

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS QUÍMICOS
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

KELI DIANE HEIN

**SUPLEMENTAÇÃO DE PERMEADO DE SORO DE LEITE PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2015

KELI DIANE HEIN

**SUPLEMENTAÇÃO DE PERMEADO DE SORO DE LEITE
PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Trabalho de Conclusão de Curso do Curso Superior de Tecnologia de Processos Químicos da Coordenação de Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo.

Orientador(a): Gracinda Marina Castelo da Silva

Toledo
2015

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO PROJETO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

KELI DIANE HEIN

**SUPLEMENTAÇÃO DE PERMEADO DE SORO DE LEITE PARA PRODUÇÃO DE
ETANOL**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, *campus* Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.*

Prof.^a Dr.^a Gracinda Marina Castelo da Silva
Orientadora

Prof.^a Dr. Clóvis Bombardelli
Banca Examinadora

Prof.^a Dr. Thiago C. Maniglia
Banca Examinadora

Toledo, Novembro de 2015

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.
(George Bernard Shaw).

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Gracinda Marina Castelo da Silva pela orientação dedicada, sendo que a conclusão deste trabalho não se tornaria possível se não fosse a sua dedicação e compreensão.

Aos técnicos dos Laboratórios da Universidade Tecnológica Federal, pelo apoio durante a realização dos experimentos realizados.

À Fátima Rodrigues Santana pelas inúmeras dúvidas sanadas e auxílio no laboratório durante a realização dos experimentos, a Luana e a Gislaine pelas recuperações de arquivos perdidos e pelo singelo apoio moral.

Aos meus pais pelo constante apoio em todas as minhas decisões, principalmente a minha mãe pelo “sutil e delicado” modo de incentivar a finalização deste trabalho.

A todos os professores que participaram de minha caminhada acadêmica e aos colegas adquiridos durante a graduação que de alguma maneira contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

HEIN, Keli Diane. **Suplementação de permeado de soro de leite para a produção de etanol**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2015.

Atualmente o Brasil apresenta grande produção leiteira, sendo que grande parte desta produção é destinada a fabricação de queijos. Neste processo há a geração de uma quantidade exorbitante de resíduo, denominado de permeado de soro de leite, que apresenta alta DBO, sendo altamente prejudicial ao meio ambiente e apresentado alto valor de tratamento. Uma maneira de diminuir a carga orgânica deste resíduo é a utilização do processo de separação por membranas, para retirada de proteínas e produção de concentrados proteicos utilizados como suplemento na alimentação animal e humana, porém mesmo após este processo o resíduo gerado, permeado do soro de leite, apresenta ainda, alta demanda bioquímica de oxigênio. Devido à composição do permeado do soro de leite, rico em lactose, torna-se possível recorrer ao processo de hidrólise enzimática para obter-se monossacarídeos fermentescíveis, visando à fermentação alcoólica para obtenção de etanol. No presente trabalho foram testadas diferentes suplementações para o permeado do soro de leite buscando uma maior produção de etanol, sendo que foi possível concluir que a *Saccharomyces cerevisiae* apresenta necessidade de suplementos que forneçam nitrogênio para o meio. Suplementos proteicos apresentam os melhores resultados deste estudo, enquanto suplementos à base de sais apresentaram resultados satisfatórios quando comparados a fermentação do permeado de soro de leite puro.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, permeado do soro de leite, fermentação alcoólica, etanol.

ABSTRACT

HEIN, Keli Diane. **Supplementation of whey permeate to ethanol production.** Completion of Course Work. Federal Technological University of Paraná. Toledo, 2015.

Currently Brazil has great milk production, and much of this production is destined to cheesemaking. In this process there is the generation of an exorbitant amount of residue, known as whey permeate, which has a high BOD and highly harmful to the environment and given high value treatment. One way to reduce the organic content of the waste is the use of membrane separation process for removal of proteins and production of protein concentrates used as supplement in animal and human nutrition, however, even after this process the residue generated whey permeate milk, has also high biochemical oxygen demand. Due to the composition of the permeate of whey is rich in lactose, it becomes possible to use the enzymatic process to obtain fermentable monosaccharides, in order to fermentation to obtain ethanol. In the present work we tested different supplementation to permeate whey seeking better yields and increased production of ethanol, and it was concluded that *Saccharomyces cerevisiae* has need supplements that provide nitrogen to the environment. Protein supplements have the best results of this study, while supplements the base salts showed satisfactory results when compared to fermentation of pure whey permeate.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, whey permeate, alcoholic fermentation, ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas envolvidas na fabricação de queijo.	14
Figura 2: Etapas do processo de concentração do soro de leite.	16
Figura 3: Representação esquemática de um processo de separação por membranas.	17
Figura 4: Processo de hidrólise da glicose pela enzima β -galactosidase.	22
Figura 5: Banho-maria e banho de gelo realizados após hidrólise enzimática para inativação da enzima.	25
Figura 6: Processo de inoculação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Figura 7: Esquema da câmara de Neubauer.	30
Figura 8: Variação do pH durante as 30 horas da fermentação alcoólica dos Meios 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.	34
Figura 9: Consumo de substratos durante as 30 horas nos Meios 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.	35
Figura 10: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 1.	36
Figura 11: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 2.	36
Figura 12: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 3.	36
Figura 13: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 4.	37
Figura 14: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 5.	37
Figura 15: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 6.	37
Figura 16: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 7.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do soro de leite doce e o soro de leite ácido.....	15
Tabela 2: Caracterização do Permeado do Soro de Leite, obtido na Sooro.	18
Tabela 3: Composição dos meios utilizados na fermentação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
Tabela 4: Características dos meios de cultura no tempo T=0h.....	33
Tabela 5: Teor alcoólico (%) observado ao final de 30 horas de fermentação.	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS.....	12
1.1.1 Objetivo geral.....	12
1.1.2 Objetivos específicos.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 PERMEADO DE SORO DE LEITE.....	13
2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	18
2.3 SUPLEMENTAÇÃO DO PERMEADO DO SORO DE LEITE.....	22
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 OBTENÇÃO DO PERMEADO DO SORO DE LEITE.....	24
3.2 HIDRÓLISE COM A ENZIMA β -GALACTOSIDASE.....	24
3.3 INOCULAÇÃO DA LEVEDURA.....	26
3.4 SUPLEMENTAÇÃO DO PERMEADO DO SORO DE LEITE.....	27
3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM A <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
3.6.1 Determinação do teor de sólidos solúveis.....	29
3.6.2 Determinação da biomassa.....	29
2.6.3 Determinação do teor alcoólico.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5. CONCLUSÕES	42
6. SUGESTÕES	43
7. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

Com o constante aumento da preocupação com a manutenção do meio ambiente, muitas medidas vêm sendo adotadas para tentar tratar ou reaproveitar resíduos poluidores. Indústrias estão cada vez mais preocupadas em atender a legislação vigente e para isso investem em pesquisas que buscam novas formas de reaproveitar resíduos gerados em processos industriais, seja na formulação de novos produtos ou como substituinte de outras substâncias em processos que já existem. Quando a reutilização é inviável, buscam-se formas econômicas e eficientes de tratar os resíduos gerados, de forma que causem menos impactos negativos no meio ambiente (CNMA, 1986; LAYRARGUES, 2000).

A produção de leite é um importante setor da economia brasileira, sendo que no ano de 2013 foram adquiridas por indústrias processadoras 6,186 bilhões de litros de leite, sem contabilizar pequenos produtores que fazem o repasse direto do produto para o consumidor final. Do leite encaminhado para as indústrias parte é destinada ao consumo e o restante é processado e transformado em diferentes produtos lácteos, sendo o queijo um dos principais (IBGE, 2014; SEAB, 2014).

No processo de fabricação do queijo utilizam-se cerca de 10 litros de leite para produzir um quilo de queijo, sendo que esta relação varia de acordo com o tipo de queijo produzido, ainda neste processo, tem-se a geração de aproximadamente nove litros de resíduo, conhecido como soro de leite. O soro de leite é composto primordialmente por proteínas, lactose, sais minerais, uma pequena quantia de gordura e uma grande quantidade relativa de água, sendo que devido à alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) ele é considerado um grande agente poluidor se despejado no meio ambiente sem tratamento (BARBOSA et al., 2010, p. 238).

Segundo dados do IBGE (2014) o Brasil produziu aproximadamente um montante de 920 mil toneladas de queijo, ou seja, aproximadamente 8180 toneladas de soro de leite, uma quantidade alarmante de resíduo que muitas vezes é descartado em mananciais de água, contaminando drasticamente corpos receptores e gerando problemas ambientais, quando na realidade antes de ser descartado deveria passar por diversos processos, como a neutralização, remoção

de óleos e gorduras, tratamentos químicos e biológicos (COSTA, 2011).

O tratamento mais comum para o soro de leite é a utilização de lagoas, onde são necessárias diversas etapas de tratamento que buscam a redução da carga orgânica do material, para que se torne possível despejá-lo na natureza. Este tratamento apresenta elevado custo e quando o descarte é realizado sem o tratamento, os efeitos colaterais no meio ambiente são grandes e a indústria responsável corre o risco de ser multada por órgãos fiscalizadores (SERPA, 2009; COSTA, 2011).

Devido a esses fatores, diversas indústrias buscam formas de reutilizar este resíduo, como no enriquecimento nutricional de bebidas ou na elaboração de produtos utilizados na alimentação humana e animal, que fazem uso do concentrado de sólidos (matéria gorda e proteínas) presentes no soro de leite, que é obtido por meio de um processo de micro e ultrafiltração por membranas, agregando assim valor econômico ao resíduo e reduzindo a sua carga poluidora (BARBOSA et al., 2010). O material proveniente do processo de filtração é denominado de permeado do soro de leite (BALDASSO, 2008), sendo ele a matéria prima utilizada neste estudo para a produção de etanol.

Um dos principais constituintes do permeado do soro de leite é o dissacarídeo lactose, que é um açúcar não fermentescível pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, inviabilizando o processo de fermentação alcoólica. Como esta levedura apresenta baixo custo e fácil obtenção torna-se interessante o seu uso em processos fermentativos, sendo que deve-se recorrer ao processo de hidrólise enzimática do permeado do soro de leite para tornar possível a realização da fermentação alcoólica. No processo de hidrólise enzimática utiliza-se a enzima β -galactosidase para converter a lactose em dois monossacarídeos fermentescíveis pela *Saccharomyces cerevisiae*, a glicose e a galactose, tornam possível à fermentação alcoólica (ANDRADE, 2005).

Na literatura não constam dados sobre a produção de etanol a partir da fermentação alcoólica do permeado do soro de leite, porém na Universidade Tecnológica Federal do Paraná encontra-se em andamento um estudo detalhado sobre o tema, sendo o presente trabalho parte deste estudo. Em um Trabalho de Conclusão de Curso (BALLER, 2014) já foram determinadas as melhores condições para a realização da hidrólise enzimática e alguns parâmetros ditos

como ótimos para a fermentação alcoólica.

A suplementação do meio a ser fermentado, baseado nas necessidades nutricionais da *Saccharomyces cerevisiae*, torna possível a busca por uma máxima produção de etanol, visto que o mesmo é uma importante fonte energética, sendo de suma importância na economia brasileira, pois é uma fonte de energia renovável amplamente utilizada em diversos setores, principalmente no transporte. A utilização de biocombustíveis torna possível a redução da utilização de fontes energéticas não renováveis, gerando conseqüentemente uma menor importação de fontes energéticas (ALMEIDA, 2006).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar diferentes suplementações do permeado do soro de leite visando uma maior produtividade de etanol através da fermentação pela *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Hidrolisar a lactose do permeado de soro de leite utilizando a enzima β -galactosidase (lactase);
- Avaliar diferentes tipos de suplementações para o permeado do soro de leite;
- Inocular a levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos diferentes meios de cultura suplementados e proceder com o processo de fermentação alcoólica;
- Retirar amostras em períodos de tempo pré-estipulado para avaliação de parâmetros do processo fermentativo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PERMEADO DE SORO DE LEITE

Segundo as especificações brasileiras, leite é um líquido branco opalescente homogêneo, oriundo da ordenha de vacas sadias e de sabor característico, sendo que este produto deve atender condições básicas de higiene e acondicionamento por ser altamente perecível (Instrução Normativa, 2002).

O leite é um produto amplamente utilizado na indústria alimentícia, servindo como matéria prima para dezenas de produtos, como queijos e iogurtes, sendo que no ano de 2012 o Brasil se encontrava na quinta colocação em relação ao mercado mundial de produção leiteira, e devido ao aumento gradativo na produção, há expectativas do país alcançar a terceira colocação do ranking mundial no ano de 2014, com um montante de 36,75 bilhões de litros (SEAB, 2014).

Uma quantia significativa do leite processado é destinada a produção de queijos, sendo que no ano de 2013 chegou a 920 toneladas. Na produção de 1Kg de queijo são necessários aproximadamente 10 litros de leite, sendo que são gerados cerca de 9 litros de um fluido opaco amarelo-esverdeado que contém 50% dos nutrientes presentes no leite, denominado de soro de leite, que é caracterizado como resíduo do processo de obtenção do queijo (MIZUBUTI, 1994). Embora para a obtenção de outros produtos, como a caseína e requeijões, o resíduo também seja o soro de leite, a produção de queijos é responsável por 95% do soro obtido nas indústrias (IBGE 2014).

Na Figura 1 estão representadas as principais etapas de fabricação do queijo. Na fabricação de queijos o leite deve passar pelo processo de padronização para depois ser acrescido de aditivos e fermentos ou coalhos, que irão auxiliar no processo de fermentação ou coagulação, sendo que logo após esse processo obtém-se a massa do queijo, que deverá ser moldada e separada do soro de leite, caracterizado como resíduo.



Figura 1: Etapas envolvidas na fabricação de queijo.
Fonte: Adaptado de Zacarchenco, 2012.

Quando descartado no meio ambiente o soro de leite é altamente prejudicial devido a sua composição possuir alta carga orgânica, estando os níveis de demanda química de oxigênio (DBO) chegam a 50.000mg/L, valor que está muito acima dos registrados para o esgoto doméstico, cujos níveis de DBO são próximos de 500mg/L, ou seja, o soro de leite revela um potencial poluidor maior que o esgoto doméstico (MIGLIORANZA, 2002).

Para se tornar possível o descarte deste resíduo na natureza ele deve ser submetido a um tratamento visando à redução de sua carga orgânica, como gorduras totais, sendo que este tipo de tratamento apresenta elevado custo. Desta forma torna-se rentável tratar o soro de leite como um subproduto, e aproveitar a sua composição nutricional e suas características físico-químicas em diversos produtos, como bebidas fermentadas, sucos, aditivos para panificação e utilização na produção animal (ou alimentação humana) principalmente na forma de concentrados proteicos, agregando grande valor econômico ao resíduo e diminuindo os gastos com tratamentos (MAGANHA, 2006). Estima-se que 50% do soro de leite produzido já é industrializado, porém a outra parte não apresenta nenhuma destinação, se tornando um problema ambiental para as mais diversas

indústrias.

Devido a diferenças na composição físico-química do soro de leite, ele pode ser classificado como soro ácido ou soro doce, sendo que a diferenciação entre ambos se dá pela diferença de pH em que ocorre a coagulação do leite. A obtenção do soro de leite doce se dá quando a coagulação do leite ocorre por ação enzimática em um pH levemente ácido (6,0 a 6,8), já no caso do soro de leite ácido o pH deve se apresentar abaixo de 6,0. Apesar das diferenças de pH em que ocorre a coagulação do leite, em ambos os casos os produtos derivados são queijos, caseína ou produtos lácteos similares (MIZUBUTI, 1994; PERRONE, 2010).

Na Tabela 1 podem ser visualizados os principais constituintes do soro de leite doce e ácido segundo as caracterizações de Antunes (2003) e Barbosa (2010), sendo possível observar que o constituinte sólido presente em maior quantidade no soro de leite é a lactose, sendo ela responsável pelo sabor adocicado, porém em ambas as análises o soro doce apresentou maior quantidade de lactose.

Tabela 1: Composição do soro de leite doce e o soro de leite ácido.

Composição	Barbosa et. Al. (2010)		Antunes (2003)	
	Doce (%)	Ácido (%)	Doce (%)	Ácido (%)
Gordura	0,43	0,36	0,5	0,4
Proteínas	0,8	0,78	0,8	0,75
Lactose	4,9	3,63	4,6	4,2
Minerais	1,59	1,32	-	-
Ácido Láctico	-	-	0,05	0,4

Fonte: Barbosa et al., 2010; Antunes (2003)

Para a obtenção de concentrados proteicos torna-se necessário submeter o soro de leite a um processo para concentrar as proteínas, sendo a separação por membranas (PSM) um dos métodos mais utilizados, que tem como objetivo separar ou concentrar espécies de tamanho e natureza química diferentes presentes em uma solução (BALDASSO, 2008).

O soro de leite submetido a esse processo é separado em duas frações, o retentado, que após secagem, é utilizado na produção de concentrado proteico de soro (CPS) em concentrações diferentes de 35, 60 ou 80 %, ou mesmo, isolado proteico de soro (IPS) com conteúdo de proteína superior a 90 % em base sólida e um permeado, chamado de permeado de soro de leite, que é caracterizado como o resíduo deste processo (BALDASSO, 2008; ZACARCHENCO, 2012). Na Figura 2 é possível observar as etapas as quais é submetido o soro de leite.

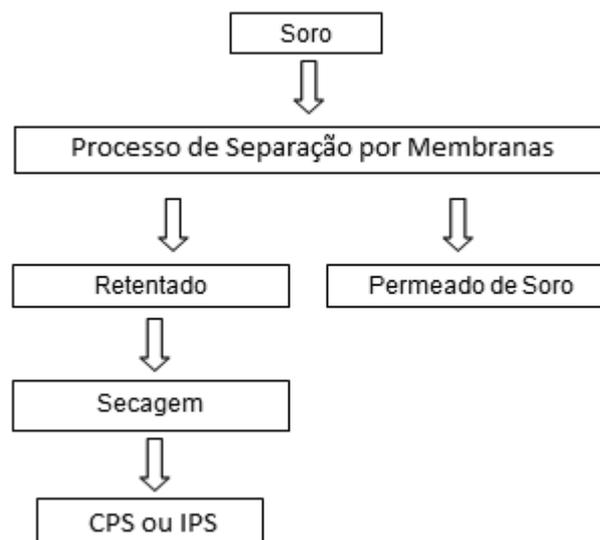


Figura 2: Etapas do processo de concentração do soro de leite.
Fonte: Zacarchenco, 2012; Baldasso, 2008.

O princípio de funcionamento dos PSM se dá pelas diferenças entre as propriedades físicas e químicas da membrana e dos componentes que a permeiam, dessa forma as membranas funcionam como uma barreira, que permite apenas o transporte de uma espécie que seja compatível com a membrana (tamanho, formato e características), sendo que muitas vezes a diferença de pressão é o preceito básico para a separação (BETTIOL, 2004; BALDASSO, 2008; ZACARCHENCO, 2012). Na Figura 3 é possível observar o processo que origina o permeado de soro de leite.

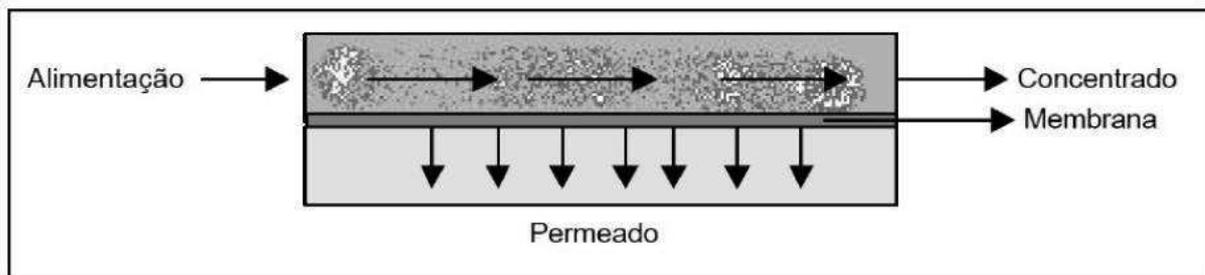


Figura 3: Representação esquemática de um processo de separação por membranas.
Fonte: Baldasso, 2008.

As primeiras aplicações de membranas sintéticas iniciaram-se por volta de 1920, porém apenas em escala de laboratório, atualmente elas são de extrema importância para diversas operações (concentração, evaporação, destilação, entre outros) efetuadas em larga escala industrial (BALDASSO, 2008). A utilização de PSM no soro de leite se deu a partir de estudos que demonstraram a qualidade das proteínas do soro de leite, devido a pontes de dissulfeto presentes em sua estrutura responsáveis pelo grau de estabilidade estrutural da molécula, que apresentam diferentes efeitos sobre o metabolismo humano, em especial a manutenção ou ganho de massa, tornando-se dessa forma interessante a concentração das proteínas presentes no soro de leite (HARAGUCHI, 2006).

O PSM utilizado na concentração do soro de leite do presente trabalho é a ultrafiltração, pois é um processo de baixo custo energético e que apresenta resultados satisfatórios, pois as membranas retêm as proteínas (de alto peso molecular) e permite a passagem dos componentes de baixo peso molecular, como a lactose e sais minerais (BETTIOL, 2004; BALDASSO, 2008; ZACARCHENCO, 2012).

Embora o permeado de soro de leite obtido neste processo apresente algumas aplicações, como na alimentação de animais, para a concentração de lactose, na produção de galactose e glicose, uma parte significativa do permeado obtido não é utilizado, em contrapartida ao concentrado de proteínas, que devido a suas propriedades é 100% comercializado (HARAGUCHI, 2006).

O permeado do soro de leite utilizado neste trabalho é procedente da Sooro, uma indústria de processamento de soro de leite situada no município de Marechal Cândido Rondon, em trabalho de TCC anterior a este, Baller (2014) Passos (2015) realizaram a caracterização do permeado do soro, os dados obtidos nestas

caracterizações se encontram na Tabela 2.

Tabela 2: Caracterização do Permeado do Soro de Leite, obtido na Sooro.

Análise	BALLER, L. D. (2014)	PASSOS, J. H. (2015)
pH	6,38	6,37
Lipídeos (%)	0,00	<0,10
Proteínas (%)	0,60	0,52
Sólidos Solúveis (°Brix)	14,10	14,1
Umidade (%)	75,90	86,34
Cinzas (%)	0,79	0,8
Lactose (%)	10,90	10,25

Fonte: Baller, 2014; Passos, 2015

2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação é um conjunto de reações bioquímicas que utiliza glicose, sacarose e frutose para a obtenção de etanol. Para ocorrer o processo fermentativo são imprescindíveis três fatores: ausência de oxigênio (processo anaeróbico), presença de açúcares e microrganismos capazes de realizar a transformação dos açúcares presentes em gás carbônico (BARBOSA et. al., 2010).

A conversão do substrato em produto ocorre devido à produção de energia pelas células de levedo por meio da degradação da matéria orgânica, que é o processo de fermentação ocorrido na ausência de oxigênio (SCHMIDELL, 2001; BARBOSA et. al., 2010). O rendimento de um processo fermentativo pode ser calculado pela seguinte relação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Etanol Produzido}}{(\text{Substrato Consumido}) \times 0,5368} \quad (1)$$

Sendo que o valor 0,5368 refere-se à estequiometria de conversão da lactose em etanol (BARBOSA et. al., 2010).

Para um processo fermentativo eficiente deve-se obter a maior conversão de substrato em produto possível, ou seja, um maior rendimento, sendo que para isso ocorrer vários fatores devem ser observados, como: o meio de cultura a ser utilizado, os fatores físicos (temperatura), fatores químicos (pH, inibidores e nutrientes) e fatores microbiológicos (características e quantidades da levedura) (BARBOSA et. al., 2010).

Entre os principais fatores que afetam diretamente o processo fermentativo está a temperatura e o pH. No caso de leveduras mesófilas, as temperaturas ótimas para a produção de etanol estão na faixa de 26 a 35°C, sendo possível observar que com o aumento da temperatura, aumenta também a velocidade da fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana e as leveduras ficam mais suscetíveis à toxidez do etanol. No caso do pH, sabe-se que fermentações que ocorrem em meio mais ácido têm maior produção de etanol, “pois restringe o crescimento do fermento, reduzindo a produção de glicerol e a contaminação microbiana” (LIMA et al., 2001, p. 17,18).

Segundo estudos realizados por URBANO (2014) e PASSOS (2015) as melhores condições de temperatura e pH para ocorrer a fermentação do permeado do soro, de leite utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que serão também utilizados neste trabalho, são 30°C e pH igual a 5,00.

Outro fator determinante para a fermentação está relacionado com a concentração da levedura, sendo que quanto maior a concentração, mais rapidamente irá ocorrer à fermentação, porém é preciso manter uma concentração ótima, a fim de evitar stress nos microrganismos. A falta de controle sobre as bactérias contaminantes também restringe o crescimento da própria levedura (LIMA et al., 2001; BARBOSA et. al., 2010).

Para aplicação na fermentação alcoólica, espera-se que os microrganismos apresentem elevada eficiência na conversão do substrato em produto; que permita acúmulo de produto ao meio fermentativo; que não produza substâncias incompatíveis ao produto; não sejam patogênicos; que não exija condições complexas de processo e que permita rápida liberação de produto ao meio (SCHMIDELL, 2001).

As leveduras são uma espécie de “bolor” e são encontradas na natureza ou produzidas em laboratórios. Para a fermentação os microrganismos que mais se destacam são as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marcianus*

e a bactéria *Zymomonas mobilis*, destacando-se o gênero *Saccharomyces* pela alta produção e tolerância a altas concentrações de etanol.

A *Saccharomyces cerevisiae* é um aeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose, sendo que os produtos finais da metabolização irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra (LIMA et al., 2001; BARBOSA et. al., 2010).

Lima et al. (2001) ressalta que a levedura do gênero *Saccharomyces* representa uma importância econômica em processos biotecnológicos, e que é um dos microrganismos mais estudados e cujo metabolismo é o mais conhecido. Portanto levedura escolhida para o processo de fermentação do permeado do soro de leite é a *Saccharomyces cerevisiae*.

Para Schimidell (2001) o meio de cultivo ideal deve "ser o mais barato possível, atender as necessidades nutricionais dos microrganismos, evitar variações drásticas no pH e excessiva formação de espuma, ter composição razoavelmente fixa e não causar dificuldades no tratamento final dos efluentes".

Os altos teores de lactose e o valor nutricional presentes no soro de leite fazem com que ele se torne um substrato atrativo para processos fermentativos, sendo que diversos autores já averiguaram a possibilidade de sua utilização como meio de cultura, além de ele ser considerado um resíduo, ou seja, não apresenta nenhum valor de obtenção (SOUZA, 2005; FLORÊNCIO, 2013).

Souza (2005) e Florêncio (2013) utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o soro de leite como substrato para um processo fermentativo que visava à obtenção de etanol. Ambos os autores conseguiram encontrar valores satisfatórios para conversão do substrato em etanol, porém tiveram que desproteínizar o soro de leite para evitar problemas com excesso de espuma no processo de destilação devido às proteínas presentes no meio e tiveram que suplementar o meio com sacarose, visto que a levedura em questão não degrada a lactose.

A partir destes estudos é possível observar a viabilidade da utilização do permeado de soro de leite como substrato na fermentação alcoólica, pois este produto mantém os altos índices de lactose presentes no soro de leite, mas devido ao PSM ele sofre uma drástica redução na presença de proteínas, sendo dispensável a etapa de desproteínização realizada por outros autores, o que

viabiliza a eficiência da fermentação, pois não há formação excessiva de espumas permitindo que os pratos da coluna de destilação operem adequadamente (BELINCANTA, 2004).

Domingues et. al. (1999) utilizou o permeado de soro de leite como substrato e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em um processo fermentativo e obteve uma conversão de substrato em etanol de 80%, porém para a realização deste experimento os autores obtiveram uma linhagem da *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente, de forma que ela fosse capaz de degradar a lactose.

A lactose presente no permeado do soro de leite é um dissacarídeo presente exclusivamente no leite (açúcar do leite) e formado por dois monossacarídeos: a galactose e a glucose (MIZUBUTI, 1994). Sendo a *Saccharomyces cerevisiae* incapaz de degradar a lactose, mas capaz de degradar monossacarídeos é possível submeter o permeado do soro de leite a um processo de hidrólise enzimática, visando a quebra do dissacarídeo lactose em dois monossacarídeos (BARBOSA et al., 2010).

A hidrólise enzimática é uma reação em que ocorre a digestão da lactose, pela enzima lactase (β -galactosidase), em nível de mucosa intestinal, em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose. A enzima catalisa o resíduo terminal β -galactopiranosil e hidrolisa a lactose nos seus monossacarídeos constituintes, β -D-galactose e D-glicose (VIEIRA, 2006; CAMPBELL, 2012). A Figura 4 mostra o processo de hidrólise da lactose.

O processo de hidrólise enzimática apresenta como benefícios a não formação de produtos indesejáveis, além de ocorrer em uma ampla faixa de temperatura. Baller (2014) definiu a utilização da enzima β -galactosidase (lactase) em uma concentração de 1,250 g/L, pH igual a 6 e temperatura de 37,5°C como sendo os melhores parâmetros para ocorrer a hidrólise enzimática. Estes parâmetros serão utilizados no presente estudo.

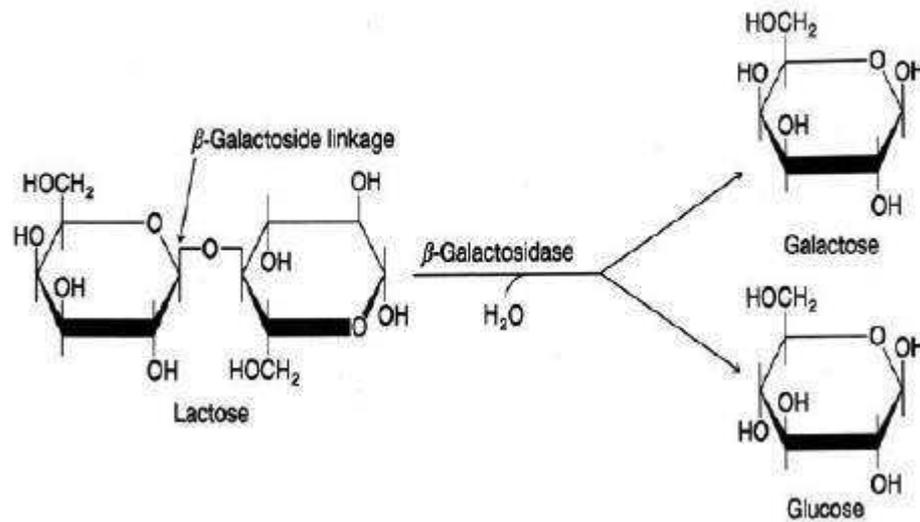


Figura 4: Processo de hidrólise da lactose pela enzima β-galactosidase.
Fonte: Vieira, 2006.

2.3 SUPLEMENTAÇÃO DO PERMEADO DO SORO DE LEITE

Segundo Malta (2006), leveduras apresentam uma forte característica de sintetizar as bases nitrogenadas necessárias para seu crescimento celular a partir do íon amônio, porém a utilização de sulfato de amônio como fonte nitrogenada resulta em maior acidez do meio, que embora possa favorecer o controle da contaminação bacteriana (e conseqüente redução da formação de ácidos láctico e acético), causa estresse à levedura, diminuindo a viabilidade e multiplicação.

Malta (2006) ainda ressalta que a suplementação de meios com amônio ou sais de amônio é possível, porém a utilização de nitrogênio orgânico é mais efetiva, constatando-se que a produção específica de células de levedura aumentou linearmente, para a produção de cachaça de alambique, com o aumento do nitrogênio proteico no meio de fermentação sintético, isso ocorre porque a *Saccharomyces cerevisiae* não assimila instantaneamente o nitrogênio quando adicionado na forma de ureia (inorgânico).

Em experimentos realizados por Jerônimo (2004), onde suplementou-se o caldo de cana a ser fermentado com a *Saccharomyces cerevisiae* para produção de cachaça, a adição de nitrogênio proteico (denominado comercialmente de

SUPRO 780) obteve uma boa multiplicação e viabilidade da levedura, propiciando assim, melhor qualidade no fermento reciclado, sendo todo suplemento consumido pela levedura, porém em testes adicionando fubá e farinha de trigo os resultados não foram satisfatórios.

Um estudo realizado por Assunção (2013) avaliou-se o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes meios utilizando o permeado de soro de queijo com e sem suplementação, sendo que a levedura apresentou um ótimo crescimento no meio in natura que continha apenas o permeado de soro, sendo o crescimento semelhante ao meio que continha apenas o meio de cultura sintético. O permeado de soro de leite que foi suplementado (com sais minerais e extrato de levedura) não apresentaram resultados significativos.

Colognesi 2013 suplementou o soro de queijo em pó com extrato de levedura, fosfato de potássio monobásico, sulfato de amônio e de sulfato de magnésio e utilizou a levedura *Saccharomyces fragilis* e verificou que ocorreu o crescimento da levedura em todos os meios, porém a produção de etanol foi de apenas 5,04%, valor consideravelmente baixo.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental foi realizado no laboratório de processos químicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Toledo (UTFPR).

3.1 OBTENÇÃO DO PERMEADO DO SORO DE LEITE

Para a realização deste trabalho utilizou-se o permeado de soro de leite, que será cedido pela Sooro – indústria de produtos lácteos concentrados do município de Marechal Cândido Rondon, sendo que o mesmo foi coletado diretamente na empresa que realiza desproteinização do soro de leite utilizando a técnica de separação por membranas. Devido à quantidade coletada ser maior, o permeado de soro de leite foi homogeneizado, acondicionado em frascos de 1,0 litros previamente esterilizados e armazenados em freezer, com temperatura de $-8,0^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$.

Utilizou-se metodologia descrita na ISO 6887-2 para descongelamento do produto evitando assim alterações nas propriedades físico-químicas, garantindo a confiabilidade dos testes realizados, dessa forma o permeado do soro de leite foi transferido para geladeira 24 horas antes da sua utilização, mantendo-se refrigeração à temperatura de $3,0^{\circ}\text{C} + 2,0^{\circ}\text{C}$.

3.2 HIDRÓLISE COM A ENZIMA β -GALACTOSIDASE

A lactose é o constituinte presente em maior percentual no permeado do soro de leite e sendo ela um dissacarídeo formado pelos monossacarídeos glucose e galactose, torna-se necessário realizar a sua hidrólise para que seja possível fermentá-la pela *Saccharomyces cerevisiae* (ANDRADE, 2005).

Para realização da hidrólise enzimática do permeado do soro de leite foi utilizada metodologia descrita por Andrade (2005) e adaptada por Baller (2014), sendo que parâmetros ótimos de pH, temperatura e concentração da levedura foram definidos no trabalho de Baller (2014).

Em um béquer com capacidade de 2 litros foi adicionado 1,5 litros de permeado do soro de leite, para realização do ajuste do pH em 5,00 utilizando-se hidróxido de sódio 0,5 mol/L e ácido Cítrico 0,5 mol/L. Para realização da hidrólise foi utilizada a enzima (lactase) β -Galactosidase Maxilact® LX 5000 proveniente da levedura *Kluyveromyces lactis* na concentração de 1,250g/L.

Foram colocados 0,2 litro de permeado de soro de leite em kitsatos com capacidade de 0,25 litros cada. Para a manutenção de um ambiente ideal para a reação de hidrólise utilizou-se um *shaker* de bancada Weg CFW08, modelo Maqib-shaker, mantendo-se agitação constante de 200 rpm e temperatura de 37,5°C. O tempo de reação será de 240 minutos conforme determinado por Vieira (2006).

Após o tempo e reação da hidrólise ser finalizado, os kitsatos foram submetidos a banho-maria à temperatura de 90°C durante 2 minutos, e imediatamente depois colocados em banho de gelo à 2°C, para inativação da enzima. Na Figura 4 é possível observar o processo de inativação da enzima por meio de banho maria e banho de gelo.



Figura 5: Banho-maria e banho de gelo realizados após hidrólise enzimática para inativação da enzima.

Fonte: O autor.

3.3 INOCULAÇÃO DA LEVEDURA

Para um melhor desempenho da fermentação alcóolica do permeado do soro de leite realizou-se a inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, visando iniciar o processo fermentativo da fase log, evitando-se dessa forma a fase de adaptação da levedura ao meio, para tanto foi utilizada metodologia adaptada de Fugita (2010).

Em um béquer foi adicionado 1L de água destilada, 10g/L de glicose, 5g/L de extrato de levedura, 5g/L de peptona e 3g/L de extrato de malte e aquecido a temperatura de 25°C para completa solubilização dos produtos, logo após adicionou-se 0,4g/L da levedura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada da marca Fleischmann®. O inóculo foi colocado em erlenmeyer com capacidade de 0,125 litro e acondicionado em um *shaker* de bancada Weg CFW08, modelo Maqib-shaker, com temperatura de 30°C, agitação de 11 rpm durante 24 horas.

Após 24 horas o fermentado foi transferido para centrífuga durante 10 min à velocidade de 3.000 rpm para separação da biomassa do meio de cultura, sendo que com a biomassa preparou-se o inóculo utilizado para a fermentação alcóolica do permeado do soro de leite. Na Figura 6 é possível observar o processo de crescimento da levedura no shaker.



Figura 6: Processo de inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
Fonte: O autor.

3.4 SUPLEMENTAÇÃO DO PERMEADO DO SORO DE LEITE

Para ser possível avaliar o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, realizou-se a fermentação de diferentes meios contendo em sua composição permeado de soro de leite puro e permeado de soro de leite adicionado de diferentes suplementações, que posteriormente serão comparados com um meio padrão-sintético formulado a partir dos estudos realizados por Santos et al., 2010. A escolha das suplementações foi realizada a partir de estudos realizados por Oliveira (2000) e Oliveira (2006). A Tabela 3 apresenta a formulação dos meios utilizados no processo fermentativo.

Tabela 3: Composição dos meios utilizados na fermentação da *Saccharomyces cerevisiae*.

Composição do Meio	
Meio 1 (Sintético Puro)	10,0g/L de glicose
	2,0g/L de extrato de levedura
	1,0g/L de peptona
	0,46g/L de ureia
	0,6g/L de KH_2PO_4
	0,25g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	q.s.p. de água destilada
Meio 2 (Puro)	200mL de permeado de soro de leite
Meio 3	200mL de permeado de soro de leite 2,0g/L de extrato de levedura
Meio 4	200mL de permeado de soro de leite 1,0g/L de peptone
Meio 5	200mL de permeado de soro de leite 0,6g/L de ureia

Meio 6	200mL de permeado de soro de leite
	0,46g/L de ureia
	0,4g/L de KH_2PO_4
	0,4g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	0,2g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Meio 7	200mL de permeado de soro de leite
	2,0g/L de extrato de malte

A adição dos suplementos ao permeado do soro de leite foi realizada seguindo metodologia descrita por Oliveira (2006), onde o permeado do soro de leite foi aquecido à temperatura de 20°C para realização da adição e solubilização do suplemento.

3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM A *Saccharomyces cerevisiae*

No processo de fermentação alcóolica do permeado do soro de leite hidrolisado utilizou-se a metodologia descrita por Andrade (2005) e adaptado por Baller (2014). O processo fermentativo foi realizado em ambiente anaeróbico com uma única saída, visando liberação dos gases formados durante a fermentação. O biorreator utilizado foi um kitasato com capacidade de 250mL, onde a parte superior da vidraria foi fechada como auxílio de uma borracha pela qual sai uma mangueira que ficou acondicionada em um recipiente com água e a saída lateral foi utilizada para retirada de amostras do fermentado que foram utilizadas para avaliar o crescimento da levedura.

Adicionou-se aos biorreatores 200mL dos meios preparados anteriormente e posteriormente realizou-se a correção do pH para 6,0 (URBANO, 2014) utilizando-se soluções de ácido cítrico 0,5mol/L e/ou hidróxido de sódio 0,5mol/L. Logo após foram adicionados 0,5mL do inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Os biorreatores foram encaminhados para o interior de um *Shaker* de bancada weg CFW08, modelo Maqib-Shaker, marca MARQLABOR, visando um maior controle sobre as variáveis do sistema. Nas primeiras duas horas de fermentação manteve-se agitação de 50 rpm, para uma maior produção de energia

e biomassa, sendo que após esse período o sistema permaneceu sem agitação. A temperatura praticada em todo o processo fermentativo foi de 30°C (PASSOS, 2015).

Foram retiradas alíquotas de 5mL para realização das análises do fermentado nos seguintes horários: 0 horas (antes de iniciar o processo fermentativo), 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 18 horas e 30 horas.

3.6 ANÁLISE DO FERMENTADO

3.6.1 Determinação do teor de sólidos solúveis

Uma das análises realizadas visando o acompanhamento do consumo de substratos é a verificação da concentração dos sólidos solúveis presentes no meio, ou seja, a determinação de graduação Brix. Neste trabalho utilizou-se metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), que emprega um refratômetro para determinar a concentração de sólidos solúveis em soluções aquosas de açúcar. Foi utilizado um refratômetro modelo ABBE 0-95%. Antes da realização da leitura da concentração dos sólidos solúveis em todas as amostras, realizou-se a calibração do refratômetro, utilizando para isso água destilada.

3.6.2 Determinação da biomassa

Para determinação da concentração de leveduras presentes nas amostras retiradas, visando avaliar o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* e consequentemente a formação de biomassa utilizou-se uma câmara de Neubauer e um microscópio ótico. É possível observar o esquema de uma câmara de Neubauer na Figura 7, onde pode-se visualizar as nove divisões principais, sendo que cada divisão possui 1mm^2 de área. Para realização da contagem das células,

utilizou-se metodologia descrita por Alves e Guimarães (2010), para tanto observou-se apenas os quatro quadrados externos.

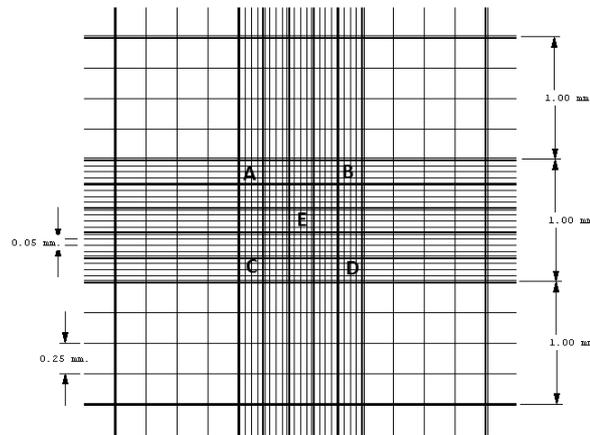


Figura 7: Esquema da câmara de Neubauer.

Fonte: Alves e Guimarães, 2010.

Das amostras retiradas para análise, foram separadas em microtubos de Eppendorf 0,1mL da amostra mais 0,4mL de azul de metila, que foi utilizado para facilitar a contagem, visto que as células viáveis são evidenciadas com este indicador. Após homogeneização a solução foi transferida para a câmara de Neubauer, sendo que a suspensão deve preencher apenas um lado dela e, foi adicionada uma lamínula sobre a câmara. Aguardou-se alguns minutos para decantação das células e logo após procedeu-se com a contagem das células em microscópio ótico.

A utilização de uma lamínula de vidro sobre a câmara serve para conter a suspensão celular, dessa forma é possível observar a formação de um espaço entre elas, que totaliza 0,1 mm. Assim é possível determinar o volume de cada um dos 9 quadrados da câmara: 0,1mm X 1mm², totalizando 0,1mm³. Para determinação das células contidas em 1mL deve-se multiplicar o número de células contadas por 10⁴ (fator de correção da câmara).

Para facilitar a determinação de células viáveis por mL, será utilizada a Equação 2 descrita abaixo:

$$\frac{n^{\circ} \text{ células}}{\text{mL}} = \frac{n_1}{n_2} \times f \times 10^4 \quad (2)$$

Onde,

n_1 = número total de células;

n_2 = número de quadrantes contados, que neste caso é 4, visto que serão contados os quatro quadrados externos da câmara;

f = fator de diluição, que neste caso é 5 visto que a 0,1 mL da amostra foi diluída em 0,4 mL de indicador.

2.6.3 Determinação do teor alcoólico

A determinação do teor alcóolico foi realizada apenas após a finalização da fermentação (30 horas), sendo que para isso seguiu-se metodologia de determinação de álcool em volume a 20°C adaptada do Instituto Adolfo Lutz (2008). Este procedimento foi realizado em triplicata, utilizando-se volumes de 30mL de amostra em cada destilação.

As alíquotas de amostra foram adicionadas ao microdestilador e coletou-se próximo de 100mL do destilado (solução hidroalcoólica) e transferido para balão volumétrico de 100mL, onde ajustou-se o volume utilizando-se água destilada. Esta solução foi levada em banho de gelo até atingir temperatura exata de 20°C e posteriormente foi transferida para um picnômetro de 10mL previamente calibrado e com volume já definido, foi realizada a pesagem do mesmo. Após determinação da massa da solução hidroalcoólica e utilizando-se o volume do picnômetro obtido anteriormente tornou-se possível determinar a densidade da solução utilizando-se a Equação 3.

$$p = \frac{m_2 - m_1}{v} \quad (3)$$

Onde,

ρ = densidade da solução (g/cm³);

m_1 = massa do picnômetro seco e vazio (g);

m_2 = massa do hidroalcoólico (g) + massa picnômetro (g);

V = volume da solução (cm^3).

A partir da densidade encontrada é possível obter na literatura a porcentagem de álcool em volume a 20 °C (% v/v) e determinar o valor do teor alcoólico para cada alíquota destilada, porém como houve diluição da amostra de 30mL em 100mL é necessário realizar a adequação do teor alcóólico utilizando a Equação 4:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (4)$$

Onde,

C_1 = teor alcoólico na amostra, valor real;

V_1 = volume de amostra utilizada (30 mL);

C_2 = teor de álcool referente a amostra diluída, que pode ser encontrado na metodologia de Adolf Lutz encontrado no Anexo 1;

V_2 = volume total utilizado (100 mL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 4 apresenta as características iniciais em que se encontravam os meios de cultura utilizados no processo fermentativo.

Tabela 4: Características dos meios de cultura no tempo T=0h.

Ensaio	Sólidos Solúveis (°Brix)	Células Viáveis/mL	pH
Meio 1	13,7	4,8x10 ⁶	5,98
Meio 2	13,7	5,6x10 ⁶	5,98
Meio 3	14,0	4,2x10 ⁶	5,99
Meio 4	14,3	6,2x10 ⁶	6,01
Meio 5	13,5	7,2x10 ⁶	6,01
Meio 6	13,7	4,0x10 ⁶	6,02
Meio 7	14,3	3,8x10 ⁶	6,02

De acordo com a Tabela 4, os sólidos solúveis dos meios fermentados apresentaram variação de 13,5°Brix à 14,3°Brix, sendo que a graduação °Brix medida em cada um dos meios representa os sólidos solúveis, compreendendo a lactose, açúcares, sais, ácidos e proteínas contidos na solução (CECCHI, 2003).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi previamente inoculada conforme descrito no tópico 3.3 e posteriormente foi acrescentado 1,5mL do inóculo no mosto para se iniciar o processo fermentativo. A variação de quantidades de células viáveis observadas em cada um dos meios no tempo T=0h, embora seja baixa, está relacionada à adaptação da levedura ao mosto, visto que cada um dos meios proposto contém diferentes suplementações (PACHECO, 2010).

O pH (potencial hidrogeniônico) determina o grau de acidez ou basicidade de um meio, sendo que a acidificação do meio contribui para a fermentação alcoólica e inibi o crescimento de bactérias, devido as características das bactérias de se desenvolverem melhor em meios com características mais básicas (CARVALHO, 2001). Dessa forma, manteve-se o pH inicial dos meios levemente ácido, próximo de 6,00 considerado pH ótimo para o desenvolvimento da *Saccharomyces cerevisiae*, conforme determinado nos estudos de Urbano (2014) e Passos (2015). Na Figura 8 é possível observar a variação do pH durante as 30 horas em que procedeu-se com

a fermentação alcóolica do meio.

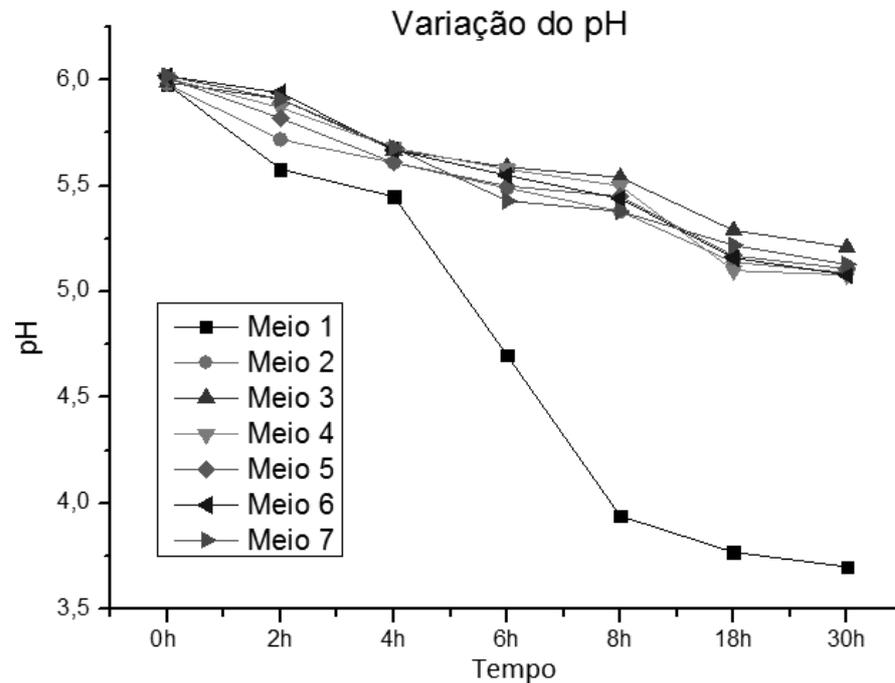


Figura 8: Variação do pH durante as 30 horas da fermentação alcoólica dos Meios 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

Fonte: O autor.

Nos ensaios de fermentação alcóolica dos Meios 2, 3, 4, 5, 6 e 7 pode-se observar um pequeno decaimento do pH, de forma que ao final de 30 horas verificou-se que os valores estavam próximo de 5,0, indicando que estava ocorrendo a fermentação do meio. A maior queda de pH pode ser visualizada no Meio 1, que ao final de 30 horas apresentou um pH de 3,7.

No processo de respiração da levedura ocorre a absorção de aminoácidos e a excreção de íons H^+ . Dessa forma, na atividade metabólica da levedura há a produção de ácidos orgânicos, como láctico, acético e succínico, assim, quanto menor a produção desses ácidos no processo fermentativo menor será a variação do pH, o que é ideal para a boa produção de etanol (BORTOLINI et. al., 2001). Grandes variações de pH durante o processo fermentativo podem indicar contaminações do meio, que ocasionam estresse osmótico impactando de forma significativa no rendimento do produto final (SCHMIDELL et al. 2001).

Na Figura 9 é possível observar a variação do consumo de substratos durante as 30 horas em que procedeu-se com a fermentação alcóolica do meio.

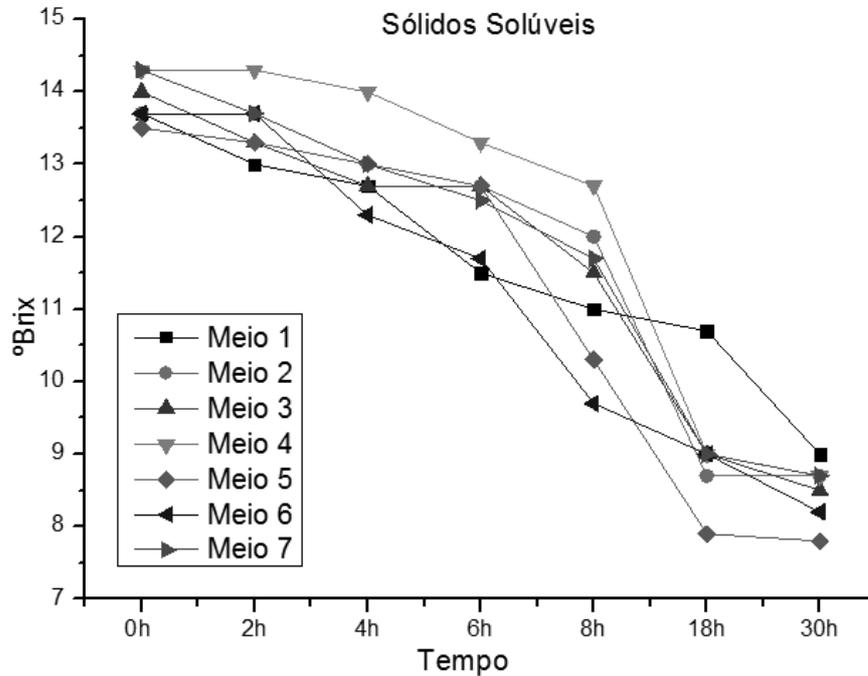


Figura 9: Consumo de substratos durante as 30 horas nos Meios 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.
Fonte: O autor.

A escala °Brix indica a refração da luz devido à presença de sólidos solúveis como lactose, açúcares, sais, ácidos e proteínas. Ao ser inoculada a levedura o decaimento de sólidos solúveis indica que esta ocorrendo a fermentação, visto que eles são utilizados como substratos para o desenvolvimento da mesma. A partir da Figura 8 é possível verificar que em todos os meios obteve-se sucesso no processo de fermentação, visto que houve grande redução dos sólidos presentes na amostra, porém não houve total consumo dos substratos.

Nas Figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 é possível observar os gráficos de variação do pH, consumo de substratos e formação de biomassa durante o processo fermentativo de todos os meios fermentados neste trabalho.

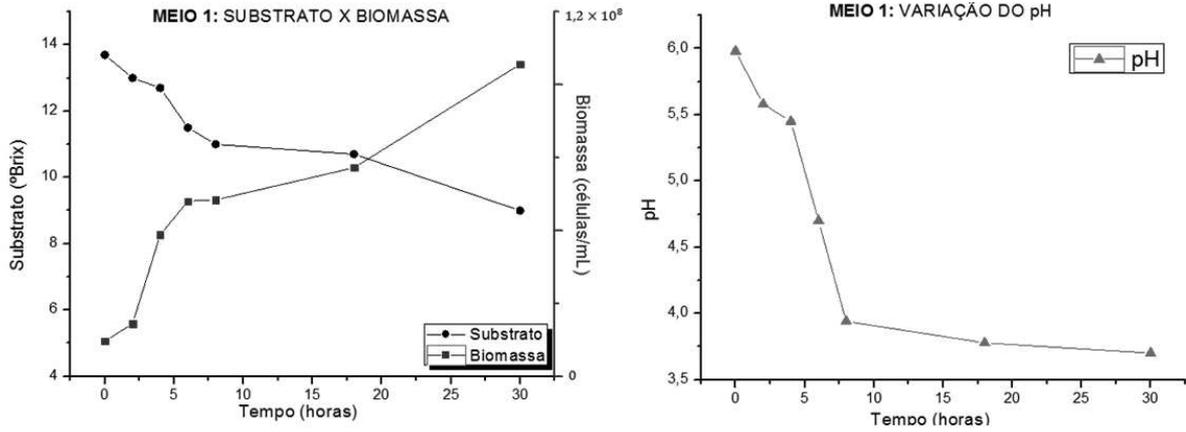


Figura 10: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 1.
Fonte: O autor.

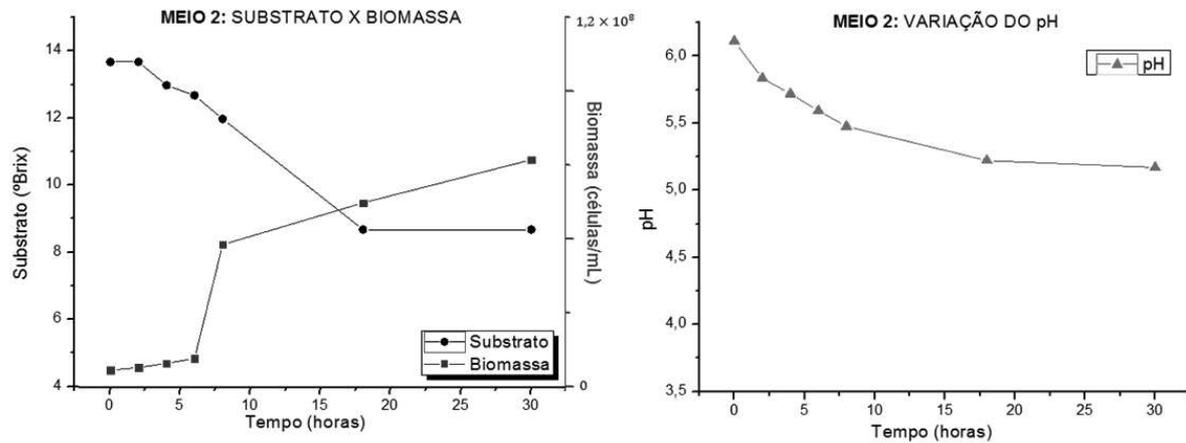


Figura 11: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 2.
Fonte: O autor.

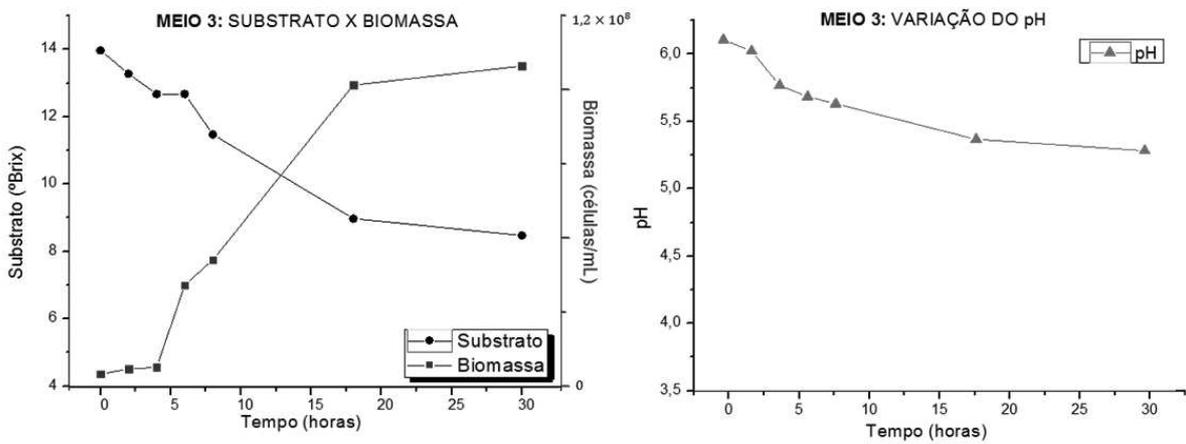


Figura 12: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 3.
Fonte: O autor.

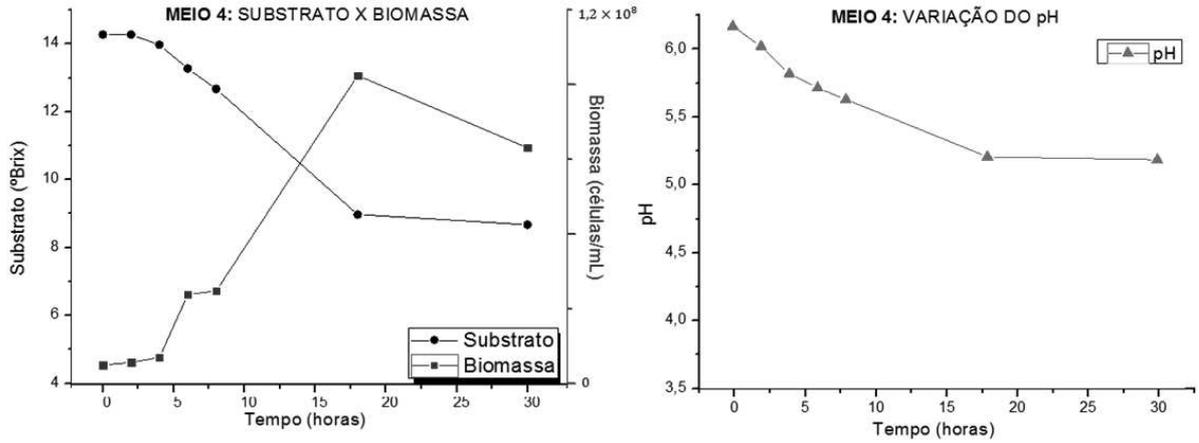


Figura 13: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 4.
Fonte: O autor.

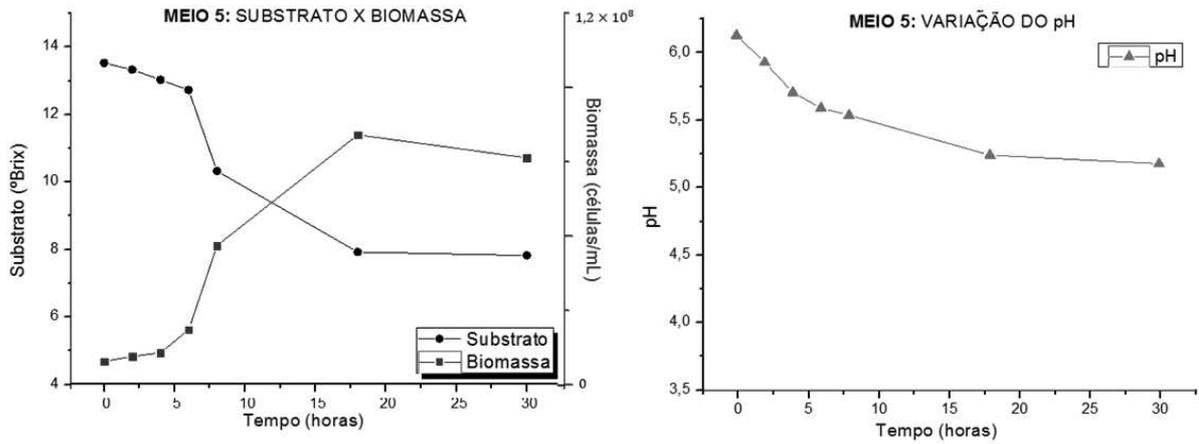


Figura 14: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 5.
Fonte: O autor.

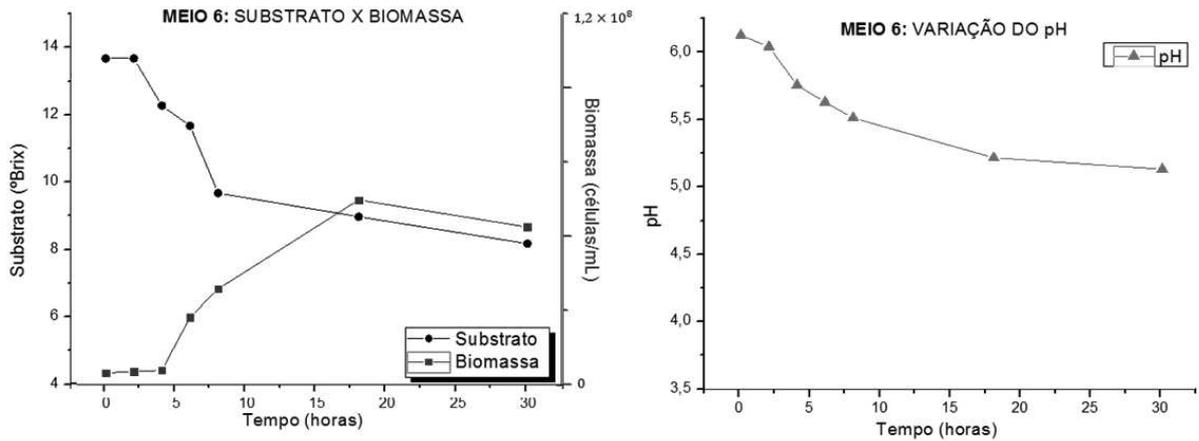


Figura 15: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 6.
Fonte: O autor.

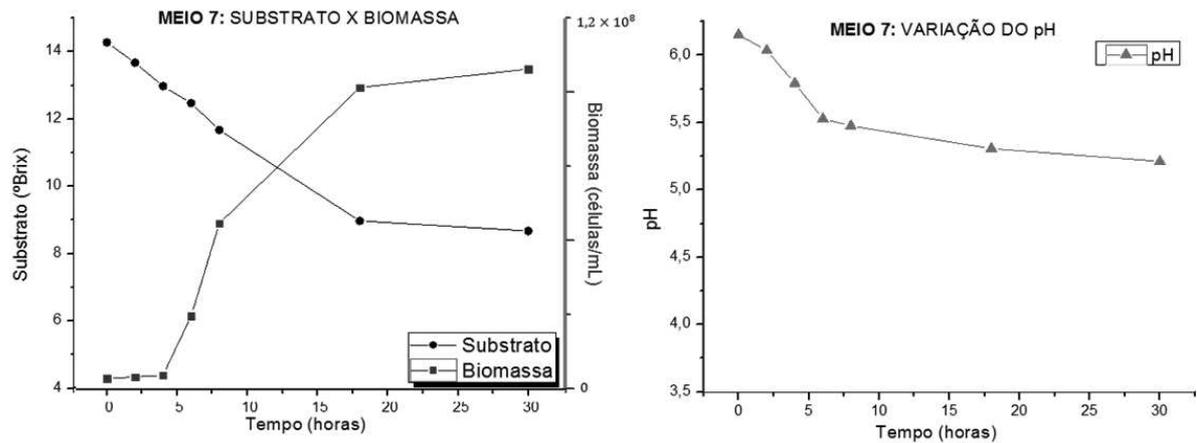


Figura 16: Variação de pH, consumo de substratos e formação de biomassa no Meio 7.
Fonte: O autor.

Em todos os meios fermentados retiraram-se amostras nos tempos 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 18h e 30h. O grande intervalo entre as amostragens de 8h e 18h se deve a inviabilidade de coletas no período noturno.

Na Tabela 5 pode ser visualizada a produção de etanol verificada ao final de 30h, além do rendimento (%) da produção de etanol.

Tabela 5: Teor alcoólico (%) observado ao final de 30 horas de fermentação.

Amostra	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7
(%) vol.	12,10	10,83	17,83	17,66	13,16	15,00	14,33
Rendimento(%)	65,81	58,90	94,90	92,02	72,63	81,58	74,67

A medida do teor alcoólico foi realizada apenas ao término da fermentação devido à pouca quantidade de permeado de soro de leite, sendo inviável a retirada de quantidade suficiente para determinação do teor alcoólico em todas as amostragens.

No Meio 1 (Figura 10), formado pelo meio sintético descrito na Tabela 3, observa-se que a fase log ocorreu a partir da 2^a hora e houve consumo de substratos até 9,0°Brix. A velocidade de conversão de glicose em etanol fica menor nas horas finais quando comparado com as horas iniciais. O rendimento do processo fermentativo foi consideravelmente baixo (65,81%) quando comparado com os resultados obtidos nos estudos de Oliveira (2006) e Oliveira (2010) que atingiu uma conversão de glicose em etanol até 88,5% na fermentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O resultados insatisfatório encontrado neste experimento pode estar diretamente relacionado ao rápido e significativo decaimento do pH, um

contaminante no processo fermentativo poderia vir a incitar a liberação de íons H⁺, tornando o meio consideravelmente mais ácido, expondo as leveduras a estresse osmótico e conseqüentemente a um baixo rendimento (BORTOLINI et. al., 2001).

O Meio 2 (Figura 11) era constituído apenas por permeado de soro de leite hidrolisado. Neste meio o consumo de substrato cessou em 8,7°Brix, a fase log ocorreu a partir da 2ª hora e o rendimento obtido foi de 58,90%. Em trabalhos realizados anteriormente, na fermentação do mesmo permeado de soro de leite, Baller (2014) obteve um rendimento de 82,89% na produção de etanol.

Bach (2014) fermentou soro de leite in natura desnatado e descreveu rendimento de 39,23% para a conversão de glicose em etanol, sendo que o autor justifica o baixo rendimento pela limitação de substratos essenciais para o crescimento adequado da *Saccharomyces cerevisiae*.

O Meio 3 (Figura 12) foi suplementado com extrato de levedura, que se caracteriza por conter altas concentrações de resíduos de levedura, proveniente da produção de cervejas ou qualquer outro processo fermentativo, que comumente são empregadas como aditivos na indústria alimentar. Estudos utilizam o extrato de levedura como fonte proteica no processo de fermentativo, sendo que este suplemente é uma importante fonte de nitrogênio, fator de extrema importância na fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*, pois auxilia na manutenção das células viáveis, aumentando a massa celular, colaborando dessa forma para uma melhor propagação das células de levedura para a produção de etanol (MALTA, 2003; JERONIMO, 2004).

Na fermentação do Meio 3 obteve-se o maior rendimento de conversão de glicose em etanol de todos os testes realizados (94,90%) e o teor alcoólico também foi o maior obtido. A fase log do processo iniciou no 4ª hora e a leitura dos sólidos solúveis no meio finalizou apontando 8,5°Brix, sendo este o meio que apresentou maior formação de biomassa durante as 30 horas de fermentação. Com este resultado é possível constatar a importância de uma fonte de nitrogênio no processo de fermentação da *Saccharomyces cerevisiae*, conforme descrito por Maia (1992), Malta (2003) e Jeronimo (2004).

O Meio 4 (Figura 13) foi suplementado com peptona, substrato proteico que serve também como fonte de nitrogênio (MAIA, 1992). A fermentação encerrou com 8,7°Brix de sólidos solúveis presentes no mosto, a fase log da fermentação ocorreu entre a partir da 4ª hora, sendo que na 30ª hora de fermentação já apresentou um

grande decréscimo na contagem de células viáveis. Este ensaio apresentou o segundo melhor resultados dos testes realizados apresentando um rendimento de 92,02% e um teor alcoólico de 17,66%, sendo que comparado ao Meio 3 este meio cessou a fermentação antes das 30 horas e atingiu resultados tão satisfatórios quanto o Meio anterior.

O Meio 5 (Figura 14) recebeu como suplemento ureia e apresentou o maior consumo de substrato de todos os meios testados, chegando a 7,8°Brix no final do processo fermentativo, em contrapartida a formação de biomassa não foi significativa, apresentando um rendimento de 72,63% e um teor alcoólico de 13,16%, considerado baixo se comparado aos meios proteicos testados.

A ureia também é uma fonte de nitrogênio, porém a levedura não assimila instantaneamente o nitrogênio quando este se encontra na forma de ureia, dessa forma pode-se explicar o baixo rendimento obtido neste meio (PINOTTI, 1991). Segundo Pinotti (1991) outro fator que pode ser decisivo no sucesso da adição de ureia ao meio a ser fermentado é a quantidade de suplemento adicionada. Neste estudo adicionou-se 0,1g/L de ureia, sendo que nos estudo desenvolvidos por Maia (1992) e Pinotti (1991) a quantidade adicionada era superior a quantidade utilizada neste estudo, sendo que quando adicionada em excesso, a ureia pode causar grande estresse osmótico nas leveduras, levando a inviabilidade das células mais rapidamente, prejudicando intensamente a produção de etanol.

O Meio 6 (Figura 15) foi suplementado com três diferentes sais: Sulfato de Amônia, Sulfato de Magnésio e Fosfato de Potássio. A fase log deste processo fermentativo ocorreu entre a partir 4ª hora, sendo que nas análises realizadas na 30ª hora observou-se que o número de células viáveis havia apresentado significativa redução, indicando o término da fermentação. Os sólidos solúveis permaneceram em 8,2°Brix, o rendimento alcançou 81,58% e teor alcoólico verificado foi de 15,0%. Embora tenha ocorrido o consumo de substratos, a formação de biomassa foi consideravelmente baixa.

O sulfato de amônio é utilizado com uma fonte nitrogenada, porém ele resulta em uma maior acidez do meio, que conseqüentemente causa estresse à levedura diminuindo a sua viabilidade e multiplicação. A adição de sulfato de magnésio e fosfato de potássio apresentam como objetivo inibir a acidez formada pelo sulfato de amônio, porém os resultados obtidos em estudo realizado por Malta (2001) evidenciaram que mesmo com a adição destes dois sais complementares não foi

possível manter a viabilidade celular e promover o crescimento. Se comparado com este estudo o presente ensaio obteve resultado mais expressivo, porém quando comparados a meios suplementados com substratos proteicos os resultados não são satisfatórios.

O Meio 7 (Figura 16) foi acrescido de extrato de malte, substrato proteico que age como fonte de nitrogênio no processo fermentativo. Neste ensaio o rendimento obtido foi de 74,67% e o teor alcoólico ao final de 30 horas foi de 14,33%. A fase log aconteceu entre a partir da 4ª hora, sendo que a fermentação cessou apresentando 8,7°Brix de sólidos solúveis. A formação de biomassa foi significativa, semelhante aos Meios 3 e 4, sendo que o baixo rendimento pode estar associado a quantidade de suplemento adicionada.

Em estudos anteriores desenvolvidos por Silveira (2003) e Martins (2013), os resultados encontrados pela primeira autora foram satisfatórios, porém a levedura utilizada pertencia uma linhagem diferente, já o segundo trabalho encontrou resultados semelhantes a utilização de extrato de levedura e peptona, porém quando utilizado em quantias menores as utilizadas no presente estudo.

5. CONCLUSÕES

- A suplementação do permeado do soro de leite para a produção de etanol pode atingir resultados mais satisfatórios quando comparados aos obtidos na fermentação do permeado de soro de leite puro;
- A partir dos testes realizados, a necessidade nutricional da *Saccharomyces cerevisiae* por fontes de nitrogênio se torna evidente, porém a dificuldade se encontra na melhor quantidade de suplemento a ser adicionada;
- O extrato de levedura e a peptona, dois suplementos proteicos que atuam como fonte de nitrogênio, proporcionaram os resultados mais satisfatórios neste estudo, apresentando um melhor rendimento e uma alta produção de etanol;
- Os suplementos a base de sais agem também como fonte de nitrogênio, apresentando melhores resultados se comparado com a fermentação do permeado do soro de leite puro, porém são necessários mais estudos para determinação de dosagens corretas a fim de evitar estresse osmótico nas leveduras impactando na produção de etanol.

6. SUGESTÕES

Sugestões para trabalhos futuros:

- Repetir os ensaios utilizando como inóculo cepas de outras leveduras;
- Realizar ensaios fermentativos combinando em diferentes concentrações os suplementos utilizados neste estudo, que apresentaram resultados positivos;
- Cálculo dos custos de viabilidade econômica para produção de etanol a partir do permeado de soro de leite à nível industrial.

7. REFERÊNCIAS

- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Volume 2. Rio de Janeiro 2010.
- ALMEIDA, A. F. S. de. **A Importância dos Biocombustíveis na Matriz Energética de Transporte Rodoviário do Brasil**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Março de 2006.
- ANDRADE, A. C. **Estudo da fermentação simultânea a hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de Proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manole, 2003.
- ASSUNÇÃO, G. M. **Uso do permeado de soro de queijo com e sem suplementação para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae***. V Simpósio de Engenharia Química, Maringá, 2013.
- BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e fracionamento das proteínas do Soro Lácteo através da tecnologia de Separação por Membranas**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- BACH, F.; FIORESE, M. L.; HASAN, S. D. M.; MAREJON, C. F. M. **Estudo da influência de variáveis no processo de produção de bioetanol de soro de leite**. ENGEVISTA, V. 16, n. 3, p.392-409, Setembro 2014.
- BALLER, L. D. **Estudo da hidrólise da lactose do permeado de soro de leite pela enzima β -galactosidase seguido da fermentação alcoólica**. Tese (Tese de Conclusão de Curso em Tecnologia em Processos Químicos) – Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal

do Paraná, Toledo, 2014.

BARBOSA, A. S.; ARAÚJO, A. S.; FLORÊNCIO, I. M.; BEZERRA, R. R. A.; FLORENTINO, E. R. **Estudo cinético da fermentação do soro de queijo coalho para a produção de aguardente**. Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil) v.5, nº3, p.237-254, julho/setembro de 2010.

BELINCANTA, J. **Coluna de para-destilação: análise das características hidrodinâmicas e de eficiência de murphree**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BETTIOL, V. R. **Estudo da influência do ClO₂ sobre membranas de Poliamida para osmose inversa**. Dissertação de mestrado, Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

Bortolini, F. **Comportamento das fermentações alcoólicas e acéticas de fermentados de kiwi (*Actinidia deliciosa*): composição dos mostos e métodos de fermentação acética**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Florianópolis – SC, 2001.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL S. O. **Biochemistry**. 7 ed. Canadá: Brooks/Cole Cengage Learning, 2012.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2º ed. Campinas, SP: Editora UNICAMP, 2003.

COLLA, L. M.; HERNÁNDEZ, C. P. **Congelamento de Descongelação – Sua influência sobre os alimentos**. Vetor, Rio Grande, 13: 53-66, 2003.

COLOGNESI G. O.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H.; ROIG S. M.; SUGUIMOTO H. H. **Produção de Etanol em Concentrado de Soro de Queijo Por *Saccharomyces fragili***. Anais do Congresso de Tecnologia em Alimentos. ITAL, São Paulo, 2013.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 01, de 23 de janeiro de 1986. Dispõe sobre critérios básicos e diretrizes gerais para a avaliação de impacto ambiental. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 de fev. 1986.

COSTA, D. C. **Caracterização e tratamento de efluentes resultantes da actividade de produção de queijo.** Dissertação de Mestrado – Engenharia do Ambiente – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa – Portugal, Maio de 2011.

IBGE. Tabulações especiais do censo Agropecuário 2013. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuario.pdf>>. Acesso em 18 de Março de 2015.

FLORENCIO, I. M. **Produção de etanol a partir de lactosoro industrial.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. n.10, v.10, p.1088-1092, 2013.

FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, SP, 2010.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; P., H. **Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana.** Rev. Nutr: vol. 19 n°4, Campinas July/Aug. 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia, São Paulo, 2008.

Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... Diário Oficial da União,

Brasília, p.13, 21 set. 2002.

JERONIMO, E. M. **O nitrogênio proteico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça.** Tese de doutorado. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004. 119 p.

LAYRARGUES, P. P., **Sistemas de gerenciamento ambiental, tecnologia limpa e consumidor verde: a delicada relação empresa–meio ambiente no eco capitalismo.** Revista de Administração de Empresas, São Paulo, n.2, v.40, p.80-88. 2000.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial.** Vol. 3. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2001.

MAGANHA, M. F. B. Guia técnico ambiental de produtos lácteos. São Paula: CEYESB, 2006, 89p. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em 14 de Abril de 2015.

MAIA, A. B. R. A. **Fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae*: desenvolvimento de um novo sistema e novas concepções sobre a formulação de meios.** . Tese de doutorado – Microbiologia. Belo Horizonte: UFMG, 1992, 210 p.

MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique.** Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006, 70p.

MIGLIORANZA, L. H. S. **Soro como solução e não como problema.** Food Ingredients, v.3, p.32, 2002.

MIZUBUTI, I. Y. **Soro de Leite: composição, processamento e utilização na alimentação.** Semina: Ci. Agr., Londrina, v.15, n.1, pg 80-94, março 1994.

OLIVEIRA, S. M. C. **Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos.** Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Universidade Estadual Paulista, 45 f, 2000.

OLIVEIRA, C. G. R. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) rica em organoselênio.** Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná, 2006.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcóolica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Engenharia Química. Uberlândia – MG, 2010.

PERRONE, Í. T. **Soro de leite: concentração, cristalização da lactose e secagem.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa – MG, 2010.

PINOTTI, R. F. **Quantificação do nível de nitrogênio nas etapas do processo de produção de álcool.** STAB, Piracicaba, v.10, n.1, p.34-35, 1991.

SANTOS, J. R. A.; GUSMÃO, N. B.; GOUVEIA, E. R. **Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 75-80, 2010.

SEAB, **Análise da Conjuntura Agropecuária: Leite no Brasil 2013/2014.** DERAL - Departamento de Economia Rural, Março de 2014. Disponível em: < http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/leite_2013_14.pdf >. Acesso em 14 de Abril de 2015.

SERPA, L.; PRIAMO, W. L.; REGINATTO, V. **Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica.** 2nd International Workshop | Advances in Cleaner Production – Key elements for a sustainable

world: Energy, Water and Climate Change. São Paulo, Brasil, Maio, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol. 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

SOUZA, K. M.; ANDRADE, A. C. e ARAÚJO, E. H. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. VI COBEQ - Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. UNICAMP 2005.

URBANO, Luiz Henrique; PINTO, Paulo Henrique Mendonça; CABELO, Claudio Cabelo. **Fermentação Alcoólica com *Saccharomyces cerevisiae* em mosto aerado de hidrolisados de amido de mandioca**. RETEC, Ourinhos, v.4, n.1, p.122- 141, jan./jun., 2014.

VIEIRA, A. M. T. **Estudo da hidrólise enzimática do soro de queijo utilizando as lactases lactozym® e prozyn®**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

ZACARCHENCO, P. B. et al. **Permeado de soro: aplicações que agregam valor aos coprodutos do leite**. Anuário Leite & Derivados. Ano XXI, n.131, São Paulo, 2012.