

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOTECNOLÓGICOS

RUAN FILIPE VIEIRA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR
FERMENTAÇÃO ANAERÓBICA DO SORO DE LEITE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TOLEDO-PR

2018

RUAN FILIPE VIEIRA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR
FERMENTAÇÃO ANAERÓBICA DO SORO DE LEITE**

**STUDY OF THE PRODUCTION OF VOLATILE FATTY ACIDS BY MILK
WHEY ANAEROBIC FERMENTATION**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Graziella Fiametti Colombo

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

TOLEDO-PR

2018



Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Esta licença costuma ser comparada com as licenças de software livre e de código aberto "copyleft". Todos os trabalhos novos baseados no seu terão a mesma licença, portanto quaisquer trabalhos derivados também permitirão o uso comercial.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Carla Rech Ribeiro CRB - 9/1685
Biblioteca UTFPR Toledo

V657e Vieira, Ruan Filipe

Estudo da produção de ácidos graxos voláteis por fermentação anaeróbica do soro de leite / Ruan Filipe Vieira; orientadora: Karina Graziella Fiametti Colombo; co-orientador: Eduardo Bittencourt Sydney.-- Toledo, PR : UTFPR, 2018.

80 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Toledo, 2018.

Bibliografia: f. 55-64

1. Hidrólise. 2. Indústria de laticínios. 3. Tecnologia de alimentos. I.Colombo, Karina Graziella Fiametti. II.Sydney, Eduardo Bittencourt. III.Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 660.6



RUAN FILIPE VIEIRA

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR
FERMENTAÇÃO ANAERÓBICA DO SORO DE LEITE

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 25 de Maio de 2018

Prof.a Karina Graziella Fiametti Colombo, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Salah Din Mahmud Hasan, Doutorado - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)

Prof Thiago Cintra Maniglia, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 17/11/2020.

Dedico este trabalho:

Dedico aos meus pais, Gilmar Jorge Vieira e Catia Luisa Manz Vieira e à minha esposa Ana Karolina Furiatti pelo apoio incondicional e incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gilmar e Cátia, por todo incentivo, carinho e amor, os quais estiveram sempre presentes motivando nos momentos mais difíceis, a eles serei eternamente grato.

À minha amada esposa, Ana Karolina, que esteve presente com muita paciência e muito amor, incentivando e colaborando para a realização deste trabalho e durante a caminhada desta pós graduação, simplesmente muito obrigado.

Aos meus queridos irmãos, Gabriel, Luan e Matheus, que de alguma maneira contribuíram e incentivaram para a conclusão desta pós graduação.

A todos os professores que tive contato durante esta pós graduação.

Quero agradecer especialmente aos meus orientadores Karina Graziella Fiametti Colombo e Eduardo Bittencourt Sydney, pelo conhecimento repassado e pelas orientações.

Agradeço muito também a todos os colegas de turma e aos colegas de curso pela amizade e colaboração.

Aos técnicos dos Laboratórios de Processos Químicos do campus de Toledo.

Ao Programa de Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos.

A UTFPR – Campus Toledo pela estrutura física e profissional disponibilizada aos alunos de mestrado.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concluído com sucesso. Muito obrigado!

RESUMO

VIEIRA, Ruan Filipe. Estudo da produção de ácidos graxos voláteis por fermentação anaeróbica do soro de leite. 2018. 81 f. Dissertação. (Pós-graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos) – Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2018.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de ácidos graxos voláteis por diferentes consórcios de microrganismos e a cepa pura *Clostridium beijerinckii*, a partir de soro de leite. Diferentes tratamentos foram avaliados para o soro de leite, com o intuito de verificar quais forneceriam maior produção de ácidos. Os processos foram hidrólise química e suplementação com extrato de levedura e peptona. Para a hidrólise foram testados 5 consórcios e a linhagem pura. A partir desta avaliação foram selecionados dois consórcios, com os quais os soros suplementados foram testados. Os resultados dos testes de hidrólise química demonstraram que o processo de hidrólise foi pior para alguns consórcios, uma vez que os resultados da maioria dos consórcios foram superiores utilizando o soro não hidrolisado. Com os consórcios utilizados no teste da suplementação, verificou-se que a suplementação aumenta a produção de ácidos graxos voláteis principalmente para o soro não hidrolisado, sendo o ácido butírico o ácido com maior quantidade produzida em todos os soros e com todos os consórcios. Este ácido teve o melhor resultado com o consórcio 3 no soro hidrolisado suplementado com um valor de 3,28 g/L. Apesar de ser a maior quantidade produzida, difere em apenas 3% do valor obtido com o mesmo consórcio no soro não hidrolisado suplementado de 3,18 g/L, sendo esta a melhor condição de produção, pois não requer o processo de hidrólise.

Palavras-chaves: Ácidos graxos voláteis. Soro de leite. Fermentação anaeróbica.

ABSTRACT

VIEIRA, Ruan Filipe. Study of the production of volatile fatty acids by milk whey anaerobic fermentation. 2018. 81 f. Dissertation. (Post-graduation in Chemical and Biotechnological Processes) – Postgraduate Program in Chemical and Biotechnological Processes, Federal Technological University of Paraná.. Toledo, 2018.

The present work had as objective to evaluate the production of volatile fatty acids by different consortia of microorganisms and the pure strain *Clostridium beijerinckii*, from whey. Different treatments were evaluated for whey, with the purpose of verifying which would provide greater production of acids. The processes were chemical hydrolysis and supplementation with yeast extract and peptone. For the hydrolysis, 5 consortia and the pure strain were tested. From this evaluation we selected two consortia, with which the supplemented whey were tested. The results of the chemical hydrolysis tests demonstrated that the hydrolysis process was worse for some consortia, since the results of the majority of the consortia were higher using the non-hydrolyzed whey. With the consortia used in the supplementation test, it was verified that supplementation increases the production of volatile fatty acids mainly for the non-hydrolyzed serum, butyric acid being the acid with the highest amount produced in all sera and with all consortia. This acid had the best result with the consortium 3 in the hydrolyzed whey supplemented with a value of 3.28 g / L. Although it is the largest quantity produced, it differs in only 3% of the value obtained with the same consortium in the non-hydrolyzed whey supplement of 3.18 g / L, which is the best production condition, since it does not require the hydrolysis process.

Keywords: Volatile fatty acids. Whey. Anaerobic fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de reação para digestão anaeróbica.....	16
Figura 2 Parte do aparato para obtenção da cultura anaeróbica.....	26
Figura 3 Soro resfriando sob atmosfera de CO ₂	34
Figura 4 Proteína precipitada.....	34
Figura 5 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado para os consórcios 1, 2 e 3.	35
Figura 6 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado para o consórcios 4, 5 e 6 (cultura pura).....	35
Figura 7 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado para os consórcios 1, 2 e 3.....	35
Figura 8 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado para os consórcios 4, 5 e 6 (cultura pura).....	36
Figura 9 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado para os consórcios 3, 4 e 6 (cultura pura).....	41
Figura 10 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado para o consórcio 3, 4 e 6 (cultura pura).....	41
Figura 11 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado suplementado para os consórcios 3 e 4.....	41
Figura 12 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado suplementado para os consórcios 3 e 4.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Identificação dos consórcios.	24
Tabela 2 Identificação dos experimentos da primeira etapa.	27
Tabela 3 Identificação dos consórcios.	29
Tabela 4 Identificação dos experimentos da segunda etapa.	30
Tabela 5 Resultados da caracterização dos soros.	33
Tabela 6 Volumes médios da soma de gás produzido durante o processo de fermentação, para os 5 consórcios e a cepa pura, nos soros hidrolisado e não hidrolisado.	37
Tabela 7 Dados das curvas analíticas.	38
Tabela 8 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE.	38
Tabela 9 Produção de AGVs encontrados na literatura.	39
Tabela 10 Dados das curvas analíticas.	43
Tabela 11 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE para os meios antes da fermentação.	44
Tabela 12 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Fórmico após a fermentação.	45
Tabela 13 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Láctico após a fermentação.	46
Tabela 14 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Acético.	47
Tabela 15 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Propiônico após a fermentação.	47
Tabela 16 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Butírico após a fermentação.	49
Tabela 17 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Butírico e a quantidade de gás produzido.	49
Tabela 18 Razão entre a produção de ácido butírico e volume total de gás produzido.	50
Tabela 19 Valores totais encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações considerando consumo e produção.	51
Tabela 20 Valores totais encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações considerando apenas produção.	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVO ESPECIFICOS	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1. RESÍDUOS NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS	13
3.1.1. <i>Soro de Leite</i>	14
3.2. BIODIGESTÃO ANAERÓBIA	15
3.2.1. <i>Cultura pura x cultura mista (consórcios)</i>	17
3.3. ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS	18
3.3.1. <i>Ácido Acético</i>	20
3.3.2. <i>Ácido Butírico</i>	20
3.3.3. <i>Ácido Propiônico</i>	21
3.3.4. <i>Ácido Láctico</i>	21
3.3.5. <i>Ácido Fórmico</i>	22
3.3.6. <i>Ácido Succínico</i>	22
4. METODOLOGIA	24
4.1. PRIMEIRA ETAPA – SELEÇÃO DE INÓCULOS.....	24
4.1.1. <i>Consórcios Microbianos</i>	24
4.1.2. <i>Substrato e Meio de Cultivo</i>	24
4.1.2.1. Hidrólise do soro	25
4.1.3. <i>Fermentação Anaeróbica</i>	25
4.1.3.1. Avaliação da produção de gás e adaptação dos microrganismos	27
4.1.4. <i>Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis</i>	28
4.1.4.1. Preparo das amostras	28
4.1.4.2. Preparo de padrões e construção da curva de calibração	28
4.1.4.3. Leitura das amostras	28
4.2. SEGUNDA ETAPA – SUPLEMENTAÇÃO.....	29
4.2.1. <i>Consórcios Microbianos</i>	29
4.2.2. <i>Substrato e Meio de Cultivo</i>	29
4.2.2.1. Suplementação	29
4.2.3. <i>Fermentação Anaeróbica</i>	30
4.2.3.1. Avaliação da produção de gás e adaptação dos microrganismos	31
4.2.4. <i>Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis</i>	31
4.2.4.1. Preparo das amostras	31
4.2.4.2. Preparo de padrões e construção da curva de calibração	31
4.2.4.3. Leitura das amostras	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. PRIMEIRA ETAPA	33
5.1.1. <i>Caracterização do soro</i>	33
5.1.2. <i>Promoção da cultura anaeróbica</i>	33
5.1.3. <i>Avaliação da produção de gás e adaptação dos microrganismos</i>	34
5.1.4. <i>Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis</i>	37
5.2. SEGUNDA ETAPA	40
5.2.1. <i>Promoção da cultura anaeróbica</i>	40
5.2.2. <i>Avaliação da produção de gás e adaptação dos microrganismos</i>	40
5.2.3. <i>Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis</i>	43
6. CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	65

1. INTRODUÇÃO

A utilização de ácidos graxos voláteis (AGVs) é bastante diversificada, desde como precursores na produção de biopolímeros (MENGMENG *et al.*, 2009), até nas indústrias química e de alimentos. Assim, fontes de obtenção destes AGVs são amplamente estudadas (LEE *et al.*, 2014). Uma via de obtenção é por processos fermentativos anaeróbicos, onde ocorre a conversão de matéria orgânica, mais especificamente carboidratos em estruturas menores, entre elas, os AGVs (SERAFINI *et al.*, 2002).

Os resíduos da agroindústria são uma fonte rica em matéria orgânica, que por apresentarem esta característica, são grandes poluidores, entretanto, apresentam enorme potencial para a produção dos AGVs. Um destes resíduos é o soro de leite, com aproximadamente 5 % de lactose, entre outros componentes (RÉVILLION; BRANDELLI; AYUB, 2000; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012; GONZÁLEZ-SISO, 1996). O estudo deste resíduo como fonte de obtenção do AGVs pode agregar valor e tornar o soro mais lucrativo para a indústria, diminuindo assim seus impactos ambientais.

A elevada geração de resíduos devido ao rápido crescimento da população humana e da economia global, torna-se um problema cada vez mais relevante para o contexto ambiental, assim, uma gestão adequada destes resíduos é importantíssima para a sustentabilidade da sociedade (LEE *et al.*, 2014). A aplicação de resíduos da agroindústria como substratos em processos fermentativos para a obtenção de compostos de interesse comercial tem sido foco de muitos estudos, o que também contribui para solucionar o problema da poluição causada por resíduos de processos agroindustriais (COSTA, 2005).

Atualmente, a obtenção de precursores básicos para a síntese orgânica ocorre a partir da biomassa, que subsequentemente podem ser convertidos em vários produtos químicos e materiais de alto valor. Estes componentes básicos são moléculas com vários grupos funcionais que podem ser transformadas em novos grupos de moléculas com aplicabilidade econômica e tecnológica (SAUER *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de ácidos graxos voláteis por fermentação anaeróbica do soro de leite não hidrolisado e hidrolisado, por diferentes consórcios microbianos e a cultura pura *Clostridium beijerinckii*, selecionando consórcios para serem usados em um estudo com os soros suplementados.

2.2. OBJETIVO ESPECIFICOS

- Avaliar a adaptação dos inóculos aos meios.
- Avaliar se o processo de hidrolise aumenta a produção de AGVs.
- Avaliar quais os AGVs são produzidos e a quantidade produzida de cada um deles
- Avaliar a se a suplementação aumenta a produção de AGVs.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. RESÍDUOS NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

A produção industrial inevitavelmente leva a geração de resíduos, dos quais muitos são grandes poluentes. A disposição incorreta destes resíduos pode levar a diversos problemas ambientais, principalmente os que possuem grande concentração de matéria orgânica (carboidratos, proteínas, gorduras, entre outros), os quais se lançados em recursos hídricos, diminuem a concentração de oxigênio dissolvido (MURARI *et al.* 2013).

A indústria de laticínios tem grande importância econômica e social (ALMEIDA, 2004), e de acordo com a Embrapa (2018), o Brasil ocupou a quarta posição em produção de leite no cenário mundial em 2014, 2015 e 2016 com um montante de aproximadamente 34 bilhões de litros de leite em 2016, o que representa 5% de todo leite produzido neste ano. Os Estados Unidos é o maior produtor nestes mesmos anos com aproximadamente 15% da produção total. A indústria de laticínios é baseada na manufatura do leite, com a produção de diversos derivados (iogurte, sorvete, queijos manteiga, entre outros), são muitos os resíduos gerados por este setor industrial, tanto líquidos, sólidos quanto gasosos. A legislação ambiental não faz distinção, pelo porte da industrial ou do poluente, ela exige tratamento ou disposição adequados. Assim o controle do processo e a utilização de novas formas de reciclagem ou reuso são meios mais viáveis de se minimizar impactos ambientais, reduzindo os custos com tratamento e disposições finais (SILVA, 2011).

Dentre estes resíduos, o líquido, que contém leite e produtos derivados do leite, açúcar, pedaços de frutas, essências, condimentos, produtos químicos diversos utilizados nos procedimentos de higienização, areia e lubrificantes que são diluídos nas águas de higienização de equipamentos, tubulações, pisos e demais instalações da indústria, é considerado o principal poluente na indústria de laticínios (SILVA, 2011).

O soro de leite, entre os subprodutos gerados pelos laticínios, é até hoje o de maior importância, tanto pelo seu volume gerado, como pela sua carga poluidora, que quando lançado em corpos receptores pode causar sérios problemas ambientais, devido à sua elevada carga orgânica de difícil biodegradabilidade (ALMEIDA, 2004). Resíduos com alta carga orgânica e elevado valor nutritivo devem ser separados e captados, para

poderem ser utilizados em outros produtos ou processos, exemplos são o soro, o leite e o leite ácido. Uma prática incorreta é o descarte de soro em cursos de água (SILVA, 2011). Segundo Alves (2005), uma tonelada de soro no tratamento de esgoto, polui o mesmo que aproximadamente 470 pessoas poluem em um dia.

3.1.1. Soro de Leite

O Soro de Leite também conhecido como soro de queijo é um líquido opaco e de cor amarelo-esverdeado (ALVES, 2005), contém cerca de 52% dos sólidos totais do leite, sendo 94% da lactose, 96% das proteínas solúveis e 38% dos minerais do leite (LEINDECKER, 2011; REMÓN *et al.*, 2016), o que representa aproximadamente 4,5-6% de lactose, 0,6-1,1% de proteína, 0,03-0,5% de gordura, 0,5-1,0% de minerais e 0,05-0,9% de ácido láctico, esta composição pode variar em função do queijo produzido e do leite utilizado (RÉVILLION; BRANDELLI; AYUB, 2000; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012), além destes componentes também são encontrados quantidades de ácido cítrico, compostos nitrogenados não-proteicos (uréia e ácido úrico) e vitaminas (PANESAR *et al.*, 2007). É o subproduto da precipitação da caseína do leite durante o processo de produção do queijo (MURARI *et al.*, 2011).

A cada quilo de queijo produzido, é gerado de nove a doze litros de soro (RICHARDS, 1997; REMÓN *et al.*, 2016; ALMEIDA, 2004) fato este que o torna o principal subproduto. A rica composição do soro de leite, de sua alta disponibilidade e seu valor econômico relativamente baixo, o tornam uma atrativa fonte de substratos para fermentação (MURARI *et al.*, 2013).

Algumas alternativas de uso do soro são: aplicação para alimentação animal, nutrição humana, produção de fertilizantes, recuperação dos compostos de interesse. O uso mais comum é na alimentação de gado e porcos, sendo o segundo com maior intensidade (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

Como nutrição humana é usado como aditivo, na preparação de sobremesas lácteas, na indústria de carne, pastelaria, bebidas desportivas e em alimentos para bebês (REMÓN *et al.*, 2016). Na produção de fertilizantes, é utilizado para complementar os nutrientes e a água necessária para as culturas (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016). O uso industrial do soro está relacionado com a separação dos seus componentes, principalmente proteínas e lactose, o que torna estes componentes os principais e mais importantes. As proteínas, por conterem todos os aminoácidos essenciais, possuem alto

valor nutricional (FERREIRA, 1997; USDEC, 1997); já a lactose, por ser fonte energética nos processos biotecnológicos (TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000), tem grande utilização nas indústrias farmacêutica e alimentícia (COSTA, 1995; SISO, 2007). A lactose é um dissacarídeo presentes em todos os tipos de leite, é constituída de uma molécula de glicose e outra de galactose, estes podem ser obtidos por processo de hidrólise (PLESSAS *et al.*, 2008). A lactose pode ser obtida do soro por processo de cristalização e usada em ração animal sem que precise ser purificada, caso seja purificada tem um uso mais nobre como insumo farmacêutico, outra opção de uso e na fermentação biológica para produção de ácido láctico (IBRAHIM, 2016).

Já as proteínas podem ser isoladas por precipitação, separação por membranas ou por cromatografia, novamente o grau de pureza determina qual será sua utilização, se em processos da indústria de alimentos ou quando mais pura na indústria farmacêutica (SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2011).

3.2. BIODIGESTÃO ANAERÓBIA.

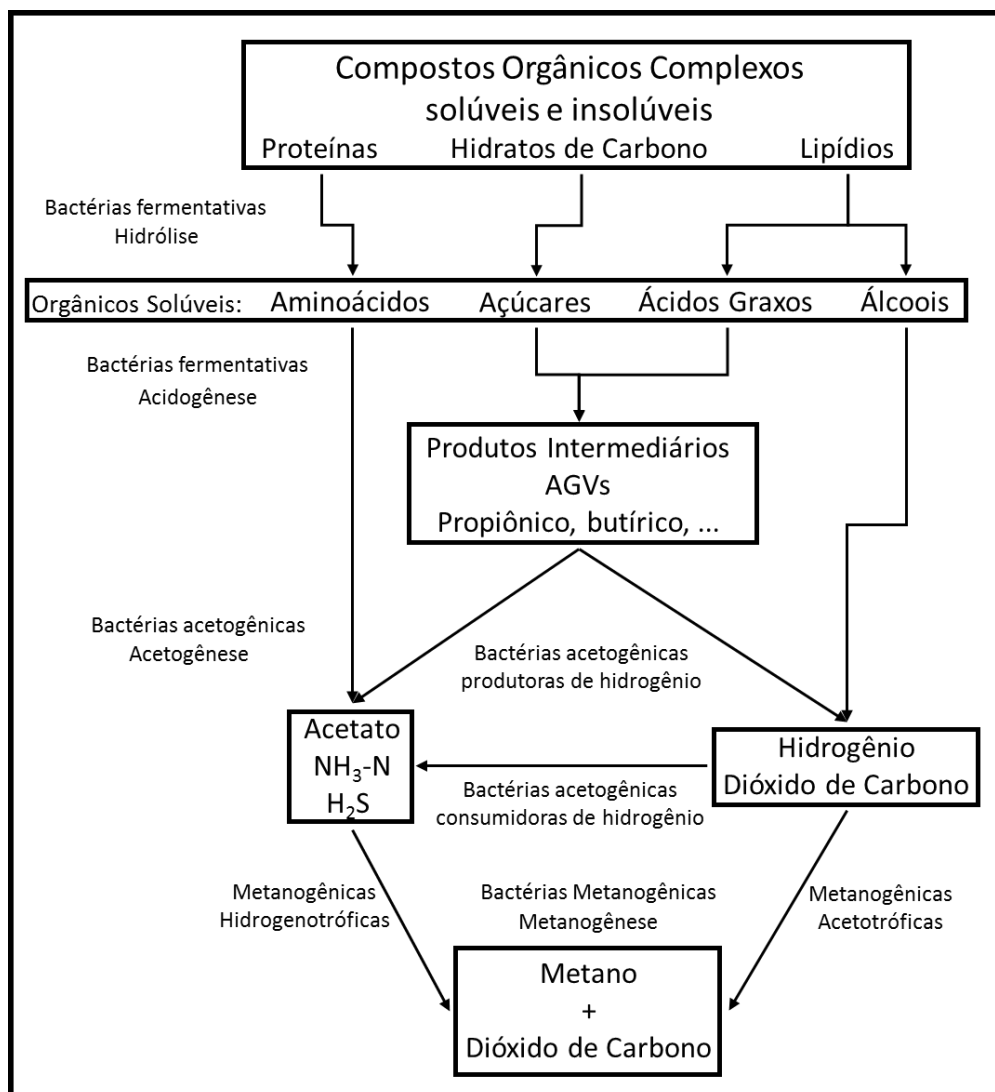
Devido a legislações mais rigorosas implementadas em diversos países a respeito da disposição dos resíduos gerados, bem como os incentivos de reciclagem e produção de energia a partir de fontes renováveis, a biodigestão anaeróbia tem se tornado tema recorrente entre a comunidade científica (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

A biodigestão anaeróbia é um processo bioquímico em que diferentes microrganismos promovem a digestão de compostos orgânicos, na ausência de oxigênio molecular, com produção de biogás e subprodutos, que tem como principais constituintes o metano (CH₄) e o dióxido de carbono (CO₂), com valores de aproximadamente 60 e 40%, respectivamente (FORESTI *et al.*, 1999; WARD *et al.*, 2008). Outros gases também podem estar presentes na composição do biogás como hidrogênio (H₂), sulfeto de hidrogênio (SH₂) e outros (WARD *et al.*, 2008). Para ocorrer o processo de fermentação anaeróbia são necessárias algumas condições, como: fonte de carbono e nutrientes (nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio e magnésio) (HOBSON; STEWART, 2005).

Algumas condições operacionais podem favorecer a produção dos AGVs, essas condições devem ser estudas para cada substrato e inoculo utilizado, as condições são: modo de operação por batelada ou contínuo, temperatura, pH, tempo de retenção, taxa de matéria orgânica e condições do substrato (LEE *et al.*, 2014). A vantagem da biodigestão

anaeróbia para a aeróbia está na produção de ácidos graxos voláteis e hidrogênio a um baixo custo energético (FERNÁNDEZ-MORALES; VILLASEÑOR; INFANTES, 2010). Este processo se divide em quatro estágios sequenciais ou simultâneos: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, com o envolvimento de diferentes consórcios de microrganismos em cada estágio (MASSÉ; DROSTE, 2000; STEIL; JUNIOR; OLIVEIRA, 2002). Na Figura 1 está representado um esquema de reação para digestão anaeróbica.

Figura 1 Esquema de reação para digestão anaeróbica.



Fonte: Adaptado de MASSÉ; DROSTE, 2000.

Na digestão anaeróbica (Figura 1), complexas reações bioquímicas realizadas por uma flora mista, em que os compostos orgânicos complexos, como hidratos de carbono, proteínas e lipídios, são quebrados pelas enzimas excretadas pelos

microrganismos hidrolíticos respectivamente em açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e álcoois durante a hidrólise (CHERNICHARO, 1997; MASSÉ; DROSTE, 2000).

Na etapa seguinte os produtos da hidrólise na ausência de oxigênio livre são convertidos em ácidos graxos voláteis (ácido acético, fórmico, propiônico, butírico e lático). Esta etapa é a acidogênese, durante este processo também são produzidos outros compostos como etanol, propanona, hidrogênio e dióxido de carbono pelas bactérias fermentativas (ou acidogênicas) que obtém energia ao realizarem estas transformações (CHERNICHARO, 1997). No processo de acidogênese a maioria das bactérias são anaeróbias obrigatórias. As duas primeiras etapas são realizadas por um consórcio de anaeróbios obrigatórios e facultativos, tais como *Bacteroides*, *Clostridia*, *Bifidobacteria*, *Streptococci* e *Enterobacteriaceae* (WEILAND, 2010). Posterior e concomitante com a acidogênese acontece a acetogênese, devido a ação das bactérias sintróficas (ou acetogênicas), que realizam a transformação dos ácidos graxos e do etanol em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. Na última etapa, as bactérias metanogênicas convertem os produtos da etapa anterior em metano e dióxido de carbono (MASSÉ; DROSTE, 2000; MOHAN; BABU; SARMA, 2007).

A biodigestão anaeróbica é normalmente realizada em condições mesófilas (35 a 37 °C). As proteínas quando sofrem biodegradação anaeróbica tem como produtos principais polipeptídeos, aminoácidos e amônia, algumas proteínas como a caseína são muito resistentes a degradação por microrganismos, o que leva a necessidade de microrganismos específicos, já os hidrocarbonetos são mais suscetíveis (PAVLOSTATHIS; GIRALDO-GOMEZ, 1991).

3.2.1. Cultura pura x cultura mista (consórcios)

Com o intuito de melhorar os processos biotecnológicos, na maioria são utilizadas culturas puras, pois assim conseguem otimizar os parâmetros do processo de fermentação de acordo com as particularidades da cepa específica do microrganismo envolvido. No entanto, há uma desvantagem, pois estes processos requerem condições assépticas e de elevada qualidade nos materiais utilizados (LU *et al.*, 2011).

Um consórcio microbiano é formado por dois ou mais grupos microbianos que vivem simbioticamente (MADIGAN *et al.*, 2009), são sistemas de multipopulações, possuem algumas vantagens com relação aos sistemas com uma população (culturas puras). Consórcios bem estabelecidos provavelmente iram ser mais resistentes à invasão

de outras espécies (BURMOLLE *et al.*, 2006), em uma eventual falta de nutrientes estas populações podem sobreviver melhor ao compartilharem metabólitos essenciais (LAPARA *et al.*, 2002), podem dividir o trabalho para realizar uma tarefa com grande carga metabólica realizando assim um circuito cooperativo (BRENNER; YOU; ARNOLD, 2008), alguns comportamentos podem ser realizados com o uso de consórcios mas que seriam difíceis de serem obtidos com populações únicas.

Assim a utilização de uma cultura mista, que não trabalha com cepas específicas, não necessitando de condições assépticas, pois o risco de contaminação não é significativo (LU *et al.*, 2011), tendo ainda a vantagem de poder ser alimentada com uma variedade de substratos com diversos compostos químicos (RODRIGUEZ *et al.*, 2016).

Com o uso de consórcios microbianos em ambientes anaeróbicos, promove-se a cooperação de uma população de microrganismos, proporcionando assim uma fermentação estável e auto-reguladora na degradação de matéria orgânica (STERLING *et al.*, 2001).

Quando utilizadas culturas mistas em processos anaeróbicos, ocorre a formação preferencial de AGVs em relação a etanol, isso ocorre pois os microrganismos que estarão em maioria são os que nas condições em que estão, conseguiram encontrar a melhor rota para obter o máximo de energia (RITTMANN; MCCARTY, 2001).

3.3. ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS

Os ácidos carboxílicos de cadeia curta, contendo até 6 carbonos e com baixo peso molecular, com pKa que variam de 3,75 a 4,87, são chamados de ácidos graxos voláteis (ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, etc). Possuem elevado caráter hidrofílico (APHA, 1992; MESQUITA *et al.*, 2013), os quais podem ser produzidos sinteticamente por rotas químicas a partir de combustíveis fósseis (produtos petroquímicos) não renováveis (HUANG *et al.*, 2002) ou de intermediários metabólicos da etapa de acidificação (fermentação) do processo de digestão anaeróbica (SINGHANIA *et al.*, 2013). Em meios com pH maiores que seus pKa apresentam-se dissociados e assim são comumente referidos pelo nome de seus sais correspondentes (acetato, propionato, ...) (MESQUITA *et al.*, 2013).

A produção de AGVs está relatada na literatura, com a utilização de meios de cultura com alta carga de matéria orgânica, diferentes condições ambientais e configurações de reatores. Estes trabalhos estão relacionados com a obtenção de

combustíveis (CH₄ e H₂), a partir de novas fontes, que sejam competitivas com as já existentes, sendo os AGVs, subprodutos encontrados. Nestes trabalhos, comumente são utilizados inóculos de linhagem pura e em poucos casos populações mistas de microrganismos (LEITE, 2005).

Na produção por via biológica, carboidratos (glicose e sacarose) vêm sendo empregados como principais fontes de carbono (ZIGOVÁ *et al.*, 1999; KONDO; KONDO, 1996), entretanto, tal fato levanta questões éticas sobre o uso de alimentos para a fabricação de produtos químicos. Este problema pode ser solucionado utilizando rejeitos ricos em matéria orgânica, como lodos gerados pelas estações de tratamento, resíduos de alimentos, fração orgânica de resíduos sólidos municipais e efluentes de indústrias agrícola, láctea e de papel, em alguns casos até misturas destes resíduos, para a produção de ácidos graxos voláteis, oferecendo uma plataforma economicamente e ecologicamente sustentável e que agrega valor (LEE *et al.*, 2014).

Apesar da diversidade de meios usados em estudos para fim de produzir AGVs, a melhor matéria prima não pode ser definida, e isso se deve a grande variedade de condições de operação e critérios de avaliação usadas nos estudos (LEE *et al.*, 2014), mas algumas características podem ser levadas em consideração para eleger um candidato a este uso, ser rico em matéria orgânica, ter grande disponibilidade e a quantidade de resíduos gerados (SALEHIZADEH; VAN LOOSDRECHT, 2004).

A etapa de hidrólise pode ser um limitante para produção dos AGVs devido à estrutura e composição dos resíduos (FDEZ-GÜELFO *et al.*, 2011), com isso em alguns casos pré-tratamentos químicos podem ser utilizados para melhorar o desempenho da fermentação. Alguns dos reagentes usados são: ácido (ELBESHBISHY *et al.*, 2011; DEVLIN *et al.*, 2011), álcali (ELBESHBISHY *et al.*, 2011; TORRES; LLORÉNS, 2008; DOĞAN; SANIN, 2009; KIM *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2010), ozônio (CESARO; BELGIORNO, 2013; BOUGRIER *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2010) e peróxido de hidrogênio (ESKICIOGLU *et al.*, 2008; SHAHRIARI *et al.*, 2012). O uso de tratamentos ácidos e alcalinos aumenta a solubilidade de substâncias poliméricas (DEVLIN *et al.*, 2011; DOĞAN; SANIN, 2009) e de rejeitos alimentares (ELBESHBISHY *et al.*, 2011).

De maneira geral, segundo Lee *et al.* (2014), a produção de ácidos graxos voláteis derivados de resíduos orgânicos é um processo anaeróbico que envolve a hidrólise, com posterior fermentação acidogênica. Segundo Singhanian *et al.* (2013), o processo de fermentação empregando recursos renováveis, é preferível do ponto de vista do desenvolvimento sustentável e da saúde humana. Os AGVs são os principais

intermediários da digestão anaeróbia, nestas condições, os microrganismos não possuem o oxigênio para usar como aceptor final de elétrons, assim a matéria orgânica é usada como aceptor e doador de elétrons, sendo assim enquanto uma parte é oxidada outra é reduzida este processo é conhecido como fermentação (MESQUITA *et al.*, 2013).

São várias as aplicações para os ácidos graxos voláteis produzidos por meio da fermentação acidogênica de resíduos. Ácidos orgânicos – ácidos acético, butírico, propiônico e láctico – vêm sendo comumente investigados como precursores de várias aplicações biotecnológicas (MOTTE *et al.*, 2015), uma destas aplicações é a produção de plásticos biodegradáveis (poli-hidroxialcanoatos) (BENGTSSON *et al.*, 2008); geração de bioenergia – biogás, bio-hidrogênio e biodiesel – e eletricidade (células de combustível microbianas) (UYAR *et al.*, 2009; CHOI; CHANG; HAN, 2010).

3.3.1. Ácido Acético

Um dos mais simples dos ácidos graxos voláteis é o ácido acético (CH_3COOH), é um ácido fraco, transparente com gosto azedo e odor irritante (KIM *et al.*, 2002), é o principal constituinte do vinagre (CHERYAN, 2009). É atualmente produzido a partir de combustíveis fósseis como um produto químico industrial e também por produtos químicos por três processos: oxidação de acetaldeído, oxidação de hidrocarbonetos e carbonilação de metanol. Também pode ser produzido por rotas biológicas usando uma rota aeróbica ou anaeróbica (CHERYAN, 2009).

Tem sido utilizado como intermediário na produção de produtos em diferentes ramos industriais, como o de produção de substâncias químicas (ácido tereftálico, dimetil tereftalato e ácido acético anidro), produtos de limpeza e alimentos (KIM *et al.*, 2002).

Há muitas frentes de pesquisa trabalhando na obtenção do ácido acético por via biológica, tentando otimizar este processo, isso devido ao fato de vários países que estipulam que o vinagre deve ser feito por via biológica (AWAD *et al.*, 2012).

3.3.2. Ácido Butírico

O ácido butírico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), possui 4 átomos de carbono, com grande utilização nas indústrias química, alimentícia e farmacêuticas, sua principal é na fabricação de plásticos de butirato de acetato de celulose que é usado para a produção de fibras têxteis, também pode ser usado com aplicação direta para melhorar a resistência ao

calor e ao sol de fibras. Existem estudos para utiliza-lo na produção de b-hidroxibutirato de polímero biodegradável. Seus ésteres são utilizados como aditivos de aromas com intuito de aumentar a fragrância semelhante a frutas na indústria de alimentos (ZIGOVÁ *et al.*, 1999).

No ramo farmacêutico, são utilizados derivados do ácido butírico como drogas vasoconstritoras, tanto em anestésicos quanto em antioxidantes, além desta utilização também está sendo utilizado no tratamento de hemoglobinopatias, câncer e doenças gastrointestinais, estão sendo estudados vários fármacos e formulações com derivados deste ácido (CHEN; BREITMAN, 1994; REPHAELI *et al.*, 2000; BLANK-PORAT *et al.*, 2007. HAMER *et al.*, 2008). Além destas aplicações também vem sendo utilizado para aumentar o rendimento de bioetanol (LEE *et al.*, 2008).

Sua produção industrial é baseada na síntese química de derivados petroquímicos, mas a sua utilização em alimentos, cosméticos e fármacos, sobre uma pressão do consumidores que preferem produtos de origem natural, e assim a produção de ácido butírico a partir de biomassa renovável tem se tornado uma alternativa atrativa (ZIGOVÁ; STURDIK, 2000)

3.3.3. Ácido Propiônico

O ácido propiônico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$), tem sido utilizado em alimentos, grãos e rações, como antifúngico e flavorizante (RAZAVI-ROHANI; GRIFFITHS, 1999; VALE *et al.*, 2004), além de intermediário na síntese de herbicidas, plásticos de acetato-propionato de celulose, solventes e produtos farmacêuticos (BARBIRATO; CHEDAILLE; BORIES, 1997; HIMMI *et al.*, 2000). A principal fonte é a síntese química a partir de derivados de petróleo, mas processos fermentativos de subprodutos industriais de baixo valor, podem ser utilizados para produção por uma via renovável (KOŠMIDER *et al.*, 2010)

3.3.4. Ácido Láctico

O ácido láctico ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$) pode ser obtido por síntese química ou fermentação. É um ácido orgânico natural, encontrado em alimentos ou devido a processos de fermentação ocorridos. Os alimentos que o contem são: iogurte, soro de leite coalhado, pães de massa azeda e outros. É um intermediário metabólico na maioria dos

organismos vivos, desde procariontes anaeróbicos até humanos. Tem grande utilização nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e química. Está sendo utilizado como uma opção ecológica para a produção de matérias, que utilizam materiais provenientes de fontes petroquímicas (DATTA; HENRY, 2006).

O ácido láctico possui duas formas, D(-)-ácido láctico e L(+)-ácido láctico. A síntese química produz uma mistura racêmica dos dois isômeros, enquanto que por via fermentativa é possível produzir uma das duas formas óptica pura, ajustando as condições da fermentação (ÅKERBERG *et al.*, 1998).

3.3.5. Ácido Fórmico

O ácido fórmico (HCOOH) é o mais simples ácido carboxílico por possuir apenas um carbono em sua estrutura. É um produto químico valioso, sendo amplamente utilizado como conservante, agente antibacteriano, inseticida e também como descongelante. Várias aplicações são encontradas nas indústrias de couro e curtumes, mercados têxteis e de borrachas, degelo de estradas, preservação de silagem e alimentos para animais ou setor médico, etc (YAN; PHILIPPOT, 2018; LOPEZ; SOMIARI; MANOUSIOUTHAKIS, 2018). O ácido fórmico desempenha também um papel importante na química sintética como um ácido, um redutor e um precursor para sínteses (YAN; PHILIPPOT, 2018). Além disso é estabelecido como um líquido "transportador de hidrogênio" e, portanto, como uma alternativa promissora para armazenamento de energia química (TEDSREE *et al.*, 2011).

O ácido fórmico é um produto com uma produção global de 640.000 toneladas/ano. A produção comercial de ácido fórmico é tipicamente realizada através da hidrólise de formiato de metila seguida de extração líquido-líquido para purificar o ácido fórmico produzido (LOPEZ; SOMIARI; MANOUSIOUTHAKIS, 2018).

3.3.6. Ácido Succínico

O ácido succínico (HOOCCH₂CH₂COOH), um ácido dicarboxílico com quatro átomos de carbonos, tem ampla aplicação nas indústrias de alimentos, produtos químicos e farmacêuticas (HONG; LEE, 2002; SONG; LEE, 2006). Pode ser utilizado para a produção de 1,4-butanodiol, gama-butirolactona, tetrahidrofurano, ácido adípico, n-metilpirrolidona, ésteres alifáticos lineares ou polímeros biodegradáveis (DELHOMME;

WEUSTER-BOTZ; KÜHN, 2009; ERICKSON; NELSON; WINTERS, 2011). Para competir com a refinaria de petróleo que fornece a matéria prima para sua produção, novas fontes e a melhoria dos processos são os principais desafios para a produção biológica econômica de ácido succínico. Muitas cepas veem sendo testadas ou projetadas para realizar a sua produção (CHENG *et al.*, 2012). Está sendo considerado umas das substancias com maior potencial de ser produzido por via fermentativa de recursos renováveis (JANG, *et al.*, 2012).

4. METODOLOGIA

4.1. PRIMEIRA ETAPA – SELEÇÃO DE INÓCULOS

4.1.1. Consórcios Microbianos

Foram bioprospectados 5 consórcios microbianos como inóculos no processo de biodigestão anaeróbica, além da utilização de uma cepa pura (*Clostridium beijerinckii*, ATCC 8260, Fonte: Coleção de culturas ATCC (EUA)). Os consórcios foram identificados conforme Tabela 1:

Tabela 1 Identificação dos consórcios.

Número de identificação do consórcio ou cepa pura	Descrição do local onde foi obtido
1	Amostra de solo, retirada a 15 cm da superfície do Jardim Zoobotânico Municipal de Toledo – PR.
2	Gordura de soro amostrada da caixa de gordura obtida na empresa de beneficiamento de soro localizada em Marechal Candido Rondon – PR.
3	Gordura de soro amostrada da caixa de gordura obtida na empresa de beneficiamento de soro localizada em Marechal Candido Rondon – PR, inoculado com uma amostra de biodigestor de uma propriedade de Toledo - PR.
4	Dejetos de pássaros provenientes de viveiro localizado no Jardim Zoobotânico Municipal de Toledo – PR.
5	Estômago suíno proveniente de frigorífico localizado em Santa Cruz do Rio Pardo – SP.
6	Cultura pura (<i>Clostridium beijerinckii</i>).

Fonte: autoria própria.

4.1.2. Substrato e Meio de Cultivo

Como meio de cultivo para fermentação, foi utilizado o soro de leite cedido pela empresa de beneficiamento de soro, localizada na cidade de Marechal Candido Rondon – PR, que foi utilizado hidrolisado e não hidrolisado, e foram caracterizados em termos de pH, acidez, sólidos totais e lactose (açúcares redutores).

Para a análise de pH foi utilizado um medidor de pH de bancada (MS TECNOPON/mPA-210) previamente calibrado. A metodologia utilizada para análise de acidez foi seguida conforme descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Transferiu-se 10 mL de amostra para um béquer de 100 mL, e acrescentou-se 5 gotas da solução indicadora de fenolftaleína. Em seguida, titulou-se com solução volumétrica de hidróxido de sódio 0,1 M até o ponto de viragem.

O teor de sólidos totais (°Brix) foi determinado por refratômetro portátil (MEGABRIX/RHB-32ATC) com a amostra a 25 °C.

A determinação do teor de lactose (açúcares redutores) foi realizada pelo método ácido dinitrossalicílico - DNS (MILLER, 1959) (APÊNDICE A), utilizando padrão de Lactose monohidratado – Sigma Aldrich com teor de 98%.

4.1.2.1. Hidrólise do soro

O pH do soro foi reduzido até 1,5 com ácido clorídrico concentrado em tubos de ensaio e levados a bloco digestor com controle de temperatura por 4 minutos a 150 °C, depois de resfriados foram neutralizados com hidróxido de sódio 1 M até o mesmo pH inicial (4,5) (GEKAS; LOPES-LEIVA, 1985).

4.1.3. Fermentação Anaeróbica

O procedimento para a promoção da cultura anaeróbica foi baseado na “Técnica Balch” desenvolvida por Ralph S. Wolfe em meados da década de 1970. A remoção de oxigênio ocorreu por ebulição do meio em uma chapa de aquecimento, no momento em que o soro entra em ebulição é colocado para resfriar sob uma atmosfera de CO₂ (Figura 2) com adição de bicarbonato de sódio quando a temperatura chegar a 85 °C. Este procedimento tem a função de diminuir o potencial redox do meio (BALCH; WOLFE, 1976).

Figura 2 Parte do aparato para obtenção da cultura anaeróbica.



Fonte: autoria própria.

Foram realizados os experimentos em dois meios de cultivo, soro não hidrolisado (SN) e soro hidrolisado (SH). Os experimentos foram conduzidos em tubos Hungate de 15 mL, com volume de trabalho de 6 mL. A estes tubos foram adicionados 6 mL do soro não hidrolisado ou soro hidrolisado sob atmosfera de CO₂. Os tubos foram selados com tampas de rosca de baquelite e septos de borracha, sendo autoclavados e armazenados para uso posterior.

Os tubos contendo soro não hidrolisado ou hidrolisado foram inoculados com 1 mL de consórcio microbiano e da cultura pura (um tubo para cada consórcio e cada soro) com auxílio de uma seringa por meio da rolha de borracha, totalizando 12 tubos que seguiram a identificação apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 Identificação dos experimentos da primeira etapa.

Identificação	Soro	Inóculo
SH1	Hidrolisado	1
SH2	Hidrolisado	2
SH3	Hidrolisado	3
SH4	Hidrolisado	4
SH5	Hidrolisado	5
SH6	Hidrolisado	6
SN1	Não hidrolisado	1
SN2	Não hidrolisado	2
SN3	Não hidrolisado	3
SN4	Não hidrolisado	4
SN5	Não hidrolisado	5
SN6	Não hidrolisado	6

Fonte: autoria própria.

Os tubos inoculados foram incubados (incubadora THOTH/6430) a 37 °C temperatura indicada para o crescimento da cultura pura descrito na ficha que acompanha a cepa e mantido nesta condição por 7 dias. Ao final do 7º dia novos tubos foram inoculados com 1 mL dos tubos anteriores, caracterizando uma nova geração. As gerações foram identificadas por uma numeração sequencial em que 1 representa a primeira geração, 2 a segunda e assim sucessivamente, como por exemplo SH1.1, sendo o número depois do ponto a geração. Foram feitas 8 gerações.

4.1.3.1. Avaliação da produção de gás e adaptação dos microrganismos

Os tubos incubados tiveram sua produção de gás medida em dois momentos durante os 7 dias – o primeiro no quarto dia de incubação e o segundo no último dia – utilizando-se uma seringa de 60 mL. A seringa foi inserida pelas rolhas de borracha do tubo e a pressão do gás formado foi capaz de impulsionar o êmbolo e assim o volume de gás medido. O objetivo foi avaliar sumariamente o desempenho do experimento e a adaptação do consórcio.

4.1.4. Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis

A produção de ácidos graxos voláteis, foi quantificada em Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), marca Thermo Scientific, modelo ULTIMATE3000, tendo como referência padrões de AGVs de concentrações conhecidas (Adaptado de CERQUEIRA *et al.*, 2011).

4.1.4.1. Preparo das amostras

Com uma seringa foi retirado 1 mL de cada um dos experimentos (ao todo 12) em todas as gerações. Estas alíquotas foram transferidas para eppendorfs e centrifugadas (NOVA TECNICA/NT 800) por 5 minutos a 10000 rpm. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de 0,22 μm , transferidos para novo eppendorf e congelados para posterior análise. No momento da análise foram diluídos 4 vezes.

4.1.4.2. Preparo de padrões e construção da curva de calibração

Foram preparados padrões de ácidos butírico, láctico, acético, propiônico, succínico e fórmico em concentrações conhecidas, 0,05 g/L, 0,25 g/L, 0,50 g/L, 0,75 g/L e 1,00 g/L, diluídos em água ultrapura, para construção das curvas de calibração.

4.1.4.3. Leitura das amostras

A análise dos produtos de fermentação foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, equipado com detector UV-VIS. Uma coluna C18 de fase reversa da marca NST (125mm x 4,0mm x 5 μm) foi utilizada para a separação dos ácidos graxos voláteis.

Como fase móvel foi utilizada uma mistura de água acidificada (pH 3) com ácido fosfórico, e metanol na proporção (90:10); a vazão foi mantida em 1 mL/min, com coluna a 25 °C; e a leitura foi realizada a 210 nm; o tempo de corrida de 19 minutos; e o volume de injeção de 20 μL .

Foi realizada também a análise de um branco constituído de soro não hidrolisado e outro de soro hidrolisado não-fermentados. Os valores de AGVs encontrados nos brancos foram descontados de todos os resultados para cepa e consórcios (Adaptado de CERQUEIRA *et al.*, 2011).

4.2. SEGUNDA ETAPA – SUPLEMENTAÇÃO

4.2.1. Consórcios Microbianos

Foram utilizados os consórcios microbianos 3 e 4 como inóculos no processo de biodigestão anaeróbica, além da cepa pura (*Clostridium beijerinckii*, ATCC 8260, Fonte: Coleção de culturas ATCC (EUA)). Estes foram os mesmos usados na primeira etapa. Identificados conforme Tabela 3.

Tabela 3 Identificação dos consórcios.

Número de identificação do consórcio ou cepa pura	Descrição do local onde foi obtido
3	Gordura de soro amostrada da caixa de gordura obtida na empresa SOORO localizada em Marechal Candido Rondon – PR.
4	Dejetos de pássaros provenientes de viveiro localizado no Jardim Zoobotânico Municipal de Toledo – PR.
6	Cultura pura.

Fonte: autoria própria.

4.2.2. Substrato e Meio de Cultivo

Como meio de cultivo para fermentação, foram utilizados os mesmos soros de leite hidrolisado e não hidrolisado, e estes dois soros também suplementados.

4.2.2.1. Suplementação

Os soros foram suplementados com 13 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de peptona, estas quantidades foram baseadas em um meio semi-sólido para a enumeração e cultivo de clostrídios e outros anaeróbios que ocorrem em alimentos e espécimes patológicos. Código: CM0149 da Oxoid Microbiology Products da Thermo Scientific.

4.2.3. Fermentação Anaeróbica

Os quatro meios de cultivo (Soro Hidrolisado (SH), Soro não Hidrolisado (SN), Soro Hidrolisado Suplementado (SHS) e o Soro não Hidrolisado Suplementado (SNS)) passaram pelo processo de promoção da cultura anaeróbica como descrito no item 4.1.3 da primeira etapa (item 4.1).

Assim os experimentos da segunda etapa (item 4.2) foram realizados com os quatro meios. Os experimentos foram conduzidos em tubos Hungate de 15 mL, com volume de trabalho de 6 mL. A estes tubos foram adicionados 6 mL do soro não hidrolisado ou soro hidrolisado ou soro não hidrolisado suplementado ou soro hidrolisado suplementado sob atmosfera de CO₂. Os tubos foram selados com tampas de rosca de baquelite e septos de borracha, sendo autoclavados e armazenados para uso posterior.

Os tubos contendo um dos soros foram inoculados com 1 mL de consórcio microbiano e da cultura pura (um tubo para cada consórcio e cada soro) com auxílio de uma seringa por meio da rolha de borracha, totalizando 10 tubos que seguiram a identificação apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 Identificação dos experimentos da segunda etapa.

Identificação	Soro	Inóculo
SH3	Hidrolisado	3
SH4	Hidrolisado	4
SH6	Hidrolisado	6
SHS3	Hidrolisado Suplementado	3
SHS4	Hidrolisado Suplementado	4
SN3	Não hidrolisado	3
SN4	Não hidrolisado	4
SN6	Não hidrolisado	6
SNS3	Não hidrolisado Suplementado	3
SNS4	Não hidrolisado Suplementado	4

Fonte: autoria própria.

Os tubos inoculados foram incubados (incubadora THOTH/6430) a 37 °C temperatura indicada para o crescimento da cultura pura descrito na ficha que acompanha a cepa e mantido nesta condição por 7 dias. Ao final do 7º dia novos tubos foram inoculados com 1 mL dos tubos anteriores, caracterizando uma nova geração, as gerações foram identificadas por uma numeração sequencial em que 1 representa a primeira

geração, 2 a segunda e assim sucessivamente, como por exemplo SH1.1, sendo o número depois do ponto a geração. Foram feitas 7 gerações.

4.2.3.1. Avaliação da produção de gás e adaptação dos microrganismos

Os tubos incubados tiveram sua produção de gás medida da mesma maneira descrita na primeira etapa (Item 4.1) no item 4.1.3.1.

4.2.4. Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis

A produção de ácidos graxos voláteis, foi quantificada em Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), marca Thermo Scientific, modelo ULTIMATE3000, tendo como referência padrões de concentrações conhecidas.

4.2.4.1. Preparo das amostras

Com uma seringa foi retirado 1 mL de cada um dos experimentos (ao todo 10) em todas as gerações. Estas alíquotas foram transferidas para eppendorfs e centrifugadas (NOVA TECNICA/NT 800) por 5 minutos a 10000 rpm. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de 0,22 μm , transferidos para novo eppendorf e congelados para posterior análise. No momento da análise foram diluídos 4 vezes.

4.2.4.2. Preparo de padrões e construção da curva de calibração

Foram preparados padrões de ácidos butírico, láctico, acético, propiônico, succínico e fórmico em concentrações conhecidas, 0,05 g/L, 0,25 g/L, 0,50 g/L, 0,75 g/L e 1,00 g/L, diluídos em água ultrapura, para construção das curvas de calibração.

4.2.4.3. Leitura das amostras

As análises dos produtos de fermentação foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, equipado com detector UV-VIS. Uma coluna de exclusão iônica ORH-801 da marca Transgenomic IC Sep (300mm x 6,5mm) foi utilizada para a separação dos ácidos graxos voláteis.

Como fase móvel foi utilizada uma solução de H₂SO₄ 0,01 M; a vazão foi mantida em 0,6 mL/min, com coluna a 45 °C; e a leitura foi realizada a 210 nm; o tempo de corrida de 30 minutos; e o volume de injeção de 20 µL.

Foi realizada também a análise dos brancos do soro não hidrolisado (SN), soro hidrolisado (SH), soro não hidrolisado suplementado (SNS) e soro hidrolisado suplementados (SHS) não-fermentados. Os valores de AGVs encontrados nos brancos foram descontados de todos os resultados para cepa e consórcios (Adaptado de MESQUITA *et al.*, 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRIMEIRA ETAPA

5.1.1. Caracterização do soro

As características Físico-Químicas dos soros (hidrolisado e não hidrolisado) são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 Resultados da caracterização dos soros.

Parâmetros	Não hidrolisado	Hidrolisado
pH	4,52 ± 0,00	4,53 ± 0,00
Acidez % ácido láctico	0,32 ± 0,00	0,28 ± 0,00
Sólidos totais	62 g.l ⁻¹ (6,2%)	61 g.l ⁻¹ (6,1%)
°brix	6,2	6,1
Açúcares redutores (lactose)	3,95 ± 0,00 %	3,47 ± 0,00 %

Fonte: autoria própria.

O pH do soro de leite varia de acordo com o tipo de queijo produzido. Existem dois tipos de soro, soro doce proveniente da coagulação enzimática de leite com pH próximo a 6,3 e 6,7, e o soro ácido resultado da manufatura de caseína ou queijos com leites coagulados inicialmente por ácido com pH próximos de 4,6 e 4,7 (PONSANO; PINTO; GOMEZ, 1992). O soro utilizado no trabalho se caracteriza como do tipo ácido, pois o pH está próximo ao deste tipo. A acidez do soro encontrada está coerente com os valores indicados pelo USDEC de 1997, que indica uma acidez de 0,35 a 0,44% de ácido láctico. Segundo Moresi (1994), o valor de sólidos totais é de 6,0 a 6,5 %, valores estes que correspondem ao encontrado, a quantidade de lactose segundo o mesmo autor é de 4,5 a 5,0%, o valor encontrado está próximo. O processo de hidrólise não alterou o pH e os sólidos totais, mas resultou em redução da acidez e do teor de Açúcares redutores.

5.1.2. Promoção da cultura anaeróbica

Durante o preparo da cultura anaeróbica, pouco antes de entrar em ebulição, ocorreu a precipitação das proteínas (Figura 3 e 4) presentes no soro para ambos os soros hidrolisado e não hidrolisado. Quando o soro de leite é aquecido com temperaturas acima

de 90 °C em pH próximo a 4,5 e 5,0, tem-se a precipitação térmica das proteínas, neste processo, ocorre a desnaturação durante o aquecimento e a agregação devido a acidez do soro (HILL; IRVINE; BULLOCK, 1982; DISSANAYAKE *et al.*, 2013). Devido a precipitação da proteína durante o preparo da cultura anaeróbica, somente a parte sobrenadante do soro foi transferida para os tubos.

Figura 3 Soro resfriando sob atmosfera de CO₂.



Fonte: autoria própria.

Figura 4 Proteína precipitada.



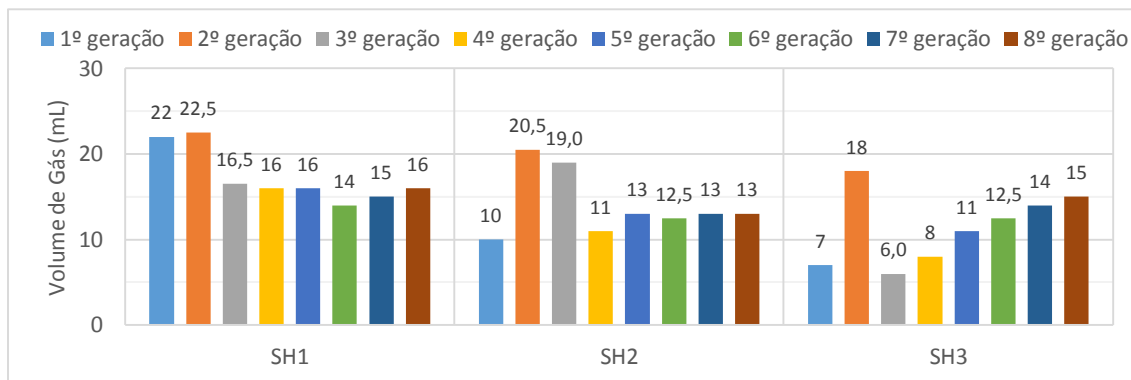
Fonte: autoria própria.

5.1.3. Avaliação da produção de gás e adaptação dos microrganismos

O processo de fermentação foi avaliado quanto à adaptação dos microrganismos ao novo meio e substrato. Foram realizadas 8 gerações, sendo que em todos foram medidos os volumes de produção de gás, e coletadas amostras de cerca de 1 mL para análise dos AGVs.

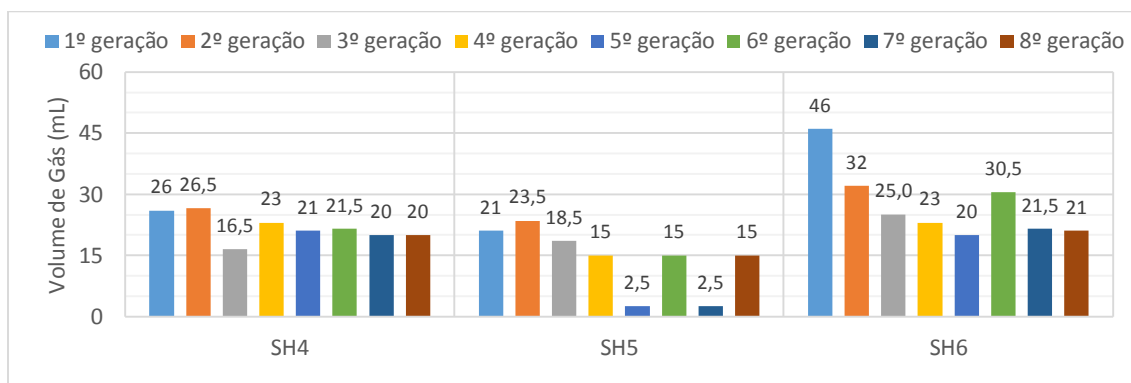
Nas Figuras 5 a 8 constam os valores totais de gás obtidos pela soma das duas coletas de gás da adaptação da cepa pura e dos consórcios microbianos nos dois meios testados. No APÊNDICE B nas Figuras B1 a B12 constam os valores obtidos nas duas coletas de gás e o total.

Figura 5 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado para os consórcios 1, 2 e 3.



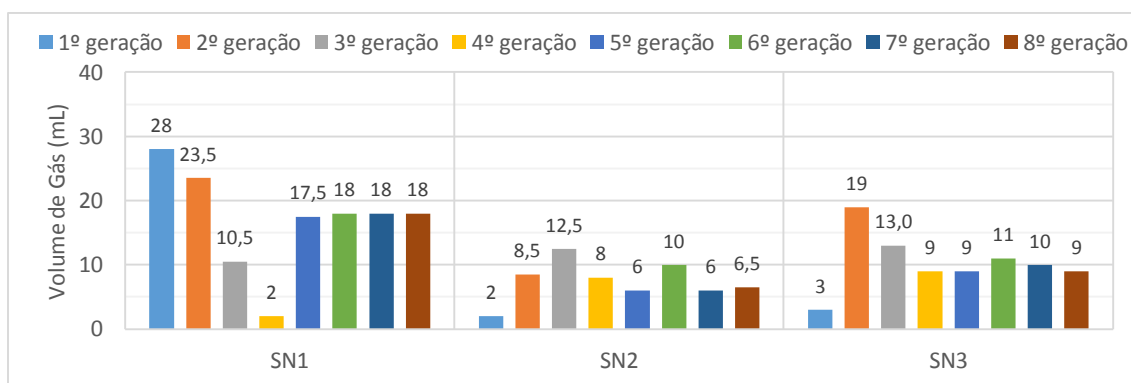
Fonte: autoria própria.

Figura 6 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado para o consórcios 4, 5 e 6 (cultura pura).



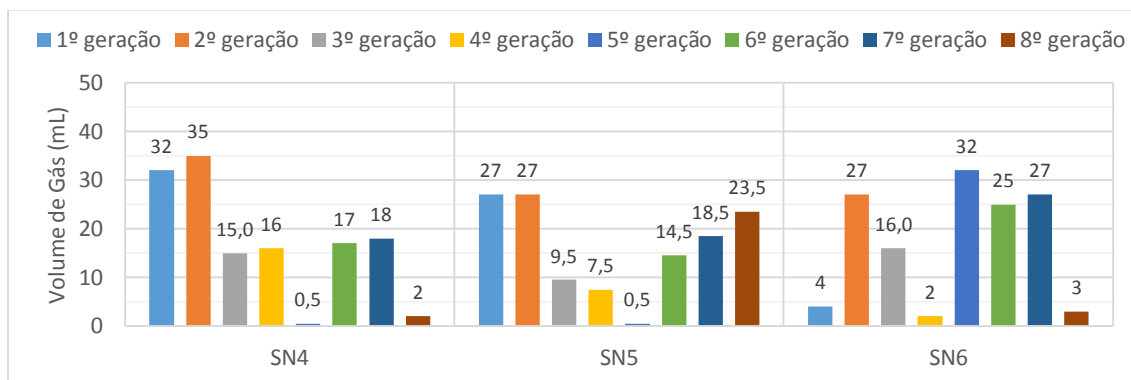
Fonte: autoria própria.

Figura 7 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado para os consórcios 1, 2 e 3.



Fonte: autoria própria.

Figura 8 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado para os consórcios 4, 5 e 6 (cultura pura).



Fonte: autoria própria.

Em relação a adaptação dos consórcios e da cultura pura, foi considerado somente a partir do momento em que a produção de gás se estabilizou em torno de um valor médio de produção. Nos 12 experimentos realizados, ocorreram a partir de gerações diferentes. Assim: para a 2ª geração somente SN2; na 3ª geração foram SH1, SH5, SH6, SN3 e SN4; na 4ª geração SH2 e SH4; na 5ª geração SH3, SN1 e SN6, apenas o experimento SN5 não se adaptou aos meios, pois não manteve a produção de gás em torno de um mesmo valor. Alguns experimentos tiveram gerações com produção abaixo de 5 mL. Nestes casos, para geração seguinte foi inoculado 1 mL da última geração que apresentou produção de gás maior que 5 mL e foi calculado a média de produção levando em consideração os valores a partir da geração em que foram considerados adaptados excluindo-se os valores menores que 5 mL, sendo os valores médios os descritos na Tabela 6, junto a estes valores estão também os valores máximos e mínimos e também o desvio padrão relativo (DPR) para cada experimento, novamente levando em consideração o mesmo critério para calcular a média, a DPR nos mostra qual dos experimentos apresentou maior variabilidade entre as medições, com isso o experimento que apresentou maior DPR foi o SN5, justamente o aquele que não havia estabilizado sua produção de gás.

Tabela 6 Volumes médios da soma de gás produzido durante o processo de fermentação, para os 5 consórcios e a cepa pura, nos soros hidrolisado e não hidrolisado.

Experimento	Volume Médio de gás (mL)	Máximo	Mínimo	DPR
SH1	16	16,5	14,0	0,92
SH2	13	13,0	11,0	0,87
SH3	13	15,0	11,0	1,75
SH4	21	23,0	20,0	1,24
SH5	16	18,5	15,0	1,75
SH6	24	30,5	20,0	3,85
SN1	18	18,0	17,5	0,25
SN2	8	12,5	6,0	2,40
SN3	10	13,0	9,0	1,60
SN4	17	18,0	15,0	1,29
SN5	19	23,5	14,5	4,51
SN6	28	32,0	25,0	3,61

Fonte: autoria própria.

Com base nestes resultados, podemos afirmar que os consórcios testados e a cultura pura possuem potencial de produção de ácidos graxos voláteis, uma vez que devido a produção de gases, sugere-se que ocorreu o processo de fermentação e, conseqüentemente, produção de AGVs.

Para a comprovação da produção e quantificação foi selecionada a 6ª geração para realizar a análise de ácidos graxos voláteis por cromatografia. Esta seleção seguiu os seguintes critérios: não poderia ser das 4 primeiras gerações, pois nem todos os experimentos estavam adaptados e a geração escolhida teria que ter todos os experimentos com valores aproximados de suas médias. Por outro lado, das quatro últimas gerações, a 5ª, 7ª e 8ª gerações tiveram experimentos com valores abaixo de 5 mL de produção de gás, a única geração que se adequou as condições foi a 6ª.

Com base nos valores da Tabela 6, podemos observar que os valores de produção de gás de um mesmo consórcio ou da cepa pura foram diferentes em cada meio, tendo alguns produzido mais gás no soro não hidrolisado (1, 5 e 6) e outros no hidrolisado (2, 3 e 4).

5.1.4. Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis

Foram quantificados os ácidos butírico, láctico, acético, propiônico, succínico e fórmico. Na Tabela 7, estão representadas as equações da reta das curvas analíticas dos

seis padrões acima citados, em que x é a concentração e y a área obtida no cromatograma, e seus valores de R^2 .

Tabela 7 Dados das curvas analíticas.

Padrão	Equação da Reta	R^2
Ácido Fórmico	$y = 19,416x - 0,122$	0,997
Ácido Láctico	$y = 9,920x - 0,019$	1,000
Ácido Acético	$y = 10,530x - 0,016$	1,000
Ácido Succínico	$y = 10,571x + 0,013$	1,000
Ácido Propiônico	$y = 10,015x + 0,083$	1,000
Ácido Butírico	$y = 10,211x + 0,307$	0,997

Fonte: autoria própria.

Os valores de R^2 são todos superiores a 0,997, o que demonstra a validade das curvas. Utilizando as equações da reta de cada curva é possível determinar a concentração (g/L) de cada um dos ácidos, os valores encontrados estão na Tabela 8.

Tabela 8 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE.

Amostras	Ác. Acético [] g/L	Ác. Succínico [] g/L	Ác. Propiônico [] g/L	Ác. Butírico [] g/L	Total AGVs [] g/L
SH1	0,00	0,00	0,00	0,44	0,44
SN1	0,00	0,16	0,00	0,35	0,52
SH2	0,24	0,00	0,27	0,92	1,43
SN2	0,00	0,14	0,14	1,45	1,73
SH3	0,17	0,00	0,00	1,04	1,21
SN3	0,00	0,00	0,00	1,36	1,36
SH4	0,00	0,00	0,06	2,24	2,30
SN4	0,00	0,29	0,19	1,78	2,26
SH5	0,00	0,00	0,00	0,13	0,13
SN5	0,00	0,30	0,00	0,91	1,21
SH6	0,16	0,00	0,00	0,64	0,79
SN6	0,00	0,30	0,00	1,10	1,40

Fonte: autoria própria.

Não foi possível detectar nos 12 experimentos, ácido Fórmico e ácido Láctico, pois a metodologia utilizada se mostrou não seletiva para estes dois ácidos. Em termos de AGVs totais, as 3 maiores foram SH4, SN4 e SN2, com 2,30, 2,26 e 1,73 g/L, respectivamente. Com isso, podemos observar que o consórcio 4 tem alto potencial de produção tanto em soro não hidrolisado quanto hidrolisado. O ácido acético foi obtido em SH2, SH3 e SH6, ocorrendo apenas em soro hidrolisado, o ácido succínico foi obtido nos

experimentos SN1, SN2, SN4, SN5 e SN6, mantendo o padrão de ter produção apenas em soro não hidrolisado. Já o ácido propiônico, teve produção em SH2, SN2, SH4 e SN4, em que os dois consórcios são capazes de produzir este ácido com ambos os meios. O ácido butírico foi produzido em todos os experimentos, com valores máximos de 2,24 g/L em SH4, 1,78 g/L em SN4 e 1,45 g/L em SN2, sendo o ácido produzido em maior quantidade em todos os ensaios.

Os experimentos SH1, SN3 e SH5 tiveram produção apenas de ácido butírico, sendo que dos três, o SN3 o mais promissor com produção de 1,37 g/L. O fato deste consórcio produzir apenas um ácido facilitaria a sua purificação. O consórcio 2 produziu três ácidos diferentes, ácido propiônico e butírico, para os dois meios e ácido acético para o hidrolisado e succínico para o não hidrolisado. O experimento SN4 também produziu três ácidos (succínico, propiônico e butírico). Os cromatogramas estão no APÊNDICE C.

A comparação da produção de AGVs na literatura, é muito complicada, uma vez que existem muitas diferenças entre os estudos, como substrato, inóculo, microrganismo, tempo de fermentação, entre outras condições. Assim a comparação se resume ao quanto cada estudo foi capaz de produzir, podendo indicar os mais promissores, bem como os microrganismos e inóculos. A Tabela 9 demonstra alguns estudos e seus resultados.

Tabela 9 Produção de AGVs encontrados na literatura.

Inóculo	Substrato	Quantidade produzida	Referência
Resíduo de reator UASB	Tofu	7,28 g/L	SHEN <i>et al.</i> (2017)
	Clara de ovo	15,23 g/L	
Rúmen	Palha de milho	22,8 g/L (4,0 g/L ácido valérico)	MURALI; FERNANDEZ; AHRING. (2017)
Inóculo acidogênico	Bagaço de uva	19,8 g/L (11,4 g/L ácido acético, 0,9 g/L propiônico, 5,3 g/L de butírico e 0,3 g/L valérico)	REBECCHI <i>et al.</i> (2016)

Fonte: autoria própria.

Em todos os estudos a produção de AGVs totais foi superior aos encontrados neste estudo, entretanto são estudos com substratos diferentes e inóculo diferentes.

Esta primeira etapa do estudo já demonstra a possibilidade de uso de novos consórcios promissores para a produção de ácido butírico a partir do soro de leite. Com os dados da primeira etapa, realizou-se a escolha de dois consórcios para serem usados na segunda etapa. Os critérios para a escolha foram excluir os consórcios que tiveram produção de ácido butírico menor que 1,0 g/L sendo estes os consórcios 1 e 5, depois foi selecionado o consórcio com maior produção (sendo o 4), e por último o que produziu apenas o ácido butírico e este foi o 3 nos experimento SN3, juntamente com estes dois consórcios (3 e 4), também foi utilizado a cultura pura (6).

5.2. SEGUNDA ETAPA

5.2.1. Promoção da cultura anaeróbica

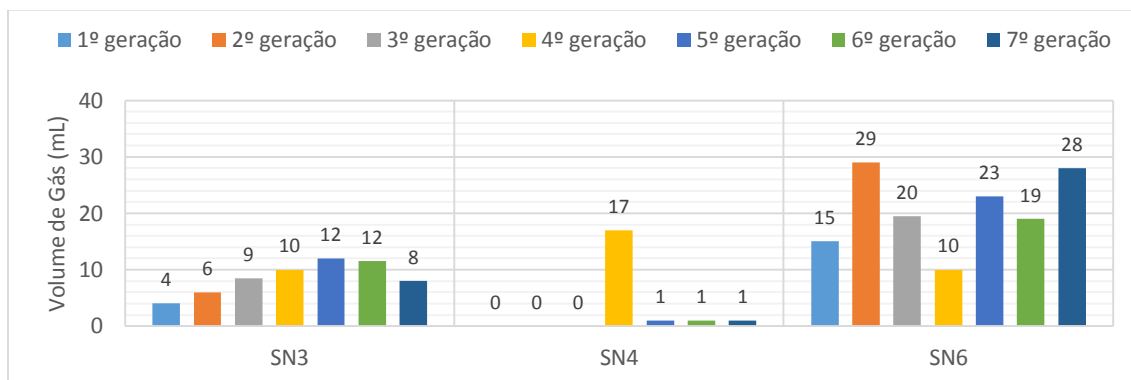
Antes do preparo da cultura anaeróbica foram separadas porções do soro não hidrolisado e do hidrolisado, a estas porções foi adicionado em cada uma, 13 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de peptona, e assim proporcionando 4 meios de cultivo diferentes sendo, soro não hidrolisado, soro hidrolisado, soro não hidrolisado suplementado e soro hidrolisado suplementado. Ambos passaram pelo processo de preparo da cultura anaeróbica, em todos ocorreu da mesma maneira que na primeira etapa a precipitação das proteínas presentes no soro e assim como na primeira etapa somente a parte sobrenadante do soro foi transferida para os tubos.

5.2.2. Avaliação da produção de gás e adaptação dos microrganismos

O processo de fermentação da segunda etapa também foi avaliado quanto a adaptação dos microrganismos aos novos meios e substratos. Foram realizadas 7 gerações, sendo que em todos foram medidos os volumes de produção de gás, e coletadas amostras de cerca de 1 mL para análise dos AGVs.

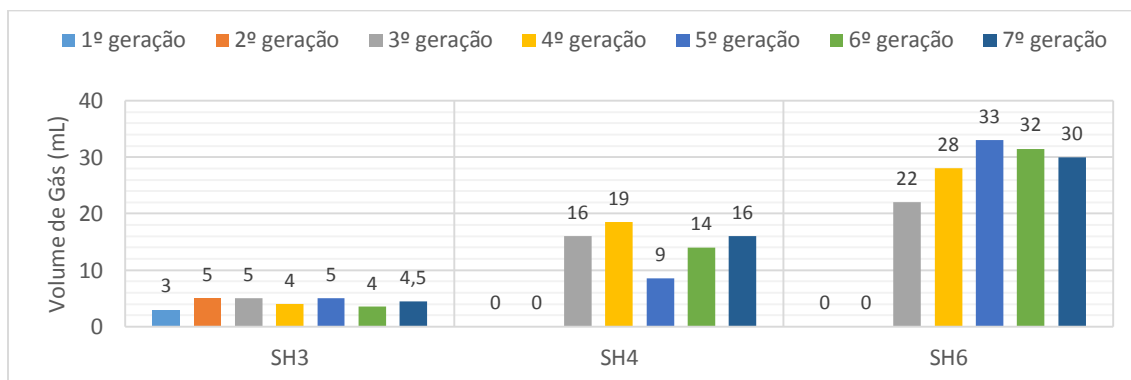
Nas Figuras 9 a 12 constam os valores totais de gás obtidos pela soma das duas coletas de gás da adaptação da cepa pura e dos consórcios microbianos nos quatro meios testados. No APÊNDICE D as Figuras D1 a D10 constam os valores obtidos nas duas coletas de gás e o total.

Figura 9 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado para os consórcios 3, 4 e 6 (cultura pura).



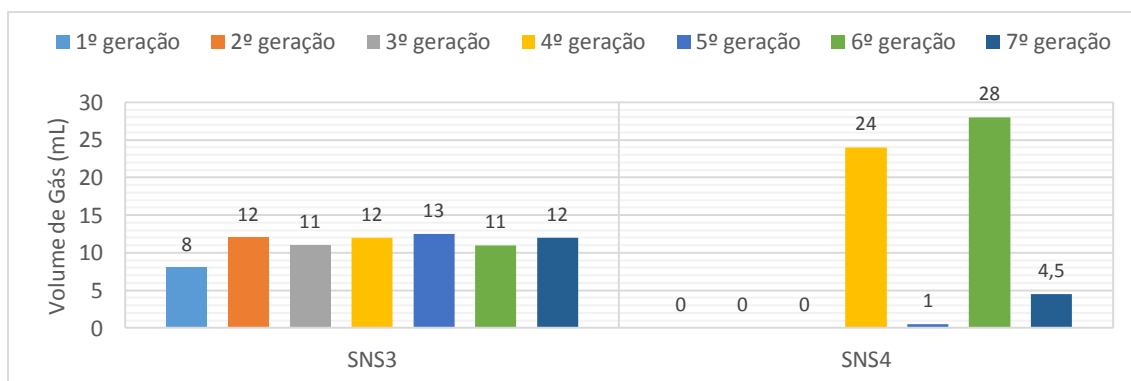
Fonte: autoria própria.

Figura 10 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado para o consórcio 3, 4 e 6 (cultura pura).



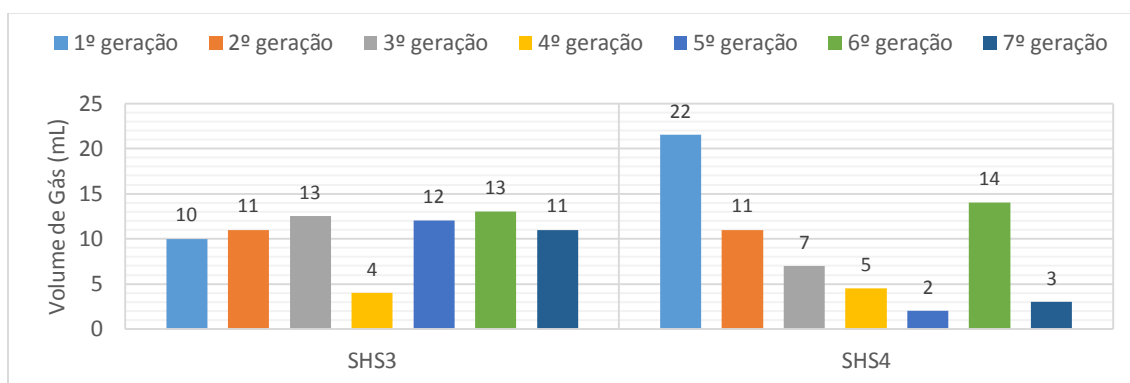
Fonte: autoria própria.

Figura 11 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado suplementado para os consórcios 3 e 4.



Fonte: autoria própria.

Figura 12 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado suplementado para os consórcios 3 e 4.



Fonte: autoria própria.

Em relação a adaptação dos consórcios e da cultura pura, na segunda etapa do estudo, foi considerado somente a partir do momento em que a produção de gás se estabilizou em torno de um valor médio de produção.

Nos 10 experimentos realizados, ocorreram a partir de gerações diferentes. Assim: para o SN3 a adaptação foi a partir da 3ª geração com média de produção de 9 mL; o SN4 não teve produção de gás nas 3 primeiras gerações apresentando um pico de produção com um valor de 17 mL na 4ª geração, e passado a 1 mL nas três últimas; o SN6 não estabilizou a sua produção de gás tendo variado de 10 mL a 29 mL; o SH3 manteve sua produção entorno de uma média de 4,5 mL desde a 2ª geração; o SH4 não apresentou produção de gás nas 2 primeiras gerações, tendo produção média de 15 mL a partir da 3ª; o SH6 teve comportamento similar ao SH4 porém com média superior sendo de 29 mL; o SNS3 teve sua produção estabilizada em torno de 12 mL desde a 2ª geração; o SNS4 não apresentou produção de gás nas 3 primeiras gerações e também na 5ª, mas dois picos próximos a 26 mL nas gerações 4 e 6, e um decaimento de 20 mL na última; o SHS3 teve média de 12 mL desconsiderando a 1ª e a 4ª geração, sendo a 4ª a que teve menor valor de gás; o SHS4 iniciou com uma produção de 22 mL e seguiu caindo até a 5ª geração, tendo um salto de 14 mL na 6ª geração e retornando a 3 na última. Alguns experimentos tiveram gerações com produção abaixo de 5 mL. Apesar disso 1 mL deste foi inoculado para a próxima geração.

Com base nos dados pode-se observar uma dificuldade do consórcio 4 em se adaptar aos meios testados com resultados melhores no meio hidrolisado suplementado e não suplementado. O consórcio 3 demonstrou-se versátil por ter se adaptado nos 4 meios, tendo resultados semelhantes nos meios suplementados, e o não hidrolisado. A

cultura pura apresentou variação nos dois meios testados assim como na primeira etapa, se mostrando mais adaptada ao meio hidrolisado que ao não hidrolisado.

Com base nestes resultados, podemos afirmar que os consórcios testados e a cultura pura possuem potencial de produção de ácidos graxos voláteis, uma vez que devido a produção de gases, sugere-se que ocorreu o processo de fermentação e, conseqüentemente, produção de AGVs.

Para a comprovação da produção e quantificação foram selecionadas as 4 últimas gerações para realizar a análise de ácidos graxos voláteis por cromatografia. A escolha de quantificar os ácidos somente das 4 últimas se deu pelo fato de que a partir da 4^o geração todos os experimentos produziram gás em alguma geração.

5.2.3. Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis

Foram quantificados os ácidos graxos voláteis butírico, láctico, acético, propiônico, succínico e fórmico.

Na Tabela 10, estão representadas as equações da reta das curvas analíticas dos seis padrões acima citados e seus valores de R^2 .

Tabela 10 Dados das curvas analíticas.

Padrão	Equação da Reta	R^2
Ácido Fórmico	$y = 20282x - 310,75$	0,996
Ácido Láctico	$y = 10686x - 224,25$	0,996
Ácido Acético	$y = 13318x - 321,2$	0,996
Ácido Succínico	$y = 16441x - 291,76$	0,996
Ácido Propiônico	$y = 8093,9x - 102,21$	0,999
Ácido Butírico	$y = 11184x - 245,01$	0,996

Fonte: autoria própria.

Os valores de R^2 são todos superiores a 0,996, o que demonstra a validade das curvas. Utilizando as equações da reta de cada curva é possível determinar a concentração (g/L) de cada um dos ácidos, em que x é a concentração e y a área obtida no cromatograma.

Na Tabela 11 temos a quantidade de cada ácido encontrado nos meios antes da fermentação.

Tabela 11 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE para os meios antes da fermentação.

Amostras	Ác. Fórmico [] g/L	Ác. Láctico [] g/L	Ác. Acético [] g/L	Ác. Propiônico [] g/L	Total AGVs [] g/L
SH	0,66	6,25	0,80	0,00	7,93
SN	0,52	5,45	0,95	0,00	6,91
SNS	0,77	5,88	0,93	4,69	12,27
SHS	0,70	4,88	0,79	4,40	10,77

Fonte: autoria própria.

Em nenhum dos quatro meios foi encontrado ácido butírico e succínico, para os meios suplementados foram quantificados os ácidos fórmico, láctico, acético e propiônico, nos soros hidrolisado e não hidrolisado foram quantificados os ácidos fórmico, láctico e acético.

O ácido em maior concentração foi o láctico com valores em g/L de 6,25, 5,88, 5,45 e 4,88 para os meios SH, SNS, SN e SHS, respectivamente. A principal diferença de quantificação foi para o ácido propiônico, que estava presente apenas nos meios suplementados com um valor próximo de 4,5 g/L.

Os valores encontrados dos ácidos após a fermentação estão representados nas Tabelas 12 a 16. Estes valores apresentados são descontando a quantidade já encontrada de cada ácido em cada meio. Os valores negativos apresentados representam a quantidade de ácido consumido e os valores positivos a quantidade produzida. Para os valores entre -0,10 e 0,10 g/L, foi considerado que não houve consumo e nem produção deste ácido, pois esta faixa representa 5% da área obtida com a menor concentração da curva analítica de cada ácido. O ácido succínico não foi obtido em nenhum dos experimentos.

Não houve produção de ácido fórmico em nenhum dos experimentos, somente consumo, no experimento SH6 também não teve consumo do ácido, os experimentos que tiveram maior consumo do ácido foram SH4 e SNS3, com média de 0,46 e 0,52 g/L respectivamente, cerca de 70% e 67% de consumo, como pode ser observado na tabela 12.

Tabela 12 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Fórmico após a fermentação.

Amostras	4º Geração [] g/L	5º Geração [] g/L	6º Geração [] g/L	7º Geração [] g/L
SH3	-0,17	-0,14	0,00	-0,25
SH4	-0,46	-0,47	-0,47	-0,45
SH6	0,00	0,00	0,00	0,00
SHS3	-0,13	-0,40	-0,38	-0,38
SHS4	0,00	-0,13	-0,15	-0,12
SN3	-0,52	-0,29	-0,26	-0,26
SN4	-0,30	-0,13	-0,12	0,00
SN6	0,00	0,00	-0,13	-0,13
SNS3	-0,54	-0,53	-0,51	-0,51
SNS4	-0,25	0,00	-0,19	-0,27

Fonte: autoria própria.

O ácido láctico foi consumido em todos os experimentos. O consórcio 4 foi o que teve as menores quantidade consumidas, nos meios SHS, SN e SNS com valores abaixo de 23%, e no meio SH teve um consumo médio de 2,68 g/L o que representa aproximadamente 43% da quantidade presente neste meio. O experimento SH6 teve um consumo médio de 6,25 g/L que representa 100% de redução, o SN6 teve um consumo que vario de 2,96 a 5,03 g/L, sem apresentar reprodutibilidade dos valores. O consórcio 3 apresentou consumo superior 44% em todos os experimentos, tendo um valor discrepante para a 4 geração do SHS3, enquanto que nas demais gerações este ácido teve um consumo de aproximadamente 96%. Para SNS3 seu consumo ficou em torno de 96%, enquanto que para o SH3 a média é de 48% aproximadamente. A suplementação resultou em um aumento na quantidade de ácido consumida para o consórcio 3, como pode ser observado na tabela 13

Tabela 13 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Lático após a fermentação.

Amostras	4º Geração [] g/L	5º Geração [] g/L	6º Geração [] g/L	7º Geração [] g/L
SH3	-3,01	-2,92	-2,76	-3,31
SH4	-2,79	-2,52	-2,67	-2,73
SH6	-6,25	-6,25	-6,25	-6,25
SHS3	-0,74	-4,68	-4,66	-4,66
SHS4	0,15	-0,48	-0,22	-0,18
SN3	-3,59	-3,96	-3,63	-3,23
SN4	-1,23	-0,82	-0,61	-0,67
SN6	-2,96	-4,59	-3,36	-5,03
SNS3	-5,64	-5,64	-5,64	-5,60
SNS4	-1,00	-0,61	-1,00	-0,22

Fonte: autoria própria.

Para o ácido acético, obteve-se tanto produção quanto consumo, a cepa pura apresentou comportamentos inversos nos meios testados enquanto no meio hidrolisado produziu uma média de 0,30 g/L no meio não hidrolisado consumiu uma média de 0,36 g/L, isso representa 37% da quantidade existente neste meio.

O consórcio 4, obteve produção nos meios SH, SHS e SNS, com média de 0,32 g/L no meio SH semelhante ao da cepa pura no mesmo meio, no meio SHS três gerações com média de 0,13 g/L e a 6º com um salto de 0,67 g/L, o meio SNS teve os melhores valores de produção exceto pela 5º geração em que teve um consumo de 0,22 g/L.

O consórcio 3 teve um consumo de 0,30 e 0,35 g/L no meio hidrolisado e no não hidrolisado respectivamente, sendo uma redução aproximada de 37%, já a suplementação deste meio resultou na produção de 2,80 g/L de ácido acético nos dois meios, isso sem levar em consideração a produção do SHS na 4 geração que foi de apenas 0,44 g/L, como pode ser observado na tabela 14.

Tabela 14 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Acético.

Amostras	4º Geração	5º Geração	6º Geração	7º Geração
	[] g/L	[] g/L	[] g/L	[] g/L
SH3	-0,26	-0,32	-0,36	-0,26
SH4	0,36	0,28	0,29	0,33
SH6	0,29	0,40	0,30	0,19
SHS3	0,44	3,20	2,77	2,49
SHS4	0,12	0,14	0,67	0,13
SN3	-0,25	-0,40	-0,41	-0,35
SN4	0,34	-0,14	-0,18	-0,18
SN6	-0,36	-0,52	-0,34	-0,33
SNS3	2,52	2,72	2,77	3,11
SNS4	0,80	-0,22	0,55	0,51

Fonte: autoria própria.

O ácido propiônico não foi produzido nos soros sem suplementação. Para os meios suplementados com consórcio 4 foi observado o consumo de 0,18 g/L nas 5º e 6º geração para o SHS o que representa menos que 4% de redução e um consumo maior para o SNS com valor médio das 4 gerações de 0,54 g/L que representa 11,5% de redução, são valor baixos de consumo, para o consórcio 3 o observado foi a produção de ácido propiônico com valores 0,59 g/L para SHS e 0,17 g/L para SNS, este último a média é com relação as 3 últimas gerações, pois a 4 geração teve um consumo de 0,30 g/L, como pode ser observado na tabela 15.

Tabela 15 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Propiônico após a fermentação.

Amostras	4º Geração	5º Geração	6º Geração	7º Geração
	[] g/L	[] g/L	[] g/L	[] g/L
SH3	0,00	0,00	0,00	0,00
SH4	0,00	0,00	0,00	0,00
SH6	0,00	0,00	0,00	0,00
SHS3	0,29	0,74	0,64	0,69
SHS4	0,00	-0,21	-0,16	0,00
SN3	0,00	0,00	0,00	0,00
SN4	0,00	0,00	0,00	0,00
SN6	0,00	0,00	0,00	0,00
SNS3	-0,30	0,18	0,17	0,16
SNS4	-0,65	-0,59	-0,44	-0,48

Fonte: autoria própria.

O ácido butírico foi produzindo em todos os experimentos. Os dois consórcios e a cepa pura demonstraram potencial de produção deste ácido, com destaque para o consórcio 3. A cepa pura (6) produziu em média cerca de 1,67 g/L para a 4^o e 5^o geração e 2,37 g/L nas gerações 6^o e 7^o no meio hidrolisado. No meio não hidrolisado teve uma variação maior nos resultados, sendo a menor de 1,77 g/L na 4^o geração e a maior de 3,38 g/L na 7^o geração, apesar da variação neste soro ser maior os valores de forma geral foram sempre maior no soro não hidrolisado que no hidrolisado, isso quando comparado geração a geração.

O consórcio 4 teve produção média de 1,37 g/L no soro hidrolisado valor este menor que o produzido pela cultura pura. Para o soro não hidrolisado a produção na 4^o geração foi de 1,65 g/L e na 5^o 0,33 g/L e por fim na duas últimas não houve produção, no soro hidrolisado suplementado não houve produção na 4^o e 7^o geração e valores de 0,49 e 1,18 g/L na 5^o e 6^o geração respectivamente, para o soro não hidrolisado suplementado correu oscilação nos resultados com valores próximos a 2,23 g/L para 4^o e 6^o gerações e valores de 0,36 e 0,87 g/L para a 5^o e 7^o geração respectivamente. O consórcio 4 apresentou problemas de manter produção constante ou ao menos próximas de uma geração para outra, exceto no soro hidrolisado, sendo inviável utiliza-lo com os demais soros.

O consórcio 3 apresentou bons resultados em todos os soros testados, sendo que no soro hidrolisado teve valor médio de 1,03 g/L, resultado menor que o consórcio 4 e a cepa pura (6), no soro hidrolisado suplementado teve média de 3,28 g/L desconsiderando o resultado de 4^o geração, este resultado superior ao consórcio 4 e aproximadamente 3x (três vezes) (218%) o valor obtido sem a suplementação, demonstrado que ao suplementar o soro para este consórcio pode-se obter maior produção de ácido butírico.

Para o soro não hidrolisado o valor médio foi de 2,60 g/L, este valor é maior que no soro hidrolisado para este mesmo consórcio em aproximadamente 2,5x (150%), assim podemos considerar que a etapa de hidrólise do soro prejudica a produção de ácido butírico para este consórcio, ao comparar este valor com a médio da cepa pura que foi 2,63, com variação dos resultados de uma geração a outra, podemos ver que são valores próximos, a diferença entre os dois é a variação entre os valores de uma geração para outra, enquanto os valores do consórcio 3 foram constantes, o da cepa pura apresentou valores mais altos e baixos entre as gerações.

Com o soro não hidrolisado suplementado o valor médio de produção foi 3,18 g/L, um ganho de aproximadamente 20% com relação a produção sem suplementação e

aproximadamente 3% inferior ao hidrolisado suplementado, com isso chegamos à conclusão de que a etapa de hidrólise não resulta em grande diferença de produção, que justifique sua utilização, mas que a suplementação resulta em maior quantidade de ácido butírico produzido.

Na Tabela 16 podemos ver os valores de produção de ácido butírico.

Tabela 16 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Butírico após a fermentação.

Amostras	4º Geração [] g/L	5º Geração [] g/L	6º Geração [] g/L	7º Geração [] g/L
SH3	1,02	0,98	0,90	1,23
SH4	1,61	0,99	1,33	1,55
SH6	1,61	1,73	2,31	2,44
SHS3	0,50	3,24	3,27	3,34
SHS4	0,00	0,49	1,18	0,00
SN3	2,55	2,73	2,73	2,39
SN4	1,65	0,33	0,00	0,00
SN6	1,77	3,05	2,41	3,38
SNS3	3,08	3,28	3,15	3,23
SNS4	2,16	0,36	2,31	0,87

Fonte: autoria própria.

Na Tabela 17 podemos ver os valores de produção de ácido butírico e da produção total de gás por geração.

Tabela 17 Valores encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações para o Ácido Butírico e a quantidade de gás produzido.

Amostras	4º Geração [] g/L	Volume de Gás (mL)	5º Geração [] g/L	Volume de Gás (mL)	6º Geração [] g/L	Volume de Gás (mL)	7º Geração [] g/L	Volume de Gás (mL)
SH3	1,02	4	0,98	5	0,90	4	1,23	4,5
SH4	1,61	19	0,99	9	1,33	14	1,55	16
SH6	1,61	28	1,73	33	2,31	32	2,44	30
SHS3	0,50	4	3,24	12	3,27	13	3,34	11
SHS4	0,00	5	0,49	2	1,18	14	0,00	3
SN3	2,55	10	2,73	12	2,73	12	2,39	8
SN4	1,65	17	0,33	1	0,00	1	0,00	1
SN6	1,77	10	3,05	23	2,41	19	3,38	28
SNS3	3,08	12	3,28	13	3,15	11	3,23	12
SNS4	2,16	24	0,36	1	2,31	28	0,87	4,5

Fonte: autoria própria.

Observando os dados da Tabela 17, pode-se perceber um padrão para todos os experimentos. Temos maiores valores de produção de ácido quanto maiores forem os valores de produção de gás. Observando cada um dos experimentos, como no SHS3 em que na 4º geração a produção de gás foi de 4 mL e a de ácido foi de 0,50 g/L, para este mesmo experimento na 7º geração a produção de gás foi 11 mL e a de ácido 3,34 g/L, este comportamento já não ocorre se comparar a produção entre os experimentos, como por exemplo a produção de ácido na 4º geração para SH4 e SH6 foi de 1,61 g/L já a produção de gás não foram iguais, os valores foram 19 e 28 mL respectivamente. Se calcular a razão entre a quantidade de ácido produzida pelo volume de gás serão encontrados valores aproximados entre as geração com alguns fora de tendência, como demonstrado na Tabela 18.

Tabela 18 Razão entre a produção de ácido butírico e volume total de gás produzido.

Amostras	4º	5º	6º	7º
	Geração [] g/L.mL	Geração [] g/L.mL	Geração [] g/L.mL	Geração [] g/L.mL
SH3	0,26	0,20	0,26	0,27
SH4	0,09	0,12	0,10	0,10
SH6	0,06	0,05	0,07	0,08
SHS3	0,13	0,27	0,25	0,30
SHS4	0,00	0,25	0,08	0,00
SN3	0,26	0,23	0,24	0,30
SN4	0,10	0,33	0,00	0,00
SN6	0,18	0,13	0,13	0,12
SNS3	0,26	0,26	0,29	0,27
SNS4	0,09	0,72	0,08	0,19

Fonte: autoria própria.

Além da produção individual dos ácidos cabe uma avaliação da produção total dos ácido, levando em consideração, produção e consumo e outra só da produção estes dados estão nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19 Valores totais encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações considerando consumo e produção.

Amostras	4º Geração	5º Geração	6º Geração	7º Geração
	[] g/L	[] g/L	[] g/L	[] g/L
SH3	-2,42	-2,40	-2,33	-2,59
SH4	-1,27	-1,72	-1,52	-1,30
SH6	-4,27	-4,21	-3,56	-3,72
SHS3	0,36	2,09	1,64	1,48
SHS4	0,24	-0,19	1,32	-0,25
SN3	-1,81	-1,92	-1,57	-1,45
SN4	0,46	-0,76	-0,91	-0,94
SN6	-1,46	-1,96	-1,41	-2,11
SNS3	-0,88	0,01	-0,06	0,39
SNS4	1,06	-0,96	1,23	0,40

Fonte: autoria própria.

Quando a relação de produção de AGVs leva em consideração todos os ácidos com seus resultados de consumo e produção, os resultados apontam que quase todos tiveram uma redução da quantidade total de ácido, isso pois a quantidade de ácido láctico em todos os meios era alta e em praticamente todos os experimentos este ácido foi consumido, com altas taxas de consumo. Dos ácidos produzidos as quantidades não foram proporcionais ao consumo, levando os resultados a valor negativo (consumo).

Tabela 20 Valores totais encontrados na análise de AGVs por CLAE nas 4 gerações considerando apenas produção.

Amostras	4º Geração	5º Geração	6º Geração	7º Geração
	[] g/L	[] g/L	[] g/L	[] g/L
SH3	1,02	0,98	0,90	1,23
SH4	1,98	1,27	1,62	1,88
SH6	1,90	2,13	2,62	2,63
SHS3	1,23	7,17	6,68	6,52
SHS4	0,27	0,63	1,85	0,13
SN3	2,55	2,73	2,73	2,39
SN4	1,99	0,33	0,00	0
SN6	1,77	3,05	2,41	3,38
SNS3	5,60	6,18	6,09	6,50
SNS4	2,96	0,36	2,86	1,38

Fonte: autoria própria.

Em termos de ácidos totais produzidos sem levar em consideração a quantidade de ácidos consumidos podemos destacar o consórcio 3 com produção de

aproximadamente 6,79 g/L para as 3 últimas geração do SHS e de 6,09 g/L nas 4 gerações do SNS estes valores são praticamente o dobro do melhor resultado dos demais.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos na primeira etapa deste estudo, observa-se que o uso do soro de leite como substrato tem potencial para produção de ácido butírico. Com relação as diferenças entre o soro não hidrolisado e hidrolisado apenas os consórcios 1 e 4, obtiveram valores maiores no hidrolisado que no não hidrolisado. Para os demais, a etapa de hidrólise do soro se mostrou desnecessária uma vez que a produção com o soro não hidrolisado foi maior. Entre todos os consórcios, o 1 mostrou-se com produção de AGVs muito abaixo em relação aos demais. Foram considerados como experimentos promissores os que obtiveram valores maiores que 1 g/L de ácido butírico, que foram os consórcios 3 e 4, e os experimentos SN2 e SN6. Destes o consórcio 4 é o com maior valor de produção em ambos os meios.

A primeira etapa do estudo já demonstra que podemos obter novos consórcios capazes de promover a biodigestão anaeróbia, e produção de substâncias de interesse, como o Ácido Butírico a partir do soro de leite, assim foi selecionado os consórcios 3 e 4 para dar continuidade ao estudo, verificado o efeito da suplementação dos soros hidrolisado e não hidrolisado, também foi dado continuidade no estudo com a cepa pura sem utiliza-la nos meios suplementados.

Nesta segunda etapa foram acompanhados a produção de AGVs de 4 gerações. Dos seis ácidos avaliados somente o succínico não foi encontrado nem antes e nem depois da fermentação, o ácido fórmico não foi produzido por nenhum dos dois consórcios em nenhum dos soros. O ácido láctico teve grande consumo para a cepa pura e o consórcio 3, com valores superiores a 44% chegando a 100% de consumo, já o consórcio 4 só teve consumo significativo no meio hidrolisado com valor de 43%, nos demais soros foi inferior a 23%. Para o ácido acético tivemos tanto produção quanto consumo, mas destacamos a produção encontrada para o consórcio 3 nos meios suplementados com uma valor de 2,80 g/L, se for de interesse a produção de ácido acético o consórcio 3 pode ser utilizado juntamente com a suplementação do soro sem passar por processo de hidrólise, isso devido ao fato de a diferença de produção entre os dois não justifica mais uma etapa. Com o ácido propiônico nos soros sem suplementação não ocorreu produção, já nos suplementados foi produzido pelo consórcio 3 valores de 0,59 g/L para SHS e 0,17 g/L para SNS. Na quantificação do ácido butírico foi verificado que a produção em todos os experimentos, demonstrando que os dois consórcios podem ser utilizados para a produção

deste ácido, no caso do consórcio 4 o melhor resultado (2,23 g/L) foi com o SNS porém este resultado não foi constante, já no SH foi obtido um valor aproximado de 1,37 de maneira mais constante. O melhor valor alcançado foi com o consórcio 3 com produção em todos os soros, no SH foi de 1,03 g/L, SHS foi 3,28 g/L, SN foi 2,60 e SNS 3,18 g/L, com estes resultados podemos chegar à conclusão de que a suplementação gera maiores valores de ácido butírico, e quanto ao uso do soro hidrolisado ou não hidrolisado, fica claro que o não hidrolisado tem resultados maiores, entretanto a diferença (3%) entre os dois não justifica acrescentar ao processo de hidrólise.

Por fim o consórcio 3 na condição de soro não hidrolisado e suplemento foi o experimento com o melhor resultado.

Com base nestes resultados de produção de AGVs, são necessário novos estudos para investigar os perfis e quantidade de produção de ácidos graxos voláteis mais especificamente o ácido butírico, utilizando soro de leite.

REFERÊNCIAS

- ÅKERBERG, C. et al. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.682-690, 25 jun. 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051232>.
- ALMEIDA, Edna dos Santos. **Tratamento do Efluente da Indústria de queijos por processos biológicos e químicos**. 2004. 83f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- ALVES, Renner Librelato Domingos. **Projeto da rede de captação logística do soro de queijo produzido no Estado de Minas Gerais**. 2005. 33 f. Monografia (Conclusão do curso de Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 18. ed. Washington: American Public Health Association, 1992.
- AWAD, Hassan M. et al. Efficient Production Process for Food Grade Acetic Acid by *Acetobacter acetii* in Shake Flask and in Bioreactor Cultures. **E-journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.2275-2286, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/965432>.
- BALCH, W. E.; WOLFE, R. S. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-Mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere.. **Applied and Environmental Microbiology**, Illinois, v. 32, n. 6, p.781-791, 8 jun. 1976.
- BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A.. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 47, n. 4, p.441-446, 14 abr. 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530050953>.
- BENGTSSON, Simon et al. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.492-499, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2008.02.004>.
- BLANK-PORAT, Diana et al. The anticancer prodrugs of butyric acid AN-7 and AN-9, possess antiangiogenic properties. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 256, n. 1, p.39-48, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2007.05.011>.
- BOUGRIER, C. et al. Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. **Chemical Engineering And Processing: Process Intensification**, [s.l.], v. 45, n. 8, p.711-718, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2006.02.005>.

BRENNER, Katie; YOU, Lingchong; ARNOLD, Frances H.. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 9, p.483-489, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>.

BURMOLLE, M. et al. Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 72, n. 6, p.3916-3923, 1 jun. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03022-05>.

CERQUEIRA, Maristela Barnes Rodrigues et al. Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.156-159, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000100029>.

CESARO, Alessandra; BELGIORNO, Vincenzo. Sonolysis and ozonation as pretreatment for anaerobic digestion of solid organic waste. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.931-936, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.10.017>.

CHEN, Zi-xing; BREITMAN, Theodore R.. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. **Cancer Research**, [s.l.], v. 54, n. 13, p.3494-3499, 1 jul. 1994.

CHENG, Ke-ke et al. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.302-318, 29 fev. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.1327>.

CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. **Reatores Anaeróbios: Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. vol. 5. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.

CHERYAN, M.. Acetic Acid Production. **Encyclopedia Of Microbiology**, [s.l.], p.144-149, 2009. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00128-0>.

CHOI, Jin-dal-rae; CHANG, Ho Nam; HAN, Jong-in. Performance of microbial fuel cell with volatile fatty acids from food wastes. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.705-714, 24 dez. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-010-0507-2>

COSTA, Antonio Wilson Macedo de Carvalho. **Aproveitamento dos rejeitos da agroindústria de leite no município de nossa senhora da glória/semi-árido de Sergipe: caracterização e perspectivas de desenvolvimento sustentável**. 2005. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento e Meio Ambiente, Núcleo de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2005.

COSTA, Ricardo Calvo. **Obtenção de lactose a partir de permeado de soro de queijo e permeado de leite**. 1995. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

DATTA, Rathin; HENRY, Michael. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, [s.l.], v. 81, n. 7, p.1119-1129, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.1486>.

DELHOMME, Clara; WEUSTER-BOTZ, Dirk; KÜHN, Fritz E.. Succinic acid from renewable resources as a C4building-block chemical—a review of the catalytic possibilities in aqueous media. **Green Chem.**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.13-26, 2009. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b810684c>.

DEVLIN, D. C. et al. The effect of acid pretreatment on the anaerobic digestion and dewatering of waste activated sludge. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 5, p.4076-4082, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.043>.

DISSANAYAKE, M. et al. Denaturation of whey proteins as a function of heat, pH and protein concentration. **International Dairy Journal**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.93-99, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.02.002>.

DOĞAN, İlgin; SANIN, F. Dilek. Alkaline solubilization and microwave irradiation as a combined sludge disintegration and minimization method. **Water Research**, [s.l.], v. 43, n. 8, p.2139-2148, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.023>.

ELBESHISHY, Elsayed et al. Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 36, n. 17, p.11379-11387, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02.067>.

EMBRAPA. **Indicadores:** Leite e Derivados. Embrapa Gado de Leite Ano 9, n. 77, Juiz de Fora, Abril 2018.

ERICKSON, Brent; NELSON; WINTERS, Paul. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.176-185, 20 set. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201100069>.

ESKICIOGLU, Cigdem et al. Synergetic pretreatment of sewage sludge by microwave irradiation in presence of H2O2 for enhanced anaerobic digestion. **Water Research**, [s.l.], v. 42, n. 18, p.4674-4682, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.010>.

FDEZ.-GÜELFO, L. A. et al. The use of thermochemical and biological pretreatments to enhance organic matter hydrolysis and solubilization from organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 168, n. 1, p.249-254, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2010.12.074>.

FERREIRA, C. L. de L. F. Relevância da utilização de soro e leiteiro na indústria de laticínios. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, n 11, p. 39-40, set./out. 1997.

FERNÁNDEZ-MORALES, F.j.; VILLASEÑOR, J.; INFANTES, D.. Modeling and monitoring of the acclimatization of conventional activated sludge to a biohydrogen producing culture by biokinetic control. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 35, n. 20, p.10927-10933, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.07.054>.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; HAANDEI, A. V.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P. F. F. **Fundamentos do Tratamento Anaeróbio**. In: CAMPOS, J. R. (Coord.). Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo. 1. ed. Rio de Janeiro: RiMa Artes e Textos, p. 29-52, 1999.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, New York, v.20, p.2-12, Feb. 1985.

HAMER, H. M. et al. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.104-119, 26 out. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x>.

HILL, A.r.; IRVINE, D.m.; BULLOCK, D.h.. Precipitation and Recovery of Whey Proteins: A Review. **Canadian Institute Of Food Science And Technology Journal**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.155-160, jan. 1982. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0315-5463\(82\)72529-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0315-5463(82)72529-5).

HIMMI, E. H. et al. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 53, n. 4, p.435-440, 12 abr. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051638>.

HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed. London: Blackide Academic & Professional, 1997. 719 p.

HONG, S. H.; LEE, S. Y. Importance of redox balance on the production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 58, n. 3, p.286-290, 1 mar. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-001-0899-y>.

HUANG, Yu Liang et al. Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 82, n. 1, p.51-59, mar. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00151-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00151-1).

IBRAHIM, Salam A.. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.. **Reference Module In Food Science**, [s.l.], p.1-7, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00857-x>.

JANG, Yu-sin et al. Bio-based production of C2-C6 platform chemicals. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 109, n. 10, p.2437-2459, 13 jul. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.24599>.

KIM, Dong-hoon et al. Combined (alkaline+ultrasonic) pretreatment effect on sewage sludge disintegration. **Water Research**, [s.l.], v. 44, n. 10, p.3093-3100, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.032>.

KIM, Jeongsik et al. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 95, n. 3, p.271-275, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723\(03\)80028-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723(03)80028-2).

KIM, Jun Seok et al. Acetic Acid Production Using Xylose and Corn Steep Liquor by thermoaceticum Strain. **Journal Of Industrial And Engineering Chemistry**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.519-523, 8 nov. 2002.

KONDO, Tetsuya; KONDO, Masao. Efficient production of acetic acid from glucose in a mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Acetobacter* sp. **Journal Of Fermentation And Bioengineering**, [s.l.], v. 81, n. 1, p.42-46, jan. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338x\(96\)83118-7](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338x(96)83118-7).

KOŚMIDER, Alicja et al. Propionic Acid Production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* Using Crude Glycerol and Whey Lactose Industrial Wastes. **Polish Journal Of Environmental Studies**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.1249-1253, 1 jun. 2010.

LAPARA, T. M. et al. Functional and Structural Adaptations of Bacterial Communities Growing on Particulate Substrates under Stringent Nutrient Limitation. **Microbial Ecology**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.317-326, 1 dez. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-002-1046-8>.

LEE, Sun-mi et al. Continuous Butanol Production Using Suspended and Immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with Supplementary Butyrate. **Energy & Fuels**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.3459-3464, 17 set. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ef800076j>.

LEE, Wee Shen et al. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 235, p.83-99, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.002>.

LEINDECKER, Gisele Cristina. **Separação das proteínas do soro do leite in natura por ultrafiltração**. 2011. 48 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LEITE, José Alberto Corrêa. **Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fixo e extração em resina de troca iônica e com solvente orgânico**. 2005. 127 f. Tese (Doutorado) - Curso de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

LOPEZ, Jorge A. Pena; SOMIARI, Ibubeleye; MANOUSIOUTHAKIS, Vasilios I.. Hydrogen/formic acid production from natural gas with zero carbon dioxide emissions. **Journal Of Natural Gas Science And Engineering**, [s.l.], v. 49, p.84-93, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jngse.2017.11.003>.

LU, Y. et al. Impact of operating history on mixed culture fermentation microbial ecology and product mixture. **Water Science And Technology**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.760-765, ago. 2011. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2011.699>.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 12. ed. São Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2009.

MASSÉ, D. I.; DROSTE, R. L. Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor. **Water Research**, [s.l.], v. 34, n. 12, p.3087-3106, 15 ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354\(00\)00064-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354(00)00064-6).

MENGMENG, Cai et al. Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 3, p.1399-1405, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.014>.

MESQUITA, Patrícia da Luz et al. Validação de método de cromatografia líquida para a determinação de sete ácidos graxos voláteis intermediários da digestão anaeróbia. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.295-302, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522013000400001>.

MILLER, G. L.. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.426-428, mar. 1959. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>.

MOHAN, S. Venkata; BABU, V. Lalit; SARMA, P.n.. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 41, n. 4, p.506-515, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.04.007>.

MORESI, M. Cost/benefit analysis of yeast autolysate production from cheese whey. **Italian Journal of Food Science**, v.6, p. 357-370, 1994.

MOTTE, Jean-charles et al. Combination of dry dark fermentation and mechanical pretreatment for lignocellulosic deconstruction: An innovative strategy for biofuels and volatile fatty acids recovery. **Applied Energy**, [s.l.], v. 147, p.67-73, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.02.042>.

MURALI, Nanditha; FERNANDEZ, Sebastian; AHRING, Birgitte Kiaer. Fermentation of wet-exploded corn stover for the production of volatile fatty acids. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 227, p.197-204, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.012>.

MURARI, Cleidiane Samara et al. Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *kluveromyces marxianus* 229. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [s.l.], v. 68, n. 393, p.42-50, 2013. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2238-6416.20130034>.

MURARI, Cleidiane Samara et al. Emprego do soro de leite bovino e bubalino para produção de biomassa pela levedura *kluveromyces marxianus* 229. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 51, fev./mar. 2011.

PANESAR, P et al. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 105, n. 1, p.1-14, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>.

PAVLOSTATHIS, S. G.; GIRALDO-GOMEZ, E.. Kinetics of Anaerobic Treatment. **Water Science And Technology**, [s.l.], v. 24, n. 8, p.35-59, out. 1991. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.1991.0217>.

PLESSAS, S. et al. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 13, p.5951-5955, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.039>.

PRAZERES, Ana R.; CARVALHO, Fátima; RIVAS, Javier. Cheese whey management: A review. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 110, p.48-68, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>.

PONSANO, Elisa Helena Giglio; PINTO, Marcos Franke; GOMEZ, Raul Jorge Hernan Castro. Cheese-whey - production, features and utilization: a review. **Semina: Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.92-96, 13 jan. 1992. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.1992v13n1p92>.

RAZAVI-ROHANI, S.m.; GRIFFITHS, M.w.. ANTIFUNGAL EFFECTS OF SORBIC ACID AND PROPIONIC ACID AT DIFFERENT pH AND NaCl CONDITIONS. **Journal Of Food Safety**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.109-120, ago. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4565.1999.tb00238.x>.

REBECCHI, Stefano et al. Volatile fatty acids recovery from the effluent of an acidogenic digestion process fed with grape pomace by adsorption on ion exchange resins. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 306, p.629-639, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.07.101>.

REMÓN, J. et al. Hydrogen production from cheese whey by catalytic steam reforming: Preliminary study using lactose as a model compound. **Energy Conversion And Management**, [s.l.], v. 114, p.122-141, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.02.009>.

REPHAELI, Ada; ZHUK, Regina; NUDELMAN, Abraham. Prodrugs of butyric acid from bench to bedside: Synthetic design, mechanisms of action, and clinical applications. **Drug Development Research**, [s.l.], v. 50, n. 3-4, p.379-391, 2000. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/1098-2299\(200007/08\)50:3/43.0.co;2-8](http://dx.doi.org/10.1002/1098-2299(200007/08)50:3/43.0.co;2-8).

RÉVILLION, Jean P.; BRANDELLI, Adriano; AYUB, Marco A.z.. Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 20, n. 2,

p.246-249, ago. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612000000200020>.

RICHARDS, N. S. P. S. Emprego racional do soro láctico. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 2, n. 9, p. 67-69, maio/jun. 1997.

RITTMANN, Bruce E.; MCCARTY, Perry L. **Environmental Biotechnology: principles and applications**. Nova Iorque: McGraw Hill. p. 768, 2001.

RODRÍGUEZ, Camino Fernández et al. Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero con producción de biogás e hidrógeno. Revisión bibliográfica. **Revista Investigación, Optimización y Nuevos Procesos En Ingeniería**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.47-62, 1 jun. 2016. Universidad Industrial de Santander. <http://dx.doi.org/10.18273/revion.v29n1-2016004>.

SALEHIZADEH, H.; VAN LOOSDRECHT, M.c.m.. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.261-279, jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.003>.

SANTOS, Maria João; TEIXEIRA, José A.; RODRIGUES, Lúcia R.. Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 879, n. 7-8, p.475-479, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.01.003>.

SAUER, Michael et al. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.100-108, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.11.006>.

SERAFINI, Luciana Atti; BARROS, Neiva Monteiro de; AZEVEDO, João Lúcio de. **Biociologia: avanços na agricultura e na agroindustrial**. Caxias do Sul: Educs, 2002. 433 p.

SHAHRIARI, Haleh et al. Anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste combining two pretreatment modalities, high temperature microwave and hydrogen peroxide. **Waste Management**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.41-52, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2011.08.012>.

SHEN, Dongsheng et al. Acidogenic fermentation characteristics of different types of protein-rich substrates in food waste to produce volatile fatty acids. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 227, p.125-132, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.048>.

SILVA, D. J. P., **Resíduos na Indústria de Laticínios**. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos, 20 f. Viçosa, Minas Gerais, 2011.

SINGHANIA, Reeta Rani et al. Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 145, p.166-174, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.137>.

SISO, A. S. **Estudo do processo de microencapsulação por “sprayer-drier” de bioaroma produzido por Propionibacterium freudenreichii**. 125 f. Tese (doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

GONZÁLEZ-SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.1-11, jul. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3).

SONG, Hyohak; LEE, Sang Yup. Production of succinic acid by bacterial fermentation. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.352-361, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.043>.

STEIL, Lara; JUNIOR, Jorge de Lucas; OLIVEIRA, Roberto Alves. Avaliação do uso de inóculo na digestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 146-159, maio, 2002.

STERLING, M. C. et al. Effects of ammonia nitrogen on H₂ and CH₄ production during anaerobic digestion of dairy cattle manure. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.9-18, mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00138-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00138-3).

TEDSREE, Karaked et al. Hydrogen production from formic acid decomposition at room temperature using a Ag–Pd core–shell nanocatalyst. **Nature Nanotechnology**, [s.l.], v. 6, n. 5, p.302-307, 10 abr. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.42>.

TIMOFIECSYK, Fabiana do Rocio; PAWLOWSKY, Urivald. MINIMIZAÇÃO DE RESÍDUOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: REVISÃO. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.221-236, 31 dez. 2000. Universidade Federal do Parana. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v18i2.1212>.

TORRES, M. López; LLORÉNS, Ma. del C. Espinosa. Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes. **Waste Management**, [s.l.], v. 28, n. 11, p.2229-2234, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2007.10.006>.

USDEC. U. S. Dairy Export Council. **Manual de referência para produtos de soro dos EUA**. Arlington, Estados Unidos, 1997.

UYAR, Basar et al. Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 34, n. 10, p.4517-4523, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.057>.

VALE, Marcos Martinez do et al. Mixture of formic and propionic acid as additives in broiler feeds. **Scientia Agrícola**, [s.l.], v. 61, n. 4, p.371-375, 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000400004>.

WARD, Alastair J. et al. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 17, p.7928-7940, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.044>.

WEILAND, Peter. Biogas production: current state and perspectives. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 85, n. 4, p.849-860, 24 set. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>.

XU, Guihua et al. Combination treatment of ultrasound and ozone for improving solubilization and anaerobic biodegradability of waste activated sludge. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 180, n. 1-3, p.340-346, 15 ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.04.036>.

YAN, Ning; PHILIPPOT, Karine. Transformation of CO₂ by using nanoscale metal catalysts: cases studies on the formation of formic acid and dimethylether. **Current Opinion In Chemical Engineering**, [s.l.], v. 20, p.86-92, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coche.2018.03.006>.

ZIGOVÁ, J; FTURDÍK, E. Advances in biotechnological production of butyric acid. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.153-160, mar. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.2900795>.

ZIGOVÁ, Jana et al. Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 34, n. 8, p.835-843, out. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592\(99\)00007-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592(99)00007-2).

APÊNDICES

APÊNDICE A: Metodologia para determinação do teor de lactose.

A determinação do teor de lactose (açúcares redutores) método ácido dinitrossalicílico - DNS (MILLER, 1959).

Soluções

Preparou-se a solução de DNS com 250 mg de ácido dinitrossalicílico, 50 mL de NaOH 2 M, 75 gramas de tartarato de sódio e potássio e 250 mL de água destilada.

A solução padrão para curva foi preparada pesando-se 250 mg de lactose para balão de 50 mL obtendo a concentração de 5 mg/mL.

Foram realizadas diluições desta solução para as concentrações de 4, 3, 2, 1 e 0,5 mg/mL.

As amostras foram centrifugadas (NOVA TECNICA/NT 800) a 10000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante, diluído 10 vezes.

Procedimento

Em tubos de ensaio foram adicionados 400 µL de padrão ou amostra a 4 mL de solução DNS. Também foi preparado um branco usando 400 µL de água destilada.

Aqueceu-se as misturas em banho-maria a 100° C por 10 min.

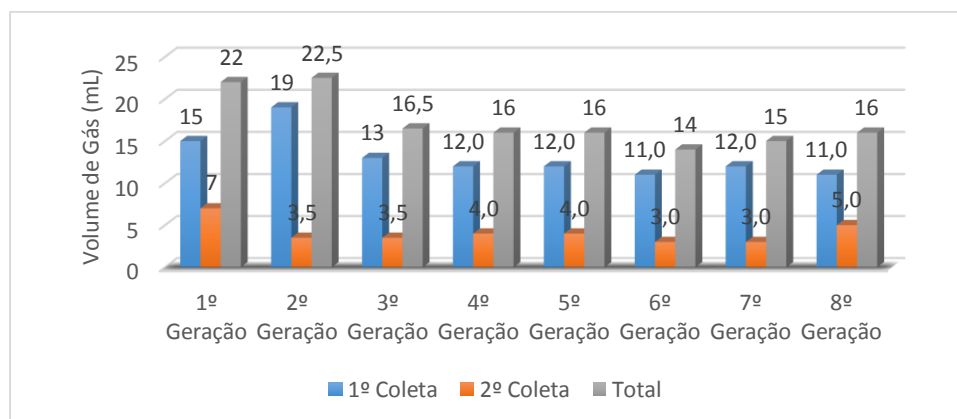
Esperou-se esfriar a mistura até 25 °C e então foram lidas as absorvâncias à 570 nm (MERCK/Pharo 100 Spectroquant®).

Com os valores de absorvância das soluções de padrão da curva obteve-se o intercepto e a inclinação da curva e assim pode-se calcular a quantidade de açúcares redutores na amostra.

Obs. A curva-padrão somente se aplica para leituras no aparelho em que foi estabelecida.

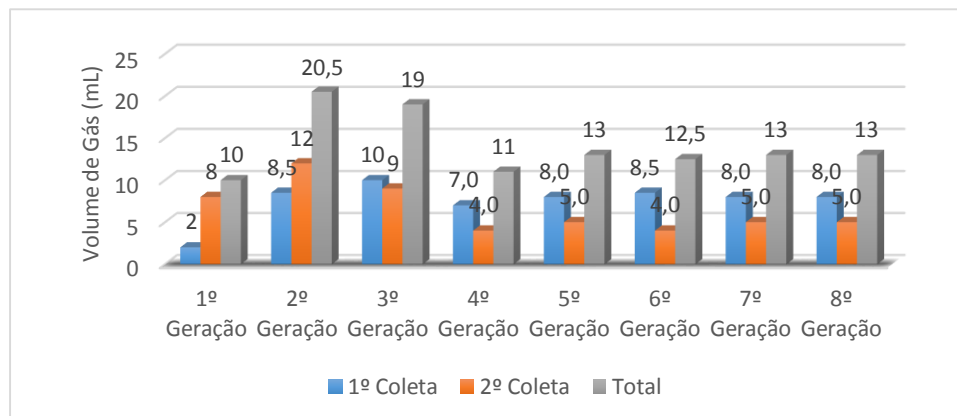
APÊNDICE B: Produção de gás e avaliação de adaptação da primeira etapa.

Figura B 1 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado consórcio 1 (SH1).



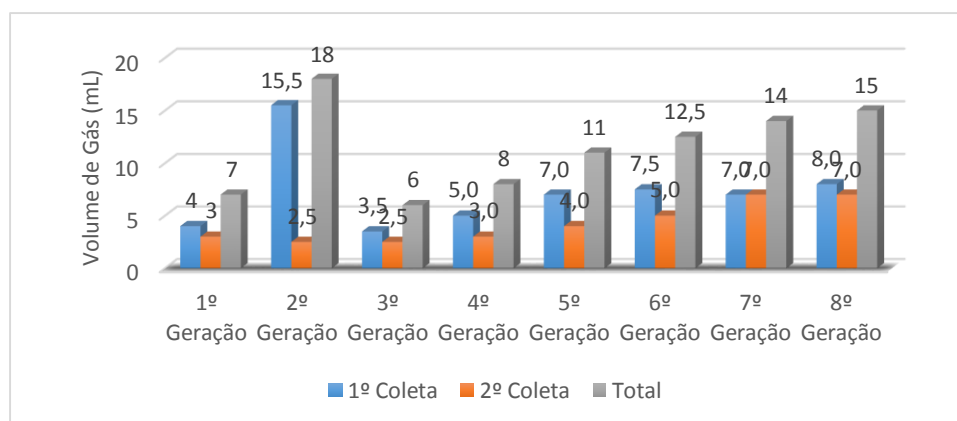
Fonte: autoria própria.

Figura B 2 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado consórcio 2 (SH2).



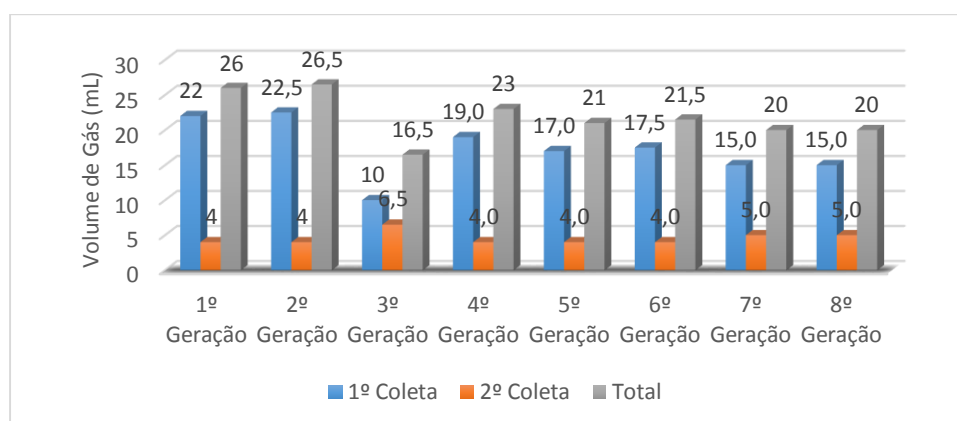
Fonte: autoria própria.

Figura B 3 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado consórcio 3 (SH3).



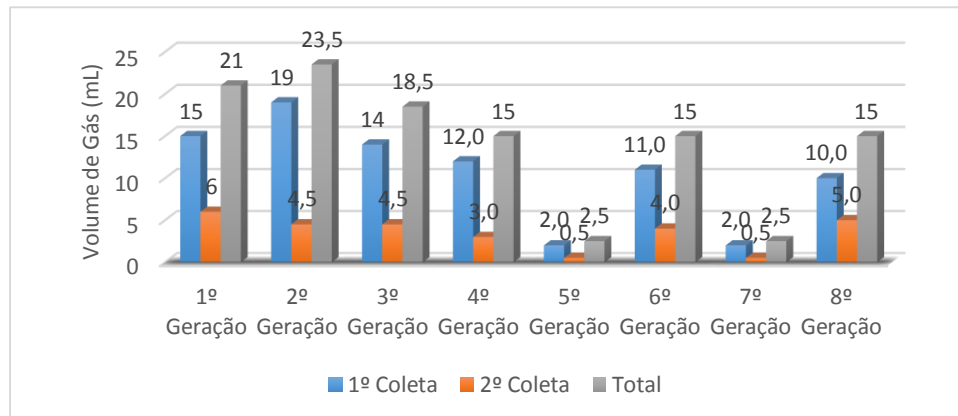
Fonte: autoria própria.

Figura B 4 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado consórcio 4 (SH4).



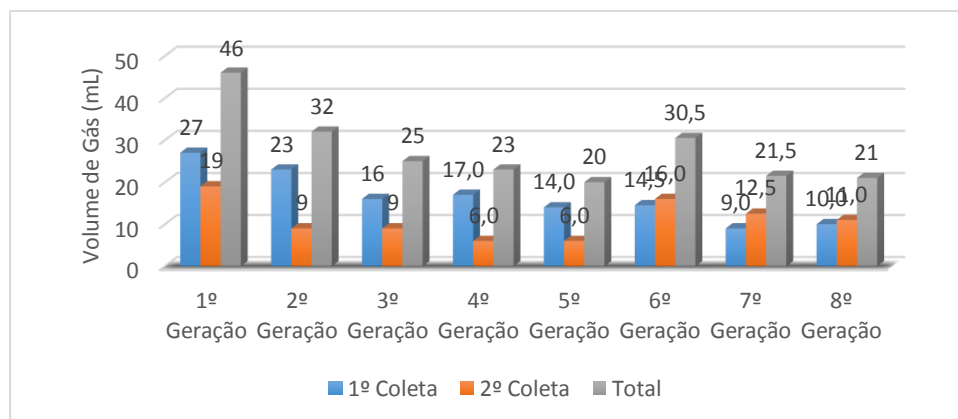
Fonte: autoria própria.

Figura B 5 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado consórcio 5 (SH5).



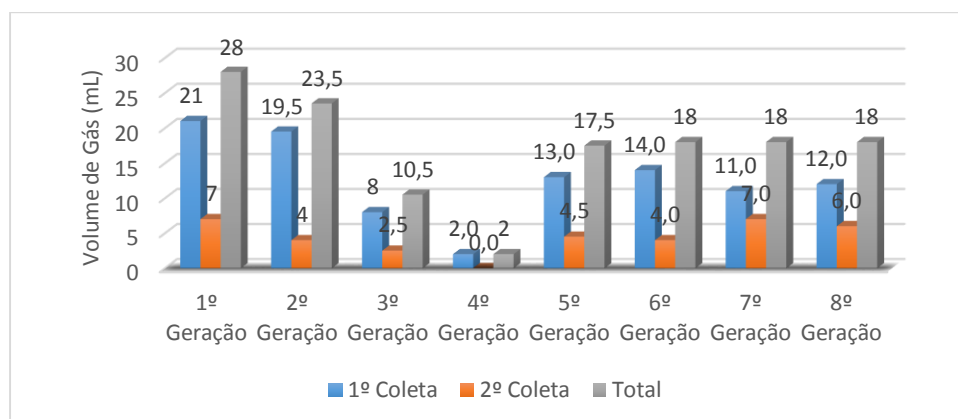
Fonte: autoria própria.

Figura B 6 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado cepa pura (SH6).



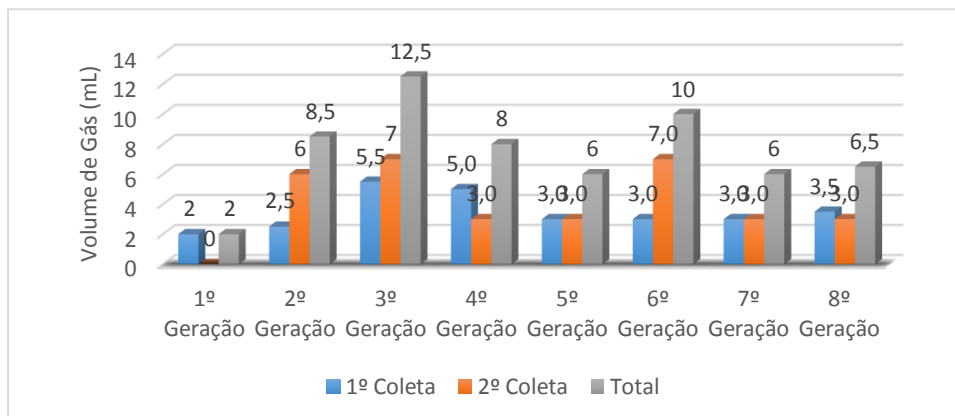
Fonte: autoria própria.

Figura B 7 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado consórcio 1 (SN1).



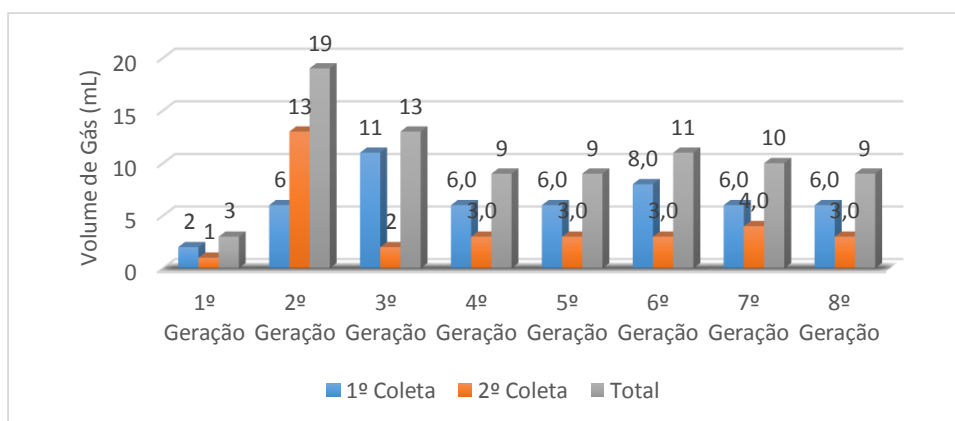
Fonte: autoria própria.

Figura B 8 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado consórcio 2 (SN2).



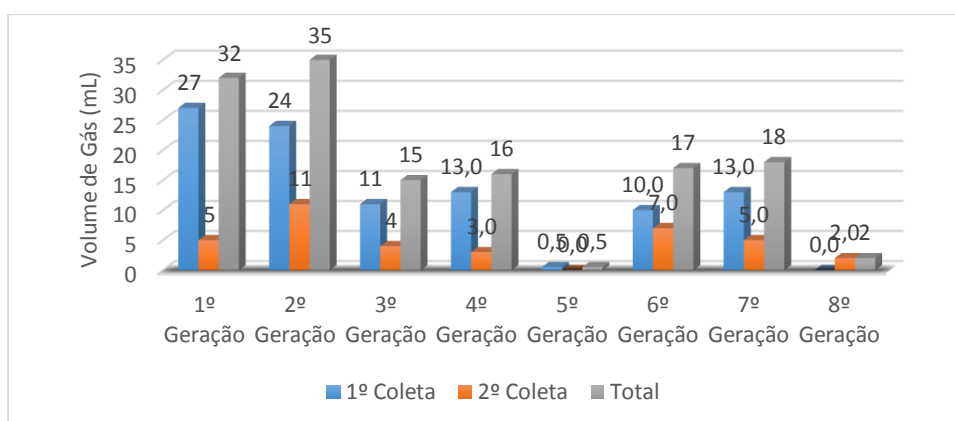
Fonte: autoria própria.

Figura B 9 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado consórcio 3 (SN3).



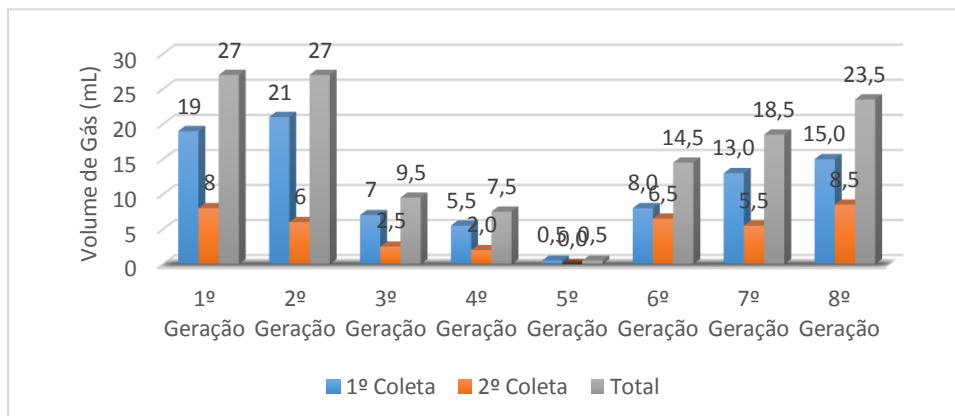
Fonte: autoria própria.

Figura B 10 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado consórcio 4 (SN4).



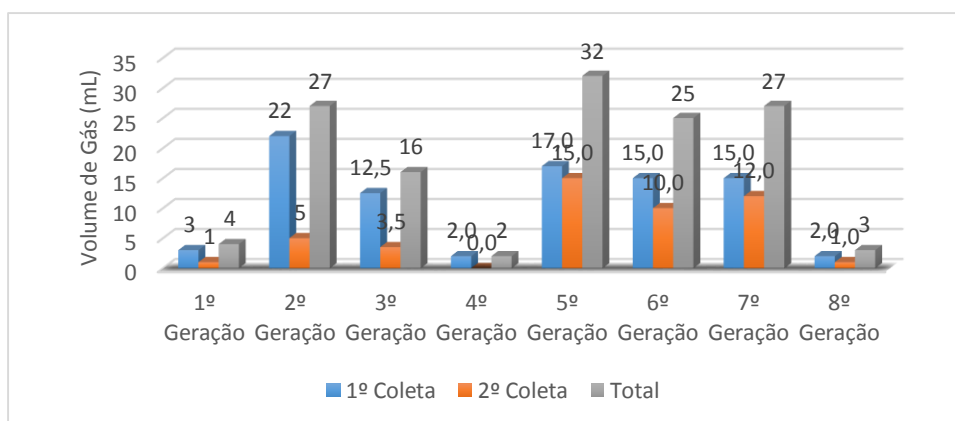
Fonte: autoria própria.

Figura B 11 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado consórcio 5 (SN5).



Fonte: autoria própria.

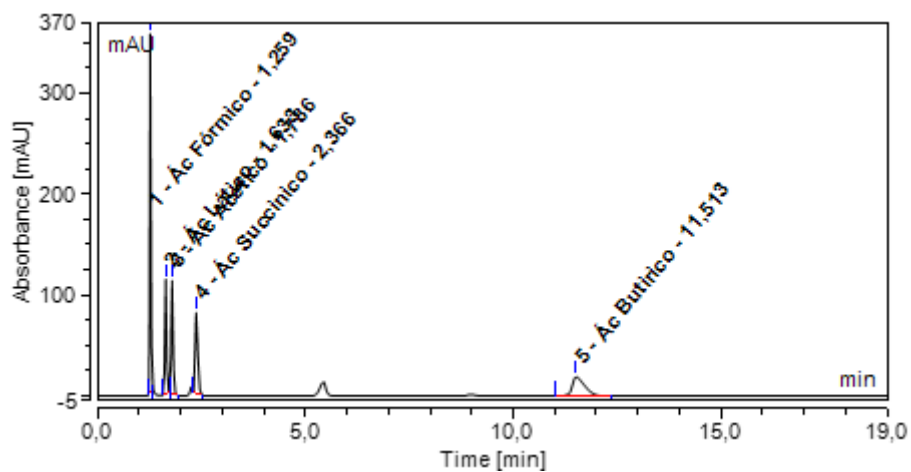
Figura B 12 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado cepa pura (SN6).



Fonte: autoria própria.

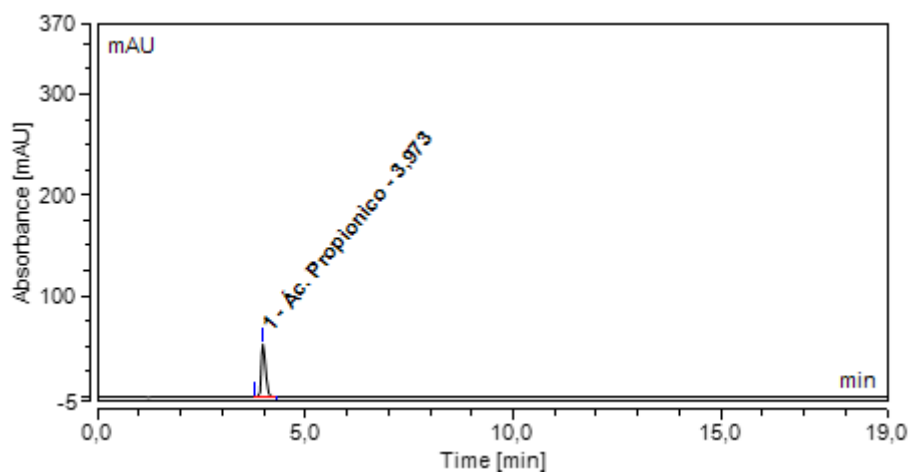
APÊNDICE C: Cromatogramas da análise de quantificação de AGVs da primeira etapa.

Figura C 1 Cromatograma dos padrões de ácidos graxos voláteis 1 g/L (Ác. Formico, Láctico, Acético, Succinico e Butírico)



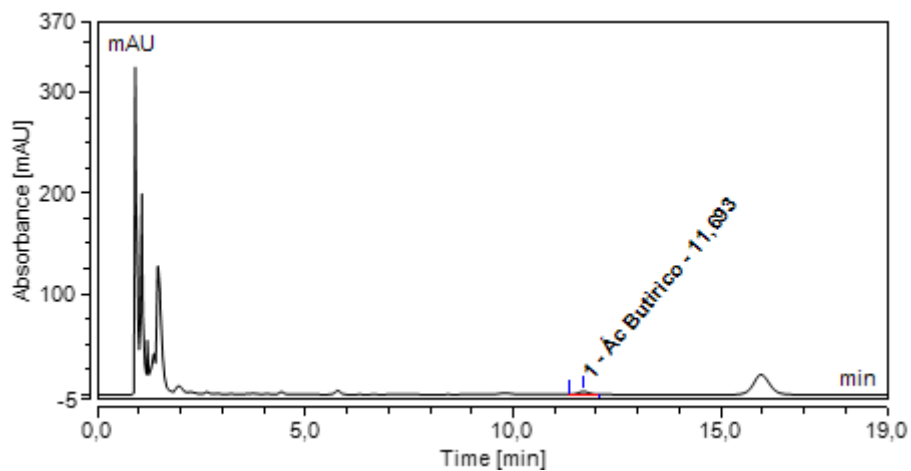
Fonte: autoria própria.

Figura C 2 Cromatograma do padrão de Ácido Propiônico 1 g/L



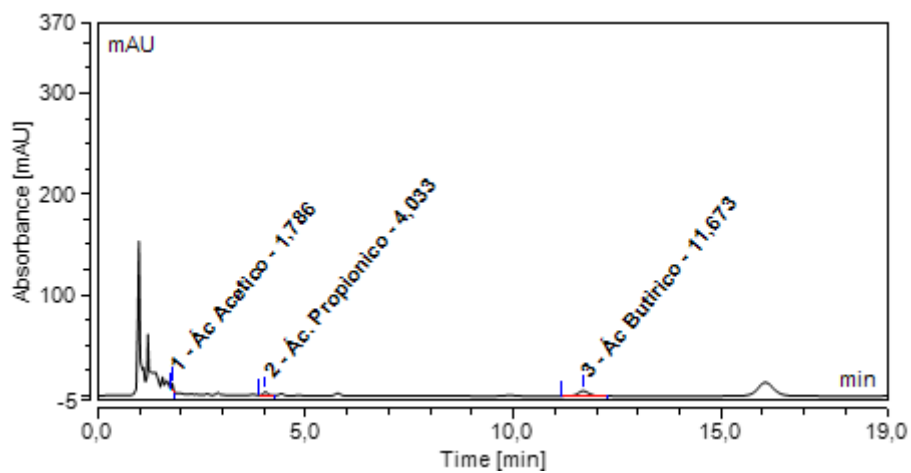
Fonte: autoria própria.

Figura C 3 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro hidrolisado consórcio 1 (SH1)



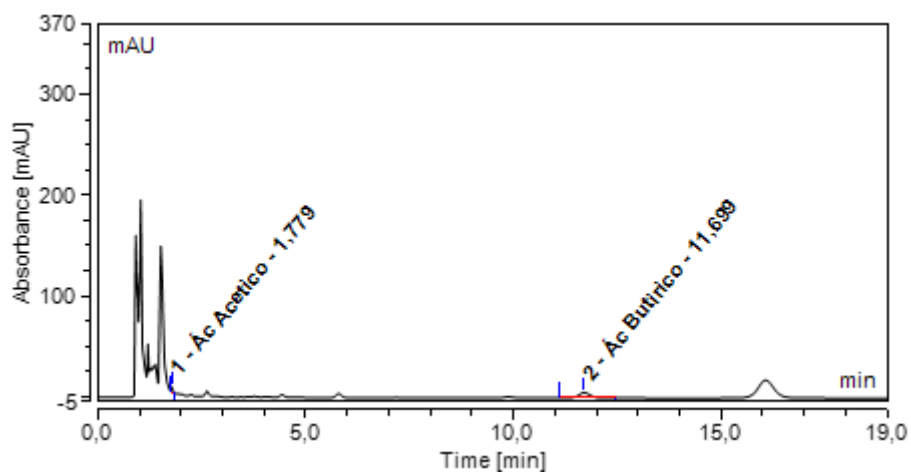
Fonte: autoria própria.

Figura C 4 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro hidrolisado consórcio 2 (SH2)



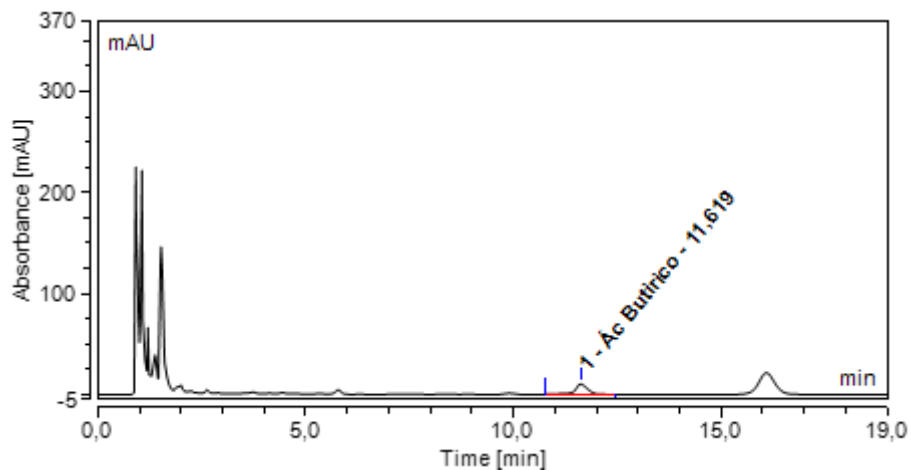
Fonte: autoria própria.

Figura C 5 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro hidrolisado consórcio 3 (SH3)



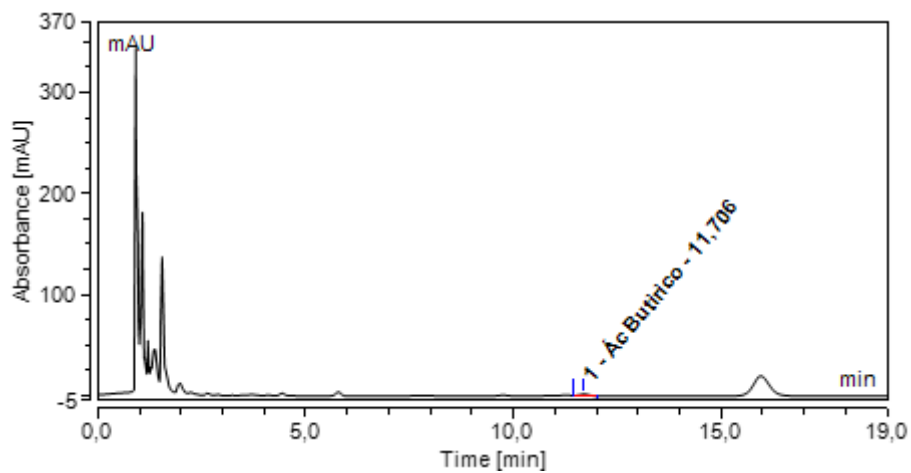
Fonte: autoria própria.

Figura C 6 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro hidrolisado consórcio 4 (SH4)



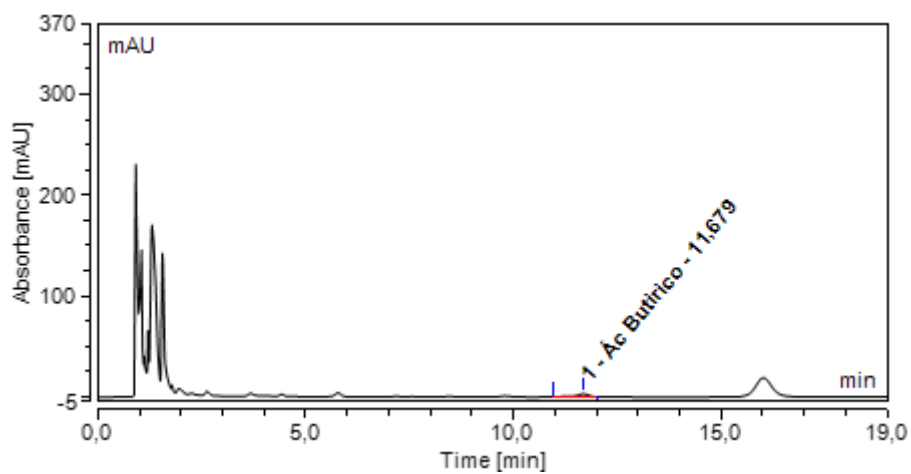
Fonte: autoria própria.

Figura C 7 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro hidrolisado consórcio 5 (SH5)



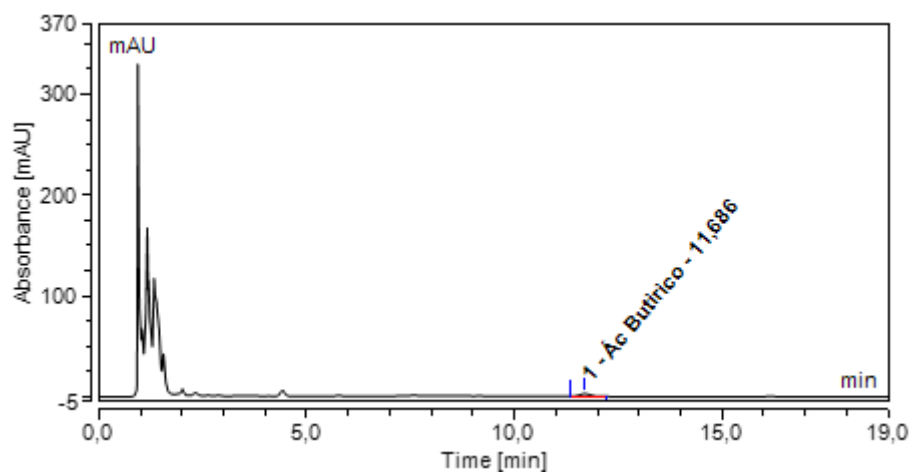
Fonte: autoria própria.

Figura C 8 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro hidrolisado cepa pura (SH6)



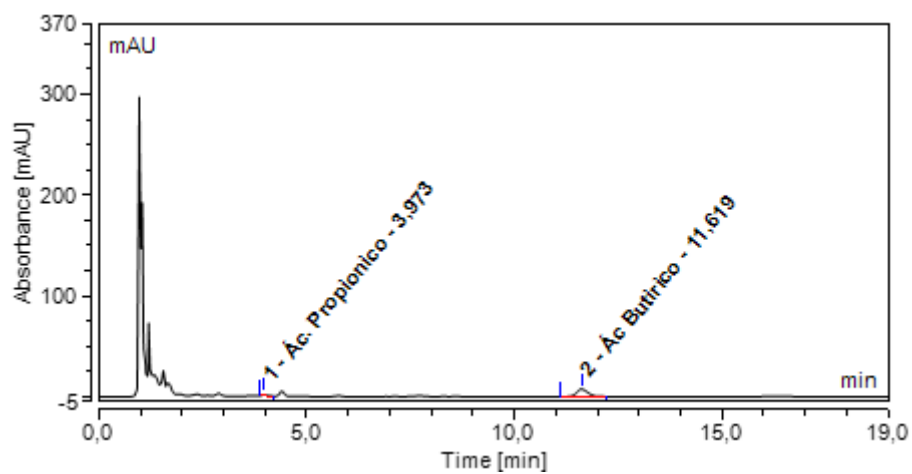
Fonte: autoria própria.

Figura C 9 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro não hidrolisado consórcio 1 (SN1)



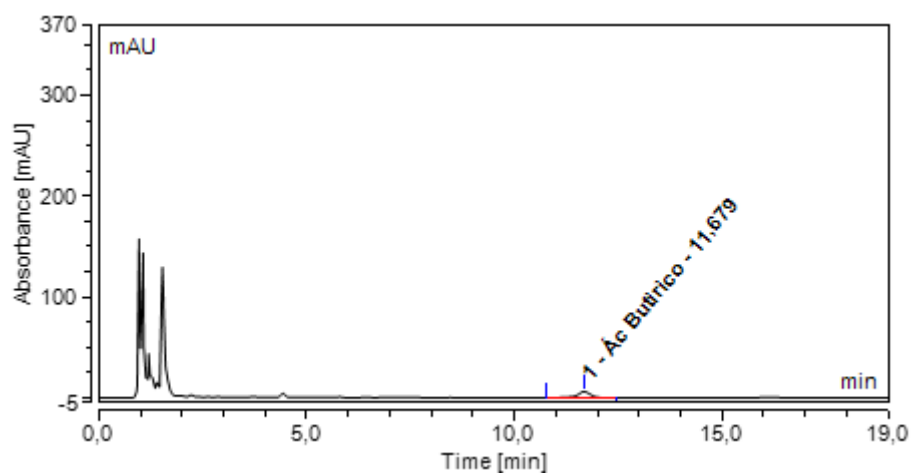
Fonte: autoria própria.

Figura C 10 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro não hidrolisado consórcio 2 (SN2)



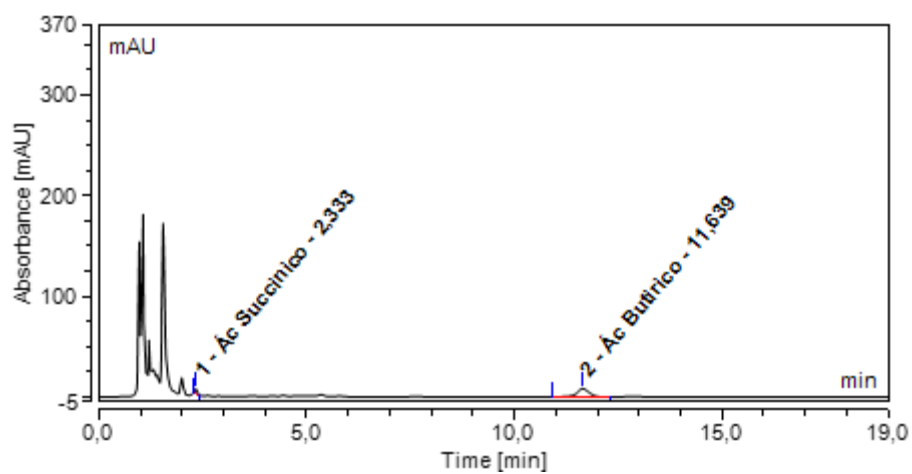
Fonte: autoria própria.

Figura C 11 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro não hidrolisado consórcio 3 (SN3)



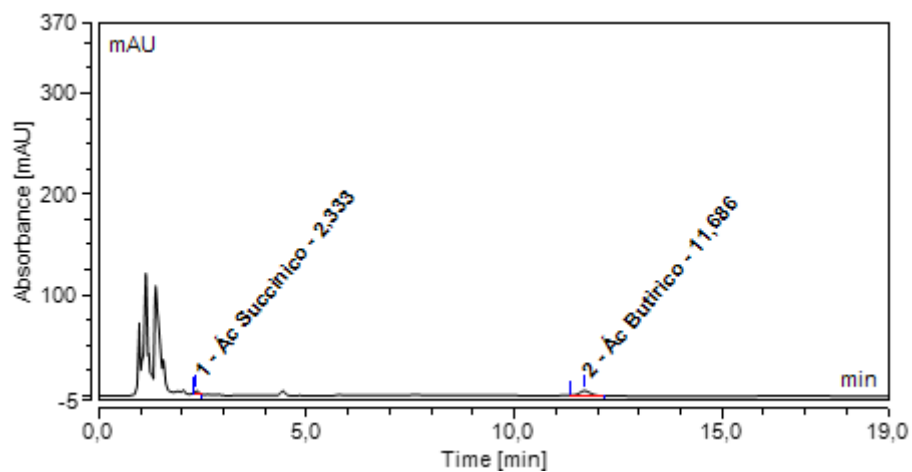
Fonte: autoria própria.

Figura C 12 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro não hidrolisado consórcio 4 (SN4)



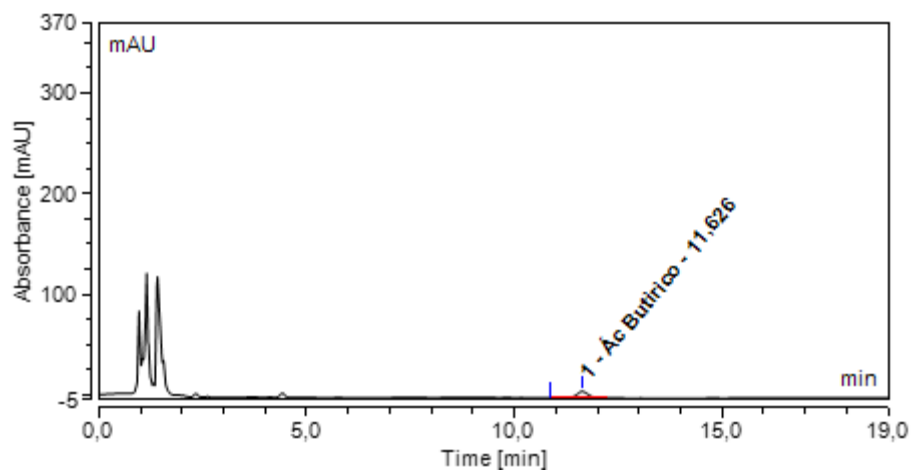
Fonte: autoria própria.

Figura C 13 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro não hidrolisado consórcio 5 (SN5)



Fonte: autoria própria.

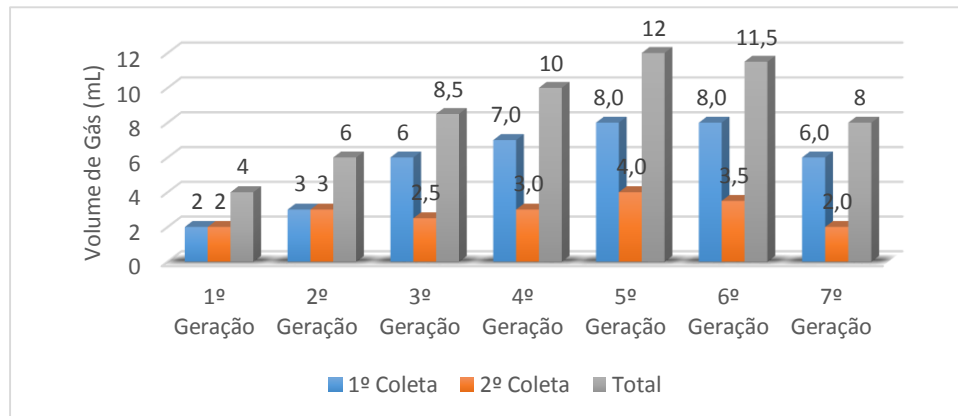
Figura C 14 Cromatograma dos ácidos graxos voláteis produzidos no soro não hidrolisado cepa pura (SN6)



Fonte: autoria própria.

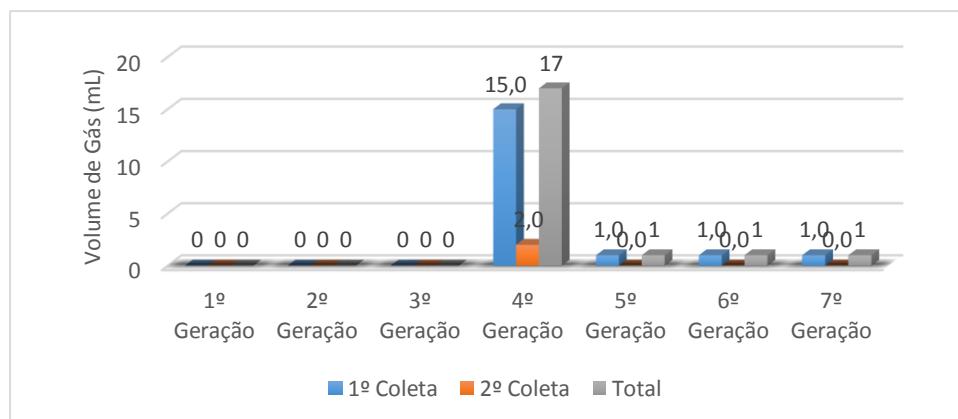
APÊNDICE D: Produção de gás e avaliação de adaptação da segunda etapa.

Figura D 1 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado consórcio 3 (SN3)



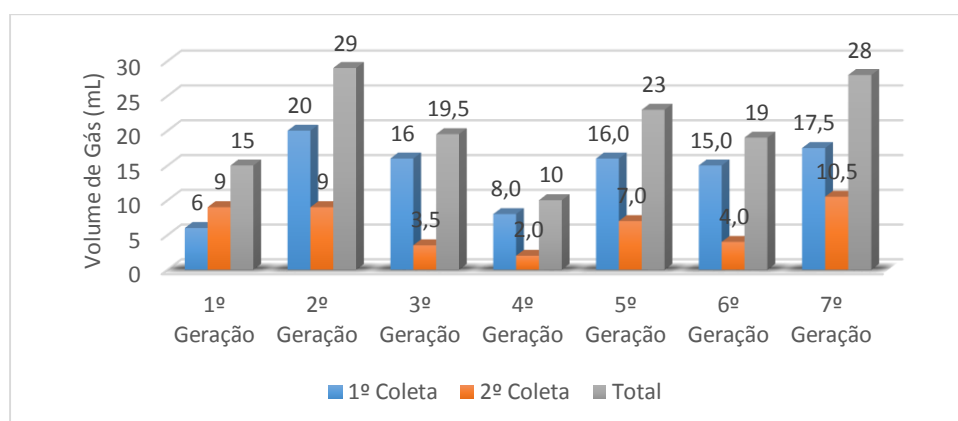
Fonte: autoria própria.

Figura D 2 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado consórcio 4 (SN4)



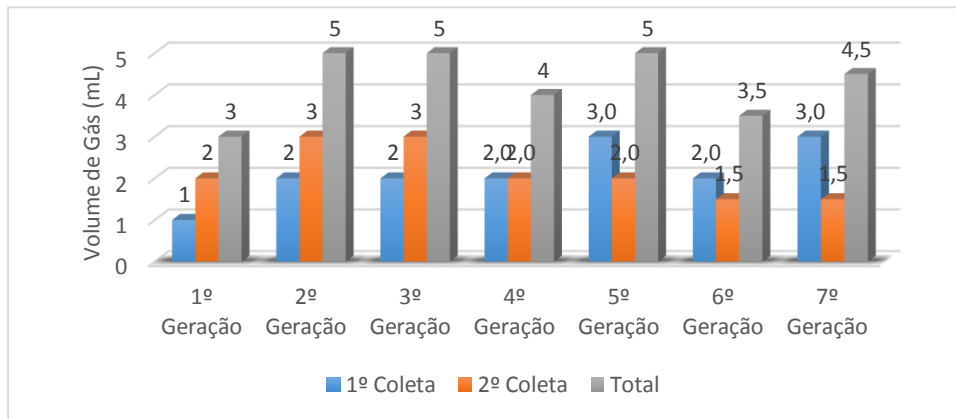
Fonte: autoria própria.

Figura D 3 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado cepa pura (SN6)



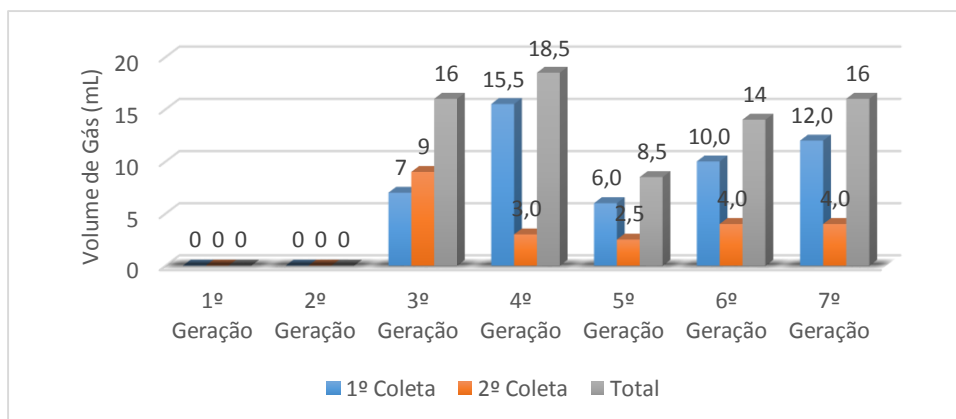
Fonte: autoria própria.

Figura D 4 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado consórcio 3 (SH3)



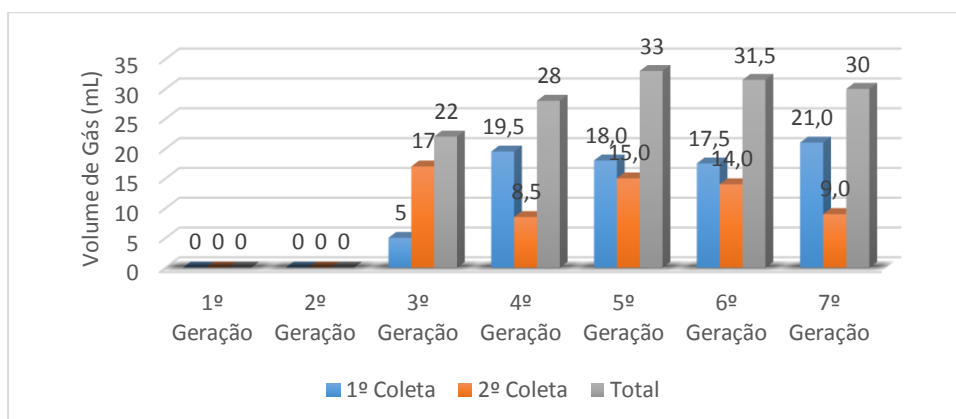
Fonte: autoria própria.

Figura D 5 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado consórcio 4 (SH4)



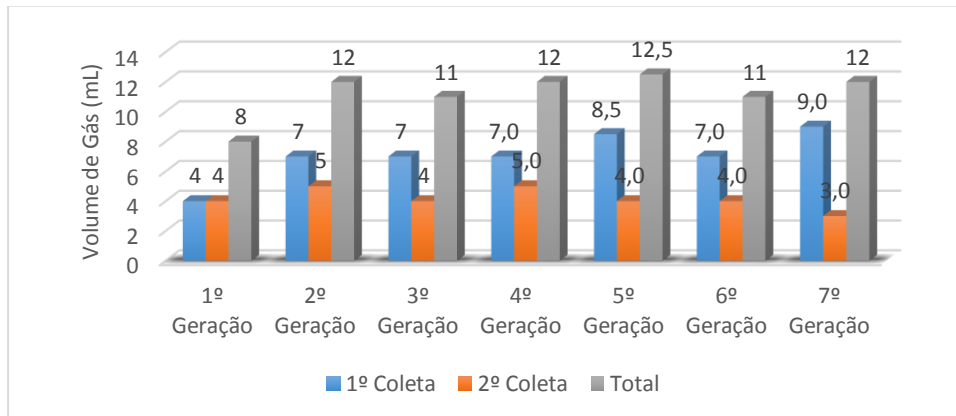
Fonte: autoria própria.

Figura D 6 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado cepa pura (SH6)



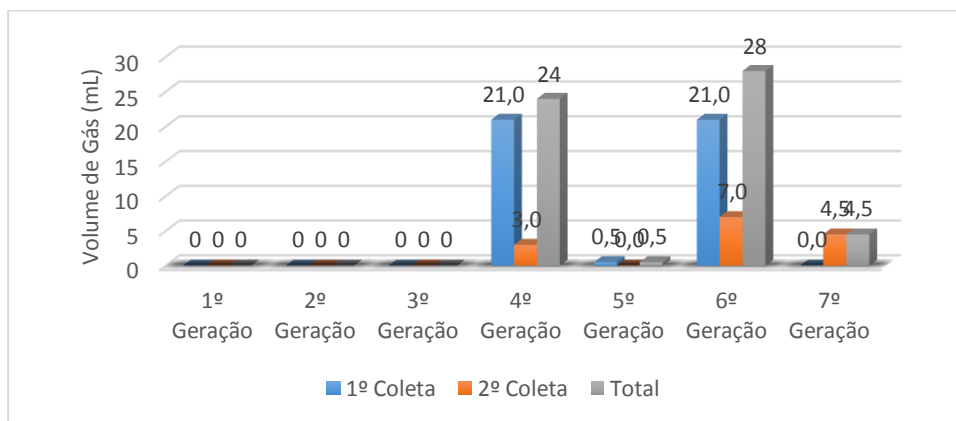
Fonte: autoria própria.

Figura D 7 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado suplementado consórcio 3 (SNS3)



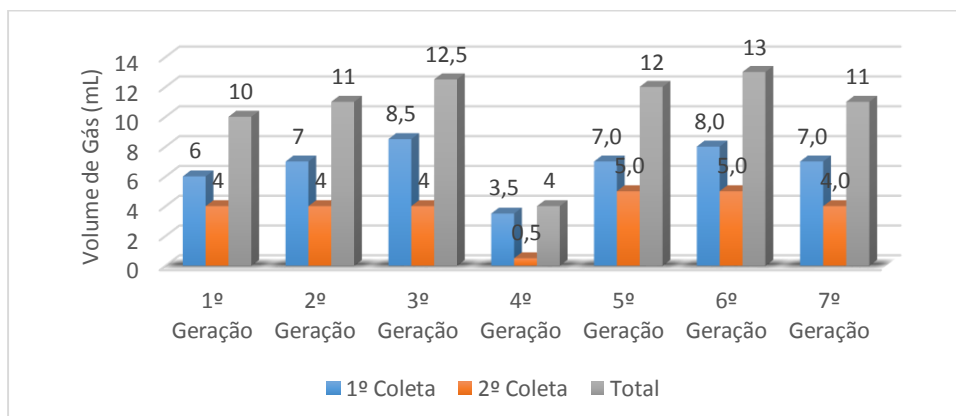
Fonte: autoria própria.

Figura D 8 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro não hidrolisado suplementado consórcio 4 (SNS4)



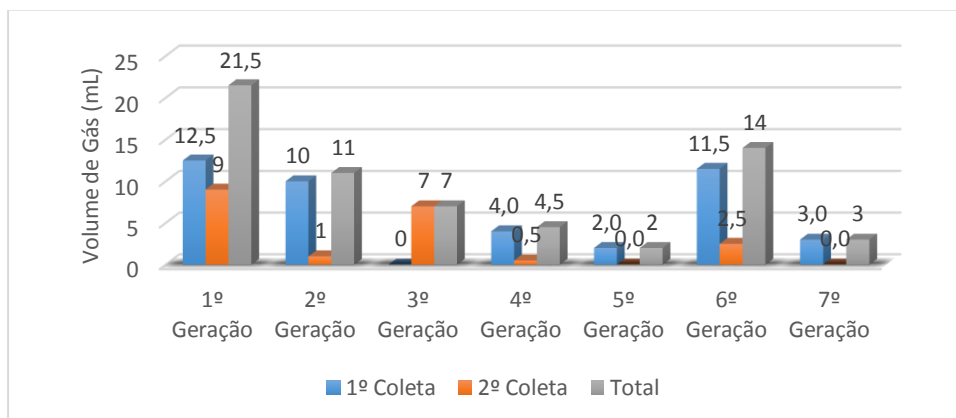
Fonte: autoria própria.

Figura D 9 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado suplementado consórcio 3 (SHS3)



Fonte: autoria própria.

Figura D 10 Produção de gás durante o processo fermentativo do soro hidrolisado suplementado consórcio 4 (SHS4)



Fonte: autoria própria.