

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS

INDIARA RUTHELLI LUNARDI VIGNAGA

**OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO
PERMEADO DE SORO DE QUEIJO UTILIZANDO A LEVEDURA
*Saccharomyces cerevisiae***

DISSERTAÇÃO

TOLEDO
2017

INDIARA RUTHELLI LUNARDI VIGNAGA

**OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO
PERMEADO DE SORO DE QUEIJO UTILIZANDO A LEVEDURA
*SACCHAROMYCES CEREVISAE***

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Processos químicos e biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos químicos e biotecnológicos.
Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva

Coorientadores: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney e Prof. Dr. Clayton Antunes Martin

TOLEDO
2017

Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Câmpus Toledo

Programa de Pós-Graduação em Processos
Químicos e Biotecnológicos



TERMO DE APROVAÇÃO

OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO UTILIZANDO A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Por

INDIARA RUTHELLI LUNARDI VIGNAGA

Essa dissertação foi apresentada às 14 horas e 30 minutos do dia oito de novembro de dois mil e dezessete, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, Linha de Pesquisa de Processos Biotecnológicos, no Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados. Após deliberação, a banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

Prof.^a Dr.^a Gracinda Marina Castelo da Silva (Orientadora – PPGQB)

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Velez Escallón (Membro Interno – PPGQB)

Prof.^a Dr.^a Márcia Teresinha Veit (Membro Externo – UNIOESTE)

****A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação do PPGQB***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela constante proteção e amparo em todos os momentos, especialmente nos que pareciam impossíveis de serem superados.

A toda a minha família, especialmente aos pais Antonia e Leone, que sempre foram exemplo de caráter e determinação.

Ao Edu, pela sua compreensão, paciência e amor.

A Professora Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva, por toda orientação, suporte, atenção, dedicação e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Aos Professor Dr. Eduardo Bittencourt Sydney por todo auxílio prestado.

Ao Professor Dr. Clayton Antunes Martin, pelo incentivo e sugestões.

Ao Professor Dr. Eder Vieira Flores e ao departamento de Química Instrumental da UTFPR *câmpus* Medianeira pelo auxílio com as análises cromatográficas.

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Tecnológicos.

A todos os servidores da UTFPR, em especial aos técnicos de laboratório Danielle, Rafael, Caroline e Bruna pela prestatividade.

A empresa SOORO que forneceu a matéria-prima e concedeu os laboratórios para realização de ensaios.

A Vanessa T. Ferreira pela amizade, companheirismo, conhecimentos, sabedoria, apoio e motivação nos momentos de alegria e também nos difíceis.

A aluna de iniciação científica Luciana Rachow.

Aos novos amigos que fizeram com que tudo fosse mais prazeroso, Jaqueline, Claudinha, Daieni, Erika e Guilherme, além de TODOS os outros.

Aos amigos próximos Elizandra, Juka, Evelyn, Daiane, Juliano, Milena, Luci, que entenderam minhas ausências e sumiços, sempre se mostrando preocupados e dando aquele apoio.

Aos amigos e colegas de trabalho Arlindo, Nath, Alysson, Luiza, Leticia e a TODA a equipe do CQ.

E todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos; Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo – PR, Brasil, 104f.

O permeado de soro de queijo é um produto secundário das indústrias de laticínios com potencial aplicação em processos biotecnológicos fermentativos, uma vez que é rico em lactose e sais minerais. Este trabalho tem por objetivo produzir etanol através da *S. cerevisiae*, utilizando como meio de cultivo o permeado de soro de queijo fluido. Realizou-se uma caracterização do permeado, após o mesmo foi submetido a uma hidrólise enzimática, utilizando a enzima β -galactosidase 6000 U na concentração de 1,05 g/L, agitação de 200 rpm, 37,5 °C durante 120 minutos em biorreator. Uma avaliação cinética foi realizada através da fermentação em incubadora, conduzida a temperatura de 30 °C, pH inicial do meio em 5,00, sem suplementação e sem agitação durante 24 h. O segundo passo foi verificar o efeito das variáveis “temperatura”, “pH” e “suplementação” na produção de etanol. Aplicou-se um planejamento experimental composto central e metodologia de superfície de resposta. A partir dos melhores resultados encontrados no delineamento experimental uma segunda avaliação cinética foi realizada, desta vez em biorreator, promovendo o aumento de escala. A hidrólise do permeado de soro de queijo resultou em conversões acima de 92%. Na cinética preliminar o rendimento ($Y_{p/s}$) foi de 0,27 g/g e a produtividade foi de 1,65 g/L.h. O planejamento experimental apontou a variável “temperatura” como significativa ao nível de 95% na produção de etanol. Dentre as condições avaliadas, obteve-se o valor mais alto de etanol (22,42 g/L) quando o meio fermentativo foi mantido a 30 °C, com pH inicial de 6,30, e suplementado com 2 g/L de extrato de levedura e 1g/L de peptona. No experimento fermentativo em biorreator a produção de etanol foi de 22,45 g/L, a uma taxa de 1,70 (g/L.h) com um rendimento ($Y_{p/s}$) de 0,47 g/g. A redução na taxa de DQO foi de 30,15%. Desta forma, o estudo demonstrou que o permeado de soro de queijo é um produto secundário com grande potencial de aplicação na produção de etanol por leveduras, uma alternativa aos combustíveis fósseis. Ao fim do processo fermentativo verificou-se uma redução da carga orgânica inicial do permeado, sendo este um dos parâmetros vinculados a redução do impacto

ambiental, bem como a diminuição dos custos de processos de tratamento do efluente.

Palavras-chave: Planejamento experimental. Metodologia de superfície de resposta. Rendimento. Produtividade. Viabilidade celular.

Masters Dissertation; Biotechnological and Chemical Processes Graduate Program; Technological University of Paraná – Toledo – PR, Brasil. 104p.

The Cheese Whey Permeate is a byproduct of the dairy industry with potential for several applications in fermentative biotechnological processes, since it is rich in lactose and mineral salts. This paper aims to obtain ethanol with the aid of *S. cerevisiae*, using liquid cheese whey permeate as medium. The permeate was first characterized and then submitted to an enzymatic hydrolysis using the β -galactosidase enzyme 6000 U under a concentration of 1,05g/L, a 200 rpm stirring, under 37,5°C during 120 minutes in a bioreactor. Later, a kinetic evaluation was conducted through a fermentation in shaker, under the temperature of 30°C, initial medium pH of 5,00, with no extra supplementation and no stirring during 24h. The second step was to verify how temperature, pH and supplementation affect the ethanol production. A central composite experimental design and response surface methodology were applied. Using the best results obtained through the experimental design, a second enzymatic evaluation was conducted, this time in a bioreactor, allowing upscale. The cheese whey permeate hydrolysis resulted in conversion rates of over 92%. In the preliminary kinetics the yield ($Y_{p/s}$) was 0,27 (g/g) and the productivity was 1,65 (g/L.h). The experimental design displayed that the “temperature” have a level of significance of 95% in the ethanol production. Among all the evaluated conditions, the highest value of obtained ethanol was 22,42 g/L, when the fermentative medium was kept under 30°C, pH 6,30 and supplemented with 2 g/L of yeast extract and 1 g/L of peptone. In the bioreactor fermentative experiment, the value of obtained ethanol was 22,45 g/L, a rate of 1,70 g/L.h and a yield ($Y_{p/s}$) of 0,47 g/g. A 30,15% reduction in the DQO rate was achieved. Therefore, this paper presented that the cheese whey permeate is a byproduct of high potential of being applied in ethanol production using yeast. An alternative to the use of fossil fuels and allowing a reduction in the organic load of the original product, which is a parameter linked to the reduction of the environmental impact as well as to the reduction of costs related to wastewater treatment.

Key-words: Experimental design. Response surface methodology. Yield. Productivity. Cell viability

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina fosfato
BAM	<i>Bacteriological analytical manual</i>
CCRD	<i>Central composite rotational design</i>
Da	Dalton
DBO	Demanda biológica de oxigênio
DO	Densidade ótica
DQO	Demanda química de oxigênio
WPC	<i>Whey protein concentrate</i>
EST	Extrato seco total
FDA	Food drugs administration
g	Grama
GOS	Galacto-oligossacarídeos
ISO	<i>Organization for Standardization</i>
kDa	quilo Dalton
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	miliMolar
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
PSM	Processo de separação por membranas
RPM	Rotações por minuto
UPLC	Cromatógrafo liquido de ultra eficiência
UV-Vis	Ultravioleta-visível
YEPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
Y (p/s)	Conversão de substrato em produto (rendimento)
Y (x/s)	Conversão de substrato em biomassa
μ	Velocidade específica de crescimento
μ_p	Velocidade específica de formação de produto
μ_x	Velocidade específica de consumo de substrato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do processo de obtenção de queijo e soro de queijo.	17
Figura 2 – Representação da molécula da lactose	19
Figura 3 – Representação esquemática de um processo de separação por membranas com escoamento tangencial.....	23
Figura 4 – Representação da enzima β -galactosidase no processo de hidrólise da lactose.....	27
Figura 5 – Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>S. cerevisiae</i>	29
Figura 6 – Rota metabólica de fermentação alcoólica em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Figura 7 – Gráfico de superfície de resposta para μ_{max} (h) de <i>S. kudriavzevii</i> envolvendo as variáveis temperatura e pH. Concentração de açúcares de 116 g/L (50% de glicose + 50% de frutose)	36
Figura 8 – Alterações em μ_{max} (h) obtidas pela equação polinomial de levedura <i>S. kudriavzevii</i> em função do pH. Temperatura mantida em 24 °C e concentração inicial de açúcares em 200 g/L.....	37
Figura 9 – Representação esquemática das etapas posteriores à hidrólise, indicando as formas trabalhadas para esterilização.	41
Figura 10 – Representação esquemática das etapas de fermentação	43
Figura 11 – Cromatograma de amostra de permeado de soro de queijo hidrolisado	58
Figura 12 – (a) cromatograma obtido a partir de metabólitos de fermentação através do índice de refração e região do UV (210 nm). (b) Cromatograma dos padrões de ácido succínico, ácido láctico, ácido acético (2 g/L) e etanol (10%). (c) cromatograma do permeado de soro de queijo hidrolisado, com os picos identificados de acordo com os padrões e boletim técnico.....	59
Figura 13 – Acompanhamento da produção de biomassa celular (g/L) (\blacktriangle), consumo de substrato (g/L) (\blacksquare), produção de etanol (g/L) (\bullet), pH (\square) e viabilidade celular (%) (*) ao longo do tempo de fermentação: temperatura 30 °C, pH 5,00; sem adição de suplementos e sem agitação em fermentação do permeado de soro de queijo hidrolisado em <i>shaker</i> pela <i>S. cerevisiae</i>	63
Figura 14 – Acompanhamento dos metabólitos do processo fermentativo: ácido acético (g/L) (\blacktriangledown), ácido succínico (g/L) (\blacksquare), ácido láctico (g/L) (\bullet), ácido fórmico (g/L) (\blacktriangle) e etanol (\blacktriangleleft) ao longo do tempo de fermentação: temperatura 30 °C, pH 5,00, sem	

adição de suplementos e sem agitação.....	66
Figura 15 – Superfície de resposta de rendimento em função da temperatura (x) e pH (y)	73
Figura 16 – Gráfico do comportamento de interação das variáveis temperatura e pH como reflexo o comportamento da concentração de etanol.....	74
Figura 17 – Superfície de resposta da viabilidade celular (%) em função da temperatura (x) e pH (y).....	76
Figura 18 – Ensaio fermentativo em biorreator	77
Figura 19 – Acompanhamento da produção de biomassa celular (g/L) (▲), consumo de substrato (g/L) (■), produção de etanol (g/L) (●), pH (□) e viabilidade celular (%)(* ao longo do tempo de fermentação: temperatura 30 °C, pH 5,00; sem adição de suplementos e sem agitação em fermentação do permeado de soro de queijo hidrolisado em biorreator pela <i>S. cerevisiae</i>	77
Figura 20 – Esquema da câmara de Neubauer.....	100
Figura 21 – Cromatograma dos padrões na concentração de 2 g/L e 5%. Composto 1: ácido succínico (12,16 min.), 2 ácido láctico (13,07 min.), 3 ácido fórmico (14,32 min.), 4 ácido acético (15,51 min.) e 5 etanol (21,75 min.)	101
Figura 22 – Cromatograma do ponto 4 do planejamento experimental. Tempo de retenção em minutos <i>versus</i> detecção (Resposta mAU)	102
Figura 23 – Representação das quantificações dos ácidos orgânicos por ensaio do planejamento experimental.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição físico química do soro de queijo coalho.....	18
Tabela 2 – Composição do permeado de soro de queijo em fase líquida e em pó ...	24
Tabela 3 – Composição química do extrato de levedura seca	34
Tabela 4 – Variáveis investigadas no estudo de Yu, Zhang e Tan (2009), envolvendo fermentação do sorgo para obtenção de etanol através de células imobilizadas de <i>S. cerevisiae</i>	35
Tabela 5 – Variáveis e seus níveis codificados aplicados no planejamento composto central	47
Tabela 6 – Matriz do Planejamento composto central para a levedura <i>S. cerevisiae</i>	47
Tabela 7 – Ácidos orgânicos e etanol pesquisados e seus respectivos tempos de retenção	54
Tabela 8 – Caracterização do Permeado de Soro de Queijo Líquido e em Pó	56
Tabela 10 – Compostos quantificados através de cromatografia no permeado de soro de queijo hidrolisado	59
Tabela 11 – Avaliação microbiológica do permeado de soro de queijo no momento da coleta.....	60
Tabela 12 – Concentração de Lactose hidrolisada e suas respectivas concentrações durante o processo.....	61
Tabela 13 – Resultados encontrados na avaliação cinética da fermentação do permeado de soro de queijo hidrolisado pela <i>S. cerevisiae</i> realizado em incubadora.....	63
Tabela 14 – Comparativo entre a fermentação de permeado de soro de queijo hidrolisado e do meio YEPD acrescido de 20 g/L de glicose com tempo total de fermentação de 24 horas.....	68
Tabela 15 – Matriz do planejamento composto central com os resultados da produção de etanol, biomassa, viabilidade celular, conversão de substrato em biomassa, rendimento, produtividade de etanol e também de biomassa	70
Tabela 16 – Análise do modelo de regressão quadrática por meio da ANOVA ($R=0,8177$), obtido através da resposta (Etanol g/L). Em negrito estão os valores com $p<0,05$	71

Tabela 17 – Análise do modelo de regressão quadrática por meio da ANOVA ($R^2=0,8174$ e R^2 ajustado= $0,5826$). Em **negrito** estão os valores com $p<0,05$ 75

Tabela 18 – Equações da reta para cada ácido orgânico e seus respectivos valores de R^2 . Na equação o valor de x corresponde a área da integração do pico.....101

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVO GERAL	15
1.1.1 <u>Objetivos Específicos</u>	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 LEITE	16
2.2 QUEIJO	17
2.3 SORO DE QUEIJO	17
2.4 UTILIZAÇÃO DO SORO DO QUEIJO	20
2.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS	21
2.6 ULTRAFILTRAÇÃO	22
2.7 PERMEADO DE SORO DE QUEIJO	24
2.7.1 <u>Aplicações Biotecnológicas do permeado de soro de queijo</u>	25
2.8 HIDRÓLISE DA LACTOSE	27
2.9 FERMENTAÇÃO	28
2.9.1 <u>Leveduras</u>	29
2.9.1.1 <u>Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	30
2.9.2 <u>Fermentação alcoólica</u>	32
2.9.3 <u>Suplementação</u>	33
2.9.4 <u>Temperatura</u>	35
2.9.5 <u>pH</u>	37
2.9.6 <u>Agitação</u>	38
2.9.7 <u>Cinética</u>	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 MICRO-ORGANISMO	40
3.2 SUBSTRATO	40
3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	41
3.4 FERMENTAÇÕES ALCÓOLICAS DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO COM <i>A. S. Cerevisae</i>	42
3.4.1 <u>Inóculo</u>	42
3.4.2 <u>Avaliação das Condições de Fermentação</u>	43
3.4.2.1 <u>Avaliação cinética da fermentação do permeado de soro de queijo</u>	43
3.5. <u>CONVERSÃO DA HIDRÓLISE DA LACTOSE</u>	44
3.5.1 <u>Análise de açúcar redutor (glicose)</u>	44
3.5.2 <u>Cálculo da conversão da hidrólise da lactose</u>	45
3.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL	45
3.6.1 <u>Matriz do planejamento composto central</u>	46
3.6.2 <u>Condições das Fermentações referidas ao planejamento experimental</u>	47
3.6.3 <u>Fermentação da melhor condição obtida no delineamento experimental.</u> <u>Aumento de escala em biorreator</u>	48
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	49
3.7.1 <u>Caracterização do Substrato</u>	49
3.7.1.1 <u>Determinação do teor de proteína</u>	49
3.7.1.2 <u>Determinação do teor de gordura</u>	49
3.7.1.3 <u>Determinação dos Sólidos Solúveis – Graus Brix</u>	49
3.7.1.4 <u>Determinação de glicídios redutores em lactose</u>	50
3.7.1.5 <u>Determinação do pH</u>	50

3.7.1.6	Quantificação do teor de cinzas	50
3.7.1.7	Quantificação dos teores de Sódio e Potássio	51
3.7.1.8	Determinação da acidez	51
3.7.1.9	Caracterização dos açúcares e ácidos orgânicos no permeado de soro de queijo desidratado – em pó	51
3.7.1.10	Avaliação microbiológica do permeado de soro de queijo	52
3.8	PROCESSO FERMENTATIVO	52
3.8.1	<u>Determinação de biomassa</u>	52
3.8.2	<u>Viabilidade celular</u>	53
3.8.3	<u>Cálculos do rendimento em etanol (Y p/s), conversão de substrato em células (Y x/s) e produtividade de cada fermentação</u>	53
3.8.4	<u>Cálculos das velocidades específicas</u>	53
3.8.5	<u>Determinação do teor de etanol produzido e dos ácidos orgânicos presentes nas amostras</u>	54
3.8.6	<u>Análise da redução de DQO após o processo fermentativo</u>	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO	56
4.1.1	<u>Permeado de soro de queijo hidrolisado</u>	58
4.1.2	<u>Análises microbiológicas</u>	60
4.2	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO EMPREGADO NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS	61
4.3	FERMENTAÇÕES	62
4.3.1	<u>Avaliação cinética preliminar da fermentação do permeado de soro de queijo</u>	62
4.3.2	<u>Avaliação dos metabólitos secundários da fermentação por <i>S. cerevisiae</i></u>	66
4.3.3	<u>Comparação da fermentação em meio sintético e em meio contendo permeado de soro de queijo hidrolisado</u>	68
4.3.4	<u>Fermentações seguindo o planejamento composto central</u>	69
4.3.5	<u>Fermentação com aumento de escala em biorreator</u>	76
4.3.6	<u>Verificação da redução da taxa de DQO</u>	80
5	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO A	98
	Métodos Analíticos	98
	ANEXO B	104
	Tabela Teste F	104

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca no *ranking* dos países produtores de leite ocupando o quinto lugar, com uma produção média de 36,12 bilhões de litros (CONAB, 2017). A região sul do país ocupa o primeiro lugar, responsável pela produção de 35,7% da produção nacional, enquanto que a região sudeste ocupa o segundo lugar, com 34,6% do total (EMBRAPA, 2015; IBGE, 2016).

A composição do leite bovino apresenta variações de acordo com a raça do animal, espécie, alimentação, e principalmente a sazonalidade (HECK *et al.*, 2009). Em sua composição apresenta cerca de 87% de água, 4% de gordura, 3,5% de proteínas, 4,8% de lactose, e 0,7% de sais minerais (POULSEN *et al.*, 2015).

A utilização do leite na produção de queijos apresenta um rendimento médio de 9 litros de leite para cada quilo de queijo produzido, gerando em torno de 90% de soro de queijo (FOX, *et al.*, 2016), um produto secundário de alto valor nutritivo agregado, e que se descartado de forma incorreta no meio ambiente se torna um grande poluidor (ORTEGA-REQUENA, REBOUILLAT, 2015).

O soro contém cerca de 90% da água do leite, 98% da lactose, 25% da proteína e 50% dos sais inorgânicos. Dentre estes a proteína e a lactose possuem propriedades interessantes e originais. Avanços na tecnologia de isolamento de proteínas tornaram possível isolar e fracionar as proteínas do soro do queijo em forma não desnaturada, resultando em outros subprodutos: o concentrado proteico de soro (WPC – *Whey Protein Concentrate*) e o permeado de soro de queijo, este rico em lactose (FOX *et al.*, 2016).

Com uma elevada concentração de lactose, o permeado apresenta aplicação potencial como fonte de carbono na obtenção de produtos valiosos em processos biotecnológicos. Com o emprego de leveduras é possível produzir o bioetanol, uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis (RYAN, WALSH, 2016).

Pesquisas estão sendo desenvolvidas a fim de encontrar os melhores métodos e condições para a conversão da lactose a etanol, buscando melhorar a eficiência e rendimento do produto, uma vez que a matéria prima é barata, podendo alcançar retorno financeiro com a produção e comercialização e diminuir a carga poluidora do permeado.

1.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar o subproduto das indústrias de laticínios - permeado de soro de queijo como fonte alternativa de substrato na produção de etanol a partir da fermentação por leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1.1 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar o permeado de soro de queijo;
- b) Elaborar um planejamento experimental para obter as melhores condições de fermentação envolvendo variação de pH, temperatura e suplementação de nutrientes ao permeado;
- c) Avaliar a cinética de crescimento comparada às taxas de produção de etanol e ácidos orgânicos (metabólitos da levedura);
- d) Avaliar o efeito das melhores condições encontradas no delineamento experimental aplicando o aumento de escala em biorreator;
- e) Quantificar a redução das cargas orgânicas do permeado de soro de queijo após o processo fermentativo por meio da análise de DQO.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITE

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 2002).

O leite é uma combinação de diversos elementos sólidos em água. Os elementos sólidos representam aproximadamente 12 a 13% do leite e a água, aproximadamente 87%. Os principais elementos sólidos do leite são lipídios (gordura), carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. Esses elementos, suas distribuições e interações são determinantes para a estrutura, propriedades funcionais e aptidão do leite para processamento. As micelas de caseína e os glóbulos de gordura são responsáveis pela maior parte das características físicas (estrutura e cor) encontradas nos produtos lácteos (BRITO *et al.*, 2015).

Os componentes do leite permanecem em equilíbrio, de modo que a relação entre eles é muito estável. A composição do leite pode variar de acordo com o estágio de lactação: no colostro, o conteúdo de proteína é maior e o de lactose encontra-se reduzido. Outros fatores que podem interferir na composição do leite são: raça das vacas, alimentação (plano de nutrição e forma física da ração), temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, produção de leite e infecção da glândula mamária (BRITO *et al.*, 2015).

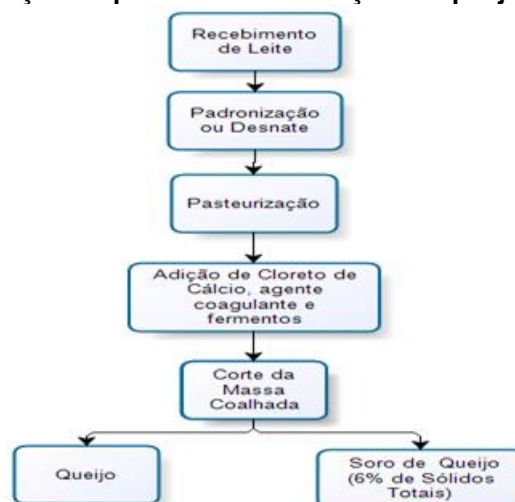
No *ranking* dos países produtores, o Brasil ocupa o quinto lugar, atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China. A região sul do Brasil foi responsável pela produção de 12,2 bilhões de litros. Dentre os estados o Paraná fica em terceiro lugar, atrás do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (EMBRAPA, 2014; SEAB, 2016). O Oeste paranaense é uma importante e tradicional região produtora de leite, onde se destacam municípios como Toledo e Marechal Cândido Rondon (SEAB, 2016).

2.2 QUEIJO

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar (MAPA, 1996; CARRASCOSA *et al.*, 2016).

A produção do queijo (Figura 1) inicia-se através do recebimento, padronização e pasteurização do leite, posteriormente armazenado em tanques onde ocorre a adição do coagulante. Após o corte da massa coalhada há a dessoragem, processo em que ocorre a liberação do soro do queijo (ZARCARCHENCO *et al.*, 2012; FOX *et al.*, 2016).

Figura 1 - Representação do processo de obtenção de queijo e soro de queijo.



Fonte: Adaptado de Zarcarchenco *et al.*, 2012.

2.3 SORO DE QUEIJO

Soro de queijo, também conhecido como soro de leite é um subproduto da coagulação enzimática do leite em pH 6,2 – 6,4 para obtenção de queijo nos laticínios (CAYOT, LORIENT, 1997; ORDOÑEZ, 2005). Após a separação da caseína do leite

pela ação da quimisona (renina) ou ácidos orgânicos ou minerais, o líquido remanescente é chamado de soro (ZACARCHENCO *et al.*, 2005).

O soro de queijo é um líquido opaco, amarelo-esverdeado ou mesmo azulado (METSAMUURONEM *et al.*, 2011; SMITHERS, 2008). Sua cor depende da qualidade e do tipo de leite usado e dos aditivos utilizados na fabricação do queijo, como urucum. Em termos de volume e em função das técnicas, utilizadas na produção de queijo, pode-se produzir de nove a dez quilos de soro, com uma média de dez litros de leite para cada quilo de queijo produzido (RICHARDS, 1997; ANDRADE, MARTINS, 2002; SMITHERS, 2008).

O soro consiste em moléculas de baixo peso molecular como a lactose, sais minerais e outros componentes em menor quantidade (TOLKACH; KULOZIK, 2005; PRAZERES, CARVALHO, RIVAS, 2012). Por muitos anos foi considerado um subproduto, a mudança do conceito mudou após estudos apontarem seu elevado valor nutricional. Cerca de 50% dos sólidos do leite vão para o soro juntamente a 98% da lactose e cerca de 25% da proteína. Dos componentes presentes no soro, a lactose e proteínas solúveis são os mais importantes (WALZEN *et al.*, 2002). Na Tabela 1 estão descritos os principais componentes do soro de queijo.

Tabela 1 – Composição físico química do soro de queijo coalho.

Componente	Valor apresentado
pH	6,59
Umidade (%)	93,10
Extrato seco total (%)	6,90
Acidez (°D)	10,70
Sais Minerais (%)	0,41
Densidade (g/L)	1024,90
Lactose (%)	3,73
Lipídeos (%)	0,46
Proteínas (%)	2,52

Fonte: Araujo, (2013).

Dentre as proteínas presentes no soro, as duas principais são as β -lactoglobulinas e as α -lactoalbuminas, que perfazem de 70 a 80% das proteínas (SGARBIERI, 1996). As demais proteínas são compostas por albumina do soro bovino (BSA), Imonoglobulinas (Ig), Lactoferrina, Glicomacropeptídeos, Proteose-peptonas, aminoácidos livres, dentre outras (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

As β -lactoglobulinas são, quantitativamente, a principal proteína do soro, e representam 10% da proteína total do leite ou cerca de 50% da massa proteica do

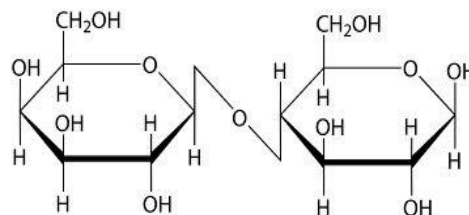
soro. A β -lactoglobulina contém 162 aminoácidos e apresenta massa molar de 18,362 kDa (YADA, 2004; RADE-KUKIC, SCHMITT, RAWEL, 2011). Sua estrutura apresenta 15% de α -hélices, 43% de estrutura β -pregueada e o restante não contém uma organização específica, sendo sensíveis a pH e temperatura (ANTUNES, 2003).

A α -lactoalbumina é a segunda proteína mais abundante no soro e representa aproximadamente 2% da proteína total do leite e 15 a 20% da proteína total do soro. Ela está presente no leite de todos os mamíferos, contém 123 aminoácidos, com massa molar de 14,1 kDa e representa 28% do teor total das proteínas do leite humano (FOX E MCSWEENEY, 1998; YADA, 2004; SGARBIERI, 2005).

Estas proteínas possuem alto valor agregado, pois, contém todos os aminoácidos essenciais (MC DONOUGH, 1997; UNITES STATES DAIRY EXPORT COUNCIL, USDEC, 1997; FERREIRA, 1997; BALDASSO, 2008; CARULLI *et al.*, 2011; BUND *et al.*, 2012). A lactose também é destaque, compondo cerca de 75% do soro, ela é fonte de material energético para diversos processos biotecnológicos, além de ser empregada como componente nas indústrias farmacêutica e alimentícia (SISO, 1996; COSTA, 1995; TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000).

A lactose (Figura 2) é um dissacarídeo formado por uma unidade de glicose e uma unidade de galactose, ligadas entre si por ligação glicosídica do tipo β -1,4.

Figura 2 – Representação da molécula da lactose.



Fonte – SOUZA; ANDRADE; ARAÚJO, 2005.

O soro de queijo é considerado um dos subprodutos mais poluentes da indústria de alimentos, possuindo elevada taxa de DBO e DQO. A DBO do soro varia de 30.000 mg a 50.000 mg de O₂ por litro de soro, valor aproximadamente cem vezes maior que do esgoto doméstico (COSTA, 1995; FARRO, 2003).

No fim do século 20, as legislações de vários países determinaram a disposição adequada do soro não tratado. Segundo Beucler *et al.*, (2005), a maior parte do soro de queijo produzido nos Estados Unidos era usada como adubo ou como ração (BEUCLER *et al.*, 2005; SMITHERS, 2008). Aproveitamento este que era responsável evitava o aumento de custos nas estações de tratamento de efluentes.

2.4 UTILIZAÇÃO DO SORO DO QUEIJO

Novas tecnologias e estudos vêm ao encontro de reaproveitar o subproduto soro de queijo na íntegra (RIBEIRO-SANTOS *et al.*, 2015). Carvalho (2012) testou a incorporação do soro de queijo na fabricação de sorvete de massa em substituição ao leite em diferentes níveis: 25, 50, 75 e 100%. O autor avaliou os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais no novo produto. O alimento final não apresentou variação significativa nos parâmetros, além de apresentar boa aceitação na análise sensorial. O autor verificou que o leite pode ser substituído pelo soro nas formulações de sorvete de massa, reduzindo o custo de produção.

A utilização do soro de queijo substituindo a água para produção de pães foi avaliada por SILVA *et al.*, (2011), gerando um produto mais nutritivo e rico em cálcio. A avaliação feita por análise sensorial mostrou boa aceitação, principalmente ao produto envolvendo o soro proveniente de leite de cabra.

Produtores rurais o utilizam na alimentação de gado leiteiro na sua forma *in natura* (LIZIERE & CAMPOS, 2006). David *et al.* (2010) aprimoraram a aplicação testando o efeito da adição de soro de queijo na alimentação de vacas em períodos de seca em substituição a suplementos ricos em uréia. Avaliaram os parâmetros sanguíneos e a digestibilidade dos animais no período em que foram submetidos a ingestão do soro de queijo. Concluíram que é uma alternativa viável em épocas que os animais são criados em condições reduzidas de nutrientes.

Burlani (2014) estudou a produção de etanol a partir da fermentação do soro e permeado de soro de queijo através da levedura *Kluyveromyces marxianus*. Avaliou através de um planejamento composto central o efeito de 3 variáveis, sendo elas o pH do meio, a concentração inicial de lactose disponível e também a temperatura de incubação. Os teores mais altos de etanol produzidos foram de 15,75 g/L em substrato composto por soro de queijo e 10,40 g/L em substrato contendo permeado de soro de queijo.

O autor também mostrou que há uma considerável redução nos valores de DQO dos subprodutos que no permeado era inicialmente de 138,8 g/L e após 24 h de fermentação reduziu a 49,5 g/L. No soro de queijo os valores encontrados foram de 101,2 g/L antes e 42,7 g/L após o tempo de fermentação.

Sansonetti *et al.* (2010) estudaram a otimização da fermentação do soro de queijo por metodologia da superfície de resposta, empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus*. Os resultados encontrados foram satisfatórios e mostram que a metodologia de superfície de resposta é uma poderosa ferramenta para extrair o máximo de informações pertinentes dos delineamentos experimentais. A otimização das condições foram com 32,35 °C para temperatura, 5,41 para o pH, 195 rpm para a taxa de agitação e 40 g/L para a concentração inicial de lactose. O tempo total de fermentação foi de 18 h. Ao término da fermentação os autores obtiveram um rendimento de 88%.

GUO *et al.* (2017) utilizaram o soro de queijo reconstituído para a produção de 2,3 butanodiol através das cepas de *Klebsiella pneumoniae* CICC 10781 e *K. oxytoca* CICC 215218.

Um modelo de planejamento Plackett-Burman e posterior planejamento composto central foram aplicados e os melhores resultados apontaram que a *K. oxytota* CICC 215218 quando submetida ao meio de cultura composto por 135 g/L de soro de queijo, 11,35 g/L de extrato de levedura, suplementado com sais (2 g/L de sulfato de amônio, 6 g/L de fosfato monopotássico, 14 g/L de fosfato dipotássico e 0,4 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado, 4 g/L de aceta do sódio trihidratado, e 4 g/L de citrato de sódio), pH ajustado em 6,5 durante as primeiras 8 horas de fermentação e depois deslocado até 6,00 até o fim da fermentação, temperatura de 35 °C e agitação mantida em 300 rpm, resultaram em uma produção máxima de 57,65 g/L de 2,3-butanodiol, um valioso composto químico que é empregado em processos industriais na fabricação de polímeros, tintas e perfumes.

Um fator limitante é que estes estudos não são encontrados em escalas industriais. Uma alternativa para o reaproveitamento do soro que é altamente vislumbrada pelas indústrias é a utilização da tecnologia de separação por membranas para obtenção do *Whey Protein Concentrate* (WPC) (BOSCHI, 2006).

2.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Os processos de separação por membranas (PSM) são operações unitárias

que utilizam membranas como meio filtrante no fracionamento de misturas, soluções e suspensões envolvendo espécies de tamanho e natureza química diferentes. Vêm sendo largamente utilizados nos processos de separação devido às vantagens apresentadas em relação a outros métodos, tais como: menor consumo de energia, permeabilidade seletiva da membrana, facilidade no escalonamento, além de poderem ser operados em condições moderadas de temperatura e pressão, e dependendo do processo sem a adição de produtos químicos (BOSCHI, 2006).

Os processos de separação por membranas que utilizam a diferença de pressão como força motriz são a microfiltração, a ultrafiltração, a nanofiltração e a osmose inversa. Esses processos diferenciam-se principalmente, pela estrutura da membrana e a intensidade do gradiente de pressão aplicado para ocorrer a separação da espécie desejada (COSTA, 1995).

2.6 ULTRAFILTRAÇÃO

A ultrafiltração é uma tecnologia que tem sido utilizada nas indústrias de laticínios há várias décadas. O processamento de soro representa um dos primeiros campos de aplicação de separação por membranas na indústria de laticínios e esta foi uma das pioneiras no desenvolvimento de equipamentos e técnicas de ultrafiltração (SOUZA, 2007; TORKAMANZADEH, *et al.*, 2016).

A técnica de ultrafiltração torna possível a melhoria da qualidade de tradicionais derivados do leite, para gerar novos alimentos que podem ser utilizados como produtos para a nutrição humana e como ingredientes à base de leite para ser usado em toda indústria de alimentos (FARRO, 2003; ATRA *et al.*, 2005; ZACARCHENCO *et al.*, 2005).

A ultrafiltração pode ser definida como processo de pressão dirigida na membrana para separação de substâncias que tenham peso molecular entre 10^3 e 10^6 Da (como as proteínas). Os solventes e certos componentes solúveis passam por meio da membrana e são coletados como permeado. Dependendo das características da membrana aplicada, alguns componentes da solução são retidos e concentrados como fração retentada (ATRA *et al.*, 2005; TORKAMANZADEH *et al.*, 2016).

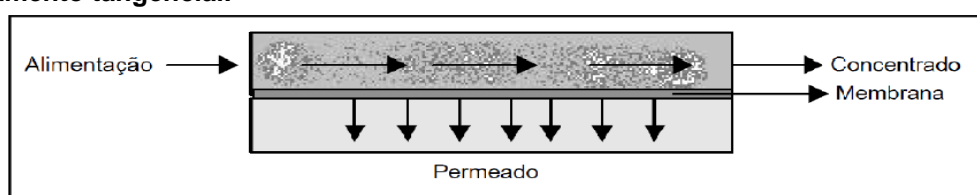
Tradicionalmente, o concentrado proteico do soro é produzido pela concentração de soro de queijo de 6.5% de sólidos para 20% por ultrafiltração, seguindo-se, conforme o caso, da dialfiltração para remoção de sais e açúcares (CHRISTENSEN *et al.*, 2006). A ultrafiltração do soro retém as proteínas no concentrado, enquanto que pequenas moléculas como a lactose e sais passam através da membrana e formam o permeado, o qual pode ser utilizado como meio de fermentação, pois, além de ter um grande teor de lactose, contém minerais e vitaminas (CAYOT, LORIENT, 1997; BRONSTEIN; MONTE ALEGRE, 1998).

Novas tecnologias têm sido desenvolvidas (nanofiltração, osmose inversa) para concentração da lactose, aumentando seu potencial de aplicação na indústria de doces (REKTOR; VATAI, 2004).

Os processos por concentração por membranas produzem maior concentração de α -lactalbumina no permeado, e retentado com maior concentração de β -lactoglobulina. A dialfiltração, usada para recuperar α -lactalbumina, é realizada pela adição de água deionizada ao retentado por concentração por nano ou ultrafiltração. A quantidade de água adicionada pode variar, mas na maioria dos casos utiliza-se cerca de 50% do volume de soro processado. Na dialfiltração, a água de lavagem adicionada ao retentado dilui as cinzas (minerais) e a lactose da fase aquosa. Com a nova passagem pela membrana, é possível obter um retentado com menos lactose e minerais (METSAMUURONEN *et al.*, 2011; KELLY, KELLY, 1995; BIRD, 1996).

O teor de proteína presente no soro pode ser concentrado a 35, 60, 70 e 80%, gerando o concentrado proteico de soro. Para a obtenção dos concentrados 35% e 60%, o soro é pasteurizado, clarificado e concentrado na sequência do processo de ultrafiltração. Ao final deste processo têm-se as duas frações: o permeado de soro de queijo e o retentado proteico (Figura 3). O retentado pode ser concentrado a vácuo e, destinado ao processo de secagem, geralmente secagem por atomização, obtendo-se como produto final o concentrado proteico de soro na forma desidratada, ou seja, em pó (RIBEIRO, 2001).

Figura 3 – Representação esquemática de um processo de separação por membranas com escoamento tangencial.



Fonte: BETTIOL, 2004.

2.7 PERMEADO DE SORO DE QUEIJO

O permeado de soro de queijo é a fração líquida obtida do processo para obtenção do WPC. Contem nutrientes importantes, como cálcio, fósforo, potássio e é rico em lactose. Atua no realce do sabor, de modo semelhante ao sal, sem integrar grandes quantidades de sódio ao produto em que é adicionado, se tornando um fator positivo na saúde do consumidor (U.S.D.E.C.A, 1997; STOLIAR, 2009).

A partir do permeado de soro pode-se, ainda, produzir mistura de sais minerais do leite e isolar oligossacarídeos. Esses componentes podem ter aplicação na formulação de vários produtos lácteos e não lácteos. A utilização do permeado do soro possibilita agregar ainda mais valor ao coproduto soro de queijo da indústria de queijos (ZACARCHENCO *et al.*, 2005). Uma das melhores formas da utilização do permeado é a submissão a processo de desidratação para obtenção do permeado em pó. No estado sólido os teores chegam a cerca de 85% de lactose e cerca de 15% de sais minerais (ZACARCHENCO, *et al.*, 2012).

Alguns autores caracterizaram o permeado de soro de queijo na fase líquida, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do permeado de soro de queijo em fase líquida e em pó

Parâmetros	BALLER, <i>et al.</i> (2015)	FONTES, <i>et al.</i> (2015)	**HU; DICKSON (2015)	*BURLANI (2014)	*ASSUNÇÃO (2014)	SMITH (2008)
pH	6,38	6,58	-	6,11	6,6	-
Lipídeos (%)	0	-	<2	0	-	-
Proteínas (%)	0,6	0,08	0,5 – 3,0	0,82	<0,18	<0,1
Sólidos Totais (%)	-	-	-	-	15	5,5
Cinzas (%)	0,79	0,41	6,0 – 20,0	0,32	0,82	0,5
Lactose (%)	10,9	-	70 - 90	6,60	15	4,9
Glicose (%)	-	-	-	-	<0,01	-
Acidez Total Titulável (% m/v)	-	0,056	-	-	-	-
Acidez °D	-	-	-	-	26	-
Umidade (%)	85,9	97,36	-	94,62	-	-
Sódio (mg/L)	-	374,4	-	-	-	-
Potássio (mg/L)	-	763,5	-	-	-	-
Cálcio (mg/L)	-	250,7	-	-	2024,04	-
Magnésio (mg/L)	-	52,04	-	-	-	-
Fósforo Total (mg/L)	-	-	-	-	1246,9	-
DBO (mg/L)	-	-	-	-	85314	-
DQO (mg/L)	-	-	-	138800	168100	-

*Produto em pó reconstituído

**Produto em pó

Baller *et al.*, (2015) e Assunção (2014) encontraram valores muito próximos de pH e teor de cinzas, enquanto que o permeado caracterizado por Smith (2008) apresenta um teor de sólidos totais inferior aos demais, tendo os menores valores encontrados para lactose e proteínas.

Em razão do alto conteúdo de nutrientes, o descarte do permeado de soro de queijo no meio ambiente, assim como do soro do queijo, causa danos ambientais (EL-KHAIR, 2009). Nos dados apresentados por Assunção (2014) e Burlani (2014) evidencia-se elevadas taxas de DQO e DBO.

A lactose no estado líquido apontada pelos autores Baller *et al.*, (2015), Burlani (2014), Assunção (2014) e Smith (2008) variou de 4,9 a 15%, valor este que pode alcançar 90% quando em pó (HU; DICKSON, 2015).

O permeado de soro em pó contém em média, 1% a 3% de proteínas. O soro de queijo contém em média, 12% a 13% de proteínas (STOLIAR, 2009). Na alimentação humana o permeado pode ser utilizado na forma condensada ou em pó, sendo a forma em pó geralmente preferida por apresentar maior tempo de armazenamento, podendo ser modificado e/ou misturado com outros produtos servindo a propósitos específicos (RUBEZ, 1998).

Burlani (2014) e Assunção (2014) trabalharam com o permeado reconstituído, partiram de uma concentração de produto em pó e a hidrataram com água. No presente estudo utilizou-se o permeado de soro de queijo no estado fluido, coletado imediatamente após ser ultrafiltrado.

2.7.1 Aplicações biotecnológicas do permeado de soro de queijo

Durán-Padilla *et al.*, (2014) utilizaram o permeado de soro de queijo como substrato na fermentação através do micro-organismo *Clostridium acetobutylicum* na produção de butanol. Suplementaram o meio fermentativo com FeSO₄ devido aos baixos índices de ferro no substrato inicial e concluíram que o permeado é uma fonte viável de açúcares para a produção do butanol desde que se adicione concentrações adequadas de fontes de ferro.

Diniz *et al.*, (2014) otimizaram a produção de etanol a partir de permeado de

soro de queijo empegando a levedura *Kluyveromyces marxianus*. Através da metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology* – RSM) e delineamento composto central rotacional (*Central Composite Rotational Design* – CCRD) avaliaram o efeito de 4 fatores em diferentes níveis: pH, Temperatura, Concentração Inicial de Lactose e Concentração Inicial de Biomassa. Na validação dos melhores ensaios encontrados com o delineamento experimental obtiveram um rendimento na produção de etanol de cerca de 90%.

Geier *et al.*, (2016) empregaram a enzima β -galactosidase obtida a partir do micro-organismo *Streptococcus thermophilus* na hidrólise do permeado no intuito de produzir galacto-oligosacarídeos (GOS). Os autores obtiveram uma hidrólise com 90% de conversão da lactose presente no substrato e um rendimento de GOS próximo a 50%. Também reforçam os interesses nutricionais do GOS tanto na nutrição humana como animal e apresentam uma nova alternativa viável ao permeado de soro de queijo.

Borges *et al.*, (2016) testaram a produção de bio-óleo e remoção da carga orgânica utilizando a microalga *Scenedesmus* sp. Os testes empregaram soluções padrão de lactose, glicose, frutose e galactose, posteriormente avaliaram outros dois substratos ricos em lactose: permeado de soro de queijo e soro de queijo. Os autores obtiveram resultados satisfatórios com o soro de queijo, mostrando que é possível trata-lo e ainda gerar um novo produto.

Parashar *et al.*, (2016) incorporaram o permeado de soro de queijo no processo de fermentação tradicional do trigo para obtenção de etanol. Nos experimentos substituíram a água por permeado hidrolisado em 5, 10, 15 e 20% do processo de moagem do trigo para obtenção do mosto fermentativo. Como inóculo empregaram a *S. cerevisiae*. Os autores concluíram que a grande quantidade de sais presente no permeado não influenciou negativamente no processo fermentativo, encontrado as melhores condições com 10% de substituição. Os autores apontaram estudos futuros com grande potencial envolvendo outros grãos, como o milho por exemplo.

A *S. cerevisiae* é incapaz de metabolizar a lactose, uma alternativa para fermentação do permeado de soro de queijo reportada por Hahn-Hagerdal (1985) é a co-imobilização da *S. cerevisiae* com a enzima β -galactosidase em alginato de cálcio, onde em seu estudo submetendo a fermentação a tal condição obteve uma produção de 52 g/L de etanol, com produtividade de 4,5 g/L.h em sistema de alimentação contínua de permeado de soro de leite a 15%. Tais resultados foram superiores as

fermentações envolvendo *K. fragilis* imobilizada, que produziu 13 g/L de etanol com uma produtividade de 1,1 g/L.h.

Alguns autores realizaram a abordagem de criação de cepas híbridas envolvendo a *S. cerevisiae*. Taya *et al.*, (1984), Farahnak *et al.*, (1986), Riu *et al.*, (1991) produziram uma cepa híbrida de *S. cerevisiae* e *K. lactis*, que foi capaz de fermentar a lactose presente no permeado e no soro de queijo e produzir mais etanol, a uma taxa mais elevada quando comparada a fermentação por apenas *K. lactis*, comportamento este observado em todos os trabalhos.

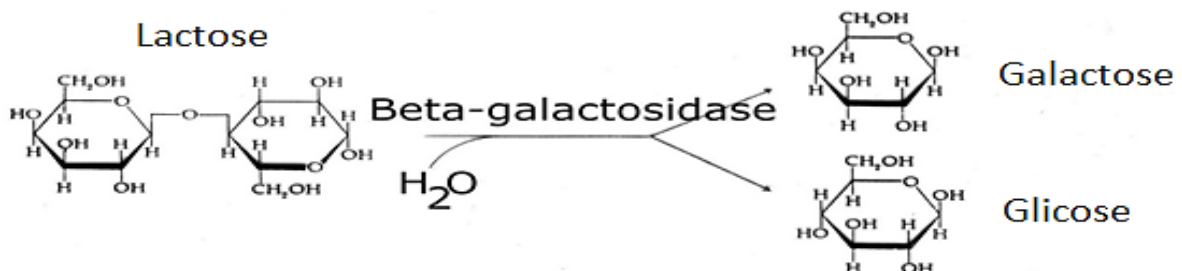
De acordo com a caracterização apresentada na Tabela 2, o permeado de soro de queijo possui uma fração considerável de lactose, e para que possa ser aplicado em processos fermentativos pela *S. cerevisiae*, uma das alternativas é a hidrólise enzimática.

2.8 HIDRÓLISE DA LACTOSE

Para possibilitar a conversão da lactose em etanol, é necessário através da reação de hidrólise enzimática, converter a lactose que é um açúcar não fermentescível em dois monossacarídeos fermentescíveis, que são glicose e galactose, para serem fermentados pela *Saccharomyces cerevisiae* (BALLER; DA SILVA; BOMBARDELLI, 2015).

A enzima lactase também conhecida como β -galactosidase, é empregada como catalisador na reação de hidrólise da lactose, forma como produtos os monômeros glicose e galactose, conforme representado na Figura (4) (SOUZA; ANDRADE; ARAÚJO, 2005).

Figura 4 - Representação da enzima β -galactosidase no processo de hidrólise da lactose.



Fonte: Adaptado de SOUZA; ANDRADE; ARAÚJO, 2005.

A β -galactosidase pode ser encontrada nos vegetais tais como amêndoas, pêssego, damasco, maçã e bragas de café, em órgãos de animais – intestino, cérebro, placenta – e também pode ser produzida por fungos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*), bactérias (*Escherichia coli*, *Bacillus sp.*) e leveduras (*Kluyveromyces lactis*) (VITOLLO, 2001; BARBOSA; ARAÚJO, 2006).

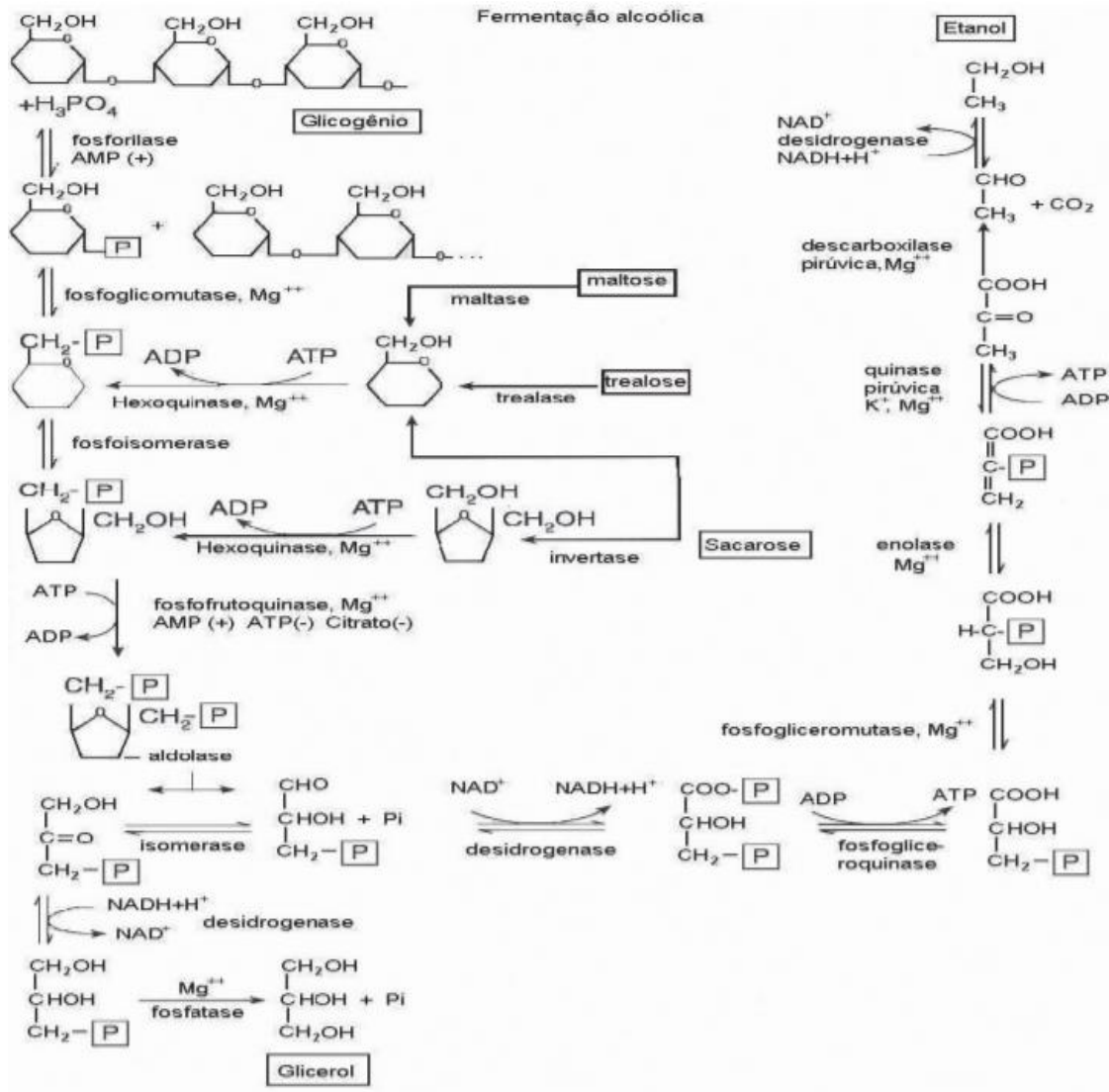
Além do aproveitamento da lactose contida no permeado como substrato para leveduras na produção de etanol, este co-produto pode também ser empregado na produção de ácido láctico e lactatos através da fermentação. Isso já vem acontecendo desde 1930, e hoje juntamente com o soro de queijo é o subproduto mais usado para este fim (PONSANO e CASTRO-GOMES, 1995).

2.9 FERMENTAÇÃO

De acordo com conceitos bioquímicos, a fermentação pode ser definida como um conjunto de trocas de decomposições químicas produzidas pela atividade de micro-organismos vivos em um substrato orgânico (SILVA, 2000).

A transformação do açúcar (glicose) em etanol e CO₂, envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica, conforme indicado na Figura 5. Essas enzimas, referidas como “glicolíticas”, sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura, dentre outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo (LIMA *et al.*, 2001; CHANDEL *et al.*, 2007).

Figura 5 – Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *S. cerevisiae*.



Fonte: Lima; Basso; Amorim, 2001.

2.9.1 Leveduras

Micro-organismos são utilizados para a produção de alimentos, entre eles estão as bactérias, bolores e leveduras. Em processos fermentativos, os micro-organismos mais utilizados são as leveduras, principalmente na indústria cervejeira, pois elas metabolizam os constituintes do mosto em etanol e também seus co-produtos, produzindo cervejas com maior qualidade, além de estabilidade satisfatórias (CARVALHO, 2006).

O objetivo primordial das leveduras, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização de diversos trabalhos fisiológicos (absorção, excreção e outros) e biossínteses, necessários à manutenção da vida, crescimento e multiplicação para perpetuar a espécie. O etanol e CO₂ resultantes da fermentação se constituem, tão somente, de produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose.

Entretanto, o etanol, bem como outros produtos da excreção (como o glicerol e ácidos orgânicos) podem ser oxidados metabolicamente, gerando mais ATP e biomassa, mas apenas em condições de aerobiose (LIMA *et al.*, 2001).

2.9.1.1 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura pertencente ao reino Fungi, não patogênica e unicelular. É um micro-organismo aeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (ausência de oxigênio molecular) (LIMA *et al.*, 2001). Podem crescer em temperaturas entre 0 e 40°C, porém sua temperatura ótima está compreendida entre 31 e 34°C.

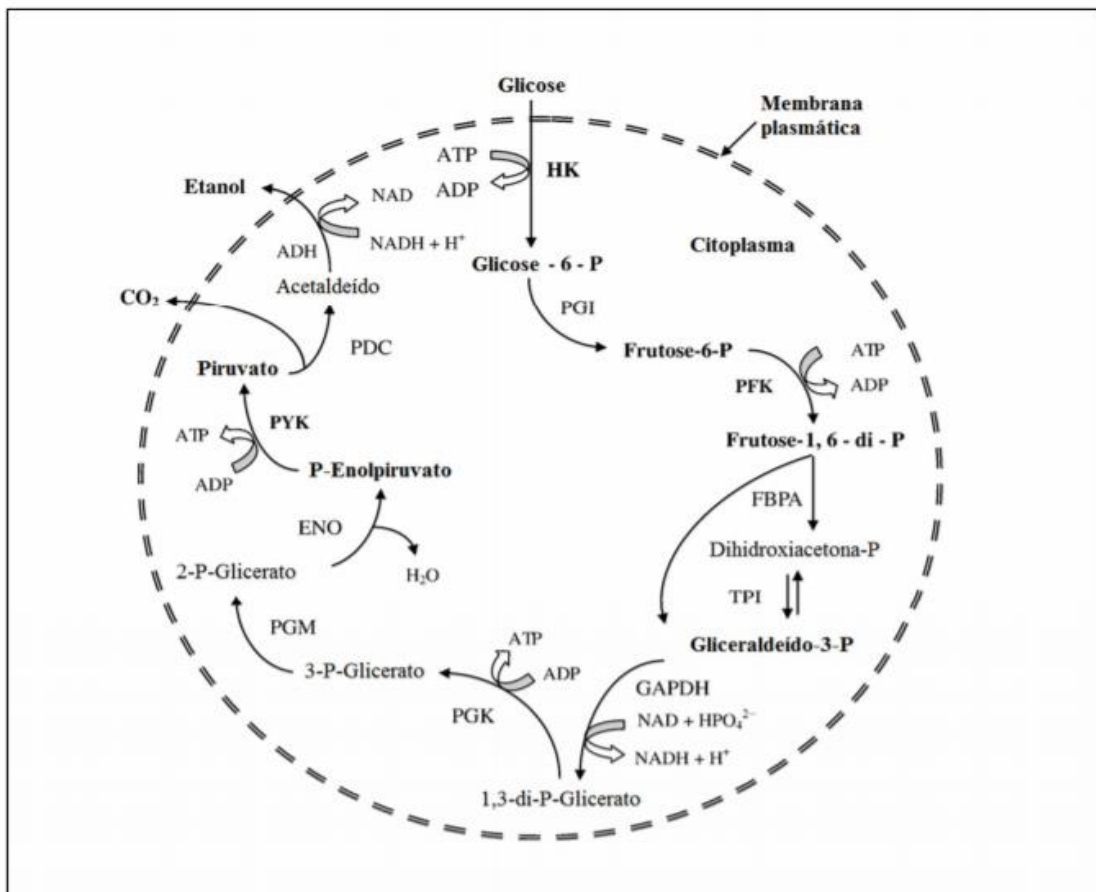
É de fácil manejo e se reproduz por brotamento, além de se proliferar prontamente em meio de cultura simples. Está amplamente distribuída na natureza, sendo frequentemente encontrada na superfície de folhas e frutos sob a forma de um pó de coloração branca, e tem participação fundamental nos processos de fermentação industrial (AZEVEDO, 2005). Sua preferência em aplicações é justificada por conta da facilidade de seu isolamento e manutenção, pouca exigência nutricional, bom crescimento em meios constituídos por resíduos industriais e sua reconhecida capacidade em produzir enzimas extracitoplasmáticas (NEVES, 2003).

Os produtos finais da metabolização do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Enquanto uma porção do açúcar é transformado em biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂ em anaerobiose, processo denominado de fermentação alcoólica. Os

carboidratos considerados substratos para a fermentação, tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura (LIMA *et al.*, 2001; AZEVEDO, 2005; SUZART; DIAS, 2007).

A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica em leveduras é a glicólise (rota Embden-Meyerhof-Parnas ou EMP), através da qual uma molécula de glicose é oxidada e duas moléculas de piruvato são produzidas (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2000). Na Figura (6) observa-se o mecanismo de formação de etanol a partir de glicose em leveduras (BAI, ANDERSON, MOO-YOUNG, 2008).

Figura 6 – Rota metabólica de fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de BAI, BASSO e MOO-YOUNG (2008). Abreviaturas: HK: hexoquinase; PGI: fosfoglicoisomerase; PFK: fosfofrutoquinase; FBPA: frutose bifosfato aldolase; TPI: triose fosfato isomerase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK: fosfoglicerato quinase; PGM: fosfogliceromutase; ENO: enolase; PYK: piruvato quinase; PDC: piruvato descarboxilase; ADH: álcool desidrogenase.

Devido a importância dos processos tecnológicos envolvendo a levedura *S. cerevisiae*, quer na panificação, na produção de cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas ou ainda na produção de um combustível alternativo e renovável, tal micro-organismo pode ser considerado o eucarioto mais estudado e cujo metabolismo é o

mais conhecido (WIESIOLEK, 2007).

2.9.2 Fermentação alcoólica

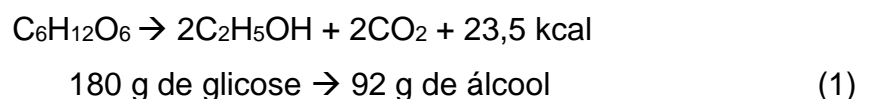
Na fermentação alcoólica, os substratos (açúcares) são transformados em produtos (etanol), e parte da energia (ATP) gerada é usada para a produção de biomassa (células). Assim, as concentrações de substrato (açúcar), produto (etanol) e células (levedura) variam com o tempo da fermentação. Lima *et al.*, (2001) definem a variação dessas concentrações como cinética química do sistema.

O preparo do substrato fermentativo consiste no tratamento da matéria prima para dela se extraírem os açúcares fermentescíveis.

Entre as matérias açucaradas distingue-se os substratos diretamente fermentescíveis e os não diretamente fermentescíveis. Os primeiros são as que contem monossacarídeos e se limitam ao suco de frutas. As não diretamente fermentescíveis são as que contêm os dissacarídeos, que fermentam após uma hidrólise, à qual se dá o nome da inversão, e que se realiza naturalmente pela ação da invertase, enzima produzida pelo agente de fermentação (LIMA *et al.*, 2001).

Em condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido posteriormente a etanol com a liberação de uma molécula de gás carbônico. Teoricamente, o rendimento é 0,511 g de etanol e 0,489 g de gás carbônico em relação a 1 g de glicose metabolizada. Dois ATPs produzidos na glicólise são utilizados para direcionar a biossíntese de macromoléculas, o que envolve uma grande variedade de reações que requerem energia. Sem o consumo contínuo de ATPs pelas células em crescimento, o metabolismo glicolítico é interrompido imediatamente, pois o acúmulo intracelular de ATP inibe a fosfofrutoquinase (PFK), uma das enzimas mais importantes envolvidas na regulação da glicólise (BAI, ANDERSON, MOO-YOUNG, 2008; BACH, 2009).

De acordo com a equação estequiométrica de Gay-Lussac (Equação 1), citado por Kunkee e Amerine (1970), o rendimento da fermentação alcoólica é expresso em quantidade de produto formado (etanol) por unidade de açúcar consumido.



Cada 100 g de glicose fornece 51,1 g de álcool ou 64,6 mL de álcool (densidade igual a 0,79). Porém, nem todo açúcar é transformado em álcool, praticamente considera-se que 1 °Brix fornece 0,5 °GL de álcool (GAVA, 2002).

O gênero *Saccharomyces*, representado por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, tem se adaptado, muito bem, às condições industriais de fermentação (NOBRE, 2005). A via fermentativa é a maneira mais importante para obtenção do etanol no Brasil, é uma maneira economicamente viável devido ao grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país (LIMA, *et al.*, 2001).

Em torno de 95% da produção mundial de etanol é realizada via processo fermentativo a partir de cultivares agrícolas, utilizando como substratos açúcares simples, tais como o disponível na cana e na beterraba, ou a partir de meios que contenham amido, como o milho e o trigo (MUSSATTO, *et al.*, 2010).

No Brasil, a produção de etanol pelo método convencional apresenta problemas relacionados à sustentabilidade, podendo reduzir a biodiversidade, contaminar águas e liberar gases do efeito estufa em função da queima da palha residual das fontes de açúcar (STRAPASSON, JOB, 2006). Diante destas condições, a produção de etanol a partir de fontes alternativas de carbono surge como maneira viável entre as fontes não convencionais de obtenção de energia (ZAFAR *et al.*, 2005), tal como o soro e o permeado de soro de queijo.

2.9.3 Suplementação

A composição do meio de cultura desempenha um papel fundamental nos processos de produção de biomassa ou obtenção de metabólitos. A disponibilidade de substâncias de crescimento é fundamental para o ótimo desempenho do micro-organismo (OLIVEIRA, 2006).

Dentre os nutrientes utilizados, o nitrogênio, na forma do íon amônio (NH_4^+), é utilizado por ser o responsável por 8 a 12% da massa seca, os peptídeos podem ser absorvidos pelas células, dentre eles destacam-se os hidrolisados enzimáticos de proteínas, como a peptona e a caseína hidrolisada. O magnésio é um co-fator de muitas reações metabólicas, o fósforo auxilia na síntese dos ácidos nucleicos e é

importante para o metabolismo energético e, o potássio atua em algumas etapas do metabolismo além de ser ativador em algumas reações da glicólise (OLIVEIRA, 2006, SANTOS, 2008).

Quando trabalha-se com a fermentação do soro, o mesmo contém em sua composição cerca de 2,5% de proteínas, porém em fermentações do permeado de soro de queijo esta fração proteica é reduzida a menos de 0,5%. Audic, Chaufer e Daufin (2003) indicam que a suplementação do permeado com fontes alternativas de nitrogênio favorecem o desenvolvimento do micro-organismo.

Wenzel e Oester (2007) indicaram a utilização de suplementos como extrato de levedura e peptona de carne, devido seu baixo custo e fácil obtenção, além dos altos teores de nitrogênio.

O extrato de levedura além do nitrogênio, contém uma série de macro nutrientes, conforme pode ser observado na Tabela 3, de acordo com estudos realizados por Sgarbieri (1999).

Tabela 3 – Composição química do extrato de levedura seca.

Componente	(%)
Proteína (N x 5,8)	61,54
Ácido ribonucleico	6,90
Lipídios	1,89
Cinzas	12,5
Fibra total	2,70
Fibra solúvel	2,70
Fibra insolúvel	0

Fonte: Sgarbieri, 2009.

O alto valor de proteínas presente no extrato de levedura, assim como na peptona as viabilizam como fonte de nitrogênio ao meio fermentativo. As quantidades adicionadas aos experimentos do presente estudo seguiram os estudos de Assunção *et al.*, (2014) que trabalharam com 2 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de peptona. Esta condição foi avaliada no planejamento experimental, sendo fixada como ponto central, variando no ponto baixo a ausência de suplementação e no nível alto 4 e 2 g/L de extrato de levedura e peptona, respectivamente.

Yu, Zhang e Tan (2009) em estudo publicado avaliaram o efeito do fósforo e do nitrogênio como suplementação ao sorgo na fermentação por *S. cerevisiae* imobilizada.

O trabalho envolveu a aplicação da metodologia de superfície de resposta para identificar o efeito de variáveis individuais e obter as condições ótimas para a produção de etanol. Os autores trabalharam variando os níveis de acordo com a Tabela 4, através de um planejamento experimental 2^3 , composto por 16 experimentos, acrescidos de 3 ensaios no ponto central para estimar o erro.

Tabela 4 – Variáveis investigadas no estudo de Yu, Zhang e Tan (2009), envolvendo fermentação do sorgo para obtenção de etanol através de células imobilizadas de *S. cerevisiae*.

Variáveis	Níveis codificados		
	-1	0	1
pH	3	5	7
Fósforo (g/L)	0,131	0,701	1,271
Nitrogênio (g/L)	1,479	2,009	2,539

Fonte: Yu, Zhang e Tan (2009).

Após realização do planejamento experimental os autores realizaram ensaios para validar o método proposto com as melhores condições obtidas no delineamento experimental, onde incluíram uma avaliação da reutilização das células imobilizadas.

As melhores condições foram apontadas com o emprego de 0,77 g/L de fósforo, 2,15 g/L de nitrogênio e pH inicial de 6,39. A taxa de produção de etanol quando cessada a fermentação foi de 122,85 g/L h. O coeficiente de correlação foi de 0,992. Ainda concluíram que na validação do método, nestas mesmas condições é possível reutilizar por 10 ciclos fermentativos o conjunto de células imobilizadas.

2.9.4 Temperatura

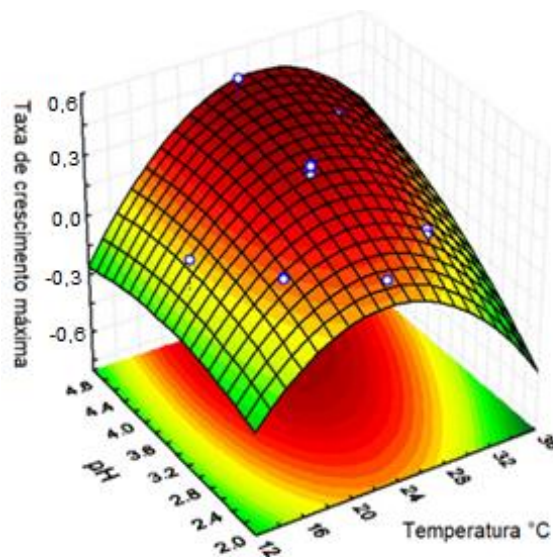
A temperatura de fermentação é outra variável importante ao processo fermentativo, em que a baixa temperatura permite obter alto rendimento em etanol, não somente pela fermentação mais completa, mas também por minimizar a perda por evaporação no caso de dornas abertas.

As leveduras são mesófilas, sendo assim, as temperaturas ótimas tanto para o desenvolvimento da levedura quanto para a produção de etanol estão na faixa de 25 a 35°C. Com o aumento da temperatura, aumenta a velocidade da fermentação, porém, favorece a contaminação bacteriana além de enfraquecer as leveduras,

tornando as mais suscetíveis aos danos causados pela toxidez do etanol (LIMA *et al.*, 2001). Temperaturas inferiores a 25 °C diminuem a atividade da levedura (SOUSA, MONTEIRO, 2011).

López *et al.*, (2009) avaliaram o efeito da temperatura, pH e concentração de açúcar nos parâmetros de crescimento de cepas híbridas de *Saccharomyces* em meio sintético, por meio da metodologia da superfície de resposta aplicada a um planejamento composto central. Trabalharam com o pH variando de 2,10 até 4,60, concentração inicial de açúcares de 110 a 278 g/L e temperatura variando de 12 a 36 °C. A temperatura foi a variável que mais interferiu positivamente no valor de velocidade máxima de crescimento (μ_{max}), apesar do pH e da concentração inicial de açúcares também serem significantes ($p < 0.05$). Através do gráfico de superfície de resposta (Figura 7) é possível observar que a temperatura mantida na faixa de 24 a 27 °C no decorrer da fermentação proporcionou os melhores valores de μ_{max} .

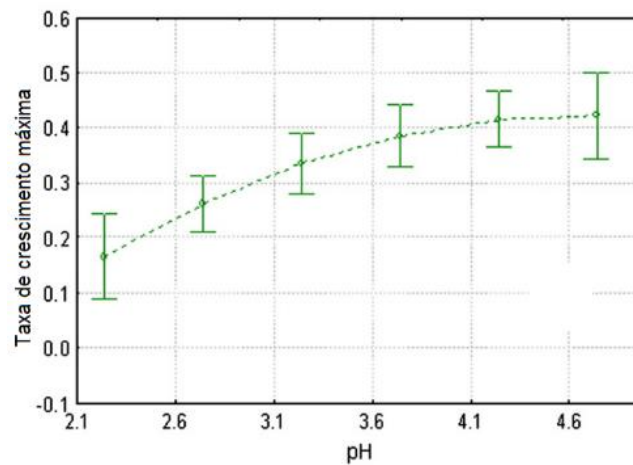
Figura 7 – Gráfico de superfície de resposta para μ_{max} (h) de *S. kudriavzevii* envolvendo as variáveis temperatura e pH. Concentração de açúcares de 116 g/L (50% de glicose + 50% de frutose).



Fonte: Adaptado de López *et al.*, (2009).

Apesar dos autores não considerarem o efeito do pH significativo, seu trabalho traz um gráfico (Figura 8) de equação polinomial que mostra a taxa de crescimento máxima aumentando a medida em que o pH é elevado. Tal fato sugere que o pH influencia de forma positiva sobre a taxa de crescimento das leveduras.

Figura 8 - Alterações em μ_{max} (h) obtidas pela equação polinomial de levedura *S. kudriavzevii* em função do pH. Temperatura mantida em 24 °C e concentração inicial de açúcares em 200 g/L.



Fonte: Adaptado de López *et. al.*, (2009).

2.9.5 pH

O pH é, sem dúvida, uma importante variável a ser considerada em um cultivo de microrganismos pois cada cepa utilizada terá um valor ótimo de pH na qual deverá ser cultivada. As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo as mais adequadas entre 4 e 5 para a *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação alcoólica inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,3 (LIMA *et al.*, 2001). Aumentando-se o pH até 7, observa-se, uma diminuição do rendimento em etanol, com aumento da produção de ácido acético (ALVES, 1996).

Fermentações alcoólicas em meios mais ácidos propiciam maior produção de etanol, pois restringe o crescimento do micro-organismo, reduzindo a produção de glicerol e a contaminação microbiana (LIMA *et al.*, 2001). Entretanto, uma avaliação deve ser feita sobre as condições de pH necessárias para que ocorra reprodução da levedura, pois valores fora da faixa de atividade da levedura causam a sua inatividade.

Ebrahimi *et al.*, (2017) durante estudo para produção de bioetanol empregando *S. cerevisiae Hansen 2055* em meio contendo casca de arroz hidrolisada encontraram a melhor condição em pH 4,8 em meio anaeróbio. Os teores encontrados chegaram a 10,61 g/L de etanol.

Trigueros *et al.*, (2016) avaliaram a fermentação do permeado de soro de queijo

hidrolisado através da levedura *Saccharomyces boulardii* com foco na produção de biomassa. Mostraram através da modelagem da taxa de crescimento específico da levedura que a faixa ideal para multiplicação do micro-organismo está entre 4,5 a 5,5.

2.9.6 Agitação

A agitação promove um aumento da capacidade de transferência de massa e calor, além de proporcionar uma maior área de contato entre as leveduras e a fonte de carbono, tornando o meio homogêneo (SOUSA, MONTEIRO, 2011). De acordo com Chaves (2006), a agitação insere ar no mosto, favorecendo o desempenho das leveduras e, conseqüentemente, contribui para a transformação completa dos açúcares fermentescíveis. O oxigênio se faz necessário no processo de multiplicação das leveduras.

O excesso de agitação pode ser prejudicial ao processo que visa produção de etanol, pois, a levedura possui dois tipos de metabolismo celular, o oxidativo e o fermentativo. O metabolismo oxidativo ocorre na presença de oxigênio, em que a levedura pode apresentar o efeito “pasteur” oxidando os carboidratos por respiração e estimulando a multiplicação intensa. Entretanto, na ausência de oxigênio o metabolismo passa a ser fermentativo, ocorre assim a produção de etanol e gás carbônico (HASHIZUME, 2001; LIMA, 2011).

2.9.7 Cinética

Para estudos cinéticos, Nascimento *et al.*, (2009) e Lima *et al.*, (2001) apontam o acompanhamento dos parâmetros de acordo com codificações: como substrato, chamado de “S” elege-se o composto que limita a reação; o produto denomina-se “P”, e finalmente “X”, como a concentração do micro-organismo, chegando-se assim à S=glicose, P=produto (etanol) e X=biomassa (levedura).

É possível comparar quantitativamente as diferentes condições do cultivo

através da diferença entre as concentrações finais e iniciais (denominadas dX , dP e dS). Devido ao fato de X (concentração celular) variar com o tempo e como consequência a concentração do complexo enzimático responsável pela conversão S-P.

Guidini (2013) avaliou a cinética da fermentação de diferentes cepas industriais floculantes de *S. cerevisiae*, visando apontar a cepa que proporcionaria os valores mais altos de rendimento e produtividade. O meio de cultura empregado foi uma solução contendo concentrações conhecidas de sacarose (180 g/L), KH_2PO_4 (5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L). Os frascos foram incubados por 24 horas a temperatura ambiente, e a concentração inicial de inóculo representou 10% do meio fermentativo.

Os resultados apresentados pela autora expressos em Y (p/s) variaram de 0,37 (g/g) para a cepa com menor valor de rendimento e 0,50 (g/g) para a cepa que mais converteu substrato em etanol. Os valores de produtividade ficaram entre 2,20 e 3,60 (g/L.h) respectivamente.

Toniato (2013) em seu estudo comparou o comportamento cinético de quatro linhagens de leveduras *S. cerevisiae*, três utilizadas nas usinas de fermentação e produção de etanol (CAT-1, PE-2 E BG-1), e um fermento seco de panificação industrial (UNIFERM®). Trabalhou com a fermentação de 3 meios de cultura distintos: caldo de cana, melaço e mosto misto, este composto por frações iguais de caldo de cana e melaço. Os meios foram padronizados através de diluição a 15 °Brix, durante 10 horas em sistema sem agitação a temperatura ambiente.

O autor observou que a linhagem PE-2 foi a que apresentou maior rendimento, expresso pelo valor de Y (p/s) de 0,44 (g/g), seguido das linhagens CAT-1 (0,43 (g/g)), linhagem de panificação (0,42 (g/g)) e BG-1 (0,36 (g/g)) todas em meio composto apenas por melaço, o qual proporcionou os resultados mais altos de etanol.

Através da cinética, verificou os maiores valores de μ_p para a linhagem de panificação, que se mostrou superior as outras leveduras e em todos os meios avaliados. Os valores de μ_p foram de $0,25 \text{ h}^{-1}$ em meio contendo somente melaço, $0,84 \text{ h}^{-1}$ em meio contendo somente caldo de cana e $0,22 \text{ h}^{-1}$ em meio misto.

Deste modo o conhecimento da cinética de formação dos produtos e crescimento do micro-organismo se mostram relevantes para determinar se é possível otimizar o processo fermentativo, adequando a fermentação ao produto de interesse.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida a partir do fermento biológico da marca Fleischmann®TM. Esta foi ativada em meio YEPD (extrato de levedura, peptona e glicose), contendo extrato de levedura (5 g/L), peptona de carne (10 g/L) e glicose (20 g/L), conforme CASAL *et al.*, (2004), em incubadora com agitação orbital (marca Toth, modelo 6430) a 100 rpm, pH 7,0 e temperatura de 30 °C, por 24 h, sendo empregada nas fermentações para obtenção de etanol.

3.2 SUBSTRATO

O substrato utilizado foi o permeado do soro de queijo na forma fluida cedido por uma fábrica de laticínios, localizada na região oeste do Paraná.

O permeado de soro de queijo foi coletado de um tanque de armazenamento em um recipiente de 60 litros, o qual foi homogeneizado e fracionado em frascos de 1 litro.

A sua caracterização físico química e microbiológica do substrato foi realizada no mesmo dia da coleta nos próprios laboratórios físico-químico e microbiológico da empresa que o cedeu. Após a coleta e caracterização o permeado de soro de queijo foi mantido congelado a temperatura de $- 8,0 \pm 2$ °C.

Para a realização dos experimentos, o permeado de soro de queijo foi descongelado sob refrigeração a temperatura de $3,0 \pm 2,0$ °C por 24 h. Os experimentos foram realizados em seguida para não alterar as propriedades físico-químicas do permeado de soro de queijo (ISO 6887-2).

3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Devido a lactose no permeado ser um dissacarídeo redutor não metabolizado pela levedura *S. cerevisiae*, optou-se pela hidrólise com a enzima comercial β -galactosidade, obtida da espécie *Kluyveromyces lactis*, da marca Lactomax Super®TM 6000U da empresa Prozyn®.

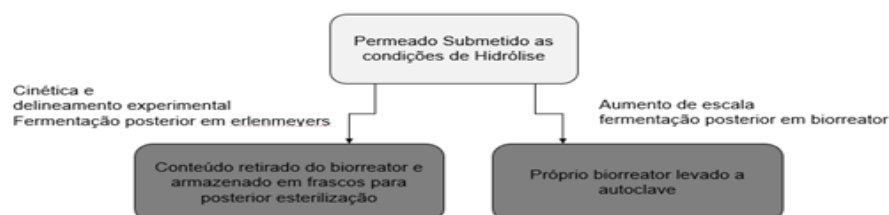
A hidrólise foi conduzida com uma adaptação das melhores condições experimentais descritas por Baller; Silva; Bombardelli (2015). Empregou-se a concentração de 1,05 g L⁻¹ da enzima lactase para cada litro de permeado, sendo então submetido a uma agitação de 200 rpm a 37,5 °C em biorreator da marca Tecnal modelo TEC-BIO-FLEX, com capacidade de 7 litros por 120 minutos. Após este período o permeado de soro de queijo foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos em autoclave horizontal (marca Phoenix modelo AV-225), visando a inativação da enzima lactase e também sua esterilização.

Realizou-se um acompanhamento da reação de hidrólise, através da quantificação de glicose, por meio do kit enzimático-colorimétrico, da marca Glicose Liquiform – Labtest. Conforme descrito por Pelczar Jr. *et al.*, (1996), a quebra de um mol de lactose libera um mol de glicose um mol de galactose, tornando a determinação de glicose suficiente para monitoramento da hidrólise.

A reação de hidrólise foi realizada antes do início de cada etapa do processo fermentativo, sendo hidrolisada quantidade suficiente de permeado de soro de queijo para cada conjunto de experimentos: i) ensaios envolvendo a avaliação cinética, ii) ensaios para a condução do delineamento experimental, e iii) ensaios para condução do experimento de aumento de escala em biorreator.

A sistemática de esterilização do permeado de soro de queijo hidrolisado após o processo de hidrólise, seguiu conforme é apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Representação esquemática das etapas posteriores à hidrólise, indicando as formas trabalhadas para esterilização.



Fonte: A autora.

Após a realização da hidrólise o permeado de soro de queijo hidrolisado foi retirado do biorreator e armazenado em frascos de vidro com capacidade de 1000 mL e levado para a autoclave, onde foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Neste momento ocorreu a inativação da enzima lactase.

Retirado da autoclave e deixado esfriar até temperatura ambiente o permeado hidrolisado autoclavado foi mantido em refrigeração a 3 °C até o momento da realização dos ensaios de fermentação.

No experimento de aumento de escala, o próprio biorreator foi levado a autoclave, sendo submetido a temperatura de 121 °C por 30 minutos, visando a esterilização do equipamento contendo o meio de cultura, bem como a inativação da enzima. Retirado da autoclave o biorreator foi conectado ao sistema de controle de temperatura para resfriamento até a temperatura de início do ensaio de fermentação.

3.4 FERMENTAÇÕES ALCÓOLICAS DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO COM *A Saccharomyces cerevisiae*

3.4.1 Inóculo

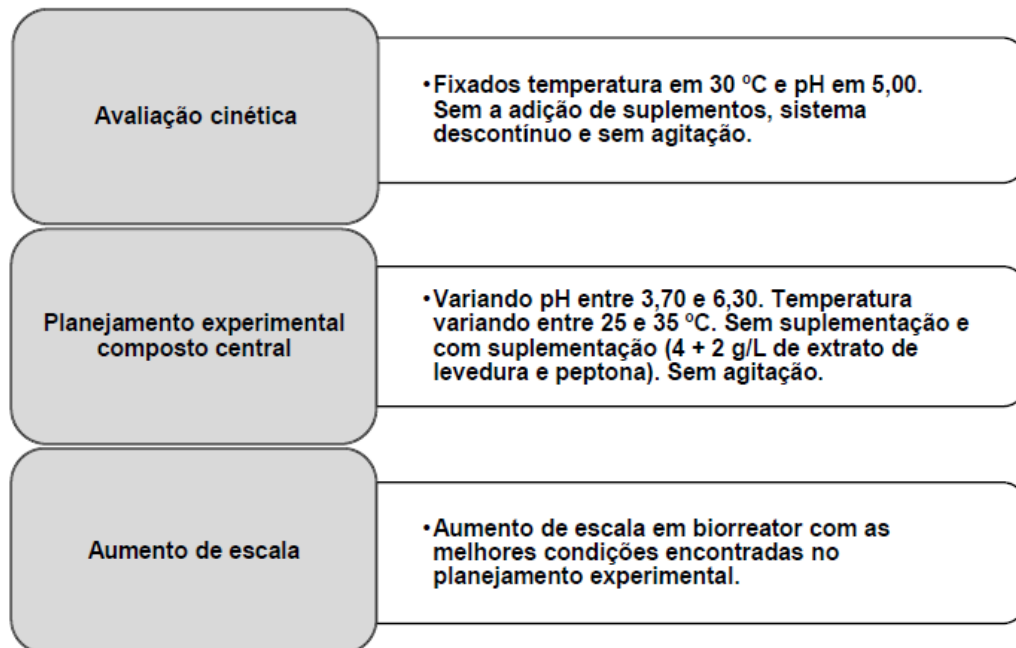
O inóculo foi preparado em erlenmeyer com capacidade de 125 mL contendo o meio utilizado para a ativação da cepa (YEPD), previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Para as fermentações os inóculos foram preparados através da padronização da concentração celular para densidade ótica a 600nm (DO) igual a 1,00 empregando um espectrofotômetro marca PG *Instruments*, modelo T80+ (GABARDO, 2015).

Os erlenmeyers contendo as leveduras foram mantidos a temperatura de 30 °C, por 24 horas em incubadora (marca Toth, modelo 6430) com agitação orbital a 100 rpm. A fim de reduzir a fase de adaptação do micro-organismo ao meio a ser fermentado, adicionou-se 10% do meio inóculo ao meio fermentativo (SANSONETTI *et al.*, 2010).

3.4.2 Avaliação das Condições de Fermentação

Realizou-se uma avaliação cinética inicial, seguido de um planejamento experimental composto central, envolvendo as variáveis pH, concentração de suplementação e temperatura, conforme indicado na Figura 10.

Figura 10 – Representação esquemática das etapas de fermentação.



Fonte: A autora.

3.4.2.1 Avaliação cinética da fermentação do permeado de soro de queijo

Na avaliação da cinética do processo fermentativo, empregou-se como inóculo a *S. cerevisiae*. Preparou-se em erlenmeyers de 125 mL individuais 90 mL de meio fermentativo, contendo somente permeado de soro de queijo previamente hidrolisado e autoclavado. Adicionou-se um ensaio contendo somente meio YEPD acrescido de 40 g/L de glicose, visando a comparação ao permeado hidrolisado e autoclavado, submetido as mesmas condições experimentais. Os ensaios fermentativos foram realizados em duplicata.

Adicionou-se 10 mL do meio inóculo (10% do volume total do meio fermentativo) aos erlenmeyers previamente preparados. O pH foi ajustado com ácido cítrico até 5,00. As fermentações foram conduzidas em sistema descontínuo e anaeróbio em

incubadora (marca Toth, modelo 6430) a temperatura de 30 °C por um período de 24 horas. O método de amostragem com coletas pré-definidas a cada 2 horas seguiu o mesmo aplicado na pesquisa de Sansonetti *et al.*, (2010). Para os experimentos contendo meio YEPD a amostragem foi realizada apenas ao término das 24 horas de fermentação.

Em cada alíquota retirada realizou-se a contagem de células através da câmara de Neubauer (Anexo A) para cálculo da viabilidade celular, determinou-se o pH, quantificou-se a glicose restante, a biomassa resultante, e também a produção de etanol e ácidos orgânicos, dentre eles o ácido succínico, láctico, fórmico e acético.

Ao fim do processo fermentativo calculou-se os valores de produtividade de etanol, produtividade de biomassa, conversão de substrato em biomassa, rendimento expresso em conversão de substrato em etanol, velocidade específica de crescimento celular, formação de etanol e também de consumo de substrato, com o emprego de planilha de cálculos eletrônica, construída de acordo com o proposto por Hiss (2013).

3.5 CONVERSÃO DA HIDRÓLISE DA LACTOSE

Neste item estão descritas as metodologias empregadas para avaliar o processo de hidrólise do permeado de soro de queijo

3.5.1 Análise de açúcar redutor (glicose)

A determinação da quantidade de açúcar redutor (glicose) foi realizada empregando o kit enzimático-colorimétrico próprio para glicose Liquiform, da marca Labtest.

Transferiu-se 24 µL da amostra previamente diluída para um tubo de ensaio juntamente com 2400 µL do reagente de cor (reagente 2). Um padrão foi realizado com a substituição da amostra pelo reagente padrão (reagente 1), e uma prova em

branco utilizando água destilada.

Todos os tubos foram homogeneizados e levados ao banho-maria, a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, realizou-se as leituras em espectrofotômetro UV-Vis PG *Instruments*, modelo T80+ em um comprimento de onda de 505 nm. Para o cálculo, utilizou-se a Equação (2):

$$Glicose \left(\frac{g}{L} \right) = \left\{ \frac{\left[\left(\frac{100}{Pad} \right) \cdot Am \cdot Dil \right] \cdot 10}{1000} \right\} \quad (2)$$

Em que:

Pad = Absorbância do padrão;

Am = Absorbância da amostra;

Dil = Diluição da amostra.

3.5.2 Cálculo da Conversão da Hidrólise

A conversão da lactose em glicose e galactose foi obtida de acordo com a Equação (3):

$$Conversão \% = \frac{[lactose\ inicial] - [lactose\ não\ hidrolisada]}{lactose\ inicial} \times 100 \quad (3)$$

3.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL

Após a avaliação cinética do comportamento da levedura *S. cerevisiae* na fermentação do permeado de soro de queijo, construiu-se um planejamento experimental composto central avaliando o efeito das variáveis de entrada pH, temperatura e concentração de suplementação.

O pH do meio fermentativo foi avaliado no planejamento experimental, de modo que o ponto mais alto representasse o pH do próprio meio fermentativo sem ajuste,

os níveis alto e baixo foram variados de acordo com a faixa ideal indicada na literatura. Os valores adotados para a variável 'pH' foram de 3,7, 5,0 e 6,3 (LIMA *et al.*, 2001; NEUMANN *et al.*, 2008; SOUZA, 2009; PASSOS, SILVA, 2014), visando encontrar tal valor que propicie o melhor desempenho do processo fermentativo.

Estudou-se a variável 'temperatura' no delineamento aplicando a faixa entre 25 e 35 °C, com o ponto central fixado em 30 °C.

Os níveis de 'suplementação' envolveram a avaliação do meio fermentativo puro sendo o nível baixo, 2 g/L de extrato de levedura e 1g/L de peptona, no ponto central e 4 e 2 g/L caracterizando o nível alto.

3.6.1 Matriz do planejamento experimental

A matriz do delineamento experimental e suas codificações estão apresentadas na Tabelas 5 e 6. Trabalhou-se fundamentalmente com planejamento experimental composto central, com a adição de 3 pontos centrais para verificação da linearidade dos experimentos. No momento da construção do planejamento, optou-se pelo modo aleatório, esta prática evita erros sistemáticos.

Tabela 5 – Variáveis e seus níveis codificados aplicados no planejamento composto central.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Suplementação (Extrato de levedura + Peptona) (g/L)	0	2:1	4:2
pH	3,70	5,00	6,30
Temperatura (°C)	25	30	35

Tabela 6 – Matriz do Planejamento composto central para a levedura *S. cerevisiae*.

(continua)

Ensaio	Suplementação (Extrato de Levedura +Peptona) (g/L)	pH	Temperatura (°C)
1	-1	-1	1
2	-1	-1	-1
3	1	0	0
4	0	1	0
5	0	0	1
6	-1	1	-1
7	0	0	-1

Tabela 6 – Matriz do Planejamento composto central para a levedura *S. cerevisiae*.
(conclusão)

Ensaio	Suplementação (Extrato de Levedura +Peptona) g/L	pH	Temperatura (C)
8	1	1	-1
9	-1	1	1
10	1	1	1
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	-1	0
14	1	-1	1
15	-1	0	0
16	1	-1	-1
17	0	0	0

Empregando o planejamento experimental como ferramenta é possível verificar e quantificar os efeitos significativos ou não significativos dentre os fatores avaliados, reduzindo o número de ensaios e melhorando a qualidade das informações obtidas com os resultados.

O programa STATISTICA™ (versão 7.0, da StatSoft, Inc.), possibilita calcular os efeitos principais das variáveis juntamente com suas interações, a superfície de resposta, além dos dados relativos à Análise de Variância (ANOVA), para a validação do modelo ao nível de 5% de significância.

3.6.2 Condições das Fermentações referidas ao planejamento experimental

O delineamento experimental seguiu as mesmas etapas descritas na avaliação cinética (item 3.4.2.1) com amostras sendo retiradas somente após 24 horas de fermentação.

Ao fim de cada ensaio do planejamento realizou-se a contagem de células através da câmara de Neubauer (Anexo A) para cálculo da viabilidade celular, determinou-se o pH, quantificou-se a glicose restante, a biomassa resultante, e também a produção de etanol e ácidos orgânicos, metabólitos do processo fermentativo.

Aliquotas de 15 mL foram retiradas, centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos

e acondicionadas em frascos sob refrigeração até o momento da quantificação dos ácidos orgânicos, bem como do etanol produzido.

3.6.3 Fermentação da melhor condição obtida no delineamento experimental – aumento de escala em biorreator

A partir dos resultados obtidos com o delineamento experimental, realizou-se um experimento cinético envolvendo o aumento de escala em biorreator.

A hidrólise foi conduzida de acordo com o item 3.3. Adicionou-se a concentração de suplementação e corrigiu-se o pH de acordo com o indicado no delineamento experimental. Após a etapa de hidrólise o biorreator foi levado a autoclave, submetido a esterilização a 121 °C por 30 minutos. O biorreator operou com um volume útil de 5,5 L, onde 4,95 L era composto de permeado de soro de queijo hidrolisado suplementado acrescido de 0,55L (10%) de meio contendo as células de levedura.

Após o processo de esterilização o biorreator imediatamente foi retirado da autoclave e acoplado ao controlador. A temperatura foi fixada em 30 °C e foi mantida até o fim do processo fermentativo. O pH foi verificado através do sistema de leitura de pH do próprio controlador, sendo previamente calibrado com soluções tampão. O sistema foi mantido sem agitação.

Alíquotas de fermentado foram retiradas do biorreator a cada 4 horas para estudo cinético. Em cada alíquota retirada realizou-se a contagem de células através da câmara de Neubauer (Anexo A) para cálculo da viabilidade celular, determinou-se o pH, quantificou-se a glicose restante, a biomassa resultante, e também a produção de etanol.

Ao fim do processo fermentativo calculou-se os valores de produtividade, conversão, rendimento e velocidades específicas conforme indicado nos itens 3.5.3.3 e 3.5.3.4.

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 Caracterização do Substrato

Neste item está descrita a sequência de métodos analíticos e microbiológicos que foram empregados na caracterização do permeado de soro de queijo, tanto na forma fluida como em pó.

3.7.1.1 Determinação do teor de proteína

A determinação do teor de proteína foi realizada através do método Dumas, pelo equipamento analisador elementar da marca LECO® modelo FP-528 (Anexo A). A análise consiste na combustão, redução, separação e detecção realizada no próprio equipamento, calibrado com padrão conhecido de *Rice Flour*, também da marca LECO®.

3.7.1.2 Determinação do teor de gordura

A determinação do teor de gordura foi realizada pelo método de butirômetro de Gerber, que consiste na separação da fase gordurosa por digestão da amostra (Souza, 2014).

3.7.1.3 Determinação dos Sólidos Solúveis – Graus Brix

A determinação de Sólidos Solúveis foi realizada através do método de

refração, utilizando um refratômetro digital da marca Atago, modelo Pal-1. O resultado foi expresso em graus Brix, que representa os sólidos dissolvidos na amostra (CECCHI, 2003).

3.7.1.4 Determinação de glicídios redutores em lactose

Para a determinação dos glicídios redutores em lactose foi utilizado o método do cobre do reativo de Fehling (Anexo A), onde a solução alcalina de sulfato de cobre em tampão de tartarato duplo de sódio e potássio foi reduzida a óxido cuproso (LANAGRO, 2014).

3.7.1.5 Determinação do pH

A determinação do pH (Potencial Hidrogênico), caracterizado como o logaritmo negativo da atividade do ion hidrogenio (H^+) (HARRIS, 2005, p. 157) foi realizada utilizando um equipamento medidor de pH da marca Digimed, modelo DM – 22, calibrado com soluções tampão de pH 4,00 e 7,00.

3.7.1.6 Quantificação do teor de cinzas

O teor de cinzas que é o resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura de 550 a 570 °C foi obtido pela diferença da quantidade inicial e final da amostra. Pesou-se 5,0 g de amostra em um cadinho de porcelana previamente calcinado e evaporou-se a água contida na amostra a 65 °C em estufa (marca Labstore modelo 400ND) e em seguida as amostras foram acondicionadas em forno mufla até as cinzas ficarem brancas ou ligeiramente acinzentadas. Pesou-se e descontou-se o valor do cadinho e com auxílio da Equação (4) foi possível obter o teor

de resíduo mineral (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$\text{CINZAS (\%)} = (100 * N) / P \quad (4)$$

Onde, N = número de gramas de cinzas

P = número de gramas da amostra

3.7.1.7 Quantificação de sódio e potássio

Os teores de sódio e potássio foram quantificados utilizando um fotômetro de chama marca Digimed, modelo DM-62 (Anexo A). A amostra é aspirada por uma chama, recebe a energia desta e gera espécies excitadas, que retornam ao estado fundamental e liberam parte da energia recebida na forma de radiação, em comprimentos de onda específicos para cada elemento (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009, AOAC, 2010).

3.7.1.8 Determinação da acidez

O teor de ácido láctico foi expresso em graus Dornic e seguiu a metodologia descrita por Brasil (2006), na qual consiste em titular a solução Dornic N/9 na presença de indicador fenolftaleína até o ponto de viragem.

3.7.1.9 Caracterização dos açúcares e ácidos orgânicos no permeado de soro de queijo desidratado – em pó

A caracterização dos açúcares e ácidos orgânicos no permeado de soro de queijo foi feita somente na forma do produto em pó. As análises foram realizadas em

parceria com a empresa cedente do produto, que enviou amostras do mesmo para análise em laboratório credenciado pela norma ISO 17.025 localizado na cidade de Minneapolis, nos Estados Unidos da América.

3.7.1.10 Avaliação microbiológica do permeado de soro de queijo

Os ensaios realizados seguiram metodologias propostas pela ISO para as determinações de: contagem de colônias a 30 °C de aeróbios mesófilos (ISO 4831-1:2015), contagem de colônias de coliformes totais e termotolerantes (ISO 4832:2006), contagem de Estafilococos coagulase positiva (ISO 6881-1:2016), contagem de colônias a 30 °C para *Bacillus cereus* (ISO 7932:2016), contagem de colônias a 37 °C de enterobacterias (ISO 21528-2 :2004) e metodologia recomendada pela FDA para a contagem de colônias a 25 °C de bolores e leveduras (FDA BAM, 2001).

3.8 PROCESSO FERMENTATIVO

Neste item estão descritas as metodologias empregadas para avaliar o processo fermentativo.

3.8.1 Determinação de biomassa

A quantificação da biomassa foi realizada de acordo com a técnica gravimétrica. Alíquotas de 30 mL do meio fermentativo foram coletadas em duplicata, em seguida centrifugadas a 3000 rpm durante 20 minutos, lavadas, novamente centrifugadas e colocadas em estufa (marca Solab) a 75 °C até peso constante. A concentração de biomassa é obtida pela diferença de massa entre o tubo de centrifuga

vazio (previamente seco em estufa a 75 °C) e o tubo de centrífuga contendo a biomassa, considerando o volume coletado (GABARDO, 2015).

3.8.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi estimada através da contagem de células em câmara de Neubauer (Anexo A). Durante as contagens diferenciou-se as translúcidas como vivas e coradas como mortas.

A porcentagem de viabilidade celular foi obtida pela equação 5:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{número de células vivas}}{\text{número de células mortas}} \times 100 \quad (5)$$

3.8.3 Cálculos do rendimento em etanol (Y p/s), conversão de substrato em células (Y x/s) e produtividade de cada fermentação

Os rendimentos Y (p/s), conversões Y (x/s) e produtividade em etanol foram calculados pelas Equações (6 a 8) descritas abaixo:

$$Y_{\frac{p}{s}} = \left(\frac{\text{etanol produzido (g)}}{\text{glicose consumida (g)}} \right) \quad (6)$$

$$Y_{\frac{x}{s}} = \left(\frac{\text{biomassa produzida (g)}}{\text{glicose consumida (g)}} \right) \quad (7)$$

$$\text{Produtividade} = \left(\frac{\text{etanol produzido (g)}}{\text{tempo de fermentação (h). volume (l)}} \right) \quad (8)$$

3.8.4 Cálculos das velocidades específicas

A velocidade específica de formação de produto (μ_p), de consumo de substrato

(μ_s) e formação de biomassa (μ_x) foram calculados pelas Equações (9), conforme proposto por Gaden (1955) e Hiss (2013).

$$\mu_p = \frac{1}{x} \cdot \left(\frac{dp}{dt}\right) \quad \mu_s = \frac{1}{x} \cdot \left(-\frac{ds}{dt}\right) \quad \mu_x = \frac{1}{x} \cdot \left(\frac{dx}{dt}\right) \quad (9)$$

3.8.5 Determinação do teor de etanol produzido e dos ácidos orgânicos presentes nas amostras

As determinações de etanol e ácidos orgânicos foram realizadas no Laboratório de Análise Instrumental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Medianeira. As determinações dos compostos foram feitas em um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (UPLC) marca Dionex, modelo Ultimate 3000, com detector de índice de refração. A temperatura do detector foi ajustada para operar em 40 °C.

Empregou-se uma coluna Aminex® HPX-87H (300 x 7,8 mm) da marca Bio-rad, com modo de separação isocrático, com forno de coluna aquecido a 50 °C. A fase móvel empregada foi uma solução de ácido sulfúrico com concentração de 5 mM a uma vazão de 0,6 mL/min (GABARDO, 2015). Os tempo totais de retenção do ácido succínico, láctico, fórmico, acético e etanol estão descritos na Tabela 7. O equipamento foi calibrado por calibração externa, com soluções de referência dos ácidos entre 1,0 e 20 g/L e de etanol entre 2,5 e 50 % (m/v) e as medidas dos sinais das soluções de referência e das amostras foram em área integrada.

Tabela 7 – Ácidos orgânicos e etanol pesquisados e seus respectivos tempos de retenção.

Analito	Tempo de retenção (minutos)
Ácido succínico	12,16
Ácido láctico	13,07
Ácido fórmico	14,32
Ácido acético	15,51
Etanol	21,75

3.8.6 Análise da redução de DQO após o processo fermentativo

Para avaliar a redução da carga orgânica no permeado de soro de queijo, análises de DQO foram realizadas, paralelas ao experimento de aumento de escala, sendo retiradas amostras antes de iniciar o processo fermentativo e ao término.

Retirou-se uma alíquota de 100 mL do biorreator antes da adição do inóculo e uma segunda alíquota, também de 100 mL após concluída a fermentação. As amostras foram acondicionadas em frascos âmbar e mantidas sob refrigeração (3 °C) até o momento da análise.

As análises de DQO inicial e final foram realizadas através do departamento de controle ambiental, no laboratório da estação de tratamento de efluentes da empresa que forneceu o permeado de soro de queijo.

Utilizou-se o kit Nanocolor® (Macherey-Nagel) para quantificação da DQO, onde 0,2 mL da amostra foi adicionada ao tubo reagente, este posteriormente levado a um bloco digestor programado a 148°C por 2 horas. Ao fim da digestão os tubos foram esfriados a temperatura ambiente e realizada a leitura em um fotômetro também da marca Macherey-Nagel, no comprimento de onda de 690 nm.

A porcentagem de redução foi calculada através da Equação (10).

$$\text{Redução (\%)} = \left(\frac{\text{Res } i - \text{Res } f}{\text{Res } i} \right) \times 100 \quad (10)$$

Em que:

Res f = Resultado final de DQO (mg/L)

Res i = Resultado inicial de DQO (mg/L)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item estão apresentados os resultados da pesquisa relacionada ao processo fermentativo do permeado de soro de queijo, envolvendo sua caracterização, hidrólise e fermentação através da *S. cerevisiae*, bem como os resultados das análises de DQO realizadas antes e após a fermentação em biorreator.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO

Os resultados do permeado fluido e do permeado na forma em pó encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização do Permeado de Soro de Queijo Fluido e em Pó

Parâmetro	Caracterização	
	Fluido	Pó
Acidez	24°D	1,20%
pH	6,3	6,4
Densidade	1,070g/L	-
Brix	15,6 ° Brix	-
Gordura	<0,05%	-
Proteína	<0,10%	-
Cinzas	0,94%	-
Lactose	9,54%	79,65%
Frutose	-	<0,10 %
Galactose	-	<0,10 %
Maltose	-	<0,10 %
Sacarose	-	<0,10 %
Cálcio	-	0,553 %
Sódio	0,038 mg/100g	0,571 mg/100g
Potássio	-	1,26 %
Fósforo	-	0,752 %
Sulfato	-	0,028 %
Ácido cítrico	-	2,21 %
Ácido glutâmico	-	<0,10 %
Ácido láctico	-	0,93 %
Ácido málico	-	0,61 %
Ácido carboxílico pirolidona	-	<0,10 %

Os resultados mostram que o açúcar de maior representatividade é a lactose

(9,54%), o que torna favorável a sua utilização em processo biotecnológico fermentativo, pois neste processo é imprescindível que haja fonte de carbono disponível para o crescimento do micro-organismo.

Outros açúcares, como a frutose, galactose, maltose e sacarose apresentaram teores inferiores a 0,10%, mostrando que a única fonte de carbono disponível para a *S. cerevisiae* é realmente a lactose, esta que após ser submetida a um processo de hidrólise se tornará fermentescível pela levedura.

A avaliação dos ácidos orgânicos apontou 2,21% de ácido cítrico, 0,93% de ácido láctico, 0,61% de ácido málico e níveis inferiores a 0,10% para o ácido glutâmico e ácido carboxílico pirolidona. Fox *et. al.*, (2016) apontam que estes ácidos são característicos da composição do leite *in natura* e que podem variar de acordo com fatores relacionados à sazonalidade, bem como nutrição dos animais.

Os baixos teores de proteínas e gordura (<0,10 e <0,05% respectivamente) mostram a eficiência do processo de separação por membranas, que faz a retirada das proteínas e do processo de centrifugação, para a retirada da gordura, processos estes aplicados na empresa que forneceu o material de estudo. O baixo teor de proteínas é um fator relevante, já que um alto teor de proteínas, de acordo com Belincanta (2004) interfere na eficiência do processo de destilação, além de favorecer a formação de espuma em processos fermentativos com agitação.

O teor de cinzas obtido na análise (0,94%) corresponde ao resíduo inorgânico que permaneceu após a queima da matéria orgânica. Na caracterização do permeado na forma em pó, observa-se que grande parte deste teor é representado pelo cálcio. De acordo com Adams e Nout (2001) o cálcio mineral aumenta a tolerância da levedura *S. cerevisiae* ao etanol.

Passos e Silva (2014) caracterizaram os nutrientes contidos no permeado de soro de queijo na forma fluida, encontrando um valor próximo a 0,85% para o cálcio, 1,85% para o potássio e 0,62% para o fósforo, indicando a presença de nutrientes fundamentais para o correto crescimento do micro-organismo, uma vez que o crescimento da levedura é um processo que requer energia química e nutrientes para a síntese dos componentes celulares (OLIVEIRA, 2006).

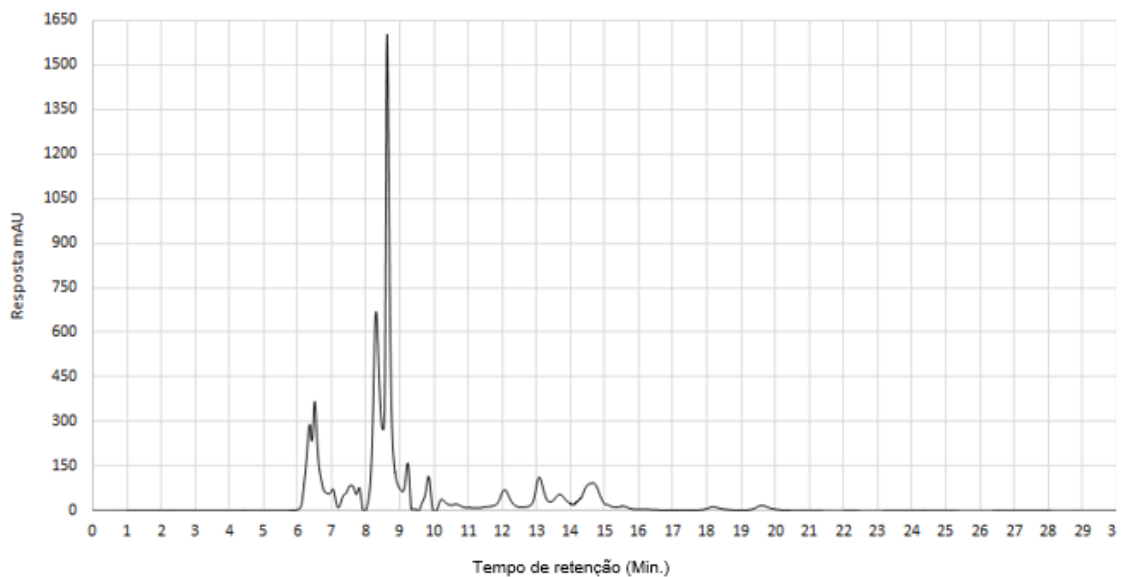
No estado fluido do permeado quantificou-se o seu teor de acidez (24°D), com pH correspondente a 6,30, que é um valor próximo ao necessário para o início da hidrólise, conforme apontado por Baller, Silva e Bombardelli (2015). Estes autores

encontraram a melhor condição para a hidrólise enzimática em pH 6,00, indicando que apenas uma pequena correção deve ser realizada, além de que este ajuste não altera significativamente as outras características do permeado de soro de queijo.

4.1.1 Permeado de soro de queijo hidrolisado

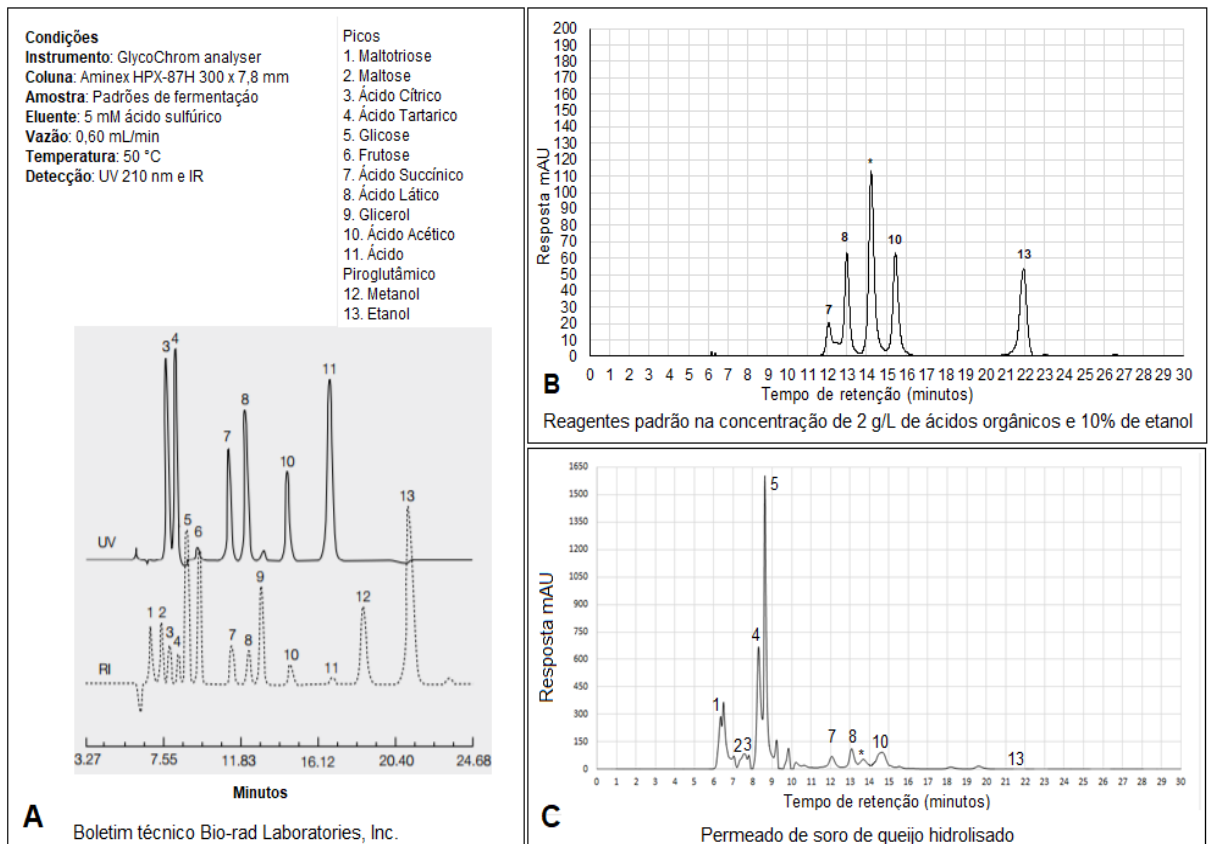
Após o procedimento de hidrólise enzimática (descrito nos itens 3.3 e 4.2) obteve-se o permeado de soro de queijo hidrolisado. Realizou-se uma análise cromatográfica deste produto, conforme descrito no item 3.5.3.5 sendo o cromatograma apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Cromatograma de amostra de permeado de soro de queijo hidrolisado.



De acordo com a Figura 11 o cromatograma apresentou picos nos tempos de retenção de 6 a 16 minutos. Os picos que apresentaram resposta nos tempos de retenção de 12 a 16 minutos foram quantificados, conforme descrito no item 3.5.3.5. Em relação aos picos que não foram quantificados por meio de padrões (6 a 11 minutos), estes foram comparados com o cromatograma detectado através do índice de refração apresentado no boletim técnico do fornecedor da coluna (Figura 12).

Figura 12 – (a) cromatograma obtido a partir de metabólitos de fermentação através do índice de refração e região do UV (210 nm). (b) Cromatograma dos padrões de ácido succínico, ácido láctico, ácido acético (2 g/L) e etanol (10%). (c) cromatograma do permeado de soro de queijo hidrolisado, com os picos identificados de acordo com os padrões e boletim técnico.



*Ácido fórmico

Fonte: Adaptado de Bio-rad Laboratories, Inc.

Pelos tempos de retenção há indícios de que os picos que não foram quantificados são (1) maltotriose, (2) maltose, (3) ácido cítrico, (4) ácido tartárico e (5) glicose. Os ácidos ácido succínico (7), láctico (8), fórmico (*), acético (10) e etanol (13) foram quantificados e estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 – Compostos quantificados através de cromatografia no permeado de soro de queijo hidrolisado

Análito	Concentração (g/L)
(7) Ácido Succínico	2,29
(8) Ácido Láctico	3,57
(*) Ácido Fórmico	1,75
(10) Ácido Acético	2,26
(13) Etanol	-

Na Tabela 10, o permeado de soro de queijo hidrolisado apresenta baixas

concentrações de ácidos orgânicos que são característicos da fermentação bacteriana. Assume-se a hipótese de que estes ácidos orgânicos são provenientes das bactérias lácticas que naturalmente estão presentes na microbiota do soro do queijo, e migram para o permeado, uma vez que utiliza-se fermentos da produção de queijos.

Uma avaliação microbiológica do permeado de soro de queijo não hidrolisado foi realizada e está descrita a seguir.

4.1.2 Análises microbiológicas

Com o objetivo de conhecer a carga microbiana do permeado realizou-se uma avaliação microbiológica no momento da coleta do mesmo no tanque de equilíbrio das membranas de ultrafiltração, sendo os resultados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Avaliação microbiológica do permeado de soro de queijo no momento da coleta

Parâmetro	Contagem (Unidade Formadora de Colônia / mL)	¹ Valores Máximos (UFC / mL)
Contagem de colônias a 30 °C pela técnica de <i>pour plate</i> - <i>Aeróbios Mesófilos</i> Método Horizontal para Enumeração de Coliformes - Técnica da Contagem de Colônias - Coliformes Totais	6,0 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁵
Método Horizontal para Enumeração de Coliformes - Técnica da Contagem de Colônias - Coliformes Totais	1,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³
Método Horizontal para Enumeração de Coliformes - Técnica da Contagem de Colônias - Coliformes Termotolerantes	<10 ¹	1,0 x 10 ²
Método Horizontal para Contagem de Estafilococos coagulase positiva - <i>Staphylococcus aureus</i>	<10 ¹	-
Método Horizontal para a Enumeração Presuntiva de <i>Bacillus cereus</i> - Contagem de colônias a 30 °C	<10 ¹	-
Método horizontal para enumeração de bolores e leveduras - Contagem de colônias a 25 °C	1,0 x 10 ³	-
Método Horizontal para detecção e contagem de Enterobacteriaceae - Contagem de colônias a 37 °C	1,0 x 10 ³	-

¹ Valores máximos indicados no projeto de Instrução Normativa para o soro de leite e para o soro de leite concentrado.

Na Tabela 11 observa-se contagem moderada de aeróbios mesófilos (6,0 x 10⁴ UFC/mL), coliformes totais (1,0 x 10³ UFC/mL), bolores e leveduras (1,0 x 10³

UFC/mL) e enterobactérias ($1,0 \times 10^3$ UFC/mL), enquanto que coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva e *Bacillus cereus* apresentaram ausência de crescimento na diluição estudada. Usualmente as indústrias de alimentos utilizam como referência os padrões do soro de leite, publicado através do Projeto de Instrução Normativa que estabelece os padrões de identidade e qualidade de soro de leite (2013) dos produtos "Soro de leite" e "Soro de leite Concentrado".

Devido ao permeado ainda não ter sido submetido a tratamento térmico no ponto da coleta, tais contagens são justificáveis devido aos vários processos que o soro de queijo foi submetido desde sua separação do queijo até o produto final.

Outros micro-organismos, se disponíveis no meio fermentativo, representam competitividade com a *S. cerevisiae*, consumindo os açúcares disponíveis ao processo de fermentação. Tais contagens indicaram que o substrato deveria ser esterilizado antes da adição do inóculo. Burlani (2014) comparou a fermentação envolvendo substratos autoclavados e não autoclavados, e os resultados obtidos apontaram um rendimento cerca de 6% superior ao meio sem competitividade de micro-organismos com a levedura.

4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO PERMEADO DE SORO DE QUEIJO EMPREGADO NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos com a hidrólise enzimática, nas diferentes etapas do estudo (cinética preliminar, delineamento experimental e aumento de escala em biorreator).

Tabela 12 – Concentração de Lactose hidrolisada e suas respectivas concentrações durante o processo.

Hidrólise da Lactose	Cinética	Delineamento experimental	Aumento de escala (biorreator)
Concentração de lactose no permeado (g/L)	95,4	95,4	95,4
Lactose hidrolisada (g/L)	87,85	89,82	94,83
Conversão (%)	92,08	94,16	99,41

Os parâmetros temperatura, pH, concentração da enzima e agitação foram fixados em 37,5 °C, 6,00, 1,05 g/L e 200 rpm respectivamente no biorreator a um tempo total de reação de 120 minutos. No processo de hidrólise do permeado ocorreu a mudança de lote da enzima na hidrólise para o ensaio de aumento de escala.

Nas bateladas realizadas para estudo cinético e delineamento experimental as conversões alcançaram 92,08 e 94,16%, valores muito próximos ao encontrado por Parashar *et al.*, (2016), que obtiveram valores médios de conversão variando entre 93,4 e 94,2% na hidrólise do permeado de soro de queijo, trabalhando nas condições de 30 °C, durante 24 a 48h a uma agitação de 200 rpm utilizando a enzima comercial Lactozyme 3000L (marca Sigma Aldrich®).

Na batelada de hidrólise realizada para o experimento de aumento de escala a concentração de lactose hidrolisada chegou a 94,83 g/L, representando 99,41% de conversão. Neste ensaio de hidrólise ocorreu a troca do lote da enzima comercial, sendo uma hipótese ao aumento de 5% na conversão, quando comparado aos outros ensaios. De acordo com Siso e Doval (1994) o processo de hidrólise do soro de queijo é considerado eficiente a aplicações fermentativas quando a conversão da lactose é superior a 90%.

Trigueros *et al.*, (2016) também trabalharam com processo enzimático de hidrólise do permeado de soro de queijo reconstituído através da enzima β -galactosidase Lactozym Pure® 6500U, da marca Novozymes. As condições aplicadas foram de pH 6,50, temperatura de 30 °C, concentração de enzima 1,25 g/L e tempo total de reação de 180 minutos. As conversões médias dos ensaios em batelada apresentaram resultados acima de 90% de conversão.

4.3 FERMENTAÇÕES

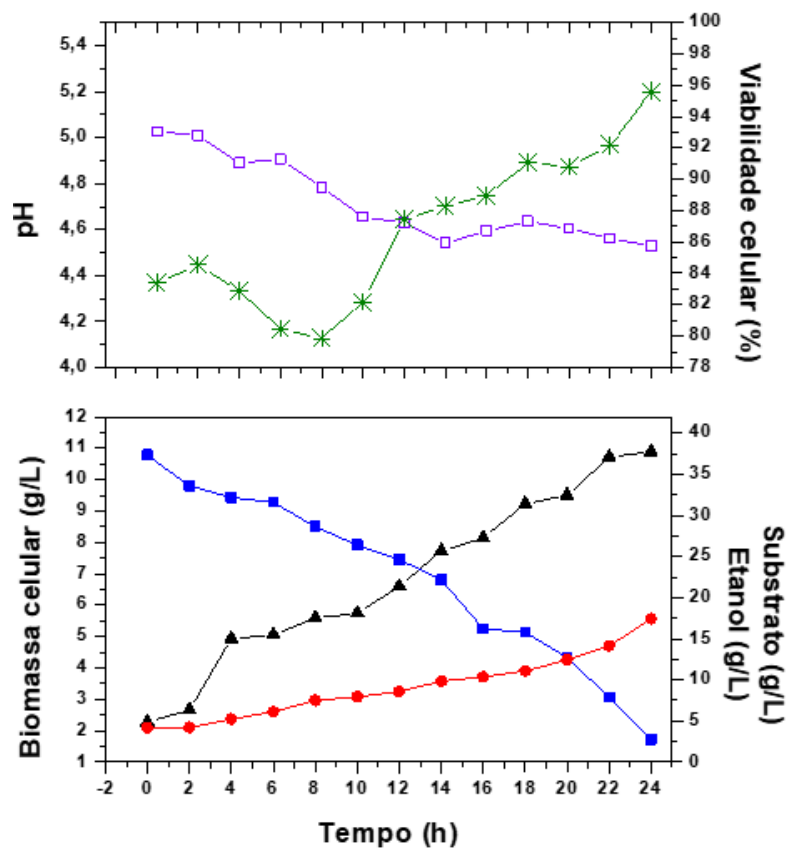
4.3.1 Avaliação cinética preliminar da fermentação do permeado de soro de queijo

Os resultados obtidos nos experimentos realizados para a avaliação cinética preliminar estão expressos na Tabela 13 e na Figura 13. São apresentados os valores de biomassa, substrato resultante, etanol produzido, pH do meio, graus brix e também os valores de viabilidade celular.

Tabela 13 – Resultados encontrados na avaliação cinética da fermentação do permeado de soro de queijo hidrolisado pela *S. cerevisiae* realizado em incubadora.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)	pH	Graus Brix	Viabilidade celular (%)
0	2,28 ± (0,056)	37,35 ± (0,014)	4,17 ± (0,049)	5,03 ± (0,00)	9,90 ± (0,00)	83,37 ± (0,028)
2	2,67 ± (0,014)	33,62 ± (0,028)	4,24 ± (0,028)	5,00 ± (0,00)	9,60 ± (0,00)	84,54 ± (0,063)
4	4,93 ± (0,042)	32,17 ± (0,014)	5,23 ± (0,042)	4,89 ± (0,00)	9,40 ± (0,00)	82,88 ± (0,021)
6	5,06 ± (0,028)	31,63 ± (0,014)	6,15 ± (0,014)	4,89 ± (0,00)	9,00 ± (0,00)	80,48 ± (0,014)
8	5,60 ± (0,035)	28,65 ± (0,042)	7,53 ± (0,028)	4,78 ± (0,00)	8,90 ± (0,00)	79,87 ± (0,098)
10	5,74 ± (0,056)	26,40 ± (0,056)	7,97 ± (0,042)	4,65 ± (0,00)	8,60 ± (0,00)	82,16 ± (0,091)
12	6,61 ± (0,021)	24,66 ± (0,021)	8,59 ± (0,070)	4,58 ± (0,00)	8,60 ± (0,00)	87,46 ± (0,070)
14	7,73 ± (0,084)	22,18 ± (0,028)	9,85 ± (0,042)	4,53 ± (0,00)	8,60 ± (0,00)	88,28 ± (0,113)
16	8,14 ± (0,035)	16,21 ± (0,049)	10,37 ± (0,084)	4,58 ± (0,00)	8,20 ± (0,00)	88,95 ± (0,070)
18	9,23 ± (0,042)	15,81 ± (0,014)	11,11 ± (0,028)	4,62 ± (0,00)	8,00 ± (0,00)	91,05 ± (0,049)
20	9,51 ± (0,014)	12,73 ± (0,021)	12,46 ± (0,056)	4,60 ± (0,00)	7,40 ± (0,00)	90,81 ± (0,091)
22	10,73 ± (0,049)	07,90 ± (0,042)	14,16 ± (0,014)	4,57 ± (0,00)	7,00 ± (0,00)	92,17 ± (0,070)
24	10,89 ± (0,049)	02,81 ± (0,028)	17,45 ± (0,049)	4,53 ± (0,00)	6,90 ± (0,00)	95,57 ± (0,091)

Figura 13 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g/L) (▲), consumo de substrato (g/L) (■), produção de etanol (g/L) (●), pH (□) e viabilidade celular (%) (*) ao longo do tempo de fermentação: temperatura 30 °C, pH 5,00; sem adição de suplementos e sem agitação em fermentação do permeado de soro de queijo hidrolisado em incubadora pela *S. cerevisiae*.



As condições em que as fermentações foram conduzidas estão descritas no item 3.4.2.1. Na Tabela 13 e Figura 13 verifica-se que a medida em que o etanol é produzido, ocorre o crescimento da biomassa e o substrato vai sendo consumido. Com 24 horas de fermentação a concentração de etanol produzida foi de 17,45 g/L, restando 2,81 g/L de glicose no meio de fermentação. A biomassa celular resultou em uma produção de 10,89 g/L.

O valor de pH ao fim do processo fermentativo foi de 4,53, valor este semelhante ao encontrado por Laopaiboon *et al.* (2009), que trabalharam com a fermentação do sorgo pela *S. cerevisiae*. Os autores encontraram um valor de pH de 4,50 a partir da décima segunda hora de fermentação, e permaneceu constante até o fim do experimento. Neumann *et al.* (2008) em seu trabalho afirmam que o pH ideal para multiplicação da *S. cerevisiae* está na faixa de 4,5 a 5,00.

Sabe-se que em ausência de meio tamponado, o valor do pH cai rapidamente durante as primeiras fases de fermentação, também observado neste estudo e este fenômeno pode ser tido como um reflexo da atividade da levedura, que está absorvendo aminoácidos, acumulando íons, excretando gás carbônico no meio ou mesmo excretando íons H⁺ durante a geração de ATP pela respiração (extrusão de prótons durante o transporte de elétrons pela Cadeia de Transporte de Elétrons – CTE) (NEVES, 2003).

De Moraes (1984) comprovou que a acidificação ocorre pela extrusão de prótons para o meio extracelular, assim como, o controle dessa extrusão é feito pelo valor do pH no meio externo. Como uma forma de buscar equilíbrio na relação entre a concentração de prótons extra e intracelular, a célula busca o controle do pH no ambiente extracelular através dessa acidificação, o que prova a importância do pH extracelular na geração de ATP que, por sua vez, está intimamente ligado ao gradiente de prótons gerados pela diferença de concentração extra e intracelular dos mesmos.

A viabilidade celular no experimento cinético alcançou o valor mais baixo na oitava hora de fermentação (79,87 %), valor este que aumentou gradativamente no decorrer da fermentação, finalizando a vigésima quarta hora com 95,57 %. Souza (2009) otimizou a produção de etanol, pela *S. cerevisiae* 63M submetendo o meio sintético contendo sacarose a temperatura de 37 °C e obteve valores de viabilidade celular iguais a 90% para a levedura após 4 horas de fermentação.

A viabilidade celular é sem dúvida um aspecto importante no controle da

fermentação alcoólica, sendo que quanto maior o valor melhor será o desempenho do processo. Na literatura, alguns autores notaram que o extrato de levedura (BAFRNCOVÁ *et al.* 1999) e o cálcio (NABAIS *et al.* 1988) exercem um efeito protetor sobre o crescimento e viabilidade, com estímulo sobre a velocidade de produção de etanol.

A fase exponencial de crescimento celular está disposta entre a décima hora até a vigésima segunda hora, conforme observado na Figura 13 dados estes empregados nos cálculos de velocidade específica. A estabilização do crescimento microbiano ocorreu entre a vigésima segunda hora e a vigésima quarta hora. Os valores de μ_s , μ_p e μ_x foram de 0,04, 0,08 e 0,15 h^{-1} respectivamente. De acordo com Ribeiro e Horii (1999), estes valores são maiores na fase exponencial.

A produtividade de etanol alcançada foi de 1,65 g/L.h, nas 24 horas de fermentação, com condições de temperatura a 30 °C, pH ajustado em 5,00, sem adição de suplementos e sem agitação.

O rendimento da fermentação ($Y_{p/s}$) e a conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) foram de 0,270 g/g. O rendimento teórico ($Y_{p/s}$) para a produção de etanol é de 0,511 g/g. Na prática, este valor dificilmente é observado devido a utilização de parte da glicose para a produção de glicerol e álcoois superiores, substâncias necessárias para a síntese de material celular e manutenção da levedura (SOUZA, 2009). Em meios que favoreçam a produção de etanol, este valor deve ser superior a ($Y_{x/s}$).

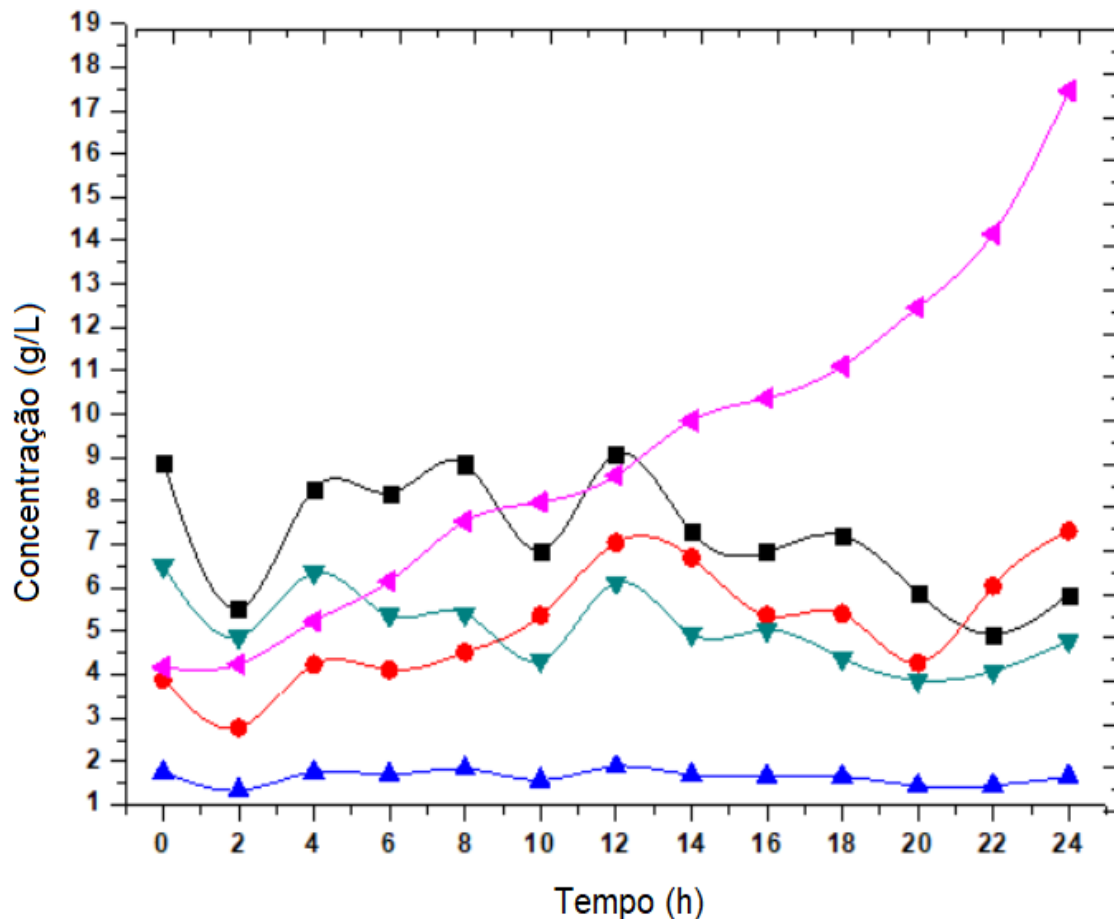
Os parâmetros de rendimento em etanol e produtividade são considerados os mais importantes para a indústria alcooleira. Quanto maiores forem os parâmetros, sinalizam que a levedura está ajustada ao processo fermentativo e resultará em boas conversões. Guidini (2013) avaliando diferentes cepas industriais da levedura *S. cerevisiae* encontrou valores de rendimento na faixa de 0,37 a 0,50 ($Y_{p/s}$) g/g. Os valores de produtividade variaram entre 2,20 a 3,60 g/L.h, resultados estes superiores ao encontrado na avaliação cinética do presente trabalho.

Visando proporcionar condições favoráveis à produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae*, construiu-se um planejamento composto experimental, para verificar quais variáveis são significativas na obtenção de etanol. A condução do delineamento experimental está descrita no item 4.3.4.

4.3.2 Avaliação dos metabólitos secundários da fermentação por *S. cerevisiae*

O experimento cinético mostrou o comportamento da levedura na produção de metabólitos secundários na fermentação do permeado de soro de queijo. As concentrações dos ácidos acético, succínico, láctico, fórmico, juntamente com a produção de etanol foram determinadas conforme descrito no item 3.5.3.5, e os resultados encontrados estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Acompanhamento dos metabólitos do processo fermentativo: ácido acético (g/L) (▼), ácido succínico (g/L) (■), ácido láctico (g/L) (●), ácido fórmico (g/L) (▲) e etanol (g/L) (◄) ao longo do tempo de fermentação: temperatura 30 °C, pH 5,00, sem adição de suplementos e sem agitação.



Os principais ácidos encontrados na fermentação alcoólica são o succínico, acético e láctico. O ácido acético é um produto formado em pequenas quantidades, enquanto o ácido láctico é o principal metabólito produzido pelas bactérias lácticas. A presença de ácidos orgânicos, como o acético e láctico, resultam em um aumento no consumo de ATP pela levedura. Nestas condições, parte do ATP que seria utilizado para o crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno

(NARENDRANATH *et al.*, 2001).

A concentração de ácido acético no experimento cinético no ponto 0 partiu de 6,5 g/L e ao fim das 24 horas apresentou uma concentração de 5 g/L, indicando uma baixa variação entre os pontos amostrados.

A concentração de ácido láctico nos experimentos partiu de 4,0 g/L e obteve seu pico máximo na última hora de fermentação com 7,0 g/L. O ácido láctico está presente naturalmente no permeado de soro de queijo, conforme pôde ser constatado em sua caracterização.

A produção deste ácido é indesejável em processos fermentativos, porém é uma realidade de muitas usinas de produção de etanol. Além das bactérias lácticas consumirem parte da fonte de carbono disponível, o ácido láctico tem efeito inibitório sobre a levedura, comprometendo principalmente a reprodução e a síntese do produto de interesse (VENTURA, 2007).

Estudando o efeito de alguns produtos secundários no sistema de fermentação, Maiorella *et al.*, (1983) concluíram que o ácido acético e o ácido láctico causam interferências químicas na manutenção das funções celulares. Os mesmos autores observaram que a concentração de ácido acético e ácido láctico, inibiram o crescimento de *S. cerevisiae* quando presente em concentrações de 0,5-9 e 10-40 g/L respectivamente.

A formação de ácido succinico durante a fermentação alcoólica depende de diversos fatores, e sua formação é indesejável, uma vez que é formado a partir das fontes de carbono disponíveis no meio. De acordo com a Figura 14, a concentração de ácido succinico no início foi próxima a 9 g/L e ao fim das 24 horas apresentou cerca de 5 g/L, representando baixa produção, sendo favorável ao meio para produção de etanol.

Alguns autores como Heerde e Radler (1978) verificaram o efeito de aminoácidos sobre a produção do ácido succinico e concluíram que o ácido glutâmico produziu a mais alta concentração de ácido succinico. Verificaram também que a formação do ácido é proporcional a concentração de glicose no meio, e que sua formação ocorre nas primeiras horas de fermentação. Ceballos-Schiavone (2009) relata que a levedura produz o ácido succinico em situações de estresse, com isto, verifica-se que a levedura *S. cerevisiae* estava adaptada ao meio fermentativo.

Basso *et al.*, (1997) estudaram o efeito de 600 mg/L de ácido succinico sobre

11 espécies de bactérias Gram-positivas contaminantes e avaliaram a ação inibidora sobre elas. Os autores justificam que a ação inibidora da fermentação foi exercida não apenas pela acidificação do meio, devido ao ácido orgânico liberado, mas pelo ânion succinato e seu efeito sinérgico com o etanol.

A concentração de ácido fórmico permaneceu constante em todos os pontos do monitoramento cinético do processo fermentativo, apresentando cerca de 1,5 g/L. De acordo com Leroy e Vuyst, (2004), o ácido fórmico é um ácido orgânico comum na fermentação da massa coalhada, na produção de queijos pelas indústrias de laticínios. Algumas bactérias lácticas, como *Streptococcus thermophilus*, uma das culturas presentes nos fermentos do queijo, produz o ácido fórmico em pequenas quantidades, sendo uma hipótese à migração deste ácido para o permeado de soro de queijo, já que o mesmo não é característico da fermentação pela *S. cerevisiae* e está presente desde o início da fermentação.

4.3.3 Comparação da fermentação em meio sintético e em meio contendo permeado de soro de queijo hidrolisado

Realizou-se a adição de um ensaio contendo somente meio YEPD acrescido de 20 g/L de glicose (total de 40 g/L de glicose) visando comparar a produção de biomassa e etanol com o meio contendo somente permeado hidrolisado. As fermentações foram realizadas em duplicata e os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Comparativo entre a fermentação de permeado de soro de queijo hidrolisado e do meio YEPD acrescido de 20 g/L de glicose com tempo total de fermentação de 24 horas

Meio	Biomassa (g/L)	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)	pH	Graus Brix	Viabilidade celular (%)
*Permeado	10,89 ± (0,049)	02,81 ± (0,028)	17,45 ± (0,049)	4,53 ± (0,00)	6,90 ± (0,00)	95,57 ± (0,091)
*YEPD + 20 g/L glicose	13,38 ± (0,084)	6,70 ± (0,098)	14,19 ± (0,084)	4,40 ± (0,00)	3,80 ± (0,00)	96,48 ± (0,049)

Na Tabela 14, o meio contendo permeado de soro de queijo mostrou ligeiro aumento na produção de etanol, (17,45 g/L) enquanto que o meio sintético acrescido de 20 g/L de glicose produziu 14,19 g/L. O meio sintético proporcionou um maior crescimento de biomassa, chegando ao fim das 24 horas com uma produção de 13,38 g/L enquanto que o meio contendo apenas o permeado produziu 10,89 g/L, neste caso apontando que o permeado de soro de queijo foi mais favorável à formação do produto de interesse, o etanol.

A viabilidade celular da *S. cerevisiae* após 24 horas de fermentação foi acima de 95% em ambos os experimentos.

Tal comparativo comprova que o permeado de soro de queijo é viável como fonte de carbono em processos fermentativos, mostrando tendência superior a produção de etanol, quando comparado ao meio sintético, onde a produção de etanol foi maior e o consumo da glicose foi menor. Este fenômeno pode ser explicado devido a composição do permeado, que contém nutrientes que são úteis para a rota metabólica da levedura, favorecendo a produção de etanol.

4.3.4 Fermentações seguindo o planejamento composto central

Por meio do planejamento composto central realizado, foi possível avaliar quantitativamente a influência das variáveis de entrada, suplementação envolvendo extrato de levedura e peptona, pH e temperatura sobre a resposta, produção de etanol. No momento da construção do planejamento, optou-se pelo modo aleatório, esta prática evita erros sistemáticos.

Na Tabela 15 são apresentados os resultados do delineamento experimental para a variável resposta em relação às interações das variáveis de entrada. Estão apresentados também os resultados da produção de biomassa, viabilidade celular, conversão do substrato em biomassa, rendimento, produtividade de etanol e também produtividade de biomassa.

Tabela 15 - Matriz do planejamento composto central com os resultados da produção de etanol, biomassa, viabilidade celular, conversão de substrato em biomassa, rendimento, produtividade de etanol e também de biomassa.

Ensaio	Suplementação Extrato de levedura + Peptona (g/L)	pH	Temperatura (°C)	Etanol (g/L)	Biomassa (g/L)	Viabilidade celular (%)	Conversão de substrato em biomassa (Y (x/s)) (g/g)	Rendimento Conversão de substrato em produto (Y (p/s)) (g/g)	Produtividade de etanol (g/L.h)	Produtividade de biomassa (g/L.h)
1	0	3,70	35	15,83 ± (0,021)	10,40 ± (0,028)	57,49 ± (0,098)	0,19	0,38	0,66	0,34
2	0	3,70	25	19,38 ± (0,042)	08,57 ± (0,091)	87,17 ± (0,091)	0,15	0,46	0,81	0,26
3	02:01	5,00	30	19,06 ± (0,028)	08,03 ± (0,035)	76,06 ± (0,077)	0,14	0,46	0,79	0,24
4	02:01	6,30	30	22,42 ± (0,049)	06,65 ± (0,077)	91,17 ± (0,070)	0,10	0,51	0,93	0,18
5	02:01	5,00	35	19,49 ± (0,035)	07,97 ± (0,063)	72,34 ± (0,021)	0,14	0,47	0,81	0,24
6	0	6,30	25	15,26 ± (0,049)	11,36 ± (0,049)	90,52 ± (0,077)	0,22	0,37	0,64	0,38
7	02:01	5,00	25	16,22 ± (0,063)	10,97 ± (0,042)	90,40 ± (0,091)	0,21	0,39	0,68	0,36
8	04:02	6,30	25	15,47 ± (0,049)	08,35 ± (0,070)	87,09 ± (0,049)	0,15	0,37	0,64	0,25
9	0	6,30	35	19,09 ± (0,042)	08,89 ± (0,035)	88,42 ± (88,42)	0,16	0,46	0,8	0,28
10	04:02	6,30	35	17,12 ± (0,056)	10,41 ± (0,042)	90,24 ± (0,056)	0,19	0,41	0,71	0,34
11	02:01	5,00	30	19,41 ± (0,042)	08,27 ± (0,049)	84,38 ± (0,063)	0,14	0,46	0,81	0,25
12	02:01	5,00	30	19,46 ± (0,035)	08,26 ± (0,042)	83,70 ± (0,091)	0,14	0,48	0,84	0,25
13	02:01	3,70	30	18,81 ± (0,028)	08,91 ± (0,084)	76,22 ± (0,127)	0,16	0,45	0,78	0,28
14	04:02	3,70	35	18,61 ± (0,007)	08,21 ± (0,028)	83,57 ± (0,035)	0,14	0,45	0,78	0,25
15	0	5,00	30	21,39 ± (0,014)	07,00 ± (0,042)	86,47 ± (0,106)	0,11	0,50	0,89	0,20
16	04:02	3,70	25	16,95 ± (0,035)	11,33 ± (0,063)	89,01 ± (0,028)	0,22	0,41	0,71	0,38
17	02:01	5,00	30	19,32 ± (0,021)	08,20 ± (0,070)	83,81 ± (0,035)	0,14	0,42	0,73	0,25

Na Tabela 15 verifica-se que a condição que apresentou a maior concentração de etanol (22,42 g/L) para as 24 h corresponde ao ensaio 4, onde o pH foi ajustado em 6,30, nível médio de suplementação, ou seja, adicionou-se 2 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de peptona e nível médio para temperatura em 30 °C.

O ensaio que obteve a menor taxa de etanol produzido (15,26 g/L) foi mantido nas condições de pH em 6,30, sem suplementação, e nível baixo para temperatura (25 °C).

Os ensaios submetidos à temperatura no nível baixo (25 °C), apresentaram em sua grande maioria, os menores resultados na produção de etanol, quando comparados aos demais ensaios.

Os pontos centrais (11, 12 e 17) apresentaram uma produção média de 19,40 g/L de etanol, produção esta inferior ao obtido no ensaio 4, que foi de 22,42 g/L.

De acordo com a Tabela 15 os ensaios que apresentaram maior produção de biomassa foram os ensaios 6 (11,36 g/L) e 16 (11,33 g/L), correspondendo a produções baixas de etanol, 15,27 e 16,95 g/L respectivamente. Como consequência, estes ensaios apresentaram as maiores conversões de substrato em biomassa, indicando que a maior parte do substrato foi utilizada no crescimento celular, produzindo pouco etanol.

Em relação a taxa de produtividade de etanol, os ensaios que mostraram as taxas mais altas foram os ensaios 4, 12 e 15, com valores iguais a 0,93, 0,84 e 0,89 g/L.h respectivamente. Estes ensaios tem em comum a temperatura de 30 °C em seus processos fermentativos.

Os valores da análise de variância para o modelo quadrático com 95% de confiança estão apresentados na Tabela 16, juntamente com os valores de p-valor, o coeficiente das variáveis, o erro padrão e o coeficiente de determinação para o planejamento composto central.

Tabela 16 - Análise do modelo de regressão quadrática por meio da ANOVA ($R=0,8177$), obtido através da resposta (Etanol g/L). Em negrito estão os valores com $p<0,05$.

(continua)

	Efeito	-95,00%	95,00%	F	p-valor
Média/Intercepto	20,00268	19,16643	20,83892		
(1)Suplementação (L)	-0,74700	-1,98300	0,48900	1,55589	0,224304
Suplementação (Q)	-0,46937	-2,85725	1,91852	0,16458	0,688570

Tabela 16 - Análise do modelo de regressão quadrática por meio da ANOVA (R=0,8177). Em negrito estão os valores com $p < 0,05$

(continuação)					
	Efeito	-95,00%	95,00%	F	p-valor
(2)pH (L)	-0,04000	-1,27600	1,19600	0,00446	0,947300
pH (Q)	0,31563	-2,07225	2,70352	0,07442	0,787334
(3)Temperatura (L)	1,37100	0,13500	2,60700	5,24097	0,031156
Temperatura (Q)	-5,19937	-7,58725	-2,81148	20,19529	0,000150
(1L) : (2L)	-0,52375	-1,90564	0,85814	0,61189	0,441726
(1L) : (3L)	0,75625	-0,62564	2,13814	1,27573	0,269858
(2L) : (3L)	1,84375	0,46186	3,22564	7,58282	0,011053

O modelo considera apenas os coeficientes de regressão estatisticamente significativos de acordo com o teste F (p -valor $< 0,05$), indicando como significativos os termos linear e quadrático da variável Temperatura ($p = 0,0311$ e $0,0001$) e também o termo de interação entre as variáveis Temperatura e pH ($p = 0,011$).

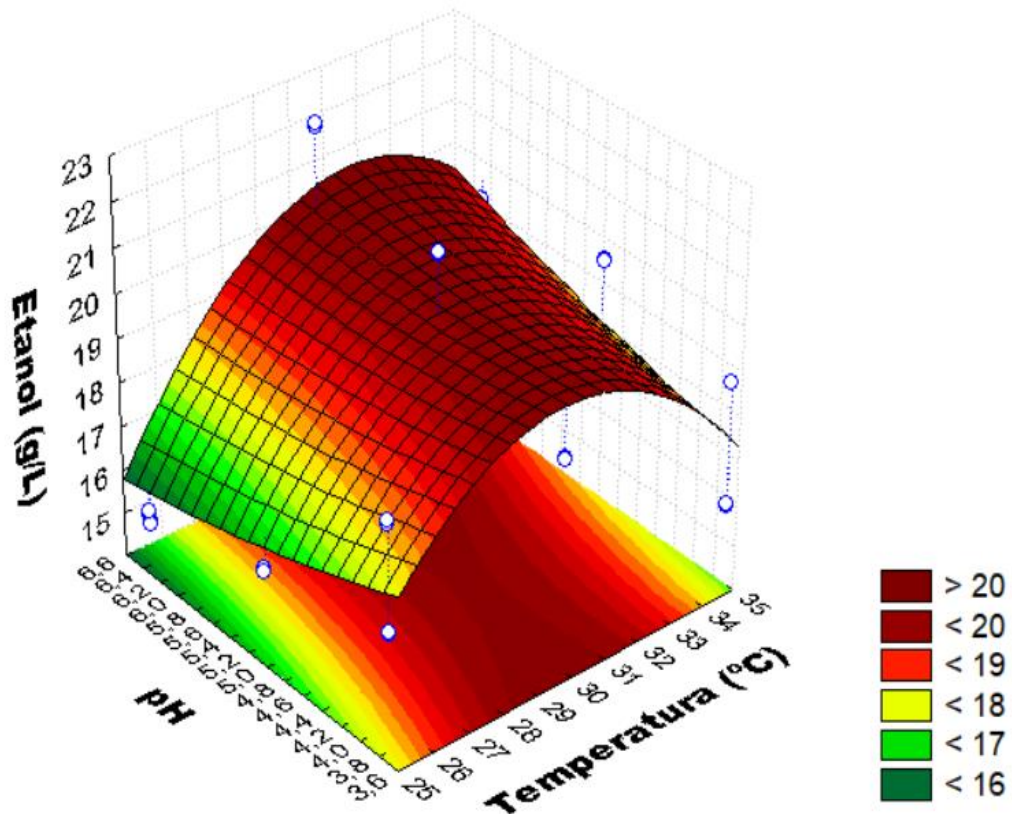
Observa-se as melhores condições para produção de etanol foram obtidas através da metodologia de superfície de resposta em que a temperatura deve ser mantida a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, assumindo um pH equivalente a 5,00 e suplementação de 2 g/L de Extrato de Levedura e 1,0 g/L de peptona.

Assim apresenta-se o modelo matemático que representa a concentração de etanol produzido em função da variável temperatura (quadrática e linear), e também respeitando a interação entre Temperatura e pH, representado pela Equação (11).

$$\text{Etanol (g/L)} = 10,00 + 1,371 * \text{Temp.} - 2,599 * \text{Temp.}^2 + 1,843 * \text{Temp.} : \text{pH} \quad (11)$$

A Figura 15 apresenta a superfície de resposta para o percentual de conversão, indicando que para melhores resultados da fermentação do permeado de soro de queijo, deve-se realizar os experimentos na faixa de temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

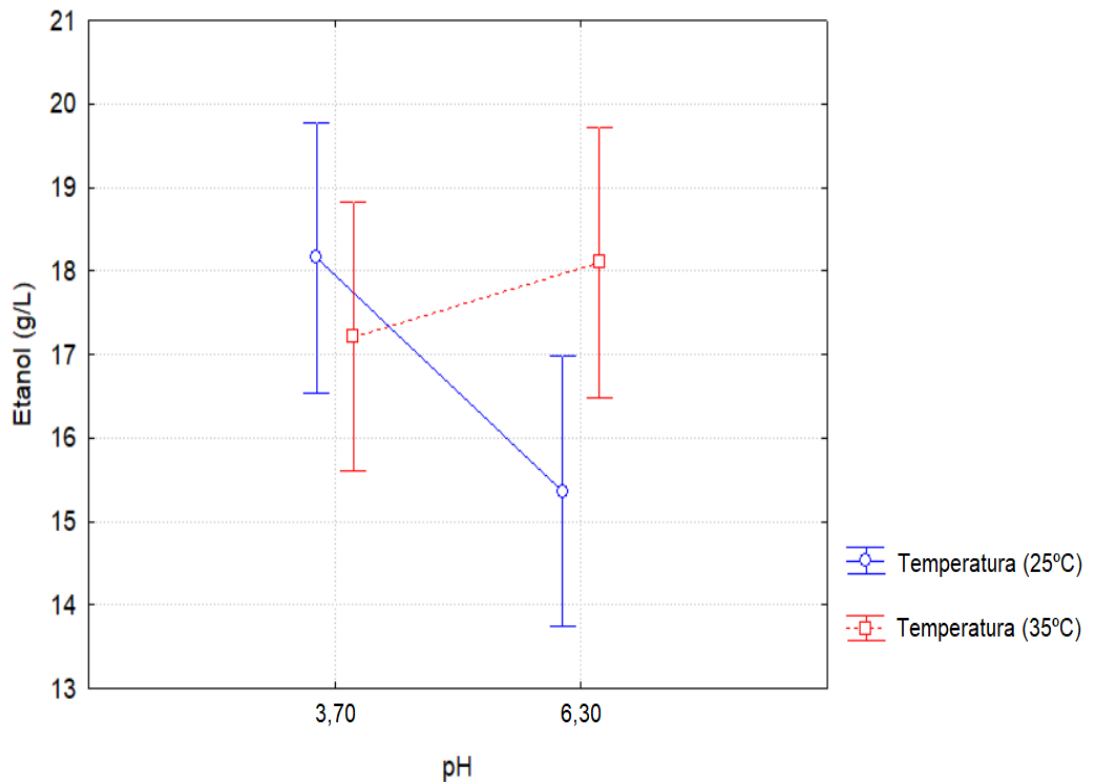
Figura 15 – Superfície de resposta de rendimento em função da temperatura (x) e pH (y),



Baseando-se nos resultados encontrados pela superfície de resposta e no ensaio que apresentou a maior produção de etanol (ensaio 4) determinou-se que o experimento cinético de aumento de escala fosse conduzido nas condições de temperatura a 30 °C, com pH ajustado em 6,30 e com a adição de 2 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de peptona.

Avaliando a interação entre as variáveis Temperatura e pH verifica-se através da Figura 16, que quando ocorre o aumento do pH, em 25 °C, ocorre uma diminuição considerável na produção de etanol (15,4%). Em contrapartida, quando a temperatura do meio fermentativo é de 35°C e submete-se a mesma variação de pH, ocorre um leve aumento na produção de etanol.

Figura 16 – Gráfico do comportamento de interação das variáveis temperatura e pH como reflexo o comportamento da concentração de etanol.



De acordo com a Tabela 15, os valores de viabilidade celular apresentaram grande variação entre os ensaios. A maior viabilidade celular foi observada no ensaio 4, com 91,17%, considerada adequada ao processo fermentativo. Os ensaios 1 (57,49%), 3 (76,06%), 5 (72,34%) e 13 (76,22%) correspondem aos menores valores de viabilidade celular, o que implica em baixa conversão do substrato pelas leveduras.

Aplicou-se a metodologia de superfície de resposta com o objetivo de verificar qual o efeito das variáveis de entrada `suplementação`, `temperatura` e `pH` na resposta viabilidade celular. Utilizou-se a mesma matriz do planejamento experimental composto central que foi utilizada para avaliação das variáveis significativas na produção de etanol. Os valores da análise de variância para o modelo quadrático para 95% de confiança estão apresentados na Tabela 17, que apresenta também os valores de p-valor, o coeficiente das variáveis, o erro padrão e o coeficiente de determinação para o planejamento composto central.

Tabela 17 - Análise do modelo de regressão quadrática por meio da ANOVA ($R^2=0,8174$ e R^2 ajustado= $0,5826$). Em negrito estão os valores com $p<0,05$.

	Efeito	-95,00%	95,00%	F	p
Média/Intercepto	82,6596	76,9962	88,32291		0,000000
(1)Suplementação (g/L)(L)	3,1800	-5,1907	11,55065	0,806975	0,398860
Suplementação (g/L)(Q)	-0,8335	-17,0051	15,33808	0,014854	0,906421
(2)pH (L)	10,7960	2,4253	19,16665	9,301042	0,018589
pH (Q)	4,0265	-12,1451	20,19808	0,346632	0,574524
(3)Temperatura (g/L)(L)	-10,4260	-18,7967	-2,05535	8,674437	0,021552
Temperatura (g/L)(Q)	-0,6235	-16,7951	15,54808	0,008312	0,929910
(1L) : (2L)	-7,3825	-16,7412	1,97617	3,479387	0,104394
(1L) : (3L)	7,3725	-1,9862	16,73117	3,469968	0,104782
(2L) : (3L)	9,0425	-0,3162	18,40117	5,220029	0,056242

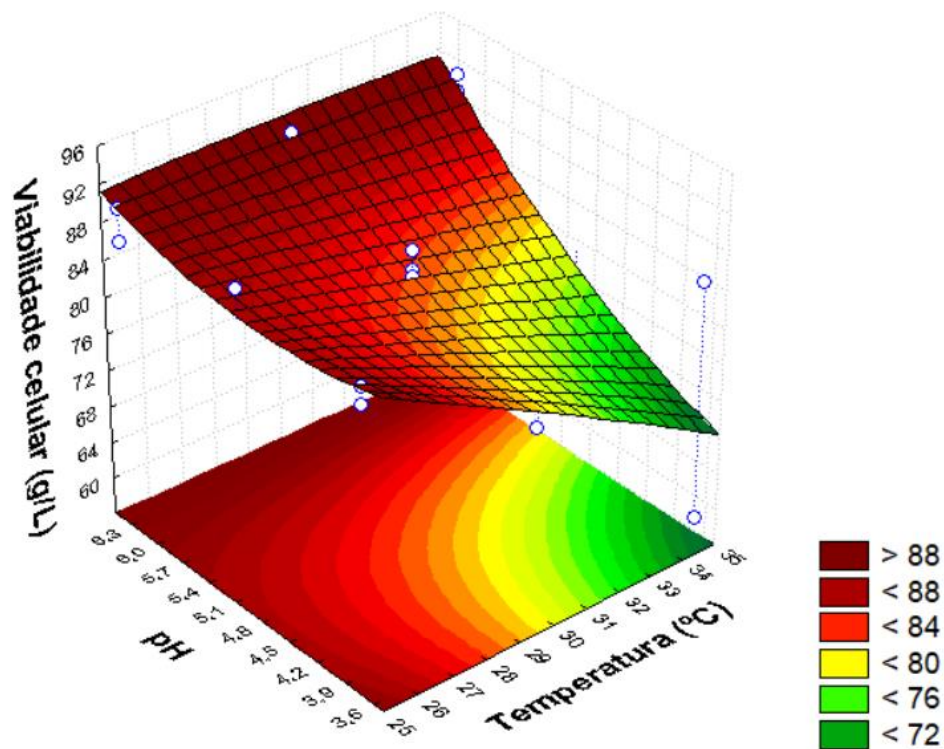
Considerando as variáveis 'pH linear', e 'temperatura linear' as quais apresentaram significância estatística quando considerado 95% do intervalo de confiança ($p=0,01$ e $0,02$ respectivamente), observa-se que as maiores viabilidades foram obtidas em temperatura a $25\text{ }^\circ\text{C}$, e pH ajustado em 6,30.

O modelo matemático que representa a viabilidade celular em função das variáveis pH e temperatura é representado pela Equação 12:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = 41,32 + 5,40 * \text{pH} - 5,21 * \text{Temperatura} \quad (12)$$

A Figura 17 apresenta a superfície de resposta para a viabilidade celular. A viabilidade celular aumenta com a diminuição da temperatura e aumento do pH, alcançando a porcentagem de 90,5 % quando a temperatura está no nível baixo e o pH no nível alto. Esta condição influencia de forma positiva na viabilidade celular das leveduras, favorecendo o desenvolvimento da mesma e conseqüente consumo de substrato de forma eficiente.

Figura 17 – Superfície de resposta da viabilidade celular (%) em função da temperatura (x) e pH (y)



Segundo OKOLO *et al.* (1987), a porcentagem de células viáveis durante a fermentação é importante para a manutenção da população de leveduras. Assim, seu monitoramento é imprescindível, pois, além de moléculas indesejadas presentes na matéria-prima, compostos tóxicos para as leveduras, que são produzidos durante a fermentação, podem acumular-se no interior das células, resultando em redução de viabilidade e eficiência na produção do etanol.

4.3.5 Fermentação com aumento de escala em biorreator

As respostas obtidas pelos tratamentos estatísticos dos dados fortaleceram a escolha dos parâmetros a serem fixados no experimento de aumento de escala. O ensaio que apresentou a maior produção de etanol no delineamento experimental teve sua escala maximizada, aumentando o volume útil de fermentação de 100 mL para 5,5 litros, conforme descrito no item 3.4.2.5. Na Figura 18 está representado o biorreator contendo o meio fermentativo.

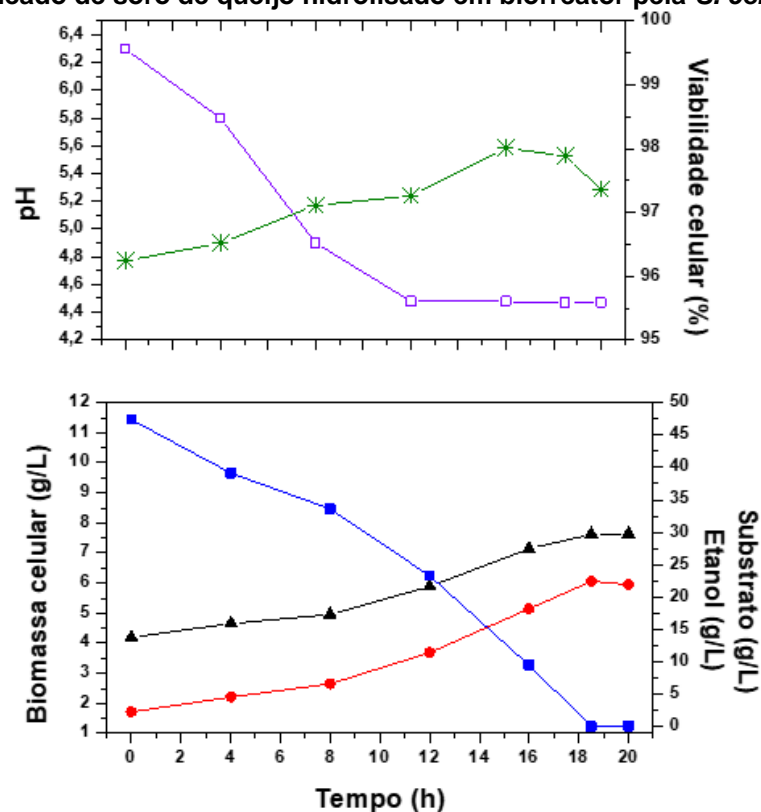
Figura 18 – Ensaio fermentativo em biorreator



Fonte: A autora

Trabalhou-se com a temperatura em 30 °C, pH 6,30 e adicionou-se ao meio 2 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de peptona. Amostras do meio fermentativo foram retiradas a cada 4 horas para o estudo cinético da fermentação. Os resultados obtidos na quantificação de biomassa, substrato, etanol, pH e viabilidade celular estão expressos na Figura 19.

Figura 19 - Acompanhamento da produção de biomassa celular (g/L) (▲), consumo de substrato (g/L) (■), produção de etanol (g/L) (●), pH (□) e viabilidade celular (%) (*) ao longo do tempo de fermentação: temperatura 30 °C, pH 6,30; com a adição de suplementos e sem agitação em fermentação do permeado de soro de queijo hidrolisado em biorreator pela *S. cerevisiae*.



Após a décima sexta hora de fermentação realizou-se uma amostragem adicional para verificação da concentração de glicose disponível no meio, visando determinar o tempo em que toda a fonte de carbono havia sido consumida. Através da Figura 19 verifica-se que com 18,5 horas de fermentação a concentração de substrato disponível ao micro-organismo havia esgotado (0,12 g/L), permanecendo sem variação considerável até a vigésima hora (0,11 g/L).

A produção máxima de etanol foi verificada com 18,50 horas de fermentação (22,45 g/L), e a produção de biomassa após 20 horas resultou em 7,64 g/L, valores estes próximos aos obtidos no ensaio 4 correspondente do planejamento experimental, que foram de 22,42 e 6,63 g/L, respectivamente.

Na Figura 19 a fase exponencial de crescimento do micro-organismo é compreendida entre a oitava hora e a décima oitava hora, não apresentando crescimento significativo entre a décima oitava hora e a vigésima hora (0,02 g/L). A produção de etanol seguiu a mesma tendência, conforme pode ser observado através da oitava hora (6,66 g/L) até a décima oitava hora (22,45 g/L).

Após a décima oitava hora, observa-se que a concentração de etanol no meio fermentativo diminuiu de 22,45 g/L para 21,96 g/L, fato este que pode ser justificado pela falta de substrato disponível a levedura, e esta metabolizar o etanol em sua manutenção celular.

Fato semelhante foi observado por Andrade (2005), na fermentação do soro de queijo (60 g/L) pela *S. cerevisiae*, quando o maior valor de etanol produzido na oitava hora de fermentação foi de 29,40 g/L, na décima hora, essa concentração de etanol diminuiu para cerca de 26 g/L.

Na Figura 19 verifica-se que a viabilidade celular se manteve alta, com resultados acima de 96% durante toda a fermentação.

Em todos os experimentos trabalhou-se com o permeado de soro de queijo hidrolisado autoclavado. De acordo com Burlani (2014) a utilização de meio fermentativo esterilizado é favorável a produção de etanol, uma vez que a elevada quantidade de micro-organismos representa a competitividade com a levedura pelos açúcares disponíveis, convertendo os em ácido láctico.

As velocidades específicas de crescimento (μ), velocidade específica de formação de produto (μ_p) e velocidade específica de consumo de substrato (μ_x) foram de 0,04, 0,21 e 0,45 h⁻¹. Comparando os resultados com a avaliação cinética

preliminar, o valor de μ_s não sofreu alteração, porém os valores de μ_p e μ_x se mostraram superiores, indicando que a fermentação no biorreator, operada com as melhores condições apontadas no planejamento experimental favorece o consumo de substrato para formação do produto de interesse, o etanol.

A produtividade de etanol alcançada foi de 1,70 g/L.h, no período entre a décima segunda hora e a décima sexta, também se mostrando superior ao valor encontrado na cinética preliminar, que foi de 1,65 g/L.h.

O rendimento da fermentação no biorreator ($Y (p/s)$) foi de 0,47 g/g, e a conversão de substrato em biomassa ($Y (x/s)$) foi de 0,07 g/g. O rendimento se mostrou superior ao resultado encontrado na cinética preliminar (0,27 g/g), enquanto que a conversão de substrato em biomassa foi inferior (0,27 g/g), evidenciando que as condições apontadas no planejamento experimental e replicadas no experimento de aumento de escala no biorreator foram favoráveis a formação de etanol ao invés de biomassa.

Apesar do planejamento experimental ter apontado que a concentração de suplementos não é significativa na produção de etanol, a literatura fornece informações de que com o uso de suplementos consegue-se obter a máxima produtividade das leveduras.

Yu, Zhang, Tan (2009) verificaram o efeito da suplementação do fósforo e do nitrogênio ao sorgo (180,7 g/L de açúcares) na fermentação por *S. cerevisiae* imobilizada. A metodologia de superfície de resposta apontou o emprego de 0,77 g/L de fósforo, 2,15 g/L de nitrogênio e pH inicial de 6,39. Nestas condições os autores conseguiram uma produtividade de 122 g/L.h.

Na indústria, na utilização de micro-organismos para a produção de etanol é indesejável que haja a formação de excesso de biomassa, cujo aumento se dá geralmente à custa da redução do rendimento do produto de interesse. O perfil fermentativo em destilarias da *Saccharomyces cerevisiae* (via Embden-Meyerhof-Parnas – EMP) produz cerca de 0,09 – 0,10 g/g de biomassa e apresenta um rendimento de aproximadamente 0,40 g/g. (BAI, ANDERSON E MOO-YOUNG, 2008), indicando que os valores encontrados no presente trabalho estão em acordo com o reportado pela literatura.

Trigueiros *et al.* (2016) trabalhando com a *S. cerevisiae* var. *boulardii* na fermentação do permeado de soro de queijo visando a produção de biomassa

obtiveram uma conversão de substrato em biomassa de 0,50 g/g, valor este superior ao encontrado no presente trabalho conforme esperado.

A fermentação em aumento de escala se mostrou favorável por diminuir o tempo de fermentação em que antes a fase exponencial do micro-organismo estava indicada entre a décima hora até a vigésima hora e no biorreator este tempo foi otimizado entre a oitava hora e a décima oitava hora.

4.3.6 Verificação da redução da demanda química de oxigênio (DQO)

O permeado de soro de queijo é um potencial poluidor por apresentar alta carga orgânica, identificados pelas análises de DBO e DQO, e se não for transformado em outros produtos, gera elevados custos para as empresas, pois o seu tratamento é oneroso (ALMEIDA, 2004; BALDASSO, 2009).

No início da fermentação coletou-se amostra do meio de cultura, em duplicata, para realização da análise de DQO, ao final da fermentação esse processo foi realizado novamente.

A análise do permeado de soro de queijo realizada no início da fermentação apresentou 126.000 mg/L de DQO, após a fermentação de 20 horas, destilação do etanol produzido e separação da biomassa resultante a DQO detectada foi de 88.000 mg/L, sendo possível observar uma redução de 30,15 %.

Burlani (2014) obteve um resultado final da DQO de 49.500 mg/L em meio fermentativo composto por permeado de soro de queijo reconstituído, após 24 horas de fermentação empregando a levedura *Kluyveromyces spp.* na produção de etanol. A redução obtida pelo autor foi de 63%, valor este superior ao encontrado no presente trabalho.

Apesar da redução no valor de DQO, o mosto fermentativo resultante apresenta um valor muito acima do que exige a legislação vigente para o lançamento de efluentes, a resolução CEMA 070/09, que estabelece um parâmetro máximo de 200 mg/L para DQO, indicando que para o lançamento deste tipo de efluente em corpos hídricos, o mesmo deverá passar por etapas adicionais de tratamento.

Como consequência do processo fermentativo há a redução da DQO, diminuindo os custos referente ao tratamento do efluente.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta uma estratégia eficiente de otimização do meio de cultivo para a fermentação do permeado de soro de queijo hidrolisado como substrato para a *S. cerevisiae*, utilizando um planejamento experimental composto central, que avaliou o efeito das variáveis de entrada sobre a variável resposta.

Os resultados da análise estatística demonstraram que o maior efeito na produção de etanol pela *S. cerevisiae* foi atribuído variável temperatura, e que os maiores efeitos na viabilidade das células durante o processo fermentativo são atribuídos ao pH e também a temperatura, enquanto que a fonte de suplementos (extrato de levedura e peptona) mostrou-se insignificante.

As condições de fermentação ideais encontradas no planejamento experimental foram validadas em biorreator, onde a concentração de etanol obtida em ambos os experimentos ficaram próximas indicando bom ajuste.

Na fermentação em biorreator obteve-se uma produtividade de etanol de 1,70 (g/L.h) a velocidade específica de crescimento (μ) de 0,04 h, de consumo de substrato (μ_x) de 0,45 h e de formação de produto (μ_p) 0,21 h. O rendimento $Y_{p/s}$ foi de 0,47 (g/g).

A cinética fermentativa realizada em biorreator se mostrou superior à fermentação em *shaker*, uma vez que o tempo para obter a máxima produção de etanol pela *S. cerevisiae* foi reduzido em 01 hora e 30 minutos.

O estudo demonstrou que o permeado de soro de queijo é um produto secundário com grande potencial de aplicação na produção de etanol por leveduras, uma alternativa aos combustíveis fósseis além de possibilitar ao final do processo fermentativo uma redução da carga orgânica inicial do mesmo, sendo este um dos parâmetros vinculados a redução do impactos ambiental, bem como a diminuição dos custos de processos de tratamento do efluente.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. M.; NOUT, M. J. R. **Fermentation and food safety**. Ed. Aspen, 2001.

ALMEIDA, E. dos S. Tratamento do efluente da indústria de queijos por processos biotecnológicos e químicos. 2004. 81f. Tese (Doutorado). Curso de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ALVES, J. G. L. F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade de Campinas. Campinas. 1996.

ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A.C.R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. (Orgs). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Vol. 2 Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. p. 215-253.

ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomera batatas L.*) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol. 22. P. 249-253, set-dez, 2002.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteína do soro de leite bovino**. 1ª edição. São Paulo: Editora Manole. 135 p. 2003.

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 965.17. 18 ed. Gaithersburg: 2010.

ASSUNÇÃO, G. M. **Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de queijo**. Dissertação de Mestrado. 130f. Programa de pós-graduação em engenharia química. Universidade Estadual do Paraná. Toledo – Paraná. 2014.

ATRA, R. *et al.* Investigation of ultra and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.67 n. 3, p. 325-332, Apr. 2005.

AUDIC, J-L.; CHAUFER, B.; DAUFIN, G. Non-food applications of milk components and dairy co-products: a review. *Le Lait (Dairy science and technology)*. EDP Science 83: 417-438. 2003.

AZEVEDO, D. P. L. De., **Atividade Antagônica da Cultura de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1015 sobre *Escherichia coli* – Estudo do Potencial Probiótico**. 2005. 53 f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

BACH, F. Obtenção de fermentado acético a base de soro de leite. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Santa Catarina. Pinhalzinho. Santa Catarina. 2009.

BAFRNCOVÁ, P.; SMOGROVICOVÁ, D; SLÁVIKOVÁ, I.; PÁTKOV, J. DOMÉNY, Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Left.**, v.21, p. 337-341. 1999.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105.

BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por membranas**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2008.

BALLER, L. D.; DA SILVA, G. M. C.; BOMBARDELLI, C., 2015. Estudo da Hidrólise da Lactose do Permeado de Soro de Leite pela Enzima β -Galactosidase seguido da fermentação alcoólica. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos. XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Fortaleza, Ceará: Brasil, Set. 2015.

BARBOSA, M. R., ARAUJO, E. H. De., Estudo da Produção da Enzima Lactase utilizando soro de queijo e fungo filamentoso *Aspergillus niger*. **Revista Horizonte Científico**. V. 1. Nº7: 2006. Disponível em: <<http://www.horizontecientifico.propp.ufu.br/viewissue.php?id=5>>. Acesso em: 10 de Agosto de 2015.

BARROS NETO B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos - Aplicações na ciência e na indústria**. 4.ed. Editora Bookman, 2010.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G; AMORIN, H.V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, v.28, supl.1, p.77-82, 1997.

BELINCANTA, Juliana. **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.

BEUCLER, J. DRAKE, M. FOEGEDING, E. A. Design of a beverage from whey permeate. **Journal of Food Science**, v.70. Terceira Edição. P. 277-285. 2005.

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

BIO-RAD LABORATORIES, INC. **Chromatography Aminex® HPLC Columns**. Bulletin 6333. Rev. A. 4 p. 2012.

BIRD, J. The application of membrane systems in the dairy industry. **Journal of the Society of Dairy Technology**. V. 49 p. 16-23. Fev. 1996.

BOSCHI, J. R. **Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração**. 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, B e C. Diário Oficial da União, Brasília, p.13, 21 set. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Instrução Normativa 68, 12/12/06. Brasília: Ministério da Agricultura, 2006.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. Composição – Agronegócio do Leite. **Agência de Informação Embrapa**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_2172_0039243.html> acesso em: 14 de Julho de 2015.

BRONSTEIN, V.; MONTE ALEGRE, R. Estudo dos parâmetros da ultrafiltração do permeado de soro de queijo fermentado por *Lactococcus lactis* sub sp. *lactis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, 9. 93-99, jan./abr. 1998.

BUND, T.; ALLELEIN, S.; ARUNKUMAR, A.; LUCEY, J. A.; ETZEL, M. R. Chromatographic purification and characterization of whey protein-dextran glycation products. **Journal of Chromatography A**. V. 1244. P. 98-105. 2012.

BURLANI, E. L. **Avaliação do potencial da levedura *Kluyveromyces spp.* Para biotransformação da lactose do soro de ricotta e permeado de soro de queijo em etanol.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Biotecnologia, Centro Universitário Univates. Brasil. 2014.

CARRASCOSA, C.; MILLÁN, R.; SAAVEDRA, P.; JABER, J. R., RAPOSO, A. SANIUÁN, E. Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. **Journal of Dairy Science**. V. 99. p. 2606-2616. 2016.

CARULLI, S.; CALVANO, C. D.; PALMISANO, F.; PISCHETSRIEDER, M. MALDITOF M.S. Characterization of glycation products of whey proteins in a glucose/galactose model system and lactose-free milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.59. p. 1793-1803. 2011.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte - as leveduras. **Revista Analytica**, n. 25, 2006.

CARVALHO, K. D. Utilização do soro de leite doce na fabricação de sorvete de massa. Dissertação de Mestrado. 197f. Centro Programa de pós-graduação em desenvolvimento sustentável e qualidade de vida. Universitário das Faculdades Associadas de Ensino –UNIFAE. São João da Boa Vista. 2012.

CASAL, M.; SCHULLER, D.; RODRIGUES, G. M. M.; PAIS, C. Métodos convencionais em microbiologia. In: CASAL, Margarida, coord. – “Microbiologia e genética molecular microbiana: manual de laboratório”. [S.l.]: Copissaurio, 2004. **Anais...** Disponível em <<http://hdl.handle.net/1822/2241>> Acesso em 12 de Maio de 2016.

CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLESEW, W. M. High gravity brewing: Nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing yeast. **Biotechnol. Left.**, v.5, n. 6, p. 429-434. 1983.

CAYOT, P.;LORIENT, D. Structure-function relations whey proteins. In: Damodaran, S.; Paraf, A. **Food proteins and their applications**. New York: Mareei Dekker, p. 225-255. 1997.

CEBALLOS SCHIAVONE, C. A. D. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – Lactobacillus – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol.** 2009. 177 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

CHANDEL, A. K.; ES, C.; RUDRAVARAM, R.; NARASU, M. L.; RAO, L. V.; RAVIDRA, P. **Biotechnology and Molecular Biology.** V. 2, p. 14. 2007.

CHRISTENSEN, K.; ANDRESEN, R.; TANDSKOV, I.; NORDDAHL, B.; DU-PREEZ, J. H. **Using direct contact membrane distillation for whey protein concentration.** *Desalination*, v. 200. P. 523-525. 2006.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial.** 2012. 200p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Univerisade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

Conselho Estadual do Meio Ambiente. **Resolução nº 70/2009** – CEMA, de 11 de agosto de 2009. Disponível em . Acesso em 21 de março de 2018.

COSTA, R. C. **Obtenção de lactose a partir do permeado de soro de queijo e permeado de leite.** 1995. 75 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

COUTINHO, M. R. V.; SILVA, J. R.; CUNHA, M. E. T.; OLIVEIRA, A. N.; LUVISOTTO, E.; SUGUIMOTO, H. H. **Produção de etanol em soro de queijo por *Sacharomyces fragilis*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces marxianus*.** Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias. Universidade do Oeste do Paraná. 2009.

CYSEWSKI, G. R.; WILKE, C. R. Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. **Biotechnology and Bioengineer.** v. 19. N. 8. P. 1125-1143, 1977.

DAVID, F. M.; COLLAO-SAENZ, E. A.; PÉREZ, J. R. O.; CASTRO, A. L. A.; RESENDE, H. R. A.; LANDIM, A. V. Efeito da adição de soro de leite sobre a digestibilidade aparente e os parâmetros sanguíneos de vacas secas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** V. 62 n. 5. 2010.

DE MORAIS, S. M. F. **Tolerância alcólica, atividade fermentativa e permeabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae*.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil. 109p. 1984.

DUMAS, J. B., Ann Chimphys (Paris), 1831;47:198

EBRAHIMI, M., CAPARANGA, A. R., ORDONO, E. E., VILLAFLORES, O. B., MOHAMMADHOSEIN, P. Effect of ammonium carbonate pretreatment on the enzymatic digestibility, structural characteristics of rice husk and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation processo with *Saccharomyces cerevisiae Hansen 2055*. **Industrial Crops and Products**. Vol. 101, p. 84-91. Jul. 2017.

EL-KHAIR, A. A. A. Formulation of Milk Permeate for Utilization as Electrolyte Beverages. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, vol. 3. P. 572-578. 2009.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Evolução na produção de leite da Região Sul**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355117/1528925/Panorama+do+Leite+-+outubro+2015/f97da482-483f-4451-bd26-e9f7e1d95c4b>>. Acesso em 14 de Outubro de 2016.

FARRO, P. C. A., Utilização do soro de queijo Minas Frescal pré-tratado e microfiltrado: efeitos da vazão volumétrica e da pressão transmembrana no fluxo do permeado. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil. 2003.

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

FOX, P. F. e MCSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry, First Edition, **London: Thomson Science**, 378p. 1998.

FOX, F. P., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., MCSWEENEY, P. L. H. Cheese Yield. **Fundamentals of Cheese Science**. Springer. Segunda edição. p. 279-280. Ago. 2016.

FOX, F. P., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., MCSWEENEY, P. L. H. Factors that Affect Cheese Quality. **Fundamentals of Cheese Science**. Springer. Segunda edição. p. 553-542. Ago. 2016.

FOX, F. P., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., MCSWEENEY, P. L. H. Whey and Whey Products. **Fundamentals of Cheese Science**. Springer. Segunda edição. p. 755-769. Ago. 2016.

GABARDO, S. **Engenharia de biorreatores contínuos com células imobilizadas para a bioconversão de soro e permeado de soro de queijo a bioetanol**. Tese. Programa de pós-graduação em engenharia química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 71 f. Porto Alegre–Rio Grande do Sul. 2015.

GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. Sao Paulo: Nobel, 2002.

GADEN, E.J. Fermentation kinetics and productivity. **Chemistry and Industry**, v.12, p.154-159, 1955.

GUIDINI, C. Z. **Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando a *S. cerevisiae* de características floculantes**. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em engenharia química. Universidade Federal de Uberlândia. 148f. Uberlândia - Minas Gerais. 2013.

GUO, X.; WANG, Y.; GUO, J.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, C.; XIAO, D. Efficient production of 2,3-butanediol from cheese whey powder (CWP) solution by *Klebsiella pneumoniae* through integrating pulsed fed-batch fermentation with a two-stage pH control strategy. **Fuel**. V. 203, p. 469-477, 2017.

GUTIEREZ, L. E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Science agriculture**. v.50. p.464-472.1993.

HAHN-HAGERDAL, B. Comparison between immobilized *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae* coimmobilized with beta-galactosidase, with respect to continuous ethanol production from concentrated whey permeate. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 27. P.914-916. 1985.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Nutrição**. V. 19, n.4, p. 479-488, 2006.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5^o ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876p.

HASHIZUME, T. Tecnologia do Vinho. In: AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia Industrial**. 1^a Ed. V. 4. São Paulo: Edgard Blucher LTDA. p. 21-68. 2001.

HECK, J. M. L., VAN VALENBURG, H. J. F., DIIJKSTRA, J., VAN HOOIJDONK, A. C. M. Seasonal variation in the dutch bovine raw milk composition **Journal of Dairy Science** v. 92, n. 10, p. 4745-4755, Oct. 2009.

HEERDE, E.; RADLER, F. Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of microbiology**. Berlin, 177. p.76-269. 1978.

HINRICHS, R. A.; KLEINBACH, M.; REIS, L. B. **Energia e Meio Ambiente**. São Paulo: Cenage Learning. 4ª edição. Cap. 17. P. 623-656, 2010.

HISS, H. **Cinética de Fermentações. Uma análise matemática da atividade microbiana**. 1ª edição. Apêndice A-1. P. 395-401. São Paulo. 2013.

IAP: Instituto Ambiental do Paraná. Parâmetros de Lançamento de Efluentes Líquidos. Disponível em: <<http://www.iap.pr.gov.br/pagina-49.html>>. Acesso em: 16 de Outubro de 2017.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 de Outubro de 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instrução Normativa 68. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2006.

ISO 21528-2 **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony count method**. 2004.

ISO 6887-2. **Microbiology of food for human consumption and animal feed. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological consideration**. 2004.

ISO 4832 **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique**. 2006.

ISO 4833-1 **Microbiologia da cadeia produtiva de alimentos – Método horizontal para a enumeração de micro-organismos. Parte 1: Contagem de colônias a 30°C pela técnica de *pour plate***. 2015.

ISO 6881-1 **Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal – Método horizontal para enumeração de estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies)**. 2016.

ISO 7932 **Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal – Método horizontal para a enumeração presuntiva de *Bacillus cereus* - Técnica da contagem de colônias a 30°C.** 2016.

KELLY, J.; KELLY, P. Nanofiltration of whey: quality, environmental and economic aspects. **Journal of the Society of Dairy Technology.** V. 48. P. 20-25, Fev. 2005.

LAIOPAIBOON, A.; NUANPENG, S.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P.; LAIOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource Technology.** V. 100. P. 4176-4182. 2009.

LANAGRO - Laboratório Nacional Agropecuário. **Determinação de açúcares redutores em lactose, açúcares não redutores em sacarose e amido em produtos lácteos por oxidimetria.** Rio Grande do Sul, 2014.

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário. **Determinação de sódio e potássio em produtos de origem animal por espectrometria de emissão atômica por chama.** Rio Grande do Sul, 2014.

LEROY, F. ; VUYST, L. de. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 67-78, 2004.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Biotechnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos.** In: Schimidell, W. Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. v. 1 cap. 1: Produção de etanol, p,1-43, 2001.

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

LIMA, T. O. **Produção artesanal de aguardente de mel de abelhas de diferentes floradas.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2011.

LIZIEIRE, R. S.; CAMPOS, O. F. de. **Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite.** Instrução Técnica 44 para o Produtor de Leite, ISSN nº 1518-3254, 2006.

LÓPEZ, F. N. A.; ORLÍC, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E. Effects of temperature, pH and

sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. **International Journal of Food Microbiology**. V. 131, p. 120 – 127. 2009.

LUCARINI, A. C.; SILVA, L. A.; BIANCHI, R. A. Um sistema para a contagem semi-automática de micro-organismos. **Revista pesquisa e tecnologia FEI**. v. 26. p. 36-40. 2004.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (2000). Nutrition and metabolism. **Brock biology of microbiology**. 9th ed. NJ: Prentice-Hall.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. H. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 25. P. 103-121. 1983.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria 146**. Brasília, 1996. Disponível em: <<http://www.agais.com/normas/leite/queijos.htm>> Acesso em 14 de Julho de 2015.

MC DONOUGH, F. E. Whey solids utilization and salvage system. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v. 11, n. 1, p. 8-11, 1997.

METSÄMUURONEN, S.; MÄNTTÄRI, M.; NYSTRÖM, M. Comparison of analysis methods for protein concentration and its use in UF fractionation of whey. **Desalination**, v.283, p.156-164, 2011.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 5ª edição, Rio de Janeiro: LTC. 2012.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L. MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V.; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *airlift* e *shaker*. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**. Campinas. V. 27, n. 4, p. 688-693. 2007.

MUSSATTO S. I.; DRAGONE G.; GUIMARAES P.M.R., et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnol. Adv.**, v.28, p.817-830, 2010.

NABAIS, R. C.; SACORREIA, I; VIEGAS, C. A.; NOVAIS, J. M. Influence of calcium-ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the

ammonium assimilation. **Metabolic Engineering**. V. 2 p. 69-77. 2000.

NASCIMENTO, P.T.S. et al. Exogenous factors in the development of flexible fuel cars as a local dominant technology. **Journal of Technology Management & Innovation**, v.4, p.110-119, 2009.

NDIMBA, B. B.; NDIMBA, R. J.; JOHNSON, T. S.; SIRISATTHA, W. R.; BABA, M.; SIRISATTHA, S.; SHIRAIWA, Y.; AGRAWALI, G.K.; RAKWALI, R. Biofuels as a sustainable energy source: An update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. **Journal of Proteomics**. v. 93, p. 234-244, 2013.

NEVES, L. C. M. **Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181**. Dissertação de mestrado. Departamento de ciências farmacêuticas. Área de tecnologia de fermentações. Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil. 2003.

NEUMANN, M.; OST, R.; PELLEGRINI, L. G. de; MELLO, S. E. G. de; SILVA, M. A. A. da; NÖRNBERG, J. L. Utilização de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) visando à produção de cordeiros Ile de France super precoces em sistema de *creep feeding*. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2285-2292, Novembro 2008.

NOBRE, T. P. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. 111f. Piracicaba - São Paulo. 2005.

OKOLO, B. *et al.* Toxicity of ethanol, n-butanol and iso-amyl alcohol in *S. cerevisiae* when supplied separately and in mixtures. **Biotechnology Letters**, Kew, v.9, n.6, p.431-434, 1987.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v.2, 279p. 2005.

ORTEGA-REQUENA, S.; REBOUILLAT, S. Bigger data open innovation: potential applications of value-added products from milk and sustainable valorization of by-products from the dairy industry. **Green Chemistry**. v. 17, p. 5100-5113. Set. 2015.

PARASHAR, A.; JIN, Y.; MASON, B.; CHAE, M.; BRESSLER, C. Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. **Journal Dairy Science**. V. 99. P. 1959-1867. 2016.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**. 2 ed. v. 2, Afiliada, 1996.

PONSANO, E. G.; CASTRO-GÓMES, R. J. H. Fermentação de soro de queijo por *Kleyveromyces fragilis* como uma alternativa para redução de sua capacidade poluidora. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 15, n.1 p.170-173. 1995.

POULSEN, N. A. *et al.* Seasonal variation in content of riboflavina and major minerals in bulk milk from three Danish daieres. **International Dairy Journal**. v. 42 p. 6-11. Mar. 2015.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Chesse whey management: A review. **Journal of Environmental Management**. V. 110. P. 48-68. 2012.

RADE-KUKIC, K.; SCHMITT, C.; RAWEL, H. M. Formation of conjugates between β -lactoglobulin and allun isothiocyanate: effect on protein heat aggregation, foaming and emulsifying properties. **Food Hydrocolloids**. v. 25. P. 694-706. 2011.

REKTOR, A.; VATAI, G. Membrane filtration of mozzarella whey. **Desalination**, Amsterdam, v. 162, p. 279-286, Marc. 2004.

RIBEIRO, C.A.F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Science Agriculture**., v. 56, p.255-263, 1999.

RIBEIRO, H. S. Obtenção e aplicação de concentrado proteico de soro de leite bovino em produtos cárneos. 2001. 259 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência da Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2001.

RIBEIRO-SANTOS, R., SOUZA, A. L. R., TROMBETE N. R. M. Proteína do Soro de Leite: Aproveitamento e aplicações na produção de embalagem biodegradável. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sstentável**. v. 10 n. 5, 2015.

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.

RUBEZ, J. O setor lácteo no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DO SETOR LÁCTEO, 1., 1998, Bueno Aires. **Anais...** Bueno Aires: Sociedade Rural Argentina, 1998. 12 p.

RYAN, M. P., WALSH, G. The biotechnological potential of whey. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. Springer. v. 15, p. 479-498. Set. 2016.

SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRO, V.; IORIO, G. Optimization of ricotta cheese whey (RCW) fermentation by response surface methodology. **Bioresource Technology**. v.101 p. 9156 – 9162. 2010.

SANTOS, A. M. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Cultura - análise da conjuntura agropecuária**. Ano 2014. Disponível em <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/bovinocultura_leite_14_15.pdf> Acesso em 14 de Outubro de 2016.

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. Sao Paulo: Varela, 2000.

SILVA, C. A.; GOMES, J. P.; SILVA, F. L. H.; MELO, E. S. R. L. CALDA, M. C. S. Utilização de soro de leite na elaboração de pães: estudo da qualidade sensorial. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 13, n. especial, p.355 - 362, 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 57, n.1, p. 1-11, July 1996.

SISO, M. I. G.; DOVAL, S. S. *Kluyveromyces lactis* immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 16. P. 303-310. 1994. SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins-From 'wutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v.18, p.695-704, 2008.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996.

SGARBIERI, V. C. Revisão; propriedades estruturais e físico-química das proteínas

do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8. p. 43-56, 2005.

SOUZA, K. M.; ANDRADE, A. C. e ARAUJO, 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.

SOUZA, A. S. **Estudo do processo de microencapsulação por “spray-drier” de bioaroma produzido por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1**. 2007. 125f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. São Paulo. Brasil. 2009.

SOUSA, J. L. U. de; MONTEIRO, R. A. B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **Fazu em Revista**, Uberaba, n. 8, p.100-107, 2011.

STOLIAR, M. U.S. Whey Ingredients in Bakery Products. Monografia publicada por U.S. **Dairy Export Council**. (USDEC Monography): Arlington, U. S. A. 8 páginas. 2009. SUZART, C. A. G., DIAS, J. C. T. **Desenvolvimento tecnológico de aguardente de soro de queijo**. Projeto Bolsa BITEC, IEL, SEBRAE e CNPQ. 2007.

TIMOFIECSYK, F. do R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos em indústria de alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 221-235, jul/dez. 2000.

TOLKACH A.; KULOZIK, U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 67, n.1/2, p. 13-20, Mar. 2005.

TONIATO, J. **Determinação de parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica em diferentes substratos**. 2013. 60f. Dissertação. (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP. Botucatu, São Paulo. 2013.

TORIJA, M.J. et al. Effects of fermentation temperature on de strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev. Int J. Food Microbiol.**, v.80, p.47-53, 2003.

TORKAMANZADEH, M.; JAHANSHAHI, M.; PEYRAVI, M.; RAD, A. S. Comparative experimental study on fouling mechanisms in nano-porus membrane: cheese whey ultrafiltration as a case study. **Water Science & Technology**. V. 74 p. 2737-2750. 2016.

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

UNITES STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. **Manual de referência para produtos de soro dos Estados Unidos**. Arlington, 135 p., 1997.

U.S D.E.C.A, US. Arlington, Manual de Referências para Produtos de Soro dos EUA, **Dairy Export Concil** v.a 22201-3001. USA, 1997.

VENTURA, R. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento de processo**. Dissertação de Mestrado. 103 p. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro - São Paulo. 2007.

VITOLLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia Industrial**. V. 4. Sao Paulo: Edgard Blucher LTDA. p. 387-420, 2001.

YADA, R. Y. Protein in Food Processing. **England: Woodhear Publishing**, 2004.

WALZEN, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMEN, J. B. Whey componentes: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlookin. **Crit. Ver. Food Science and Nutrition**. V. 42, p. 353-375. 2002.

WENZEL, J. D.; OESTER, D. A. Supplementation of ethanol fermentations and processes including supplemental components. US 200800003653 A1, 29 jun. 2006, 21 fev. 2007.

WIESIOLEK, C. C. **Alterações fisiológicas em *Saccharomyces cerevisiae* submetida a campo eletromagnético estático**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal de Pernambuco. Brasil. 2007.

ZAFAR, S.; MOHAMMAD, O.; MAHAMMED, S.; HUSAIN, S. Batch kinetics and modeling of ethanolic fermentation of whey. **International Journal of Food Science and Technology**. V.40, p. 597-604, 2005.

ZARCARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; SPADOTI, L. M.; GALFINA, D. A.; TRENTO, F. K. H. S.; SILVA, A. T. Permeado de Soro. Aplicações que agregam valor aos coprodutos do leite. **Anuário Leite e Derivados**. 2005.

ZARCACHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; SPADOTI, L. M.; GALLINA, D. A.; TRENTO, F. K. H. S.; ALVES, A. T. S. Permeado de soro: aplicações que agregam valor aos coprodutos do leite. **Anuário Leite & Derivados**, n. 131, p. 48-55, 2012.

ANEXO A – Métodos Analíticos

Determinação de proteínas – Método Dumas (1831)

A quantificação do teor de proteínas do permeado de soro de queijo consistiu na pesagem de 0,1500 ($\pm 0,010$) g da amostra, em capsula de estanho, em seguida preencheu-se a capsula com óxido de alumínio para evitar perdas da amostra no momento da combustão. O resultado é expresso em porcentagem de proteínas por grama da amostra, de acordo com a Equação 13.

$$\% \text{ Proteínas} = \text{Concentração de N} * 6,38 \quad (13)$$

Quantificação do Teor de Sódio e Potássio – Método Lanagro (2014)

Pipetou-se volumetricamente 4 mL da amostra e adicionou-se em balão volumétrico, completando o volume com água destilada. No fotômetro de chama, após estabilização da chama por 30 minutos, a leitura do branco foi ajustada por meio da aspiração de água destilada por 10 minutos. O equipamento foi calibrado com soluções padrão de Sódio e Potássio, ambos com concentração conhecida de 20 ppm. Logo em seguida a amostra foi aspirada e os resultados foram expressos em ppm e convertidos a mg/100g, de acordo com a Equação 14.

$$\text{Teor do íon (mg/100g)} = (\text{concentração (mg/L)}/10) \quad (14)$$

Determinação de glicídios redutores em lactose

De acordo com sua estrutura, os carboidratos glicose e galactose são definidos como poli-hidroxi-aldeídos, segundo Lanagro (2014) eles recebem esta denominação por que apresentam em sua estrutura vários grupos hidroxilas (^-OH) e um grupo aldeído (CHO), devido a estas características apresentam a capacidade de reduzir

soluções alcalinas como a solução de Fehling e chamados de glicídios redutores.

A metodologia foi realizada conforme descrito pela Instrução Normativa 68 (2006), no qual foram pipetados 10 mL do permeado e transferidos em um balão volumétrico de 250 mL. Adicionou-se 5 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15 % e 5 mL de solução de sulfato de zinco a 30% e ajustou-se o menisco. A solução foi deixada em repouso por 50 minutos e filtrada em papel filtro qualitativo, o filtrado foi transferido para uma bureta para posterior titulação.

A titulação foi feita com duas soluções preparadas, uma com 5 mL de solução de Fehling A e outra com 5 mL da solução de Fehling B, em ambas foram adicionadas 40 mL de água purificada e levados para aquecimento até ebulição da solução onde foram adicionadas 1 gota de solução de azul de metileno a 1 % e titulado até desaparecimento da coloração do indicador.

A percentagem de lactose pode ser encontrada através da Equação 15:

$$\% \text{ de glicídios redutores em lactose} = [100 \times 250 \times (T/2) \times 1,39] / (V \times m) \quad (15)$$

Onde,

T = título da solução de Fehling;

V = volume de amostra gasto na titulação (mL);

m = massa da amostra (g);

1,39 = fator de conversão da glicose em lactose.

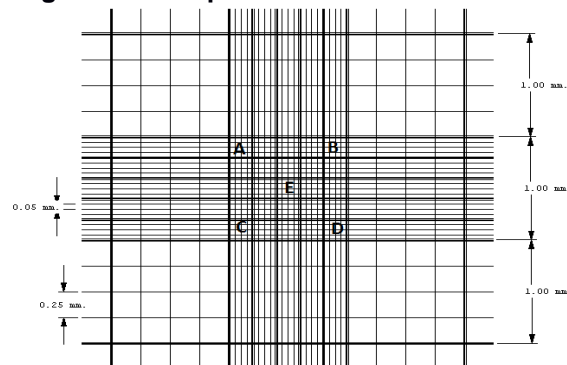
Determinação do número de células em suspensão

Pela metodologia proposta por Alves e Guimarães (2010) foi possível determinar a concentração de leveduras presentes no meio fermentativo utilizando a câmara de Neubauer e um microscópio ótico, para cálculo da viabilidade celular.

A câmara de Neubauer é uma lâmina de vidro com divisões que auxiliam na contagem, ela possui 9 quadrados que medem 1 mm² de área. O esquema da câmara ao microscópio ótico está representado na Figura 20. Sendo que para o método somente os quatro quadrados externos são utilizados na contagem de células, e cada quadrado externo é formado por mais 16 quadrados menores que auxiliam a

contagem.

Figura 20 – Esquema da câmara de Neubauer



Fonte:; SILVA; BIANCHI, (2004).

De acordo com a metodologia, alíquotas de 0,3 mL foram retiradas de cada erlenmeyer e transferidas para tubos falcon com 0,9 mL de água, e homogeneizadas.

Uma lamínula foi adicionada na parte superior da câmara de Neubauer e 0,5 mL foram retiradas dos tubos falcon e transferidas para a extremidade da câmara com cuidado para que a suspensão preenche-se apenas um lado dela, e assim foi levada para análise e contagem de leveduras em microscópio ótico.

A lamínula de vidro sobre a câmara serve para conter a suspensão celular, o espaço formado entre elas é de 0,1 mm, sendo assim, o volume determinado por cada quadrado é equivalente a 0,1 mm³, portanto, as células contadas em um quadrado contidas em 1 mL equivalem ao valor de células contado multiplicado por 10⁴ (fator de correção da câmara).

O número de células por mL de cada suspensão foi obtido através da Equação (16):

$$n^{\circ} \text{ células / mL} = (n1 / n2) * f * 10^4 \quad (16)$$

Onde,

n1 = número total de células;

n2 = número de quadrantes contados;

f = fator de diluição.

Determinação da concentração de ácidos orgânicos e etanol

As curvas de calibração foram construídas a partir de padrões, diluídos em água ultrapura, obtendo-se as seguintes concentrações: 20g/L, 10 g/L, 8g/L, 4g/L, 2g/L e 1g/L. Estas amostras foram analisadas no cromatografo a liquido de ultra eficiência e a partir da área de integração do pico obtido no cromatograma (Figura 21) calculou-se a equação da reta para cada ácido orgânico (RIBANI *et al.*, 2004). Para o etanol, trabalhou-se com concentrações de 2,5 a 50% (m/v). As equações obtidas bem como seus respectivos coeficientes de regressão linear estão expressos na Tabela 18.

Figura 21 – Cromatograma dos padrões na concentração de 2 g/L e 5%. Composto (1): ácido succinico (12,16 min.), (2) ácido láctico (13,07 min.), (3) ácido fórmico (14,32 min.), (4) ácido acético (15,51 min.) e (5) etanol (21,75 min).

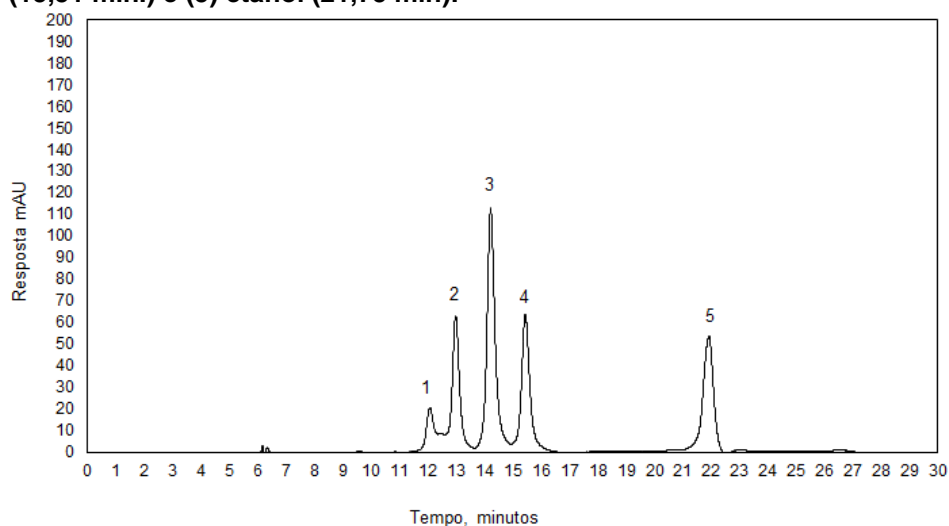
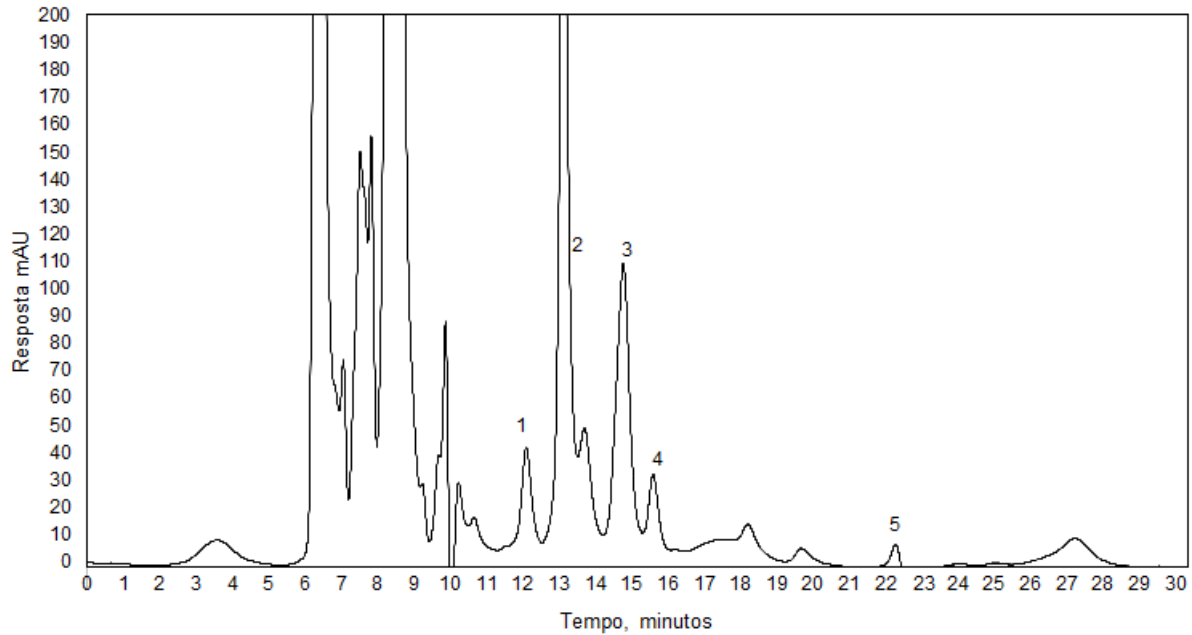


Tabela 18 – Equações da reta para cada ácido orgânico e seus respectivos valores de R². Na equação o valor de x corresponde a área da integração do pico.

Composto orgânico (g/L)	Equação da reta	R ²
Ácido Acético	$0,0646x + 0,9633$	0,9633
Ácido Succinico	$0,2255x + 0,5108$	0,9930
Ácido Láctico	$0,0796x + 0,4807$	0,9938
Ácido Fórmico	$0,0414x + 0,6333$	0,9946
Etanol	$0,0428x + 0,2616$	0,9828

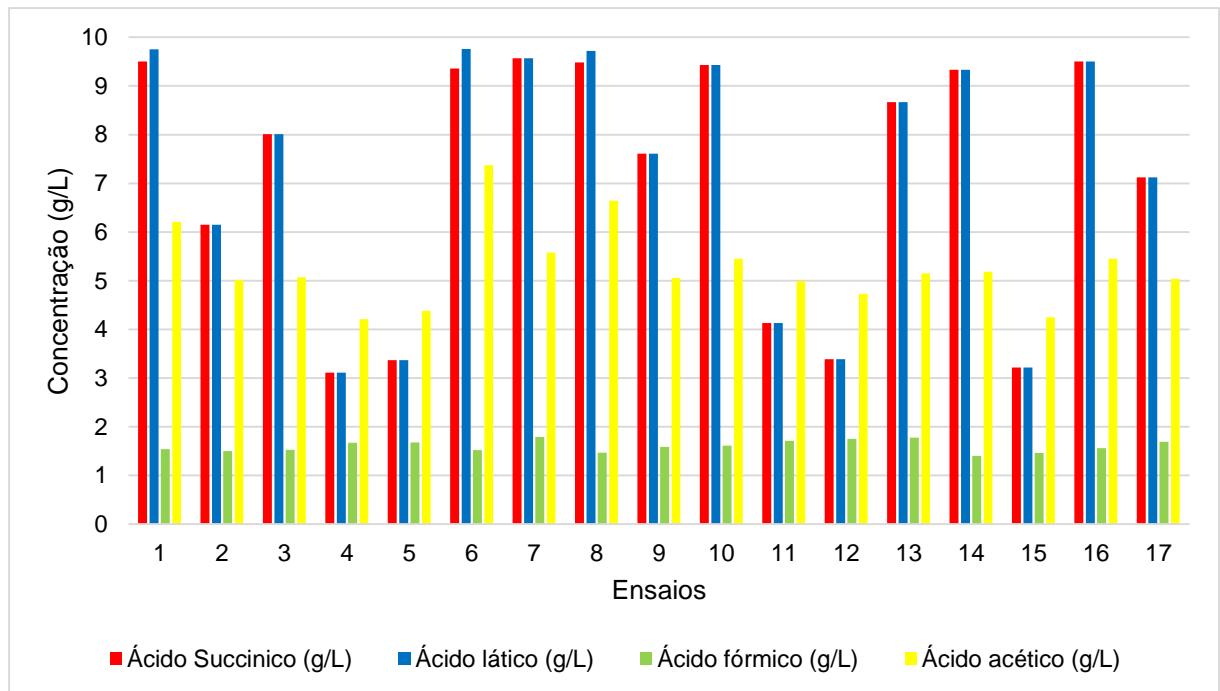
Na Figura 22 está apresentado o cromatograma do ensaio que apresentou a maior produção de etanol (22,42 g/L). Nela estão indicados os picos referentes aos ácidos e etanol identificados.

Figura 22 – Cromatograma do ponto 4 do planejamento experimental. Tempo de retenção em minutos versus detecção (Resposta mAU). (1) ácido succínico, (2) ácido láctico, (3) ácido fórmico (4) ácido acético e (5) etanol.



Na Figura 23 é apresentada a quantificação dos ácidos orgânicos ao término das 24 horas em cada ensaio do delineamento experimental.

Figura 23 – Representação das quantificações dos ácidos orgânicos presentes em cada ensaio do planejamento experimental.



Na Figura 23 observa-se as concentrações dos ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação. O ensaio que correspondeu a maior produção de etanol

(ensaio 4), apresentou as menores produções dos metabólitos secundários.

Nos pontos 1, 6, 7, 8, 10, 13, 14 e 16 observa-se considerável produção de ácido succínico e ácido láctico, verificando a produção de etanol, indicam que nestes ensaios a concentração de etanol produzida foi mais baixa. A relação não pode ser considerada uma vez que a produção destes metabólitos secundários não foram avaliadas estatisticamente pelo planejamento experimental.

Torija *et. al.*, (2003) diz que com o aumento da temperatura há maior formação de metabólitos secundários como o glicerol, ácido acético e ácido succínico. Gutierrez (1993) também mostrou que com o aumento de temperatura e da concentração de sacarose ocorreu maior formação de álcool isoamílico pelas leveduras estudadas.

ANEXO B

Tabela 23 - Tabela teste F (α 0,05)

v1 →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	25	30
v2 ↓																	
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	242.98	243.90	245.95	248.02	249.05	249.26	250.10
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.46
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.70	8.66	8.64	8.63	8.62
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.86	5.80	5.77	5.77	5.75
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.62	4.56	4.53	4.52	4.50
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.94	3.87	3.84	3.83	3.81
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.51	3.44	3.41	3.40	3.38
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.22	3.15	3.12	3.11	3.08
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.01	2.94	2.90	2.89	2.86
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.85	2.77	2.74	2.73	2.70
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.72	2.65	2.61	2.60	2.57
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.62	2.54	2.51	2.50	2.47
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.53	2.46	2.42	2.41	2.38
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.46	2.39	2.35	2.34	2.31
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.40	2.33	2.29	2.28	2.25
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.35	2.28	2.24	2.23	2.19
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.31	2.23	2.19	2.18	2.15
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.27	2.19	2.15	2.14	2.11
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.23	2.16	2.11	2.11	2.07
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.20	2.12	2.08	2.07	2.04
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.18	2.10	2.05	2.05	2.01
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.15	2.07	2.03	2.02	1.98
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.24	2.20	2.13	2.05	2.01	2.00	1.96
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.11	2.03	1.98	1.97	1.94
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.09	2.01	1.96	1.96	1.92
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.07	1.99	1.95	1.94	1.90
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.06	1.97	1.93	1.92	1.88
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.04	1.96	1.91	1.91	1.87
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.03	1.94	1.90	1.89	1.85
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.01	1.93	1.89	1.88	1.84
35	4.12	3.27	2.87	2.64	2.49	2.37	2.29	2.22	2.16	2.11	2.07	2.04	1.96	1.88	1.83	1.82	1.79
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.92	1.84	1.79	1.78	1.74

Fonte: Montgomery, D. C. e Runger, G. C. (2012).