixa experimental avaliada. Para mais, as interações de segunda ordem também se mostraram significativas, demonstrando que o efeito de um fator depende dos níveis dos demais.

Os modelos lineares, por sua natureza, assumem relações diretas e proporcionais entre as variáveis independentes e a variável resposta, de modo que não capturam curvaturas nem interações complexas de ordem superior entre os fatores. Como consequência, sua aplicação pode resultar em baixo poder preditivo e explicação limitada da variabilidade dos dados. Quando os pontos centrais diferem significativamente da média dos pontos fatoriais, modelos quadráticos se mostram mais adequados para a predição dos resultados. A incorporação de termos quadráticos permite capturar de forma mais realista os máximos, mínimos e padrões de comportamento não lineares da variável resposta, proporcionando assim uma descrição mais fiel e precisa do sistema.

#### 4.4.4.2 Obtenção de ácido lático

Os resultados da ANOVA para as concentrações de ácido lático obtidos a partir da fermentação de subprodutos de laticínio inoculados com *Leuconostoc lactis* estão apresentados no Apêndice 2, Tabela 2.

As estimativas dos efeitos principais e das interações entre as variáveis, juntamente com os valores de erro padrão, p-valor, coeficientes das variáveis no modelo e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo, foram calculadas considerando um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ) e estão dispostos na Tabela 14, a seguir. Os valores destacados em itálico indicam efeitos estatisticamente significativos para um intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

TABELA 14: ESTIMATIVA DOS EFEITOS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDAS PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADOS COM *Leuconostoc lactis* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

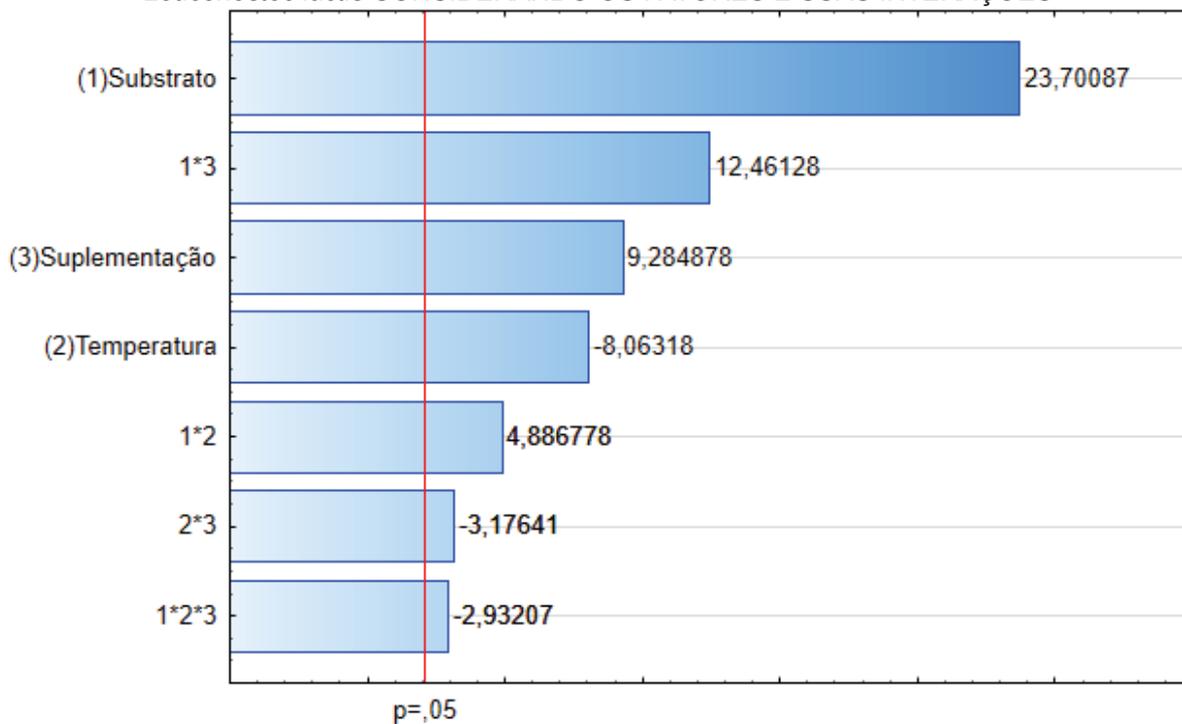
Fator	p-valor	Coefficiente	Erro
<i>Intercepto</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,3567</i>	<i>0,0034</i>
<i>(1) Substrato</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,0808</i>	<i>0,0034</i>
<i>(2) Temperatura</i>	<i>0,0000</i>	<i>-0,0275</i>	<i>0,0034</i>
<i>(3) Suplementação</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,0317</i>	<i>0,0034</i>
<i>1*2</i>	<i>0,0002</i>	<i>0,0167</i>	<i>0,0034</i>
<i>1*3</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,0425</i>	<i>0,0034</i>
<i>2*3</i>	<i>0,0057</i>	<i>-0,0108</i>	<i>0,0034</i>
<i>1*2*3</i>	<i>0,0098</i>	<i>-0,0100</i>	<i>0,0034</i>

$R^2 = 0,9827$ .

FONTE: A autora (2025).

Os níveis de significância das variáveis podem ser visualizados no Gráfico de Pareto apresentado na Figura 13, onde os valores que se encontram à direita da linha vermelha indicam efeitos estatisticamente significativos, ou seja, os fatores que influenciam de forma relevante o resultado observado.

FIGURA 13 - GRÁFICO DE PARETO PARA ANOVA DE CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁCTICO OBTIDAS PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM *Leuconostoc lactis* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES



FONTE: A autora (2025).

A avaliação dos resultados permite compreender como os diferentes fatores e suas interações influenciam a produção de ácido láctico durante o processo fermentativo.

O valor de p igual a 0,0000, do intercepto, indica que, independente dos fatores, há uma produção significativa de ácido láctico, ou seja, há considerável produção de ácido láctico nas condições centrais do delineamento. Adicionalmente, o coeficiente do intercepto de 0,3567 sugere que, sem a influência dos fatores analisados, a concentração base de ácido láctico é de 0,36 % de ácido láctico (m/v), representando um total de 3,57 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico. O erro padrão de 0,0034 reflete a precisão dessa estimativa.

Os três fatores analisados individualmente demonstraram efeitos significativos na produção de ácido láctico, com p-valores de 0,0000. O coeficiente de 0,0808 aponta que, com um incremento de 0,08 % de leiteiro de manteiga na composição do substrato, espera-se um aumento proporcional na concentração de ácido láctico. O coeficiente de 0,0317, indica que um aumento no teor de suplementação contribui em mesma proporção para a conversão dos substratos no bioproduto. O coeficiente negativo (-0,0296), da temperatura, em contrapartida, sugere uma relação inversa

entre temperatura e produção de ácido láctico, ou seja, o aumento da temperatura, resulta na redução da concentração do ácido láctico no meio.

O coeficiente negativo da interação de terceira ordem (- 0,0100) indica que quando os três fatores estão em seus níveis máximos (+1), a produção de ácido láctico tende a cair, demonstrando possível saturação ou antagonismo complexo no sistema. A interação entre substrato e temperatura (0,0167), revela sinergia positiva entre os fatores, de modo que, observa-se um aumento na produção de ácido láctico quando os fatores simultaneamente estão em +1. O mesmo é observado para interação entre substrato e suplementação (0,0425). Em contrapartida, existe uma pequena interação negativa entre temperatura e suplementação (-0,0108), de forma que a suplementação perde efeito sob temperaturas mais elevadas.

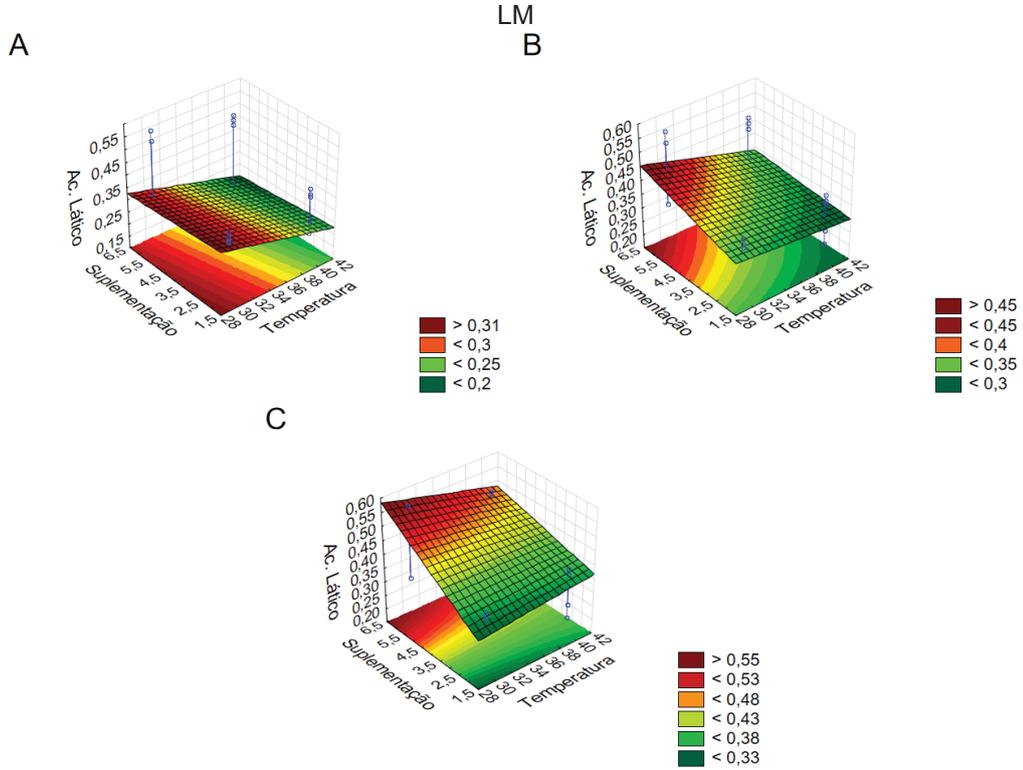
A superfícies de resposta para as interações, demonstradas nas figuras a seguir, permitem observar a influência dos conjuntos de fatores, sobre a obtenção do ácido láctico.

A composição do substrato, variações nos níveis de suplementação, e o aumento de temperatura, têm efeitos distintos sobre a produção do ácido láctico. Na Figura 14, observa-se os diferentes efeitos da interação entre suplementação e temperatura, sobre a produção de ácido láctico, nos meios de cultivo constituídos por A) AF, B) AFLM e C) LM.

A interação entre temperatura e substrato, apresentada na Figura 15 para as concentrações de suplementação de A) 2%, B) 4% e C) 6%, evidencia um impacto negativo na produção de ácido láctico, que pode ser atribuído ao aumento da temperatura combinado com níveis elevados de suplementação.

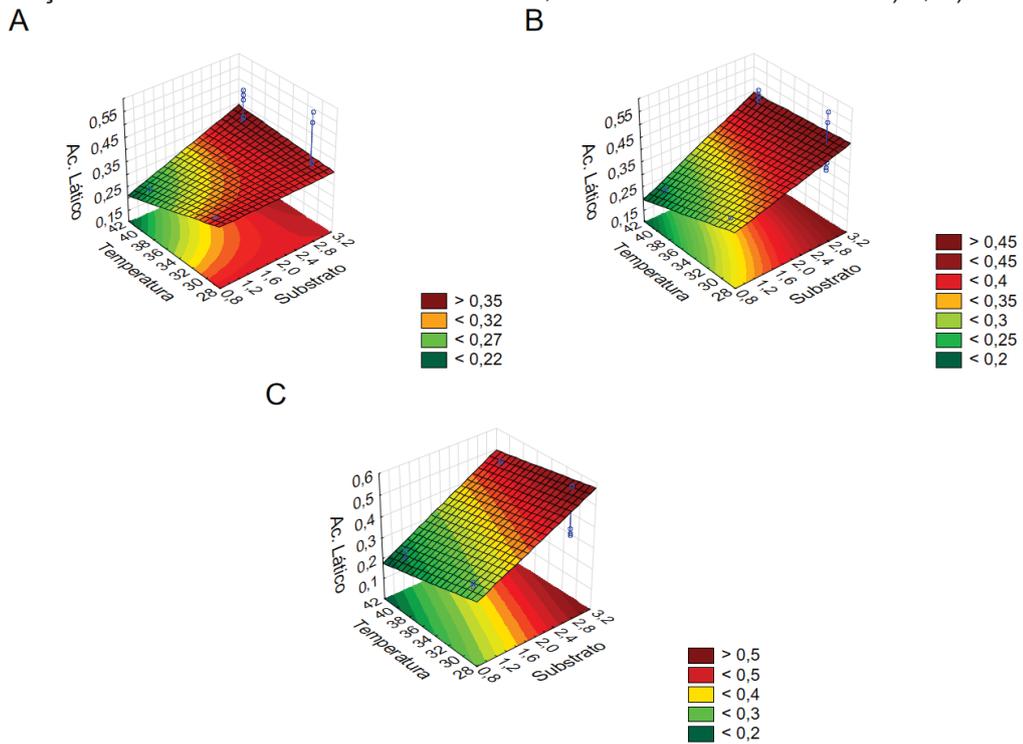
A interação entre substrato e suplementação, demonstrou-se significativa, sendo que a combinação de ambos os fatores têm impacto positivo na variável resposta, conforme pode ser observado nas superfícies de resposta expressas na Figura 16, sendo A) 30, B) 35 e C) 40 °C.

FIGURA 14 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO OBTIDO PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADOS COM *Leuconostoc lactis* EM FUNÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO E TEMPERATURA, NOS SUBSTRATOS A) AF, B) AFLM E C) LM



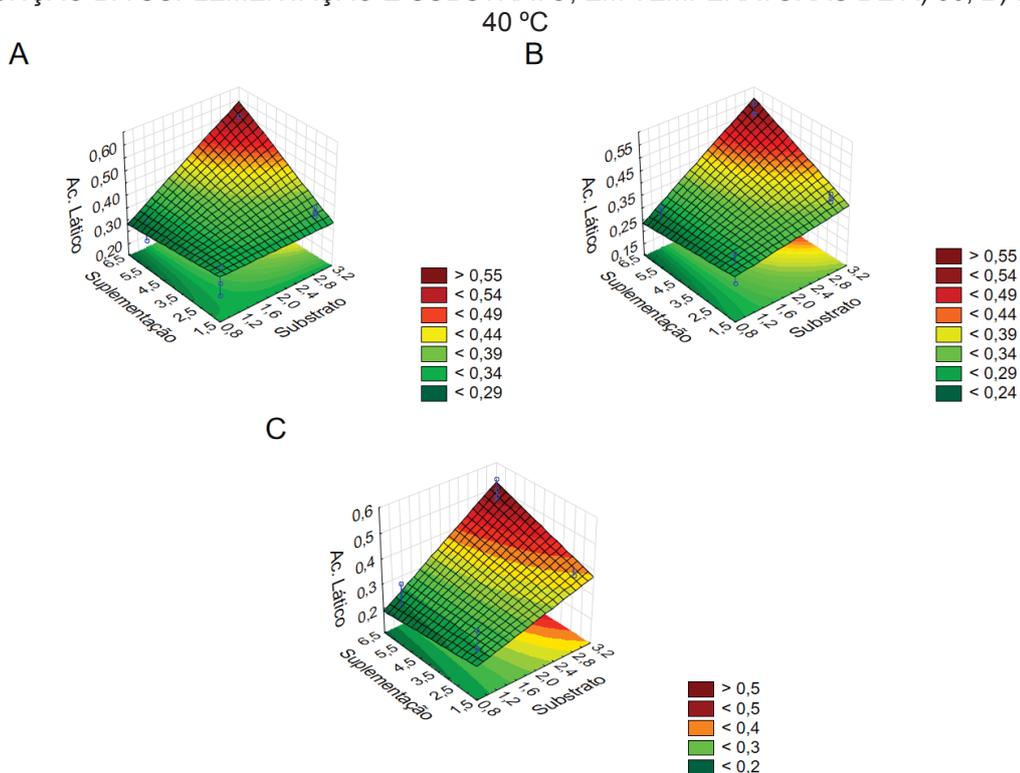
FONTE: A autora (2025).

FIGURA 15 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO OBTIDO PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADOS COM *Leuconostoc lactis* EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E SUBSTRATO, SUPLEMENTADOS COM A) 2, B) 4 E C) 6%



FONTE: A autora (2025).

FIGURA 16 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO OBTIDO PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADOS COM *Leuconostoc lactis* EM FUNÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO E SUBSTRATO, EM TEMPERATURAS DE A) 30, B) 35 E C) 40 °C



FONTE: A autora (2025).

Considerando o exposto, a avaliação do incremento de leiteiro de manteiga (+1) no substrato, no entanto, não se faz possível, pois com exceção aos ensaios realizados no ponto central (50% LM e 50% AF) e nível -1 (100% AF), os demais tratamentos foram constituídos 100% por LM.

A suplementação com extrato de levedura ainda que favoreça a produção do ácido láctico, como mencionado anteriormente, em excesso, pode resultar na inibição do crescimento microbiano. Além disso, Pinho *et al.* (2019) evidenciaram que o aumento na concentração de extrato de levedura no meio de cultivo, não apresentou diferença significativa quando comparado ao ensaio realizado em concentração menor do extrato. Portanto o aumento na concentração de extrato de levedura também se mostra inviável.

Em relação às temperaturas testadas, as mesmas estão dentro da faixa ótima para o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas mesofílicas, de modo que, temperaturas inferiores proporcionariam diminuição na atividade metabólica, e consequente redução na taxa de crescimento, enquanto temperaturas superiores poderiam ocasionar a inativação enzimática, bem como, morte celular (Jay, 2000).

O valor de  $R^2$  de 0,9769 indica que aproximadamente 97,69% da variação na concentração de ácido láctico pode ser explicada pelos fatores e interações analisados. Isso sugere que o modelo estatístico utilizado é eficaz em capturar a dinâmica do processo fermentativo. No entanto, 2,31 % da variação permanece inexplicada, indicando que outros fatores não avaliados no presente estudo também influenciam a produção de ácido láctico, merecendo atenção nos próximos experimentos.

O modelo foi determinado conforme a Equação 6 a seguir.

$$AL = -0,26S - 0,02T - 0,06EL + 0,007S * T + 0,05S * EL + 0,001T * EL - 0,001S * T * EL + 0,86 \quad (6)$$

Em que,

AL = ácido láctico;

S = substrato;

T = temperatura;

EL = suplementação.

Com o objetivo de aprofundar a compreensão sobre os fatores que influenciam a produção de ácido láctico, foi conduzida uma análise de regressão linear múltipla conforme representado na Tabela 15.

TABELA 15 - ANOVA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁCTICO OBTIDOS PELA FERMENTAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE LATICÍNIO INOCULADO COM *Leuconostoc lactis* CONSIDERANDO OS FATORES E SUAS INTERAÇÕES

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Regressão</i>	<i>0,1990</i>	<i>3</i>	<i>0,0663</i>	<i>22,2259</i>	<i>0,0000</i>
Resíduo	0,0597	20	0,0030		
Total	0,2587				

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

$R^2=0,7692$ .

FONTE: A autora (2025).

A ANOVA revelou F de 22,23, com um p-valor associado inferior a 0,0001, o que indica significância estatística altamente robusta ao nível de 5% de significância ( $\alpha = 0,05$ ). Além disso, o coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,7692$ ) evidencia que em torno de 77 % da variabilidade observada na variável resposta é explicada pelo

modelo de regressão, sugerindo um ajuste razoável entre os valores observados e os valores preditos.

No entanto, 23 % da variabilidade dos dados segue inexplicada pelo modelo. Para mais, considerando a interação tripla entre os fatores estatisticamente significativa, levanta-se a hipótese de que a relação entre as variáveis pode não ser estritamente linear, o que justifica a necessidade de uma avaliação da curvatura do modelo. Portanto, para investigação de possíveis efeitos não lineares procedeu-se com a ANOVA considerando o planejamento experimental  $2^3$  com quadruplicatas no ponto central, conforme disposto na Tabela 2 do Apêndice 3.

A ANOVA com teste de curvatura revelou resultados estatisticamente significativos para todos os fatores principais, interações e para o termo de curvatura. O termo de curvatura apresentou um valor de F igual a 132,95, com um p-valor extremamente baixo ( $p < 0,000001$ ), indicando a existência de curvatura altamente significativa na resposta. Esse resultado evidencia que a relação entre os fatores estudados e a variável dependente não é adequadamente descrita por um modelo linear simples, sendo necessário o ajuste de um modelo quadrático ou de segunda ordem para representar o comportamento do sistema de forma mais precisa.

Os efeitos principais, substrato, temperatura e suplementação apresentaram efeitos altamente significativos ( $p < 0,000001$ ) sobre a variável resposta. As interações entre os fatores também se mostraram estatisticamente relevantes, tanto as interações dois a dois, como a interação tripla apresentaram p-valores abaixo de 0,05, reforçando a existência de efeitos combinados entre os fatores sobre a variável resposta.

O erro puro, calculado com base em 27 graus de liberdade, apresentou um quadrado médio (QM) de 0,0004, o que demonstra uma boa precisão experimental. O coeficiente de determinação do modelo foi de  $R^2 = 0,9687$ , indicando que 97% da variabilidade da resposta pode ser explicada pelos efeitos incluídos no modelo.

Sendo assim, conclui-se que o modelo proposto possui um excelente poder explicativo, mas a presença de curvatura significativa exige o uso de modelos que considerem termos quadráticos para descrever adequadamente o comportamento da variável resposta em função dos fatores estudados.

#### 4.4.5 Avaliação do potencial de produção de $\beta$ -galactosidase e ácido láctico através da fermentação de leite de manteiga e água de filagem inoculados com *Leuconostoc lactis*

Os efluentes e subprodutos de laticínios demonstram elevado potencial para a obtenção de bioprodutos de interesse, uma vez que sua composição favorece o desenvolvimento de microrganismos, bem como a obtenção de metabólitos secundários.

Vários são os trabalhos que empregam o soro de leite como meio de cultivo para o desenvolvimento de fungos, leveduras e bactérias, visando a obtenção de  $\beta$ -galactosidase (Bosso *et al.*, 2019; Pereira, 2014).

A investigação dos efeitos dos substratos para a obtenção de  $\beta$ -galactosidase vai de encontro com os resultados verificados no presente estudo, uma vez que o substrato demonstrou ter efeito significativo na atividade da enzima. Para mais, a escolha por substratos de baixo custo e alta disponibilidade, como subprodutos de laticínios, é uma estratégia interessante para a produção de  $\beta$ -galactosidase, contribuindo com a valorização de resíduos agroindustriais (Monteiro; Gomes, 2018).

Monteiro e Gomes (2018) verificaram que a otimização do meio de cultivo para as concentrações de lactose, caseína e levedo permitiram a obtenção de atividade enzimática 5,74 vezes superior, de 7,28 U mL<sup>-1</sup> em comparação com o valor de 1,27 U mL<sup>-1</sup> observado em meio MRS anteriormente a otimização. Enquanto Da Silva *et al.* (2015), observaram produção de 8,5 U mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -galactosidase utilizando soro de leite como substrato inoculado com bactérias do gênero *Streptococcus* em cultura estática por 48 horas. Com isso, demonstraram a influência da otimização do substrato e sua suplementação sobre a atividade de  $\beta$ -galactosidase.

Da mesma forma, pesquisas relacionadas à produção de ácido láctico são fundamentais na busca por alternativas para otimizar os processos de sua obtenção, especialmente utilizando matérias-primas de baixo custo, como subprodutos agroindustriais.

Nesse sentido, a utilização de subprodutos agroindustriais associado à adição de nutrientes, como o extrato de levedura, podem apresentar efeitos significativos na obtenção de ácido láctico, conforme o observado no presente estudo.

De acordo com Pinho *et al.* (2019) a adição de nutrientes ao meio de cultivo

pode melhorar significativamente a produção de ácido láctico, contribuindo com fontes de nitrogênio, vitaminas e minerais, que são essenciais ao crescimento bacteriano.

Este estudo permitiu verificar que a temperatura também tem papel importante na produção do ácido láctico, reafirmando o observado por Pinho *et al.* (2019) que identificaram a temperatura de 40 °C como ideal para a produção de ácido láctico, influenciando tanto no desenvolvimento microbiano, como na atividade de uma série de enzimas das bactérias ácido lácticas. Os autores sugeriram ainda que temperaturas inadequadas podem reduzir a taxa de produção do ácido, bem como, favorecer a formação de subprodutos indesejados.

Nesse contexto, é importante desenvolver pesquisas que visem a otimização das variáveis para favorecer a conversão do substrato nos produtos de interesse, bem como a avaliação do potencial de diferentes substratos e microrganismos para essas transformações.

O estudo permitiu observar a influência dos fatores temperatura, substrato e suplementação, sobre a obtenção tanto do ácido láctico como da  $\beta$ -galactosidase utilizando bactéria ácido láctica do gênero *Leuconostoc*, em leite de manteiga e água de filagem. Sendo que para a obtenção de  $\beta$ -galactosidase as condições mais promissoras foram observadas em meio de cultivo composto água de filagem, suplementado com 2 % de extrato de levedura e incubado a 30 °C. Enquanto para a obtenção do ácido láctico, substrato constituído por leite de manteiga, com 6 % de extrato de levedura, incubado a 40 °C.

Para mais, atualmente a literatura carece de pesquisas voltadas à caracterização e aproveitamento de leite de manteiga e água de filagem, efluentes expressivos gerados no processamento do leite. De modo que o presente estudo fornece perspectivas relevantes quanto a valiosa composição desses subprodutos e potencial aplicação para produção de ácido láctico e  $\beta$ -galactosidase, compostos amplamente empregados nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

## 5 CONCLUSÃO

A presente pesquisa possibilitou a caracterização dos subprodutos provenientes de laticínio evidenciando seu potencial biotecnológico para aplicação em processos fermentativos visando a obtenção de  $\beta$ -galactosidase e ácido láctico a partir de microrganismo (*Leuconostoc lactis*) isolado do leite de manteiga.

Para além, a avaliação da síntese de ácido láctico e  $\beta$ -galactosidase em função do tempo, proporcionou o entendimento da conversão do substrato no biocomposto de interesse, bem como o papel da  $\beta$ -galactosidase nesse processo, e ainda o impacto da fermentação sobre o pH, que é um fator importante tanto para o desenvolvimento microbiano como para a atividade enzimática.

Os resultados em relação à síntese de ácido láctico demonstraram valores interessantes, sendo o maior rendimento correspondente a  $5,43 \pm 0,23 \text{ g L}^{-1}$ , verificado para o ensaio 2, que teve o substrato composto por leite de manteiga com 6 % de suplementação e foi incubado a 40 °C. Resultados semelhantes foram relatados na literatura.

Além disso, a comparação entre as concentrações de ácido láctico produzido em meio sintético MRS, projetado com nutrientes específicos para favorecer o crescimento microbiano, com as concentrações obtidas nos meios compostos por LM e AF, permitiu reafirmar o potencial do leite e da água de filagem para a obtenção de produtos de alto valor agregado.

O mesmo foi observado para a  $\beta$ -galactosidase, que demonstrou maior atividade no ensaio 1, constituído por AF, suplementada com 2 % de extrato de levedura e incubada a 30 °C sob agitação de 150 rpm, resultando em  $1,64 \pm 0,06 \text{ U mL}^{-1}$  de atividade enzimática, valor semelhante aos registrados na literatura, com exceção para trabalhos realizados em meios otimizados para a produção da  $\beta$ -galactosidase.

Com relação aos fatores avaliados, através do planejamento experimental e avaliação estatística dos dados pode-se concluir que, tanto o substrato como a suplementação desempenham papel significativo na produção e atividade enzimática.

Já em relação a síntese de ácido láctico, o estudo permitiu verificar que tanto os fatores substrato, temperatura e suplementação individualmente, como a interação entre o substrato e a sua suplementação, influenciam significativamente na

obtenção do bioproduto, e portanto, devem ser avaliados visando a otimização desse processo fermentativo.

Sendo assim, a pesquisa possibilitou confirmar que a utilização do leite de manteiga e água de filagem, para a obtenção tanto de ácido láctico como da  $\beta$ -galactosidase através de processos fermentativos, apresenta-se como alternativa promissora na busca por soluções economicamente viáveis para a obtenção desses bioprodutos, e ainda contribui com a sustentabilidade ambiental, proporcionando uma destinação mais nobre aos subprodutos agroindustriais.

## 5.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros a caracterização dos produtos através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) se faz necessária, a fim de assegurar as concentrações de ácido láctico obtidas, uma vez que a bactéria *Leuconostoc lactis* fermenta carboidratos através da via heterolática, bem como, podem ter outros ácidos presentes nos subprodutos, oriundos dos processos produtivos de queijo e manteiga.

A avaliação estatística dos dados pode ser realizada considerando modelos não lineares ou ainda métodos não paramétricos, visando a obtenção de melhores ajustes dos dados. Além disso, as condições de fermentação podem ser otimizadas utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), voltado às melhores condições identificadas para a obtenção de cada um dos produtos de interesse.

Ainda, considerando o aproveitamento dos subprodutos de laticínios, microrganismos comerciais com metabolismo adaptado para a obtenção da  $\beta$ -galactosidase e ácido láctico devem ser avaliados. Também a complementação dos subprodutos com glicose e lactose, além de outros suplementos, deve ser avaliada para a otimização dos subprodutos como meio de cultivo. Finalmente, deve-se considerar a ampliação de escala, assim como, analisar a separação e purificação dos bioprodutos.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos**, Módulo IV. 2004.
- ALONSO, B. V. *et al.* O papel das bactérias ácido lácticas na indústria de laticínios. 2023.
- ALVES, S. M dos S. *et al.* Redução dos teores de lactose em leites com diferentes concentrações de gordura, fermentados por grãos de Kefir. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 11, n. 2, p. 1-12, 2020.
- AMORIM, H.V.; *et al.* Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica - Microscopia. Piracicaba: Fermentec, 74p, 2003.
- APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater. 21 ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
- APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23 ed. Baltimore: United Book Press, 2017.
- AQUARONE, E., *et al.* **Produção de Enzimas Microbianas**. In: Biotecnologia Industrial. Vol. 3. (4. ed.). São Paulo: Edgar Blücher Ltda. p. 351-362. 2001.
- ATLASBIG. **Produção Mundial de Manteiga por País**. 2023.
- AZZOLINI, J. C.; FABRO, L. F. Monitoramento da eficiência do sistema de tratamento de efluentes de um laticínio da região meio-oeste de Santa Catarina. **Unoesc & Ciência ACET**, v. 4, p. 43-60, 2013.
- BARUKČIĆ, I.; JAKOPOVIĆ, K. L.; BOŽANIĆ, R. Whey and buttermilk – neglected sources of valuable beverages. In: GRUMEZESCU, A. M; HOLBAN, A. M. **Natural Beverages Cambridge**: Academic Press, 2019. p. 209-242.
- BELLAVER, E. H. **Analysis of the probiotic and antioxidant potential of  $\beta$ -galactosidase-producing *Lactobacilli***. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciência e Biotecnologia, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Videira – UNOESC, 2017.
- BERNFELD, P.  $\alpha$ -amylase. **Methods Enzymol**, v. 1, p. 149-151, 1955.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BORDINI, F. W. *et al.* Avaliação de diferentes meios de cultivo no crescimento celular de bactérias ácido lácticas. In: **6º Simpósio de Segurança Alimentar**, 2018, Gramado, RS. Anais, 2018.

BONFIM, J. M. *et al.* Composição bromatológica do soro de leite bovino proveniente do processo de fabricação do queijo Mozzarella. In: SIDALC - Aliança de Serviços de Informação Agrícola. 2015.

BOSSO, A. *et al.* **Avaliação da produção de lactase por *Aspergillus oryzae* utilizando superfície de resposta.** VII Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, 11 a 13 set. 2019, Londrina, PR. 2019a.

BOSSO, A. *et al.* Soro de Queijo para Produção de  $\beta$ -Galactosidase. **UNICIÊNCIAS**, v. 23, n. 1, p. 31-37, 2019b.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, Athens, v. 72, p.248-254, jan. 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto N° 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, N° 155, Seção I-Parte I, pág. 10.785, 07 de julho de 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, sec1, p.3977, 11 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Mapa do leite*. 2025.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Estabelece a classificação dos corpos de água e os padrões de qualidade para lançamento de efluentes. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 mar. 2005.

BRASIL. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Estabelece as condições e os procedimentos para o licenciamento de atividades e empreendimentos de impacto significativo. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 maio 2011.

BRITO, M. A. *et al.* **Composição.** Agronegócio do Leite. Agência Embrapa de Informação Tecnológica - Ageitec. 2020.

CAMÊLO, Y. A. **Aplicação dos subprodutos da indústria de produtos lácteos e suas tendências: uma revisão.** 2021. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Alimentos) – Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos, 2021.

CANCELLA, M. J. *et al.* Bactérias lácticas como probióticas, bioconservantes de alimentos e produtoras de bacteriocinas: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 79, n. 1, p. 37-47, 2024.

CAREVIĆ, Milica *et al.* Optimization of (-galactosidase production from lactic acid bacteria. **Hemijaska industrija**, v. 69, n. 3, p. 305-312, 2015.

CASSOL, M. F. *et al.* Efeito da sazonalidade nos componentes nos componentes do leite produzido em pequenas propriedades de uma cooperativa do Oeste de Santa Catarina. **Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE)**, p. e28420-e28420, 2021.

CASTRO, G. R. de. Produção e aplicações do ácido láctico: uma revisão bibliográfica. 2024.

CNA – **Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Prêmio Queijos do Paraná amplia categorias e abre concurso de muçarela.** Brasília: CNA, 2024.

CONRAD, A. *et al.* Produção de ácido láctico a partir do soro de leite: uma alternativa sustentável para o reaproveitamento de resíduos. 2023.

CUNHA, J. S.; *et al.* Manteiga: peculiaridades do processo de fabricação. MilkPoint, 27 set. 2022.

DELLA FLORA, I. K.; DUPONT, G. K. **Processos fermentativos para produção na indústria.** 1. ed. São Paulo: Intersaberes, 2024.

MAN, J.C de; ROGOSA, M; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied microbiology*, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

DOURADO, C. P. *et al.* **Produção de ácido láctico a partir da fermentação do soro de leite pelo *Lactococcus lactis*.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2024.

EMBRAPA. Anuário Leite 2020: Leite de vacas felizes. 2020.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Classification of genera (2025).

ÊXODO CIENTÍFICA. **Suplementos para meios de cultura.** 2020.

FANG, X. *et al.* Products of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain F17 and *Leuconostoc lactis* strain H52 are biopreservatives for improving postharvest quality of ‘Red Globe’grapes. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 656, 2020.

FAO. (2021). **Relatório de progresso dos ODS 2021.** Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.

FERREIRA, D. N. **Influência do uso de retentados de baixo fator de concentração no rendimento e na qualidade da mussarela de reduzido teor de gordura feita por acidificação direta.** 2004. Tese de Doutorado. Campinas, SP: [s.n.], 2004.

FISCHER, J. *et al.* **Hidrólise de Lactose por  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* Imobilizada em Reator de Leito Fixo.** 2010. Dissertação (Mestrado em

Engenharia Química) — Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

FONG, B. A.; WU, W.-Y.; WOOD, D. W. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 198–202, 2009.

FREIRE, Thayná Thamires *et al.* Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e513101119964-e513101119964, 2021.

FREIXO, J. M. **Caracterização física e química do leite em pó e sua aplicação em uma bebida fermentada**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

FRENZEL, N. B. *et al.* **Identificação e isolamento de microrganismos envolvidos na fermentação de kefir de leite**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Positivo, Curitiba, 2020.

FURTADO, M. M. Mussarela - Fabricação & Funcionalidade. **São Paulo: Setembro Editora**, 2016.

GAO, J. *et al.* Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. **European Food Research and Technology**, v. 236, p. 549-556, 2013.

GEKAS, Vassilis; LÓPEZ-LEIVA, Miguei. Hydrolysis of lactose: A literature review. *Process Biochemistry*, Vol. 20, No. 1, 2-12 ref. 157. 1985.

GONÇALVES, L. M.; MONTEBELLO, A. E. S.; SANTOS, J. A. Cadeia produtiva de leite no Brasil: competitividade, sustentabilidade e políticas públicas. **Revista de Gestão e Secretariado**, v. 14, n. 5, p. 7765-7786, 2023.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. ePub rev., atual. e ampl. Porto Alegre: [s.n.], 2022. ISBN 978-65-00-43160-5.

GRUPO BELA VISTA. As famílias dos queijos. Grupo BV, 16 jun. 2024.

GUMUSTOP, I.; ORTAKCI, F.. Comparative genomics of *Leuconostoc lactis* strains isolated from human gastrointestinal system and fermented foods microbiomes. **BMC Genomic Data**, v. 23, n. 1, p. 61, 2022.

GUO, X. *et al.* Sporolactobacillus—a new functional genus with potential applications. **Current Research in Food Science**, p. 100822, 2024.

Huff, G. M., Protocolo de Identificação Molecular de bactérias (Kit Qiagen). Núcleo Experimental de Micologia Aplicada. Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina. Palotina. 2024.

IDR-PARANÁ. **Industrialização e tecnologia no campo impulsionam a cadeia do**

**leite no Paraná.** Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná, 2024.

INDUPROPIL. Ácido Láctico 1 kg. 2025.

INSTRUÇÃO NORMATIVA, Nº. 68, de 12 de dezembro de 2006. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos.** 2006.

ISSA, A. T.; TAHERGORABI, R. Milk bacteria and gastrointestinal tract: Microbial composition of milk. **Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases**, p. 265-275, 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **São Paulo: IMESP**, 1985.

Jay J. M. Indicators of food microbiological quality and safety. Modern food microbiology. Maryland: Aspen Publication; 2000.

JESUS, L. F. de M. C. de. Produção de  $\beta$ -galactosidase por fungos filamentosos: screening, purificação e caracterização bioquímica. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp). 2020.

KOT, W. *et al.* Sequence and comparative analysis of *Leuconostoc* dairy bacteriophages. **International journal of food microbiology**, v. 176, p. 29-37, 2014.

KURNICK, J. V.; MICHELLIM, M. G. G.; TRIBST, A. A. L. Desenvolvimento e caracterização de bebidas de soro de queijo e de soro de ricota de ovelha. **XXXI Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP – 2023**. Universidade Estadual de Campinas, 2023.

LAHTINEN, S. *et al.* **Lactic Acid Bacteria:** microbiological and functional aspects. 4. ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 2012. 798 p.

LAUFFER, O. L. **Produção biotecnológica de ácido láctico a partir de diferentes fontes de carbono.** Tese (Trabalho de Diplomação) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2019.

LEDERBERG, J. The beta-D-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 60, p. 381-392, jun. 1950.

LEITE, A. M. O. *et al.* Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food microbiology**, v. 31, n. 2, p. 215-221, 2012.

LEMO, D. O.; MELO, D. dos S.; SANTOS, L. G. dos. **Avaliação da composição centesimal e propriedades nutricionais do leiteiro.** In: Encontro Nacional da Agroindústria, 4., 2018, Bananeiras, PB. Anais eletrônicos [...]. Campinas: Galoá, 2018. DOI: 10.17648/enag-2018-91571.

LIBÓRIO, P. T. H. R. *et al.* **Avaliação físico-química do soro de queijo coalho**

**produzido no município de Jucati – PE.** Revista Brasileira de Agroecotecnologia, v. 7, n. 1, p. 42-45, 2017. ISSN 2317-3114.

LIMA, C. H. G. de S. **Avaliação de propriedades probióticas e tecnológicas in vitro de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS.** 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

LIRA, D. K. de. CHINELATE, G. C. B. **Estudo do aproveitamento de subprodutos agroindustriais: alternativas para os resíduos gerados pelas indústrias de laticínios.** In: Congresso Internacional da agroindústria., 2020, Recife, PE, Anais eletrônicos [...]. Recife: Graças, 2020. DOI:10.31692/ICIAGRO.2020.0153.

LOPES, M. F. P. D. *et al.* **Identificação de bactérias do ácido láctico (BAL) isoladas do queijo do Pico (DOP).** Angra do Heroísmo: Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias, 2011.

MACHADO, E. L.; RAMOS, G. D. M.; ANTUNES, V. de C. O leiteiro e sua utilização pela indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 1, p. 43-54, 2022.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia.** Segunda Edição, Rio de Janeiro: Biotecnologia: ensino e divulgação, 2016.

MARTARELLO, R. D. **Purificação de uma beta-galactosidase produzida por aspergillus foetidus através de técnicas cromatográficas.** 2016. Dissertação (Pós Graduação em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília. 2016.

MARTINEZ, F. A. C. *et al.* Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in food science & technology**, v. 30, n. 1, p. 70-83, 2013.

MCSWEENEY, P. LH (Ed.). The microbiology of cheese ripening. In: **Cheese problems solved.** Elsevier, 2007. p. 117-132.

MENDES, B. G. *et al.* Qualidade e rendimento da mussarela em tempos de armazenamento sob refrigeração da massa acidificada. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, n. 1, p. 1744–1756, 2015.

MONTEIRO, P. S.; GOMES, P. M da S. Production of kefir as an alternative for utilization of buttermilk. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 3, p. 162-171, 2018.

MONTEIRO, M. de L. G. Características funcionais do queijo mussarela elaborado com dois tipos de agentes coagulantes e temperaturas de filagem. Dissertação (Pós Graduação em Ciência dos Alimentos) -Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras. 1999.

MORDOR INTELLIGENCE. **Tamanho do mercado de ácido láctico e análise de ações – Tendências e previsões de crescimento (2024 – 2029).** 2024.

MURADOR, G. *et al.* Produção de  $\beta$ -galactosidase através da *Saccharomyces*

fragilis Cultivada em Soro de Queijo. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 4, p. 337-342, 2020.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. General Tests and Apparatus. In: **Food Chemicals Codex**. Washington: The National Academies Press, p. 459-554, 1981.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; SRIVASTAVA, A. L. (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 167-178, 2004.

OGIER, J. C. *et al.* Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. **International journal of food microbiology**, v. 126, n. 3, p. 286-290, 2008.

OJO, A. O.; DE SMIDT, O. Lactic acid: a comprehensive review of production to purification. **Processes**, v. 11, n. 3, p. 688, 2023.

OLIVEIRA, F. B. de. **Desenvolvimento do leiteiro fermentado adicionado de polpa de pitaya**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

OLIVEIRA, P. dos S. P. Produtividade leiteira no Brasil: A pecuária como pilar do agronegócio. **Ciências em Sintonia: Explorando Conexões entre Exatas e Naturais** - Volume 2, 2024.

OLIVEIRA, P. H. S. Coprodutos do queijo tipo muçarela: viabilidade de aproveitamento artesanal. **Evoluções das ciências exatas no mundo contemporâneo**, p. 114, 2022.

**O PRESENTE RURAL**. VBP do leite tem leve queda em 2024. 10 jan. 2023.

PEREIRA, A. C. Tipos de leiteiro gerado pelas indústrias de laticínios fiscalizadas pelo serviço de inspeção federal e sua destinação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 2, p. 103-110, 2022.

PEREIRA, M. P. B. *et al.* Influência da transferência de oxigênio na produção de  $\beta$ -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 utilizando soro de queijo. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 71-74, 2014.

PEREIRA, N. T. Produção de ácido láctico com resíduos agroindustriais: uma revisão da literatura. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2019.

PINHO, C. L. C. de *et al.* Produção de ácido láctico em meio à base de efluentes da indústria de alimentos por cultura láctea mista imobilizada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. e2018100, 2019.

PIZAIA, P. D. *et al.* Composição, proteólise, capacidade de derretimento e formação de "blisters" do queijo mussarela obtido pelos métodos tradicional e de ultrafiltração: composition, proteolysis, melting capacity and blisters formation. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 485-491, 2003.

POLETO, L. **Isolamento e identificação de microrganismos produtores de hidrogênio a partir do glicerol residual**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul.2014.

QIAGEN. **DNeasy Blood & Tissue Handbook**. 2023.

ROCHA, D. T. da.; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C de. Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária. In: SIDALC - Aliança de Serviços de Informação Agrícola. 2020.

RODRIGUES, J. K. L. A. *et al.* Importância e perspectivas da proteína lactase: uma revisão. **Revista Multitexto**, v. 7, n. 2, 2019.

SABIONI, R. C. **Otimização de um processo industrial de filagem: uma comparação entre métodos multiobjetivo**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) — Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2018.

SANGWAN, V. *et al.* Production of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* for galactooligosaccharides synthesis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4206-4215, jul. 2014.

SANTA-ROSA, L. N.; PIRES, A. C. dos S. **Leitelho: um coproduto versátil**. In: *MilkPoint*, 24 fev. 2021.

SANTOS, J. dos. **Estudo do processo semicontínuo de tratamento do soro do leite utilizando microalgas em sistema aberto**. 2023. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2022.

SANTOS, N.; SILVA, L. H.; SANTOS, A. M. Tratamento de efluentes líquidos na indústria de laticínios: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 3, p. 168-176, 2022.

SANTOS, N. A. *et al.* **Composição química de resíduos agroindustriais com uso potencial na biotecnologia**. Anais do Simpósio de Alimentos e Nutrição Universidade Veiga de Almeida, RJ. 2024

SANTOS, N. A. *et al.* Composição química de resíduos agroindustriais com uso potencial na biotecnologia. III SIAN - Simpósio de Alimentos e Nutrição. Ciência dos Alimentos. Universidade Veiga de Almeida. 2023

SAQIB, S. *et al.* Sources of  $\beta$ -galactosidase and its applications in food industry. 3 **Biotech**, v. 7, n. 79, p. 1-7, maio 2017.

SARAVANAN, C.; SHETTY, P. K. H. Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli batter. **International journal of biological macromolecules**, v. 90, p. 100-106, 2016.

SCHIMIDELL, W. *et al.* Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial.

In: **Biotecnologia Industrial** - Vol. 2: Engenharia Bioquímica. 2. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2021. p. 21-34.

SCHOCH, C. L. *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **Database (Oxford)**, 2020. baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.

SCHUBERT, P. F.; FINN, R. K. Alcohol precipitation of proteins: the relationship of denaturation and precipitation for catalase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 11, p. 2569-2590, 1981.

SEMA. Resolução nº 021, de 16 de fevereiro de 2009. Dispõe sobre a adoção de padrões de qualidade ambiental para águas superficiais. Secretaria de Estado do Meio Ambiente (SEMA). **Diário Oficial do Estado**, Paraná, 16 fev. 2009.

SILVA, B. P. *et al.* Análise da influência de hidrocolóides e de soro de leite em bebidas lácteas pasteurizadas sabor chocolate. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 9, n. 3, páginas 278-291, 2017.

SILVA, E. C. *et al.* Produção de  $\beta$ -galactosidase por bactérias ácido lácticas utilizando soro de leite. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 749-754, 2015.

SILVA, F. T. **Manual de produção de manteiga**. Projeto Núcleos de Difusão de Tecnologias Agroindustriais Alimentares. EMBRAPA - CTAA. 1996.

SILVA, F. T. **Queijo Mussarela**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroindústria de Alimentos, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016.

SILVA, M. S. de J. **Valorização de resíduos da indústria agroalimentar**. Tese de Doutorado. 2020.

SILVA, R. R da; SIQUEIRA, E. Q. de; NOGUEIRA, I. de S. Impactos ambientais de efluentes de laticínios em curso d'água na Bacia do Rio Pomba. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, p. 217-228, 2018.

SILVA, T. P. M. da. **Produção de manteiga de ovelha com kefir e com probióticos**. Dissertação mestrado - Pós-Graduação em Engenharia alimentar, Escola Superior Agrária, Coimbra, 2022.

SIMPSON, D. M.; BEYNON, R. J. Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 1, p. 444–450, 2010.

SINAPSE BIOTECNOLOGIA LTDA. Galactosidase, Beta, 5 KU. São Paulo, 2025.

SIQUEIRA, K. B. **Na era do consumidor: uma visão do mercado lácteo brasileiro**. In: SIDALAC Aliança de Serviços de Informação Agrícola. Juiz de Fora – MG, 2021.

SOUSA, B. G. A.; BORGES, F. C.; SÁ, J. P. N. Potencial do uso do soro de leite e leiteiro para produção de derivados na Cidade de Nossa Senhora da Glória-SE, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 10, n. 25, p. 753-764, 2023.

SOUZA, G. B. *et al.* Análise das etapas de produção e tratamento de efluentes das indústrias de laticínios. In: **Agronegócio e Sustentabilidade: métodos, técnicas, inovação e gestão**. Editora Científica Digital, 2021. p. 106-128.

**SUGESTÃO Nº 34, 2023.** Sugere emenda ao Orçamento para realização de evento cultural de escala internacional do setor queijeiro, tendo em vista a importância da produção de leite no país e seu papel na economia e indústria de laticínios. Débora de Carvalho Pereira Sperat Czar. Brasília/DF, 8 nov. 2023. Câmara dos Deputados, Comissão de Legislação Participativa.

SYNTH. Ácido Láctico L P.A. A.C.S. 2025.

TEIXEIRA, I. M. D. *et al.* Elaboração de bebida à base de leiteiro e análise sensorial de bebidas achocolatadas comerciais. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 42010-42022, 2020.

VASCONCELOS, H. **Ranking dos maiores laticínios do Brasil 2023: volume das maiores empresas cresce acima da média brasileira.** *MilkPoint*. 2024.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. de S. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos.** 2013.

VEDAMUTHU, E. R. The dairy *Leuconostoc*: use in dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2725-2737, 1994.

VIANA, C. C. *et al.* **Efluente da indústria de laticínios: qual tecnologia aplicar para tratamento?**. In: SIDALC Aliança de Serviços de Informação Agrícola. 2021.

VIEIRA, A. C. A. *et al.* Potencial probiótico de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 1, p. 32-42, 2022.

XAVIER, J. R.; RAMANA, K. V.; SHARMA, R. K.  $\beta$ -Galactosidase: Biotechnological applications in food processing. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1-15, out. 2018.

ZHANG, Y. *et al.* Buttermilk as a wall material for microencapsulation of omega-3 oils by spray drying. **LWT Food Science and Technology**, v. 127, e109320, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109320

ZISU, B.; SHAH, N. P. Texture characteristics and pizza bake properties of low-fat Mozzarella cheese as influenced by pre-acidification with citric acid and use of encapsulated andropy exopolysaccharide producing cultures. **International Dairy**

**Journal**, v. 17, n. 8, p. 985-997, 2007.

WILKE, P. Produção e purificação parcial de beta-galactosidase a partir de bactéria isolada do soro do queijo. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. Palotina. 2021.

WOICIECHOWSKI, A. L., *et al.* In: **Biotecnologia de alimentos**. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, 2013. v. 12, cap.6, p. 143-172.

## APÊNDICE 1 – METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO LEITELHO DE MANTEIGA E ÁGUA DE FILAGEM

Os ensaios realizados para a caracterização da água de filagem e leiteiro de manteiga foram realizados em triplicatas.

### 1 - pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, em equipamento DM-22DIGIMED, previamente calibrado.

### 2 - Teor de açúcares redutores

Para evitar a interferência da fração proteica das amostras, durante a quantificação de açúcares redutores, inicialmente foi realizada a precipitação de proteínas utilizando álcool gelado, adaptado de Schubert e Finn (1981). O álcool possui constante dielétrica inferior à da água, portanto, quando adicionado a soluções proteicas aquosas aumenta as forças de atração entre as cargas opostas causando a redução do grau de ionização ou protonação dos grupos ácidos e básicos das moléculas proteicas, promovendo a agregação das proteínas, e consequente precipitação (Simpson e Beynon, 2010). A temperatura inferior a 4 °C minimiza a possibilidade de desnaturação das proteínas pela presença do solvente orgânico, que em temperaturas superiores a 10 °C pode desestabilizar as interações hidrofóbicas intramoleculares (Fong, Wu e Wood, 2009).

Em tubos de centrífuga foram adicionados 2 mL das amostras, e lentamente, 8 mL de álcool isopropílico 99,6 °INMP gelado. As amostras foram agitadas lentamente e incubadas por 30 minutos em freezer -20 °C. Posteriormente, foram centrifugadas por 5 minutos a 6000 rpm para a separação das proteínas precipitadas no fundo dos tubos e os sobrenadantes contendo os açúcares, lipídios e demais compostos solúveis. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaios e o álcool foi evaporado em capela de exaustão de gases. Finalmente sucedeu-se para a análise de açúcares redutores.

Para determinação de açúcares redutores, levou-se em consideração a metodologia empregada por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013), executada com

base na variante metodológica de Bernfeld (1955).

Uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra foi transferida para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 0,5 mL do reagente DNS. As misturas foram agitadas vigorosamente e, em seguida, levadas para banho-maria com água em ebulição (100 °C) por 15 minutos. A reação, foi então interrompida, imergindo os tubos em banho de gelo. Por fim, as misturas foram diluídas com 5 mL de água destilada, homogeneizadas e determinadas suas absorvâncias em espectrofotômetro a 540 nm, juntamente a uma amostra de calibração (branco).

Para a curva padrão, utilizou-se uma solução de 1,0 g L<sup>-1</sup> de glicose. A solução foi diluída preparando soluções com concentrações variando de 0,1 g L<sup>-1</sup> a 0,9 g L<sup>-1</sup> de glicose. As misturas foram preparadas da mesma forma que para as amostras, no entanto, substituindo as amostras pelas soluções de glicose e água destilada para o branco. Após os 15 minutos de banho e a interrupção em banho de gelo, foram determinadas as absorvâncias em espectrofotômetro.

Foi plotado um gráfico de absorvância versus concentração de glicose e a partir da equação da reta calculado e fator conforme a Equação 1:

$$f = \frac{1}{coef. angular} \quad (1)$$

Onde,

f = fator de concentração.

E as concentrações de açúcares nas amostras, de acordo com a Equação 2:

$$GRT = abs * f * d \quad (2)$$

Em que,

GRT = grupos redutores totais;

abs = média das absorvâncias lidas;

f = fator de concentração;

d = inverso da diluição da amostra.

### 3 - Teor de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada conforme a metodologia de Bradford (1976). Inicialmente, 100 mg de Azul de Coomassie G250 foram dissolvidos em 50 mL de etanol a 95%, sendo essa mistura realizada lentamente sob agitação. A solução foi mantida em agitação por 10 minutos. Posteriormente, foram incorporados 100 mL de ácido fosfórico 85%, gota a gota, ainda sob agitação. O volume foi ajustado para 1L com água destilada, e agitada por mais 20 minutos. A solução foi armazenada em frasco âmbar, em geladeira, e filtrada em papel filtro anterior antes de ser utilizada.

Para a curva padrão, utilizou-se albumina sérica bovina (BSA) com concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  em água destilada. A curva de calibração foi construída utilizando volumes de 10, 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão, dispostos em tubos de ensaio, completando-se o volume final de cada tubo para 100  $\mu\text{L}$  com água destilada.

Para as análises foram empregadas alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras e 5 mL do reagente Coomassie, os tubos foram agitados em vórtex e incubados por cinco minutos. Para o branco, substituiu-se a amostra por 100  $\mu\text{L}$  de água destilada. Após 5 minutos, a absorbância foi medida a 595 nm.

#### 4 - Teor de lipídios

A quantificação dos lipídios foi realizada de acordo com o método proposto por Bligh e Dyer (1959). Inicialmente foram homogeneizadas e pesadas 50 g das amostras que foram transferidas para um béqueres de 500 mL. Posteriormente foram adicionados 50 mL de clorofórmio e 100 mL de metanol e as soluções foram homogeneizadas. Adicionou-se 50 mL de clorofórmio e 50 mL de água. Em seguida, com o auxílio de um agitador mecânico, as soluções foram agitadas por 15 minutos, em capela de exaustão de gases.

Na sequência o material homogeneizado foi filtrado, para funis de separação de 500 mL, utilizando funis de vidro com papel filtro contendo sulfato de sódio anidro. Após a completa separação e clarificação, o clorofórmio, contendo os lipídios, camadas inferiores dos funis, foram transferidas para balões de fundo chato com boca esmerilhada de 300 mL, previamente tarados. O solvente foi evaporado em um rotaevaporador até sua completa remoção. Os balões foram transferidos para uma estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 hora, resfriados em dessecador e pesados até o

peso constante. Finalmente o teor de lipídios foi obtido através da Equação 3:

$$L = \frac{N * 100}{P} \quad (3)$$

Onde,

L (%) = Teor de lipídios totais;

P = massa da amostra em gramas;

N = (massa do balão + massa de óleo) - massa do balão em gramas.

#### 5 - Teor de carboidratos

Conhecido os teores de proteínas e lipídios, o teor de carboidratos foi estimado por diferença conforme o Instituto Adolfo Lutz (1985), através da equação.

$$\text{Carboidratos}(\%) = 100 \% - P(\%) - L(\%) - U(\%) - C(\%) \quad (4)$$

Onde,

L (%) = Teor de lipídios totais;

P (%) = Teor de proteínas;

U (%) = Teor de umidade;

C (%) = Teor de cinzas.

#### 6 - Teor de umidade

O teor de umidade em base umidade foi obtido através da secagem direta em estufa, seguindo o procedimento estabelecido pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Foram pesadas, separadamente, 5 g das amostras em cápsulas de porcelana previamente aquecidas em mufla a 550 °C, resfriadas em dessecador e pesadas. As amostras foram expostas à temperatura por 3 horas, foram resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e, tomadas suas pesagens. O procedimento sucedeu até a obtenção de pesos constantes. A umidade então foi obtida pela Equação 5:

$$Umidade (x.b.u \%) = \frac{(massa\ inicial - massa\ final\ da\ amostra)}{massa\ inicial\ da\ amostra} \cdot 100 \quad (5)$$

Onde,

x.b.u = base úmida

## 7 - Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado através da incineração das amostras em mufla de acordo com a metodologia descrita pelo método do Instituto Adolfo Lutz (1985). Foram pesadas 5 g de cada amostra em cadinhos, previamente aquecidos em mufla a 550°C por 15 minutos, resfriados em dessecador até a temperatura ambiente e pesados. As amostras foram evaporadas em banho-maria, secas em chapa elétrica, carbonizadas em temperatura baixa e incineradas em mufla a 550 °C até obtenção de cinzas claras e eliminação completa do carvão, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. O procedimento foi repetido até a obtenção de pesos constantes. Finalmente o teor de cinzas foi determinado conforme a Equação 6:

$$Teor\ de\ Cinzas\ (\%) = \frac{massa\ final\ da\ amostra}{massa\ inicial\ da\ amostra} \cdot 100 \quad (6)$$

## 8 - Sólidos suspensos totais (SST)

As análises de sólidos foram realizadas de acordo com o Standard Methods For Examination of Water and Wastewater 23ª edição.

Inicialmente, foram adaptadas membranas em cadinhos de Gooch e filtrados 20 mL de água destilada por três vezes sucessivas, com o auxílio de um kitasato e uma bomba de vácuo. Os cadinhos contendo as membranas foram transferidos para a estufa à temperatura nominal de 103 a 105 °C, por uma hora e, em seguida, resfriados em dessecador até temperatura ambiente. Os cadinhos foram pesados e anotadas suas massas em gramas.

As amostras foram homogeneizadas e, alíquotas de 20 mL foram transferidas para os cadinhos para serem filtradas. Os cadinhos foram novamente transferidos para a estufa à temperatura de 103 a 105 °C por uma hora. Após, foram transferidos para o dessecador, para esfriar e, após uma hora, foram tomadas suas pesagens e anotadas. Esse processo se repetiu até a pesagem constante.

Finalmente os sólidos suspensos totais foram obtidos através da Equação 7:

$$\text{Sólidos Suspensos Totais (mg/L)} = \frac{(P1 - P) * 1000 * 1000}{\text{Volume de amostra (mL)}} \quad (7)$$

Onde,

P = peso do cadinho mais a membrana;

P1 = peso do cadinho com a membrana e o resíduo após estufa;

1000 é utilizado para conversão de g para mg, e mL para L.

#### 9 - Sólidos suspensos voláteis (SSV)

Após a determinação dos sólidos suspensos totais, os cadinhos contendo as amostras calcinadas foram levados a mufla pré aquecida a 550 °C por 15 minutos, posteriormente, foram resfriados em dessecador por uma hora, em seguida foram tomadas suas pesagens. O processo foi repetido até a obtenção de peso constante.

Os sólidos suspensos voláteis foram então obtidos por meio da Equação 8:

$$\text{Sólidos Suspensos Voláteis (mg/L)} = \frac{(P1 - P2) * 1000 * 1000}{\text{Volume da amostra (mL)}} \quad (8)$$

Onde,

P2 = peso do cadinho e o resíduo após a mufla a 550 °C.

#### 10 - Sólidos suspensos fixos (SSF)

Os sólidos suspensos fixos foram calculados, considerando as pesagens obtidas nos ensaios de sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis, conforme a Equação 9:

$$\text{Sólidos Suspensos Fixos (mg/L)} = \frac{(P2-P)*1000*1000}{\text{Volume da amostra (mL)}} \quad (9)$$

## 11 - Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A determinação da DQO foi realizada seguindo o procedimento descrito no Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater, 21ª edição.

Em tubos de borosilicato com tampas rosqueáveis, foram adicionados 2,50 mL das amostras de leiteiro de manteiga e água de filagem diluídas a uma concentração de 3%. Água destilada foi utilizada para o branco, e soluções padrão de Hidrogenoftalato de Potássio (KHP) para a curva de calibração. Segurando os tubos próximo à rosca, foram adicionados 1,50 mL da solução de dicromato de potássio. Os tubos foram agitados e, posteriormente, adicionados 3,50 mL da solução de sulfato de prata em ácido sulfúrico. Novamente os tubos foram agitados por inversão segurando-os pela tampa. As amostras foram digeridas a 150 °C em digestor, por 2 horas. Posteriormente, foram resfriadas à temperatura ambiente e determinadas as absorvâncias em espectrofotômetro a 620 nm. Para a curva de calibração foram plotadas as absorvâncias das soluções padrão, em y, e os valores de DQO em mg L<sup>-1</sup> das soluções de KHP, em X, e determinou-se a equação da reta obtida. Finalmente, com a equação de reta, foram obtidos os resultados de DQO para o leiteiro e água de filagem.

## APÊNDICE 2 – ANOVA - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2<sup>3</sup>

TABELA 1 - ANOVA PARA ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE CONSIDERANDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2<sup>3</sup>

Fator	SQ	df	QM	F	p
(1) <i>Substrato</i>	3,2856	1	3,2856	320,1559	0,0000
(2) <i>Temperatura</i>	0,1667	1	0,1667	16,2404	0,0010
(3) <i>Suplementação</i>	1,4702	1	1,4702	143,2546	0,0000
1*2	0,1148	1	0,1148	11,1880	0,0041
1*3	0,4056	1	0,4056	39,5225	0,0000
2*3	0,0024	1	0,0024	0,2339	0,6352
1*2*3	0,0013	1	0,0013	0,1315	0,7216
Erro Puro	0,1642	16	0,0103		
Total SQ	5,6108	23			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R<sup>2</sup> = 0,9707.

FONTE: Autora (2025).

TABELA 2 - ANOVA PARA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO CONSIDERANDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2<sup>3</sup>

Fator	SQ	df	QM	F	p
(1) <i>Substrato</i>	0,1568	1	0,1568	561,7313	0,0000
(2) <i>Temperatura</i>	0,0181	1	0,0181	65,0149	0,0000
(3) <i>Suplementação</i>	0,0241	1	0,0241	86,2090	0,0000
1*2	0,0067	1	0,0067	23,8806	0,0002
1*3	0,0433	1	0,0433	155,2836	0,0000
2*3	0,0028	1	0,0028	10,0896	0,0057
1*2*3	0,0024	1	0,0024	8,5970	0,0098
Erro Puro	0,0045	16	0,0003		
Total SQ	0,2587	23			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R<sup>2</sup> = 0,9827.

FONTE: Autora (2025).

### APÊNDICE 3 – ANOVA - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2<sup>3</sup> COM 4 REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

TABELA 1 - ANOVA PARA ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE CONSIDERANDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2<sup>3</sup> COM 4 REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Curvatura</i>	2,6297	1	2,6297	373,2506	0,0000
<i>(1) Substrato</i>	3,2856	1	3,2856	466,3488	0,0000
<i>(2) Temperatura</i>	0,1667	1	0,1667	23,6562	0,0000
<i>(3) Suplementação</i>	1,4701	1	1,4701	208,6689	0,0000
<i>1 by 2</i>	0,1148	1	0,1148	16,2968	0,0004
<i>1 by 3</i>	0,4056	1	0,4056	57,5697	0,0000
<i>2 by 3</i>	0,0024	1	0,0024	0,3406	0,5643
<i>1*2*3</i>	0,0013	1	0,0013	0,1916	0,6650
Erro Puro	0,1902	27	0,0070		
Total SQ	8,2665	35			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R<sup>2</sup> = 0,9769.

FONTE: Autora (2025).

TABELA 2 - ANOVA PARA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO CONSIDERANDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2<sup>3</sup> COM 4 REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL

Fator	SQ	df	QM	F	p
<i>Curvatura</i>	0,048050	1	0,048050	132,9479	0,000000
<i>(1) Substrato</i>	0,156817	1	0,156817	433,8907	0,000000
<i>(2) Temperatura</i>	0,018150	1	0,018150	50,2186	0,000000
<i>(3) Suplementação</i>	0,024067	1	0,024067	66,5892	0,000000
<i>1 by 2</i>	0,006667	1	0,006667	18,4458	0,000202
<i>1 by 3</i>	0,043350	1	0,043350	119,9436	0,000000
<i>2 by 3</i>	0,002817	1	0,002817	7,7933	0,009513
<i>1*2*3</i>	0,002400	1	0,002400	6,6405	0,015753
Erro Puro	0,009758	27	0,000361		
Total SQ	0,312075	35			

Os valores destacados em itálico mostram os efeitos significativos para o intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

R<sup>2</sup> = 0,9687.

FONTE: Autora (2025).