

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOCOMBUSTÍVEIS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DIFERENTES  
ROTAS DE PRODUÇÃO DE ETANOL BIOCOMBUSTÍVEL A  
PARTIR DE RESÍDUOS DE INDÚSTRIAS LÁCTEAS**

Aluno: Arnildo Albiero  
Orientador e supervisor: Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel  
Coorientador: Prof. Luis Fernando Souza Gomes

PALOTINA – PR  
Agosto de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOCOMBUSTÍVEIS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DIFERENTES  
ROTAS DE PRODUÇÃO DE ETANOL BIOCOMBUSTÍVEL A  
PARTIR DE RESÍDUOS DE INDÚSTRIAS LÁCTEAS**

Aluno: Arnildo Albiero  
Orientador e supervisor: Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel  
Coorientador: Prof. Luis Fernando Souza Gomes

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso Superior de  
Tecnologia em Biocombustíveis –  
UFPR/Setor Palotina, como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Tecnólogo em Biocombustíveis.**

PALOTINA – PR  
Agosto de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOCOMBUSTÍVEIS

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ROTAS DE  
PRODUÇÃO DE ETANOL BIOCOMBUSTÍVEL A PARTIR DE RESÍDUOS  
DE INDÚSTRIAS LÁCTEAS

Aluno: Arnildo Albiero

Orientador: Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel

Coorientador: Prof. Luis Fernando Souza Gomes

O PRESENTE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO FOI  
APRESENTADO E APROVADO PELA SEGUINTE BANCA  
EXAMINADORA:

  
Prof. Luis Fernando Souza Gomes

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr Carlos Henrique Coimbra Araújo

  
Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel  
Orientador:

PALOTINA - PR  
Agosto de 2013

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.  
As facilidades nos impedem de conhecer.  
Mesmo as críticas, nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à profª Elide Mª Balzan Dotta docente do CEEBJA pela dedicação em me conduzir nos meus primeiros passos do saber, depois de mais de quarenta anos fora dos bancos escolares e pelo incentivo nos momentos difíceis. Dedico também à direção e aos demais professores (as) e funcionários (as) do CEEBJA de Palotina

A minha esposa Irma e ao meu filho Helton que nunca duvidaram da minha capacidade.

Aos meus filhos Marcos Roberto e Carla Giovana, *in memoriam*.

Ao professor Dr. Dile P. Stremel pela incansável ajuda na orientação do meu Estágio.

Ao professor Dr. Luis Fernando Souza Gomes pelas colaborações e sugestões na qualidade de coorientador.

Aos professores da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina pelo incentivo, pela orientação nos momentos de dúvidas.

Aos todos os amigos que me apoiaram e incentivaram.

Aos meus colegas de curso pela amizade, auxílio e tempo de convívio.

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela vida, por tudo o que consegui até agora, pela oportunidade de mostrar minha capacidade de aprender, pelas dificuldades enfrentadas e por esta conquista maravilhosa.

Albiero, 2013

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 SORO: DEFINIÇÕES E CARACTERÍSTICAS .....	3
2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO SORO.....	5
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
3.1 DESCRIÇÃO DA ROTA ENVOLVENDO HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO .....	8
3.2 MATÉRIA PRIMA .....	10
3.3 PREPARO DO INÓCULO .....	10
3.4 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	12
3.4.1 Contagem em câmara .....	12
3.4.2 Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) de uma cultura microbiana .....	13
3.4.3 Estimativa da biomassa seca .....	15
3.5 FERMENTAÇÃO.....	15
3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL.....	18
3.6.1 Procedimento experimental.....	18
3.6.2 Procedimento de cálculo para determinação da concentração de etanol .....	19
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>20</b>
4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDA PARA O MONITORAMENTO CELULAR DURANTE A FERMENTAÇÃO DA LACTOSE. ....	20
4.2 RESULTADOS DO CULTIVO DO INÓCULO.....	21
4.3 DESEMPENHO PARA ROTAS UTILIZANDO HIDRÓLISE ÁCIDA .....	21
4.4 DESEMPENHO PARA ROTAS UTILIZANDO <i>Kluyveromyces</i> .....	23
4.5 DESEMPENHO PARA ROTAS UTILIZANDO CO-CULTURAS.....	24
4.5.1 Determinação do fator de conversão etanol-substrato.....	25
4.5.2 Determinação do fator de conversão microrganismo-substrato. ....	25
4.5.3 Rendimento e produtividade.....	27

4.5.4 Avaliação econômica do potencial de produção de álcool de segunda geração.....	28
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>30</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Variação das concentrações de lactose, etanol e biomassa durante a fermentação da solução de soro de queijo em pó pela levedura <i>Kluyveromyces fragilis</i> a 35° C e 150 rpm.....	7
FIGURA 2. Fluxograma do processo envolvendo hidrólise química e fermentação....	9
FIGURA 3: Preparo do inóculo envolvendo propagação para tubos de ensaio de <i>Kluyveromyces .marxianus</i> CCT 4086 a partir de placas com ágar BDA.....	11
FIGURA 4: Área e volume do quadrado de contagem. ....	12
FIGURA 5: <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 em câmara de Neubauer vista em um microscópio ótico em aumento de 40 X.....	13
FIGURA 6: Crescimento experimental de <i>Bacillus subtilis</i> PR 29 em meio sintético (BHI) e semissintético (BHI) .....	14
FIGURA 7: Destilador adaptado para determinação do teor de etanol e concentração na amostra fermentada. ....	18
FIGURA 8 - Curva de calibração obtida com células de levedura.....	20
FIGURA 9 - Fermentação com <i>S. cerevisiae</i> após hidrólise ácida de soro líquido. ..	21
FIGURA 10 - Fermentação com <i>S. cerevisiae</i> após hidrólise ácida de uma solução de lactose P.A. ....	22
FIGURA 11: Fermentação com <i>S. cerevisiae</i> após hidrólise ácida de uma solução de soro em pó. ....	23
FIGURA 12: Fermentação com <i>Kluyveromyces marxianus</i> , evolução do processo foi determinado em função da conversão da lactose. ....	23
FIGURA 13 Desempenho da Rota 5: fermentação com <i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de acordo com a Tabela 5. Perfil de etanol calculado. ....	24
FIGURA 14 - Desempenho da rota 6: fermentação com <i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de acordo com a Tabela 6. Perfil de etanol calculado. ....	25
FIGURA 15 - Estimativa de $Y_{XS}$ para o processo de fermentação com $S_0 = 86 \text{ g L}^{-1}$ .....	26
FIGURA 16 - Estimativa de $Y_{XS}$ para o processo de fermentação com $S_0 = 79,5 \text{ g L}^{-1}$ . ....	27

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição média do leite bovino.....	3
TABELA 2 - Principais componentes do extrato seco do soro de queijo <i>in natura</i> .....	3
QUADRO 1: Propriedades comparativas da lactose e da lactose 90% hidrolisada ....	6
TABELA 3: Validação do modelo para estimativas de concentração de soro em pó e soro líquido pelo método DNS ( MULLER, 1959).....	10
TABELA 4 - Rota1: proposta para conversão de lactose em etanol a partir do soro em pó- 60 g L <sup>-1</sup> .....	16
TABELA 5 - Rota 2: proposta para conversão de lactose em etanol a partir do lactose P.A.- 50 g L <sup>-1</sup> .....	16
TABELA 6 - Rota 3 para conversão da lactose em etanol a partir de pó diluído - 150 g L <sup>-1</sup> .....	16
TABELA 7- Rota 4 para conversão da lactose em etanol a partir da lactose P.A. - 50 g L <sup>-1</sup> .....	17
TABELA 8 - Rota 5 para fermentação do soro em etanol a partir de co-culturas de leveduras.....	17
TABELA 9 - Rota 6 para fermentação do soro em etanol a partir de co-culturas de leveduras.....	17
TABELA 10 - Desempenho do rendimento, produtividade e concentração para co-culturas e comparação com dados da Literatura (Andrade, 2005) para 60 g L <sup>-1</sup> .....	27
TABELA A1 - Simulação de custos e lucros para uma planta com laboratório .....	33
TABELA A2 - Lucro somente da venda do álcool em relação ao soro.....	33
TABELA A3 – Porcentagem de álcool em volume a 20° C(%v/v) correspondente à densidade relativa .....	34

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ABS	Comprimento de onda (nm)
ART	Açúcares redutores totais
$C_{\text{lactose}}$	Concentração de lactose
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
D.O.	Densidade ótica
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DNS	Dinitrosalissílico
DQO	Demanda química de oxigênio
$f_d$	Fator de diluição
g L <sup>-1</sup>	Gramas por litro
HCl	Ácido clorídrico
Kg m <sup>3</sup>	Kilograma por metro cúbico
Kg	Kilograma
L	Litro
M <sub>a</sub>	Massa do álcool
Mi	Milhão
min	minuto
mm	milímetro
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	nanômetro
°C	Grau célsius
P/V	Peso por volume
P	Produto
PA	Para análise
PDA ou BDA	Meio de cultura (batata, dextrose, ágar)
pH	Potencial Hidrogeniônico

$R^2$	Coeficiente de correlação
rpm	Rotação por minuto
T	temperatura
$t_f$	Tempo de fermentação
V	Volume
$\rho$	Densidade
$Y_{P/S}$	Rendimento em etanol
$Y_{X/S}$	Rendimento em células
$d_{H_2O, 20^\circ C}^{20^\circ C}$	Densidade do destilado em relação a da água pura a 20°C
S	Substrato
X	Microrganismo

## RESUMO

Neste trabalho avaliou-se técnica e economicamente um maior aproveitamento da lactose proveniente do soro de leite das indústrias de laticínios da região oeste do Paraná para desenvolver um produto que venha suprir, ao menos em parte, a necessidade de uma fonte renovável de biocombustíveis, o etanol. Para cada litro de soro são desperdiçados cerca de 50 g de lactose e 10 g de proteína, além de 0,5 a 0,7% de sais minerais com elevado valor nutricional e funcional, criando condições para poder pensar-se num processo de valorização do soro com simultânea redução da carga poluente e aumento da diversidade de oportunidades para agregar valor e aproveitamento dos resíduos de pequenos e médios laticínios. Muitos produtores se interessam pela questão do álcool a partir desta fonte para abastecer a sua frota e reduzir a logística de transporte, no entanto dependem de um custo, equiparando-se com o preço pago atualmente para outras empresas que aproveitam o soro. Pensando nesta realidade, desenvolveram-se testes experimentais com rotas econômicas para a produção de etanol a partir de processos fermentativos. Avaliou-se pré-tratamento químico para hidrólise da lactose e fermentação convencional e processo com leveduras que fermentam diretamente a lactose nas mesmas condições operacionais e nutricionais de fontes de micronutrientes e extratos proteicos. Primeiramente, avaliou-se para diferentes rotas a conversão da lactose em etanol. Posteriormente, com a definição de uma rota adequada monitorou-se o comportamento celular associado ao consumo de substrato e formação de produtos. Observou-se que é possível altas conversões de substrato e melhoria na produtividade do processo de produção de etanol. A melhor opção foi pela rota que utiliza levedura e co-culturas de leveduras com a capacidade de realizar diretamente a assimilação de lactose e formação de etanol em uma única etapa, ao invés de pré-tratamento químico, o qual não trouxe vantagens significativas. Do ponto de vista econômico, partindo-se do soro *in natura*, seria possível obter um retorno de R\$ 1.560,00 por mês para uma capacidade de processamento de 17.000 litros por semana, o que mostra uma agregação de valor no caso da opção do etanol.

**Palavras-chave:** soro, lactose, hidrólise ácida, *Kluyveromyces marxianus*.

## 1 INTRODUÇÃO

Nas indústrias de laticínios, entre os principais efluentes encontra-se o soro provindo da produção de queijos. Soro é o nome dado ao líquido remanescente das etapas de precipitação e remoção da caseína do leite, durante a fabricação do queijo. As indústrias de laticínios o produzem diariamente em grandes quantidades. Para 1 kg de queijo produzido gera-se, em média, 9 kg de soro. Na região oeste do Paraná, segundo nossas pesquisas nos laticínios da região, estão em funcionamento 15 indústrias de laticínios de pequeno e médio porte que produzem cada uma, em média, de 30 a 50 mil litros de soro por dia, perfazendo um total de 600 a 800 mil litros dia, estas empresas geralmente vendem o soro por 0,03 R\$ L<sup>-1</sup> para o processamento do soro em pó. Por se tratar de um subproduto de baixo valor econômico, antigamente o soro era simplesmente lançado nos cursos d'água sem nenhum tratamento prévio. A produção de queijo é deste modo, responsável pela geração de grandes quantidades de efluentes, tornando-se um grave problema ambiental devido à sua elevada carga orgânica de difícil biodegradabilidade. Sua alta Demanda Química de Oxigênio (DQO) dificulta significativamente a eficiência de qualquer tratamento de efluente. Portanto há uma necessidade do estudar alternativas de utilização da lactose presente no soro de queijo.

Um dos caminhos mais promissores é utilizar a lactose do soro como fonte de carbono para a produção de ácidos orgânicos por fermentação. A lactose não é usada diretamente nos processos fermentativos convencionais que empregam *Saccharomyces cerevisiae*.

Apesar de a levedura *Saccharomyces cerevisiae* fermentar uma grande variedade de açúcares, não é capaz de metabolizar a lactose, devido à ausência da enzima  $\alpha$ -galactosidase (que hidrolisa este açúcar em glucose e galactose) e da permease da lactose, que permite a entrada da lactose para o interior das células. Isto só seria possível indiretamente através da glicose e da galactose produzidas pela hidrólise de sua molécula através da  $\beta$ -D-galactosidase (obtida comercialmente) ou da hidrólise ácida a alta temperatura, geralmente a 150° C e curto tempo.

Outro aspecto em que os processos de fermentação da lactose são passíveis de melhoramento não se prende com o processo prévio enzimático ou ácido em si, mas com o microrganismo utilizado na fermentação alcoólica da lactose.

O microrganismo mais utilizado é a levedura do gênero *Kluyveromyces*, que fermenta naturalmente este açúcar apresentando, no entanto, problemas de inibição por etanol. Apesar da possibilidade de utilizar uma rota mais simples, o problema maior reflete em altos volumes com baixa concentração de etanol.

A avaliação de alternativas para a produção de etanol por fermentação, se por rota prévia química, enzimática ou unicamente por levedura *Kluyveromyces* depende ainda das condições operacionais de temperatura, pH e suprimentos nutricionais para acelerar a fermentação.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver estudos técnicos e econômicos para maior aproveitamento da lactose proveniente do soro de leite das indústrias de laticínios da região oeste do Paraná para elaboração de um produto que venha suprir, ao menos em parte, a necessidade de uma fonte renovável de biocombustíveis, o etanol. Quanto à matéria prima, utilizou-se soro em pó cedido pela Sooro de Marechal Cândido Rondon, com alta concentração de lactose e soro líquido cedido pelo Laticínio La Salle de Palotina - PR. Para ambas as matérias primas, procurou-se avaliar rotas envolvendo tratamento ácido a alta temperatura com correção do meio e posterior fermentação com *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* e co-culturas dos dois microrganismos. Apesar de apresentarem reações lentas e produtividade moderada, a opção pelo processo envolvendo co-culturas de *Kluyveromyces* e *S. cerevisiae* mostrou-se mais eficiente, obtendo-se concentrações de etanol superiores a alguns experimentos verificados na literatura.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SORO: DEFINIÇÕES E CARACTERÍSTICAS

Em decorrência dos problemas enfrentados pelas indústrias para efetuarem o tratamento do soro como resíduo industrial, adequando-o às exigências dos órgãos de inspeção e saúde pública, começaram na década de 60 os testes de aproveitamento para o soro de queijo (KOSIKOWSKI, 1967; NELSON; BROWN, 1969). O soro de queijo pode ser definido como a parte líquida do leite, após a precipitação da caseína, seja para fabricação desta, seja na confecção de queijos. O soro engloba aproximadamente metade dos sólidos contidos no leite, dos quais a lactose é o constituinte presente em maior quantidade (RAMOS, 1985).

Nas Tabelas 1 e 2 observa-se as composições do leite e extrato seco do soro, além de outros componentes importantes.

TABELA 1 - Composição média do leite bovino

<b>Componentes</b>	<b>Composição (%)</b>
Água	86
Proteína	3,5 (85% caseína)
Gordura	4,0
Lactose	5,0
Minerais	0,7
Fosfolipídios	0,03
Cálcio	0,1

Fonte: (BOBBIO; ORSATTI, 1992)

TABELA 2 - Principais componentes do extrato seco do soro de queijo *in natura*

<b>Componentes</b>	<b>Composição (%)</b>
Lactose	70 a 80
Compostos nitrogenados	10 a 14
Sais minerais	1,5 a 4
Lipídeos	0,05 a 0,6

Fonte: (SANTIAGO, *et al.*, 2004)

Aproximadamente 50% de produção mundial de soro de queijo passa por algum tratamento e é transformado em vários produtos alimentícios, sendo que 45% deste total é utilizado diretamente na sua forma líquida, 30% na forma de soro de queijo pulverizado, 15% como lactose e subprodutos delactosados e o restante como queijo (MARWAHA; KENNEDY, 1988).

Dentre os subprodutos da indústria de laticínios, o soro é que se encontra em maior quantidade, tanto em volume gerado, como pela carga poluidora, podendo causar graves problemas ambientais se lançado na natureza. Quase todo o volume do leite se transforma em soro de queijo que contém metade do extrato seco, representado por lactose, proteínas solúveis e sais (PAULUCCI, 1991).

O soro jogado diretamente no solo causa problemas ambientais, pois compromete a estrutura físico-química do solo e diminui o rendimento das colheitas (PONSANO *et al.*, 1992). Possui alta DBO, variando de 30.000 a 50.000 mg L<sup>-1</sup> (MAWSON, 1994). Embora várias possibilidades de utilização tenham sido pesquisadas nos últimos 50 anos, até o ano de 1995, a metade do soro produzido em todo o mundo ainda era descartado como um efluente (SISO, 1996).

Segundo ATHANASIADIS *et al.*, 2004, o soro de leite contém em média de 4,8 a 5,3% de lactose, possuindo uma elevada carga orgânica de 40-70 g L<sup>-1</sup> representando um importante problema ambiental. Cerca de 9 kg de soro de leite são gerados durante a produção de 1 kg de queijo, totalizando mais de 160 milhões de toneladas de soro de leite produzidos no mundo a cada ano (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

O Brasil é o sétimo maior produtor de queijos do mundo com uma produção total em 2005 de 480 mil toneladas, gerando aproximadamente 4,3 milhões de toneladas de soro de queijo (USDA, 2006).

Na região oeste do Paraná estima-se que sejam produzidos 1,0 milhão de litros por dia dos quais 10% são destinados à alimentação animal e 90% são vendidos para empresas.

O soro de queijo torna-se um grande problema se descartado no meio ambiente, devido sua alta carga poluidora, possui elevada DBO, em torno de 30-60 kg m<sup>-3</sup> e é constituído principalmente de alta concentração de lactose, em torno de 4 a 8% (p/v) (HATZINIKOLAU *et al.*, 2005).

O soro de leite jogado diretamente no solo, causa problemas ambientais, pois compromete a estrutura físico química do solo e diminui o rendimento das colheitas (PONSANO *et al.*, 1992).

A lactose está presente no leite e no soro, em média 5% no estado molecular em solução verdadeira, com partículas de diâmetros inferiores a 1 nm. É formada por dois monossacarídeos, uma molécula de D-glicose e uma de molécula de  $\beta$ -D-galactose. O grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, ficando livre para reagir com agentes oxidantes, sendo assim a lactose é considerada um açúcar redutor (BECKER, 2009).

## 2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO SORO

Quanto à fermentação do soro de leite para fins de produção de etanol, trabalhos tem sido relatados a partir de meados da década de 70, estimulados pela crescente necessidade mundial de energia, além de representar uma forma simples de tratamento e disposição de grandes quantidades de soro de leite produzido pelos laticínios (KOSIKOWSKI, 1979).

Com os crescentes preços dos combustíveis automotores, tem-se chamado a atenção para a possibilidade de produzir etanol a partir de outras fontes renováveis. Neste contexto, o soro de queijo vem surgindo como uma alternativa viável na produção de etanol (DEMOTT *et. al.*, 1981; CHEN; ZALL, 1981).

A hidrólise da lactose já é estudada a longo tempo, na produção de alimentos ou como substrato para fermentação alcoólica para produção de etanol (GEKAS; LOPES-LEIVA, 1985). Inicialmente, foi como rota ácida-fermentativa a ser explorada e neste caso, severas condições de pH e temperatura faziam a conversão de 80% de hidrólise em 3 min., à temperatura de 150° C e pH igual a 1 ou 2 (GEKAS, 1985). Em outro trabalho, sugere-se como alternativa mais viável o método enzimático, utilizando a enzima  $\beta$ -galactosidase (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985; MAHONEY, 1997).

Na fermentação, a escolha do microrganismo a ser usado na produção de etanol depende do processo empregado, do substrato em questão e dos objetivos a serem alcançados, é desejável que as leveduras produtoras de álcool apresentem certos requisitos para que a eficiência do processo seja adequada, tais como o

fornecimento de alta taxa de fermentação e alto rendimento do produto (MENESES, 1980; JONES *et al.*, 1983; KOSARIC *et al.*, 1983).

No trabalho de Vinhal (2001), aspectos físico-químicos importantes para a fermentação a partir da hidrólise da lactose envolvendo modificações físicas e químicas são levantados pelo autor, Quadro 1.

QUADRO 1: Propriedades comparativas da lactose e da lactose 90% hidrolisada

PROPRIEDADES	LACTOSE	LACTOSE HIDROLISADA	REFERÊNCIA
Solubilidade g/100 ml a 25° C	17	55	TALLEY; HUNGER (1952)
Viscosidade cP de solução a 50% a 25° C	17	105	HEMME <i>et al.</i> , 1979
Fermentabilidade	Limitada	Boa	-
Taxa relativa de escurecimento	1	3,4	POMERANZ <i>et al.</i> 1962
Doçura relativa à solução de sacarose	30-40	65-90	GUYE; EDMONSON (1978); AMERINE <i>et al.</i>
Propriedades umectantes	-	Comparável à sacarose	SHAH ; NICKERSON (1978)

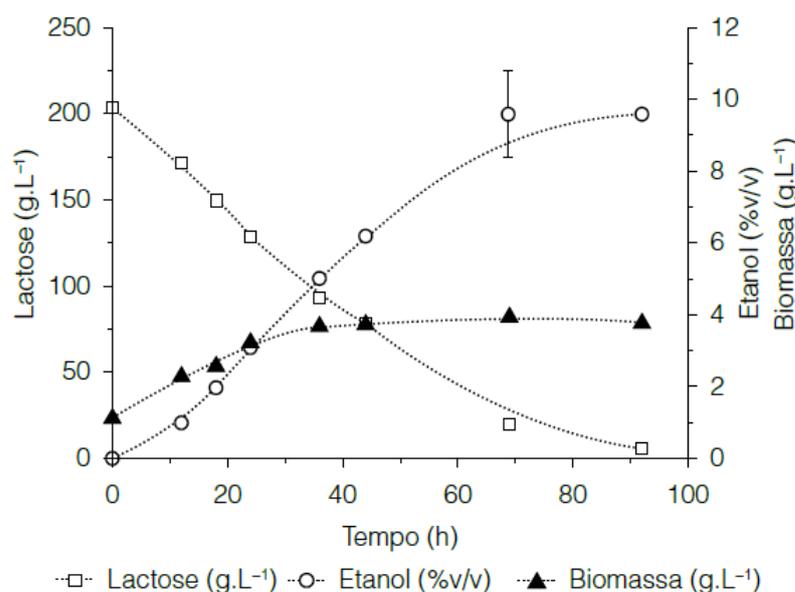
Fonte: VINHAL, 2002

Trabalhos recentes na produção de etanol têm utilizado rotas enzimáticas-fermentativas. Em Andrade (2005,p.35) experimentos foram realizados empregando fermentação simultânea à hidrólise enzimática, variando as quantidades de soro de queijo, quantidade de nutrientes (na forma de extrato de levedura e sulfato de amônio), quantidade de enzima, quantidade de inóculo e agitação. As condições de temperatura e pH para todos os ensaios foram afixadas em 30° C e 4,5.

Atualmente esforços estão sendo direcionados em rotas que utilizam leveduras capazes de hidrolisar a lactose e fermentar simultaneamente. Em trabalho recente de DRAGONE, *et al.*, (2009), o presente estudo visou a produção e caracterização da produção de etanol através da fermentação descontínua do soro de queijo e posterior destilação do produto fermentado. Os ensaios fermentativos foram conduzidos a 35° C e 150 rpm por 92 h, em um biorreator de 7 litros (volume total) empregando a levedura *Kluyveromyces fragilis*.

No caso acima, a fermentação da solução de soro de queijo em pó com uma alta concentração inicial de lactose ( $200 \text{ g L}^{-1}$ ) permitiu obter um fermentado alcoólico com um teor de etanol de 9,6% v/v, após 92 h (Figura 1).

FIGURA 1. Variação das concentrações de lactose, etanol e biomassa durante a fermentação da solução de soro de queijo em pó pela levedura *Kluyveromyces fragilis* a  $35^\circ \text{ C}$  e 150 rpm.



Fonte: DRAGONE, *et al.*, (2009)

Alguns autores têm relatado que a utilização de soro de queijo em pó em vez do soro de queijo bruto (sem tratamento) proporciona uma fonte concentrada de lactose e de outros nutrientes que permitem um processo mais econômico para a produção de etanol (OZMIHÇI; KARGI, 2007b; c).

Segundo esses autores, os custos da destilação podem ser reduzidos mediante a fermentação de soluções concentradas de soro de queijo em pó (até  $200 \text{ g L}^{-1}$  de lactose) que possibilitam teoricamente alcançar elevadas concentrações de etanol (10-12% v/v).

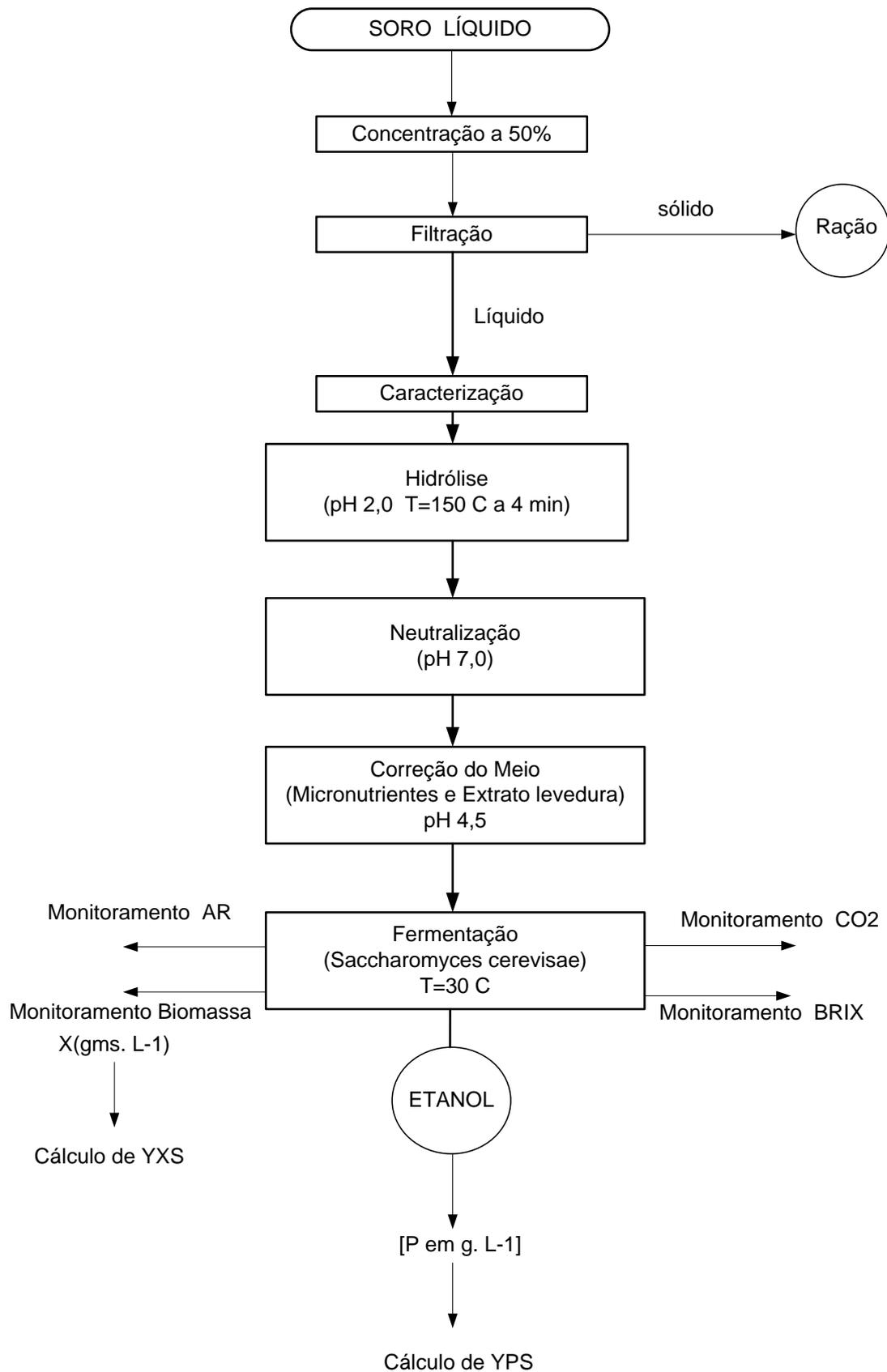
De acordo com OZMIHÇI; KARGI (2007a), o custo de produção do soro de queijo em pó a partir do soro de queijo pela secagem por pulverização ou em tambor varia entre U\$S 0,20 e  $0,40 \text{ kg}^{-1}$  de soro, o que permite compensar os custos da destilação para a produção de etanol puro.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DESCRIÇÃO DA ROTA ENVOLVENDO HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO

O fluxograma da Figura 2 mostra o procedimento realizado desde o preparo da matéria prima até o produto final, passando pelo processo de fermentação e monitoramento das variáveis de interesse, bem como o cálculo dos fatores de rendimento. Inicialmente o soro líquido recém adquirido e conservado à baixa temperatura em geladeira, é concentrado a 50%, filtrado e caracterizado para determinar o teor de lactose (principal fonte de carbono do processo), posteriormente para realização da hidrólise ácida, o pH é levado a 2 com HCl concentrado hidrolisado e submetido a 150° C por 4 min em tubos de ensaio no bloco digestor com controle de temperatura. Em seguida, após resfriamento, neutraliza-se com hidróxido de sódio e faz-se a correção do meio com nutrientes e extrato de levedura. Novamente o pH é corrigido para 4,5 com ácido sulfúrico P.A. e a temperatura é ajustada a 30° C. O volume de fermentação é corrigido para 200 ml com água destilada e adicionado em erlenmeyer. Determinados experimentos não eram agitados com frequência e observou-se períodos de reações lentas, devido ao acúmulo de CO<sub>2</sub> e limitações de transferência de massa. Posteriormente, optou-se por submeter a agitação em banho-maria, agitador do tipo Doubnoff a uma frequência de 100 rpm visando a retirada do CO<sub>2</sub> e permitir maior aeração visando o crescimento celular, o que trouxe maior velocidade de reação e tempos mais curtos de fermentação. Nos processos agitados, fermentação ocorreu por tempo suficiente para conversão dos açúcares, até baixa concentração final constante. Durante o processo, monitorou-se a biomassa, liberação de dióxido de carbono, Brix e açúcares redutores. Com os valores da biomassa e variação da concentração de açúcares redutores obteve-se o fator de rendimento em relação ao substrato. No caso do etanol, após a fermentação, o volume total de fermentado foi medido e destilado. Destilou-se a amostra em um microdestilador Kjeldal modificado, obtendo-se um volume de destilado, no qual foi medido o teor e a massa de álcool, possibilitando, através de cálculos, avaliar-se a concentração de etanol no fermentado e posteriormente o fator de rendimento etanol/substrato do processo.

FIGURA 2. Fluxograma do processo envolvendo hidrólise química e fermentação



### 3.2 MATÉRIA PRIMA

O soro de leite *in natura* e em pó foram disponibilizados por empresas da região oeste do Paraná. Os experimentos e caracterizações das matérias primas foram executados nos laboratórios do bloco de química e multidisciplinar da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. Inicialmente, procedeu-se à determinação da concentração inicial de lactose do soro visando o acompanhamento da conversão de massa ao longo do tempo. Para determinação da concentração da lactose e estimativa da concentração inicial de substrato procedeu-se ao ajuste da curva de calibração pelo método dos mínimos quadrados de um modelo linear envolvendo absorvância e concentração de lactose P.A. O método utilizado para obtenção da curva de calibração envolveu o preparo de uma solução padrão de 5 g L<sup>-1</sup> e sucessivas diluições, seguindo-se o procedimento para determinação de açúcares redutores através do método espectrofotométrico com reagente DNS (MILLER, 1959). A Equação (01) foi obtida das leituras a 540 nm com espectrofotômetro Edutec EEQ 9023.

$$\text{Lactose(g L}^{-1}\text{)} = 2,658 \text{ ABS}_{540\text{nm}} f_D R^2 = 0,993 \quad (01)$$

A Equação (01) foi validada para amostras comerciais de leite e soro de queijo. Foram analisadas amostras de soro após tratamento térmico por autoclavagem, centrifugação e filtração, para fatores de diluição de 20 vezes. As concentrações foram medidas em termos de açúcares redutores (AR).

Obteve-se os teores de lactose calculados próximos aos reais observados na faixa de 4 a 5% para ambos os casos, Tabela 3

TABELA 3: Validação do modelo para estimativas de concentração de soro em pó e soro líquido pelo método DNS (MULLER, 1959).

Lactose(g L <sup>-1</sup> )	ABS	fd	Literatura (g L <sup>-1</sup> )	Produto
53,80804	1,012	20	40-50	leite
50,88369	0,957	20	40-50	soro

### 3.3 PREPARO DO INÓCULO

Amostras de levedura comercial de *S. cerevisiae* em pó foram conservadas em geladeira em baixa temperatura enquanto a levedura *Kluyveromyces marxianus*

CCT 4086 cedida pelo curso de engenharia química da Unioeste-Campus Toledo foi repicada (Figura 3), em placas de petri com ágar BDA e mantida em estufa de crescimento biológico a temperatura a 28° C.

FIGURA 3: Preparo do inóculo envolvendo propagação para tubos de ensaio de *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 a partir de placas com ágar BDA



Fonte: Elaboração do autor, 2013

Posteriormente preparou-se vários tubos de ensaio com solução de lactose P.A. e condições corrigidas com fontes de nitrogênio, fósforo, proteínas e sais minerais. Os tubos foram autoclavados e posteriormente levados para inoculação em bancada sob condições assépticas empregando alça de platina e bico de bunsen. Mediu-se a densidade ótica inicial e incubou-se em estufa a 30°C para posterior utilização. Fez-se verificações diárias a absorbância a 660 nm. A inicial foi de 0,3 e após 48 horas chegou à máxima de 1,6 nm. Tentativas de aumento da concentração foram feitas adicionando mais lactose P.A.

Procedeu-se a leitura em câmera de Neubauer da amostra diluída, possibilitando quantificar a concentração inicial nos biorreatores.

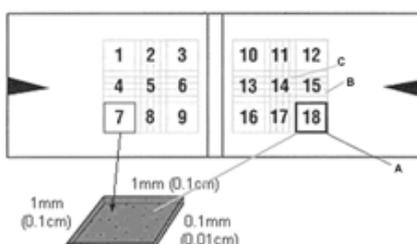
### 3.4 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A quantificação da concentração celular em um meio de cultura é essencial para a determinação da cinética e estequiometria do crescimento da biomassa. Os métodos podem ser classificados em duas categorias: diretos e indiretos. Em muitos casos os métodos diretos não são possíveis devido à presença de sólidos suspensos ou outros compostos interferentes no meio. Massa celular é preferível determinar ao invés de número de células, mas a combinação de ambas as medidas é desejável, (STREMEL, 2013, p.49).

#### 3.4.1 Contagem em câmara

O número de células pode ser determinado através da contagem ao microscópio, utilizando-se uma câmara de Neubauer, também conhecida como Hemacitômetro ou Câmara de Contagem.

FIGURA 4: Área e volume do quadrado de contagem.



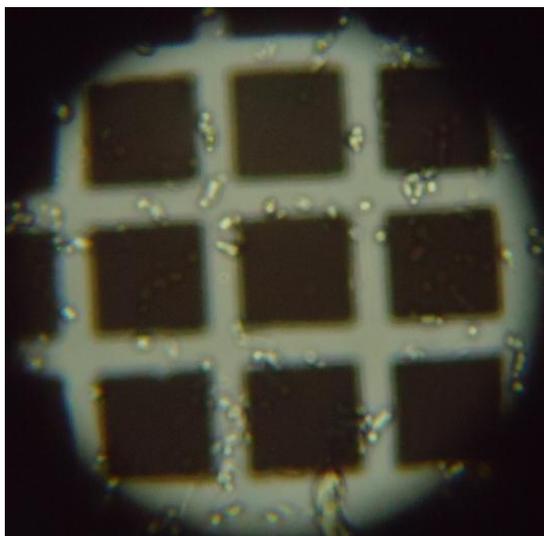
Fonte: (VIERA, 2000)

Cada câmara possui nove quadrados de contagem, cada um com  $1\text{mm}^2$  de área, resultando em uma área total de  $9\text{mm}^2$ . Na Figura 4, cada milímetro quadrado está dividido em 16 quadrados de  $1/16\text{mm}^2$ , exceto quatro laterais. O da área central, número 5, está dividido em 25 quadrados de  $1/25\text{mm}^2$  sendo cada um destes, subdivididos em 16 quadrados de  $1/1400\text{mm}^2$ , totalizando quatrocentos quadrados na área central (STREMEL, 2013, p.49).

$$\left(\text{Número de células ml}^{-1}\right) = [N]25 (10)^4 f_D \quad (02)$$

Onde [N] = média das células contadas nos 16 quadrados menores presentes nos 25 centrais da área 5 da Figura 4.

FIGURA 5: *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 em câmara de Neubauer vista em um microscópio óptico em aumento de 40 X.



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

#### 3.4.2 Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) de uma cultura microbiana

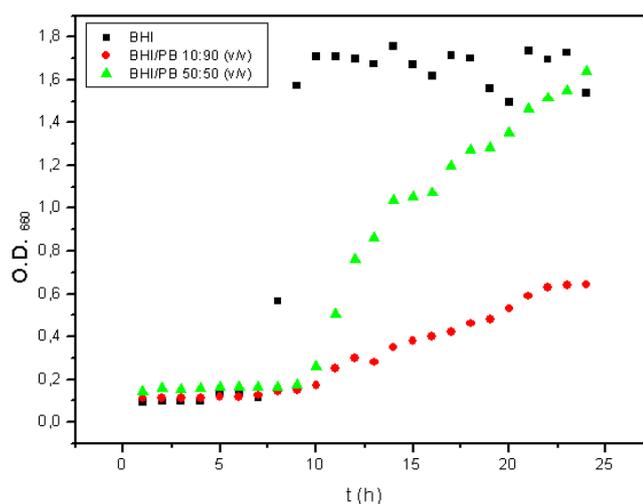
A avaliação da turbidez de uma cultura microbiana constitui um método rápido, embora indireto, de estimar a concentração celular. Um feixe de luz focado numa suspensão microbiana é parcialmente desviado (dispersão da luz) pelas células, e a percentagem de luz não desviada (transmitância,  $T$ ) é medida por recurso de um espectrofotômetro. A quantidade de luz que atravessa a suspensão celular depende da concentração de células na suspensão e do tamanho destas, do comprimento de onda e da intensidade ( $I_0$ ) da luz incidente e do diâmetro do tubo que contém a suspensão celular. A Densidade Óptica (D.O.) da cultura corresponde à absorvância, que é determinada com base na expressão  $D.O. = \log(I_0/I)$ , onde  $I_0$  é a intensidade da luz incidente e  $I$  é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de células. Comprimentos de onda frequentemente usados para medição da Densidade Óptica de suspensões de células de bactérias ou leveduras incluem 540, 600, 640 ou 660 nm. Existe, dentro de certos limites, uma relação linear entre a absorvância ou D.O. da cultura e o número total de células por mililitro de suspensão, ou seja a concentração celular. Contudo, para suspensões celulares muito densas (por exemplo, com  $D.O._{560}$  superior a 0,4) é frequentemente necessário diluir as culturas de modo a que todos os valores de D.O. medidos estejam incluídos na parte linear da curva D.O. versus concentração celular.

Este método não permite distinguir entre células viáveis e células mortas e não permite obter diretamente valores absolutos da concentração de células, sendo especialmente utilizado quando se pretende confirmar se uma dada cultura se encontra em crescimento ou para acompanhar o crescimento microbiano com base no aumento da D.O. medida a um comprimento de onda particular

A curva de calibração relaciona densidade ótica (D.O.) à medida de massa. Tal curva pode ser não linear a altos valores de D.O. > 0,3 e depende da extensão do estado fisiológico da célula.

Na Figura 6, pode-se observar o crescimento celular em efluente da água de maceração do arroz e meios sintéticos medido em termos de densidade ótica (D.O.). Este procedimento facilita a determinação da velocidade específica constante ( $\mu_i$ ) para cada cultivo, durante a fase exponencial para um sistema batelada. Para isto, admite-se que as concentrações celulares proporcionais à D.O. Os parâmetros  $\mu_i$  são constantes durante a fase exponencial e independentes da concentração de substrato, são importantes para identificar o comportamento da população da biomassa durante o crescimento exponencial. Dependendo das condições nutricionais estes parâmetros podem variar consideravelmente indicando o potencial do nutriente para o crescimento.

FIGURA 6: Crescimento experimental de *Bacillus subtilis* PR 29 em meio sintético (BHI) e semissintético (BHI)



Fonte: (STREMEL *et al*, 2008)

### 3.4.3 Estimativa da biomassa seca

Envolve a pesagem das células microbianas. Corresponde frequentemente à determinação do peso seco das células presentes num determinado volume de cultura. As células são filtradas ou centrifugadas, lavadas e secas numa estufa (usualmente a 80°C) até peso constante. Este processo é moroso. É usado em circunstâncias específicas, como por exemplo, quando se pretende obter o rendimento em biomassa do crescimento.

## 3.5 FERMENTAÇÃO

No caso da hidrólise ácida, tentativas a baixa temperatura resultaram dificuldade na conversão da lactose em glicose e galactose, optando-se por condições mais severas a tempos curtos: Rotas 1, 2 e 3, Tabelas 4, 5 e 6. Após a hidrólise de amostras de soro em pó ou líquido, corrigiu-se o pH para 4,8 e adicionou-se nutrientes para fermentação com *S. cerevisiae* a 10% em base seca. No caso da Rota 4 Tabela 7, inoculou-se em torno de 10 ml de solução repicada e previamente adaptada de *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 em solução de lactose P.A. Na Rotas 5 Tabela 8, utilizou-se uma co-cultura de leveduras, visando eliminar o problema da inibição da enzima lactase pela glicose e também da levedura *Kluyveromyces* pelo etanol. Na Rota 6 Tabela 9, após centrifugação do fermentado, reutilizou-se a co cultura da Rota 5

Monitorou-se para as Rotas 1 a 4 a evolução da formação de CO<sub>2</sub> e perda de massa do sistema. Uma vez que as condições iniciais eram conhecidas, e com base na estequiometria da reação, determinou-se a conversão da lactose em etanol.

Para as Rotas 5 e 6, Tabelas 8 e 9, como o desempenho para as co-culturas foi superior, optou-se por determinar com mais precisão as conversões de substrato, produção de etanol e crescimento, através de curvas de calibração ART e células.

Os processos de produção de etanol a partir da lactose envolveram a execução de seis rotas, três rotas empregaram *Sacharomyces cerevisiae* comercial a 10% em base seca, a quarta rota utilizou a levedura *Kluyveromyces marxianus*. Nas três primeiras rotas, desenvolveu-se hidrólise ácida com temperatura controlada de 150° C em bloco digestor com pH em torno de 1 a 2. Posteriormente as amostras foram resfriadas e o pH elevado para 4,8 com NaOH 1N. Para todas as amostras,

antes da fermentação os meios foram supridos com sais minerais e extratos proteicos, de acordo com formulações estabelecidas para fermentação submersa com *Saccharomyces cerevisiae* (PULITANO, 1990) visando acelerar o metabolismo celular. As Tabelas 4 a 9 trazem uma síntese das rotas desenvolvidas.

TABELA 4 - Rota1: proposta para conversão de lactose em etanol a partir do soro em pó- 60 g L<sup>-1</sup>

Pré Tratamento	Químico com HCl e fermentação convencional
Matéria prima	Soro em pó
Hidrólise	Acidificação até pH 1 a 2 com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 5 min. a 150° C
Correção de pH	Até 4,8
Correção do meio	Micronutrientes e extrato de proteína
Microrganismo	Levedura de panificação
Condição Operacional	Temperatura de 32° C e tempo de 42,5 horas

Fonte: Elaboração do autor, 2013.

TABELA 5 - Rota 2: proposta para conversão de lactose em etanol a partir do lactose P.A.- 50 g L<sup>-1</sup>

Pré Tratamento	Químico com HCl e fermentação convencional
Matéria prima	Lactose P.A.
Hidrólise	Acidificação até pH 1 ou 2 com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 5 min. a 150° C
Correção de pH	Até 4,5
Correção do meio	Micronutrientes e extrato de proteína
Microrganismo	Levedura de panificação
Condição Operacional	Temperatura de 32° C e tempo de 26 horas

Fonte: Elaboração do autor, 2013.

TABELA 6 - Rota 3 para conversão da lactose em etanol a partir de pó diluído - 150 g L<sup>-1</sup>

Pré Tratamento	Química com HCl e fermentação convencional
Matéria prima	Soro em pó diluído a 50 g L <sup>-1</sup>
Hidrólise	Acidificação até pH 1 ou 2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 4 min a 150° C
Correção de pH	Até 4,5
Correção do meio	Micronutrientes e extrato de proteína
Microrganismo	Levedura de panificação
Condição Operacional	Temperatura de 32° C e tempo de 24,5 horas

Fonte: Elaboração do autor, 2013.

TABELA 7- Rota 4 para conversão da lactose em etanol a partir da lactose P.A. - 50 g L<sup>-1</sup>

Pré Tratamento	Não há
Matéria prima	Lactose P.A. diluída a 50 g L <sup>-1</sup>
Correção de pH	Até 6,0
Correção do meio	Micronutrientes e extrato de proteína
Microrganismo	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Condição Operacional	Temperatura de 32° C e tempo de 46,5 horas

Fonte: Elaboração do autor, 2013.

TABELA 8 - Rota 5 para fermentação do soro em etanol a partir de co-culturas de leveduras

Pré Tratamento	Autoclavagem 121° C
Matéria prima	Soro líquido, 12,8 °BRIX, 86,7 g L <sup>-1</sup>
Correção de pH	Até 4,8
Correção do meio	Micronutrientes e extrato de proteína
Microrganismo	<i>Kluyveromyces marxianus</i> e levedura de panificação
Condição Operacional	Temperatura de 40° C e tempo de 29,5 horas

Fonte: Elaboração do autor, 2013.

TABELA 9 - Rota 6 para fermentação do soro em etanol a partir de co-culturas de leveduras

Pré Tratamento	Autoclavagem a 121° C
Matéria prima	Soro líquido, 12,6 °BRIX, 79,5 g L <sup>-1</sup>
Correção de pH	Até 4,8
Correção do meio	Micronutrientes e extrato de proteína
Microrganismo	<i>Kluyveromyces marxianus</i> e levedura de panificação
Condição Operacional	Temperatura de 40° C e tempo de 21,5 horas

Fonte: Elaboração do autor, 2013.

## 3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL

### 3.6.1 Procedimento experimental

O etanol foi determinado após destilação e determinação da densidade a 20° C, seguindo a metodologia do Manual do Instituto Adolf Lutz (LUTZ, 2008, p. 413). Um conjunto de destilação foi montado, acoplando-se um balão de destilação com boca esmerilhada a um aparelho de Soxhlet e este conectado a um condensador de bolas (Figura 7). A temperatura do vapor foi controlada em torno de 70 a 80° C através de um termômetro adaptado no aparelho e o aquecimento ocorreu de forma manual regulando-se uma manta de aquecimento no seu máximo durante a evaporação e condensação na faixa de temperatura desejada.

FIGURA 7: Destilador adaptado para determinação do teor de etanol e concentração na amostra fermentada.



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

### 3.6.2 Procedimento de cálculo para determinação da concentração de etanol

O volume do destilado foi coletado destilando-se em torno de  $\frac{3}{4}$  do fermentado e o valor final foi medido com precisão. O destilado foi submetido a um controle de temperatura a 20° C em um banho de gelo e água e determinado a sua densidade relativa, utilizando-se o volume através de uma micropipeta calibrada e a massa em uma balança analítica com precisão de 0,0001 g.

O valor de  $n_1$  é uma relação de massas específicas em  $\text{g ml}^{-1}$ . Como a massa específica da água a 20° C é  $1 \text{ g ml}^{-1}$ , praticamente, ao se determinar a massa específica do destilado, fornece-se diretamente o valor da densidade, Equação 03.

$$d_{\text{H}_2\text{O}, 20^\circ\text{C}}^{20^\circ\text{C}} = n_1 \text{ (conhecido)} \quad (03)$$

Conhecendo-se  $n_1$ , obtém-se o valor de  $\%V_a$  na Tabela A3, Anexo 1 e calcula-se o volume de álcool puro  $V_a$  (ml) pela Equação 04.

$$V_a \text{ (ml)} = \frac{\%V_a}{100} V_d \quad (04)$$

De posse da massa específica do etanol puro, Equação 05 e do volume de álcool puro, Equação 04, calcula-se a massa de álcool puro total obtida, Equação 06

$$\rho_a \text{ (g.ml}^{-1}\text{)} = 0,79074 \quad (05)$$

$$m_a \text{ (g)} = V_a \text{ (ml)} 0,79074 \text{ (g ml}^{-1}\text{)} \quad (06)$$

Finalmente, a concentração de etanol é encontrada, dividindo-se a massa de etanol pelo volume fermentado, Equação 07.

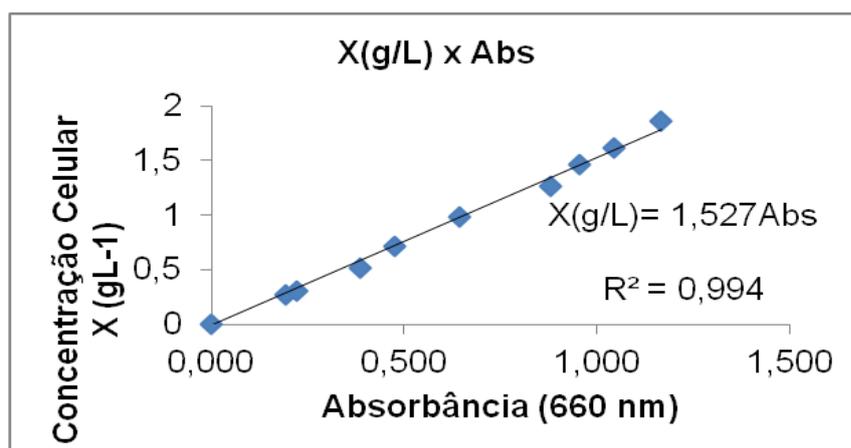
$$[P \text{ (gL}^{-1}\text{)}] = \frac{m_a \text{ (g)}}{V_{\text{fermentado}} \text{ (L)}} \quad (07)$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDA PARA O MONITORAMENTO CELULAR DURANTE A FERMENTAÇÃO DA LACTOSE.

Para avaliação da biomassa, primeiramente desenvolveu-se uma curva de calibração celular, este procedimento envolve o preparo de uma solução de  $2 \text{ g L}^{-1}$  de levedura comercial e diluições sucessivas, para posterior leitura em espectrofotômetro a 660 nm. As concentrações são plotadas contra a absorbância e os dados são ajustados a um modelo linear para posterior utilização, Figura 8. Somente para a fermentação das Rotas 5 e 6 procurou-se avaliar o crescimento celular através da absorbância, para isto procedeu-se à centrifugação das amostras coletando-se dois eppendorf e centrifugando-se a 7.500 rpm durante 2 min. O sobrenadante era utilizado para determinação de ART pela Equação (01), enquanto o precipitado era diluído em água destilada e o volume completado para 10 ml em balões volumétricos calibrados. Após homogeneização, amostras de 2 ml eram lidas contra o branco (água destilada) em espectrofotômetro e a concentração celular determinada com a equação linear obtida na Figura 8.

FIGURA 8 - Curva de calibração obtida com células de levedura.



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

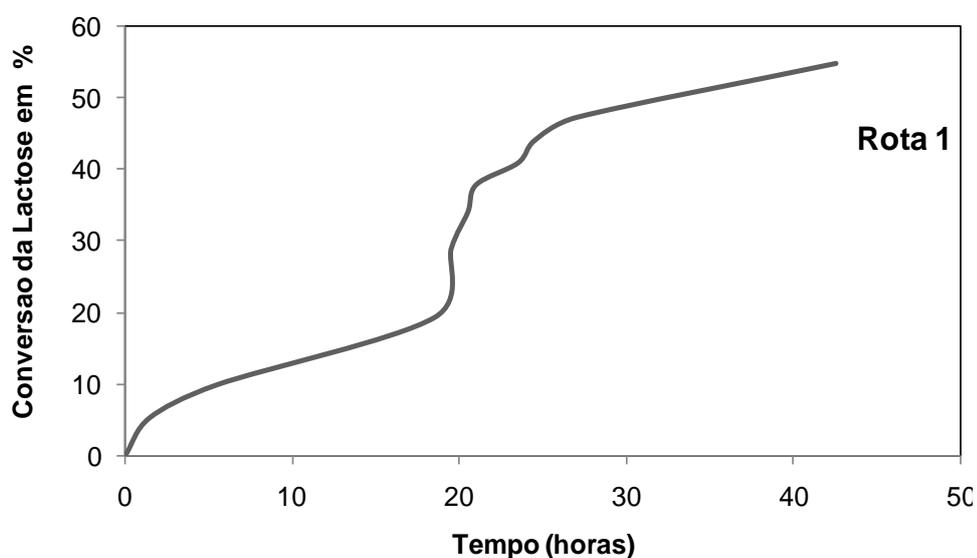
## 4.2 RESULTADOS DO CULTIVO DO INÓCULO

No procedimento para propagação do inóculo de *Kluveromyces marxianus*, a primeira etapa envolveu tubos preparados com lactose P.A. e nutrientes, cultivados em estufa. A contagem inicial em câmara foi de  $5,95 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Após 9 dias de fermentação em tubos, o crescimento médio passou para  $16,95 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Dois mililitros desta cultura foram utilizados para 50 ml de fermentação, posteriormente o meio foi centrifugado e as células separadas para nova fermentação. Este procedimento também foi importante para verificar que o meio nutricional contribuiu pouco para um crescimento exponencial e mostra uma dinâmica lenta do fungo, requerendo outras alternativas para produção de um inóculo satisfatório para o processo.

## 4.3 DESEMPENHO PARA ROTAS UTILIZANDO HIDRÓLISE ÁCIDA

Para o caso da Rota 1, Figura 9, se considerando um crescimento associado a produção de etanol, verifica-se uma fermentação lenta, por 20 horas e com tendência a uma fase exponencial pequena das 20 até as 28 horas de reação, esta fase exponencial foi favorecida pela agitação intensa do processo em condição de anaerobiose e liberação do  $\text{CO}_2$  acumulado, favorecendo a transferência de massa.

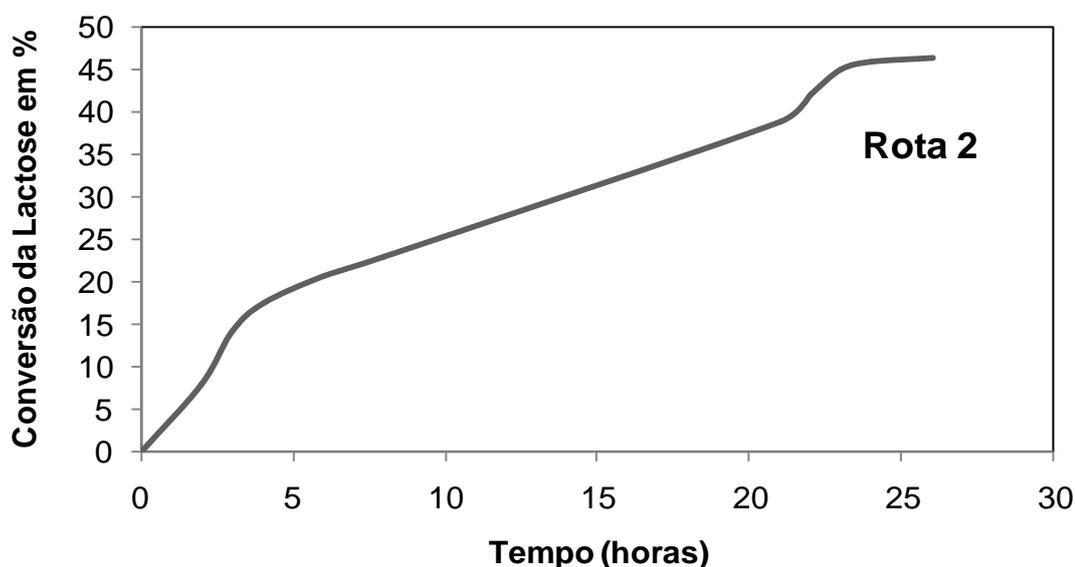
FIGURA 9 - Fermentação com *S. cerevisiae* após hidrólise ácida de soro líquido.



No caso do processo mostrado na Figura 9, o desempenho poderia ser melhorado, aumentando o tempo de hidrólise ácida, a correção de nutrientes e a agitação para aumentar a velocidade de reação.

Para a Rota 2, Figura 10, os resultados foram semelhantes com o da Rota 1, novamente, com uma tendência lenta no metabolismo de conversão de substrato e formação de produtos, neste caso o desempenho foi pior, mostrando que há uma limitação na hidrólise ácida, a sugestão seria melhorar a hidrólise aumentando o tempo a altas temperaturas, aumentar o suprimento de nutrientes para acelerar a fase inicial e diminuir a fase lag implementando maior agitação.

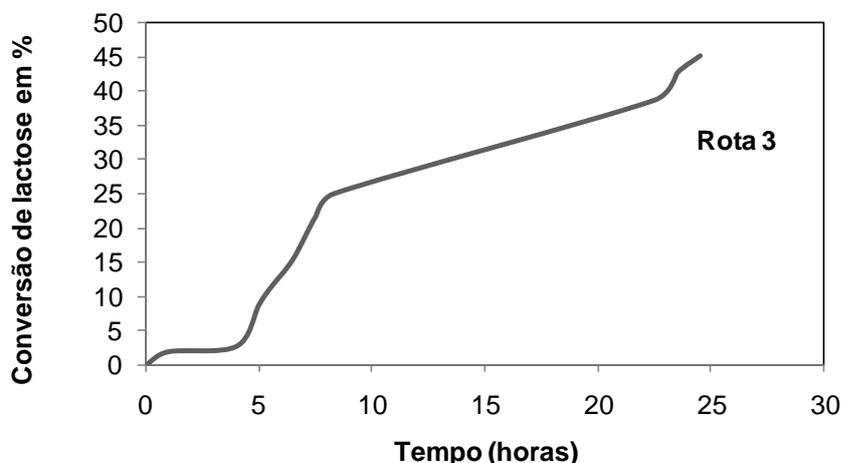
FIGURA 10 - Fermentação com *S. cerevisiae* após hidrólise ácida de uma solução de lactose P.A.



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

Situação semelhante a das Rotas 1 e 2 pode ser observada com a Rota 3, Figura 11. Se admitirmos crescimento associado à formação de produtos, neste caso, é nítida a fase lag observada de quase 4 horas, com posterior fase de aceleração. Neste caso o soro em pó apresenta maior quantidade de nutrientes do que a lactose, favorecendo uma aceleração no metabolismo. O decréscimo da velocidade de conversão pode ser explicado pela redução de concentração de lactose, ou da fonte de carbono. Uma vez que a velocidade de reação depende da concentração de substrato é natural que fases menos acentuadas ocorram após a fase de aceleração.

FIGURA 11: Fermentação com *S. cerevisiae* após hidrólise ácida de uma solução de soro em pó.

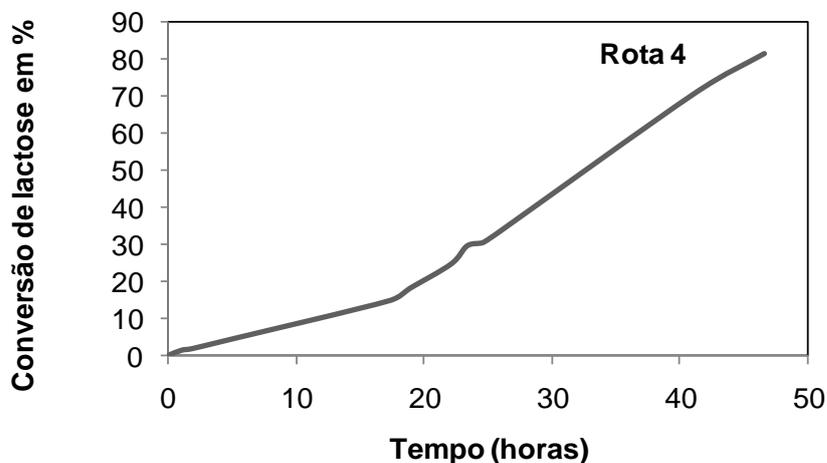


Fonte: Elaboração do autor, 2013.

#### 4.4 DESEMPENHO PARA ROTAS UTILIZANDO *Kluyveromyces*

Na Figura 12 verifica-se ausência de fase lag e um comportamento lento para a conversão, consequência da baixa velocidade de crescimento celular. Apesar da reação ser lenta, a conversão é satisfatória a períodos longos. Pode-se reduzir este tempo e melhorar a velocidade de reação, aumentando a concentração do inóculo inicial e aspectos nutricionais, aliando a presença de outra levedura com melhor capacidade de fermentação e menor inibição pelo etanol.

FIGURA 12: Fermentação com *Kluyveromyces marxianus*, evolução do processo foi determinado em função da conversão da lactose.

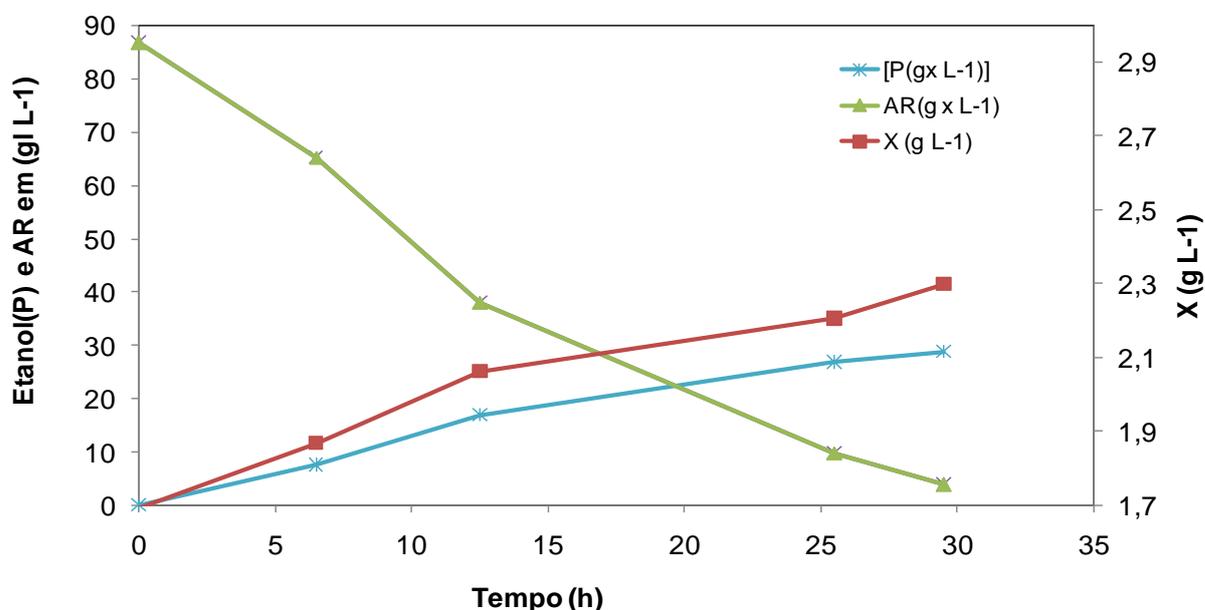


Fonte: Elaboração do autor, 2013.

#### 4.5 DESEMPENHO PARA ROTAS UTILIZANDO CO-CULTURAS

As Figuras 13 e 14 mostram o desempenho de uma co-cultura de duas espécies de leveduras fermentando simultaneamente. Neste caso o objetivo foi desenvolver o processo em condições de menor inibição da enzima lactase, produzida pela *Kluveromyces*, já que a glicose, pode reprimir a reação de hidrólise. Os perfis de Biomassa seca ao longo do tempo foram obtidos de acordo com o procedimento descrito em 4.1, enquanto os perfis de açúcares redutores pelo método DNS, Equação 01.

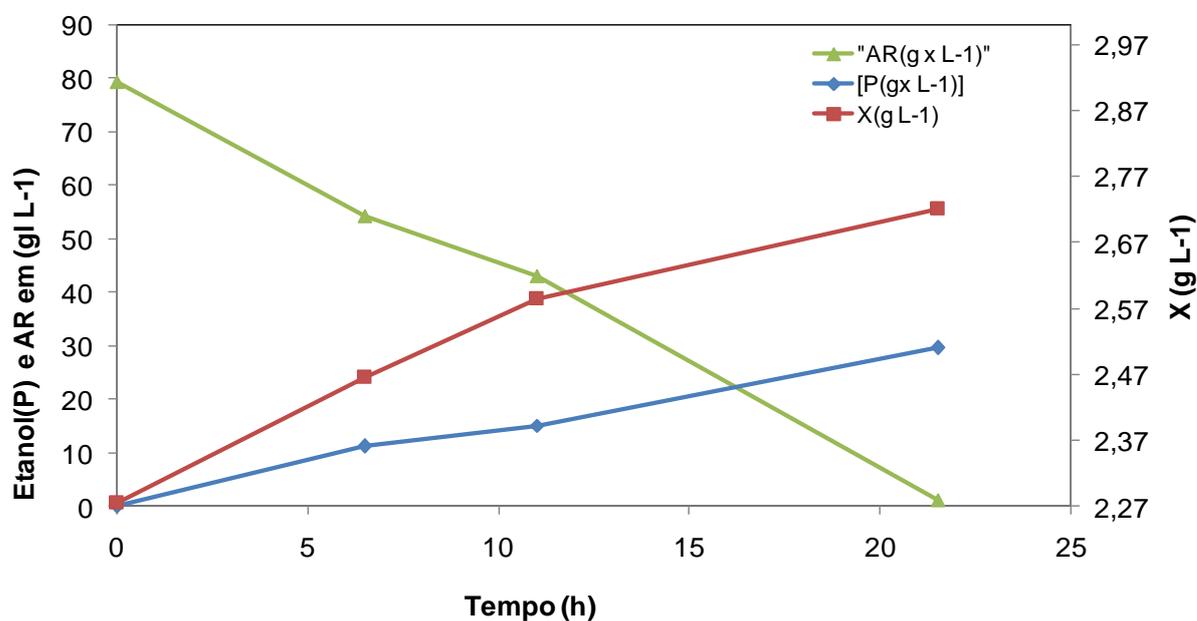
FIGURA 13 Desempenho da Rota 5: fermentação com *Kluveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com a Tabela 5. Perfil de etanol calculado.



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

O fator de rendimento em etanol foi obtido de acordo com o descrito no item 4.5.1 e assim foi possível ajustar os perfis das Figuras 13 e 14. Observa-se que o comportamento celular é muito parecido com o perfil da concentração de etanol, isto ocorre, porque considerou-se um crescimento associado e relações lineares para a determinação do etanol ao longo do tempo. Os resultados teóricos e experimentais são muitos satisfatórios se considerando trabalhos da literatura envolvendo processo enzimático com levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde em Andrade (2005) obteve-se valores variando de 18,65 g L<sup>-1</sup> a 30,39 g L<sup>-1</sup>

FIGURA 14 - Desempenho da rota 6: fermentação com *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com a Tabela 6. Perfil de etanol calculado.



Fonte: Elaboração do autor, 2013

#### 4.5.1 Determinação do fator de conversão etanol-substrato

O fator de conversão  $Y_{PS}$  foi determinado com os dados iniciais e finais de fermentação. A variação de etanol foi obtida através do procedimento descrito no item 3.5.1

$$Y_{PS} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{[P] - [P_0]}{[S_0] - [S]} \quad (08)$$

$$Y_{PS} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{27 \text{ g L}^{-1} - 0}{79,5 \text{ g L}^{-1} - 1,32 \text{ g L}^{-1}} = 0,3473 \frac{\text{gP}}{\text{gS}} \quad (09)$$

#### 4.5.2 Determinação do fator de conversão microrganismo-substrato.

O fator de conversão  $Y_{XS}$  foi determinado ajustando um modelo linear da concentração de células pela concentração de substrato em diferentes tempos do processo. Este valor é importante para comparar com dados da literatura visando avaliar o crescimento desejado durante o processo.

Desmembrando o fator de conversão e colocando em termos de X versus S

$$Y_{XS} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{[X] - [X_0]}{[S_0] - [S]} \quad (10)$$

$$[X] = [X_0] + [S_0]Y_{XS} - [S]Y_{XS} \quad (11)$$

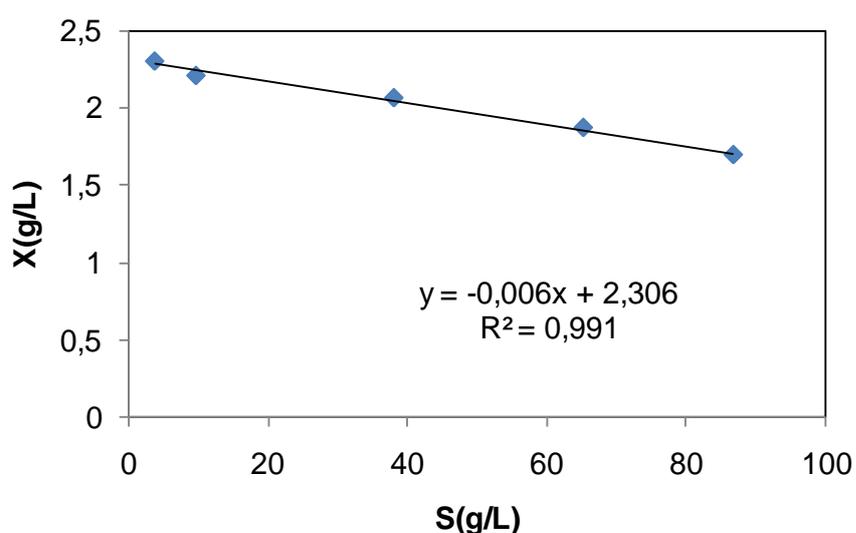
a partir da Equação 10, obtém-se o modelo linear:

$$[X] = -[S]Y_{XS} + b \quad \text{onde } b = [X_0] + [S_0]Y_{XS} \quad (12)$$

Pode-se observar que a Equação 11 tem coeficiente angular negativo quando plota-se **[X] por [S]**. O valor de  $Y_{XS}$  é obtido procedendo-se a um ajuste pelos mínimos quadrados, Figuras 15 e 16.

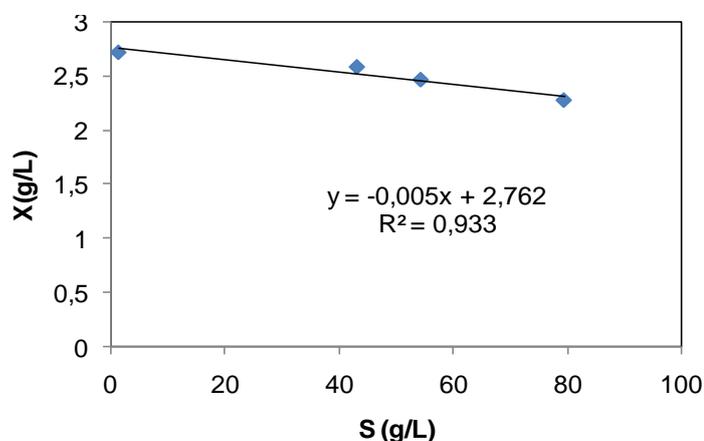
A Equação de **[X] por [S]** obtida acima permite calcular a concentração de célula ao longo do tempo, conhecendo-se o valor de ART inicial e o consumido instantaneamente. Neste caso admite-se que o fator de conversão celular é aproximadamente constante e válido para um processo em que o consumo de substrato contribui para o crescimento celular de forma associada. No caso da Figura 15,  $Y_{XS}=0,006 \text{ g célula g}^{-1} \text{ ART}$  e Figura 16,  $Y_{XS}=0,005 \text{ g célula g}^{-1} \text{ ART}$ .

FIGURA 15 - Estimativa de  $Y_{XS}$  para o processo de fermentação com  $S_0 = 86 \text{ g L}^{-1}$



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

FIGURA 16 - Estimativa de  $Y_{XS}$  para o processo de fermentação com  $S_0 = 79,5 \text{ g L}^{-1}$ .



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

#### 4.5.3 Rendimento e produtividade

Para o cálculo da produtividade e rendimento e foram utilizadas as Equações 13 e 14, respectivamente.

$$\text{Produtividade}(\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \frac{P(\text{g L}^{-1})}{t_F(\text{h})} \quad (13)$$

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{P(\text{g L}^{-1})}{0,5368 \text{ ART}_{\text{consumido}}(\text{g L}^{-1})} \quad (14)$$

O valor de 0,5368 refere-se ao valor teórico para a conversão da lactose a etanol, como apresenta a Equação 15.



TABELA 10 - Desempenho do rendimento, produtividade e concentração para co-culturas e comparação com dados da Literatura (Andrade, 2005) para  $60 \text{ g L}^{-1}$ .

Desempenho	Rota 5	Rota 6	Literatura
Rendimento	65%	72%	77 a 93%
Produtividade	$0,96 \text{ g L}^{-1}\text{h}$	$1,34 \text{ g L}^{-1} \text{ h}$	$1,43 \text{ a } 2,85 \text{ g L}^{-1} \text{ h}$
Concentração	$28 \text{ g L}^{-1}$	$29 \text{ g L}^{-1}$	$18 \text{ a } 30 \text{ g L}^{-1}$

Fonte: Elaboração do autor, 2013.

#### 4.5.4 Avaliação econômica do potencial de produção de álcool de segunda geração

A importância na produção de etanol a partir do soro, passa pela questão de se utilizar um resíduo ao invés de um produto alimentício, ou nobre, sendo assim, apesar do custo significativo de produção, a avaliação econômica pode ser aprimorada com melhorias das condições de conversão, produtividade, rendimento, além das oportunidades de tecnologias que empreguem o soro hidrolisado na preparação de meios de fermentação para correção de mostos.

Aqui pretende-se avaliar o custo de produção e as possibilidades de lucro para pequenas produções com excedente deste produto.

Fez-se um levantamento das necessidades de implantação de uma unidade de produção de 150 m<sup>2</sup>, com um laboratório de microbiologia e controle de qualidade acoplado, além dos equipamentos para o desenvolvimento de uma unidade de produção de álcool com uma produção semanal de 450 litros de álcool a 82%, o que daria em torno de 1.800 litros por mês. Isto consumiria apenas 17.000 litros de soro puro por semana, que deve ainda ser reduzido em 50% em um processo de evaporação para concentração em torno de 60 a 100 g L<sup>-1</sup> de lactose. Devido à capacidade de fermentação, seriam possíveis em torno de 3 fermentações por semana, o que traria uma demanda de pelo menos 4 dornas de 5.000 litros e uma dorna de 100 litros para o preparo do \_noculo, Tabela A1.

Na Tabela A2, observa-se o lucro somente da produção de álcool se não fosse vender o soro de processamento, o valor de R\$ 1.560,00 quase não justifica a implantação da unidade, pois teria de contratar funcionários capacitados para operar a planta.

## 5. CONCLUSÕES

O desempenho das rotas que empregaram hidrólise ácida permitiram mostrar que o tempo de hidrólise é um fator a ser otimizado. Neste caso aliando-se o aspecto nutricional pode-se levar a maiores velocidades de reações e finalmente a conversões próximas a 100%, no entanto, em termos de processo, a produtividade de todas as etapas seria baixa se comparado a outras alternativas que não empregam rotas químicas. A utilização de leveduras que fermentam diretamente a lactose permite altas conversões e produtividades. Resultados mostraram que se bem adaptadas e com concentrações adequadas, leveduras do gênero *Kluyveromyces* são adequadas para o processamento, possibilitando ainda que co-culturas não sintam tanto o processo de inibição pelo etanol. Quanto à implantação de uma unidade de produção, o alto custo da mesma mostra que estudos de viabilidade técnica e econômica são um desafio, isto se deve a baixas produtividades e concentrações no produto final.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A.C. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *saccharomyces cerevisae***. 110 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química).Uberlândia-MG, 2005.
- ATHANASIADIS, I. *et al.* **Development of a novel whey beverage by fermentation with kefir granules effect of various treatments**. Biotechnol. Progr. 20, 1091-1095, 2004.
- BECKER, D. E. **Preoperative medical evaluation: Part 1: General principles and cardiovascular considerations**. Anesthesia progress, Richmond, v. 56, n. 3, p. 92 – 103, 2009.
- BOBBIO, P. A.; ORSATTI, **Química do processamento de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1992.
- CHEN, H. C.; ZALL, R. R. **Continuous fermentation of whey into alcohol using an attached film expanded bed reactor**. Process biochemistry, v. 17, n. 1, p. 20-25,1982.
- DEMOTT, B. J.; DRAUGHON, F. A.; HERALD, P. J. **Fermentation of lactose in direct-acid-set cottage cheese whey**. Journal of food protection, v. 44, n. 8, p. 588-590,1981.
- DRAGONE, G.*et al.* **Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation**. Food chemistry, Kidlington, v. 112, n. 4, p. 929–935,2009.
- GEKAS, V.; LOPES-LEIVA, M. **Hydrolysis of lactose: a literature review**. Process. Biochemistry, New York, v. 20, p.2-12,1985.
- GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. **Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey**. Biotechnolgy advances, v. 28, p. 375-384, 2010.
- GITALDO-ZUNIGA, A. D. *et al.* **Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de leite**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 57, n. 325, p. 35-46, 2002.
- HATZINIKOLAOU, D. G. *et al.* **Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of the whey permeate by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger***.Biochemical Engineering Journal, v. 24, p. 161-172, 2005.
- JONES, R. P.; PAMMENT, N. E.; GREENFIELD, P. F. **Alcohol fermentation by yeasts – the effect of environmental and other variables**. Process biochemistry, v. 16, n.3, p. 42- 49, 1983.
- KOSARIC, N.; WIECZOREK, A.; CONSENTINO, G. P., **Etanol fermentation** Ed. Biotechnology, Wheinheim: Verlag Chimie, p. 257,1983.

KOSIKOWSKI, F.U. **Greater utilization of whey powder for human consumption and nutrition.**Journal of Dairy Science. v. 50, n. 8, p. 1343-1345, 1967.

KOSIKOWSKI, F. U. **Whey utilization and whey products.**Journal of Dairy Science, v. 62, p. 49-60, 1979.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - Métodos físico-químicos para análise de alimentos. - Bebidas alcóolicas.** cap IX 4ª Edição, 1ªedição digital, São Paulo, 2008.

LOPES-LEIVA, M. H.; GUSMAN, M., **Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates.** Process biochemistry. v. 30, p. 757-762,1985.

MAHONEY, R. R., **Lactose: Enzymatic Modification.**London, Chapman; Hall, 1997.

MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J.F., **Review: whey pollution problem and potential utilization.** Intl. J. Food Sci. Technol, v. 23, p. 323-336, 1988.

MAWSON, A. J., **Bioconversions for whey utilization and waste abatement.** Bioresource Technology, v. 47, n. 3, p. 195–203, 1994.

MENEZES, T. J. B., **Etanol, o combustível do Brasil.** São Paulo: Agronomia Ceres, p. 223,1980.

MULLER, G. L., **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars.** Analytical Chemistry, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

NELSON, F.E.; BROWN, W.,**Corrosion whey utilization in fruit juice drinks.**Journal of Dairy Science, v. 52, n. 6, p. 901, 1969.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. **Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP).**Enzymeand Microbial Technology, New York, v. 41, n. 6-7, p. 876–880, 2007b

PAOLUCCI, A. A. P. **Formulação de um meio de cultura a base de soro de queijo para produção de *lactococcus lactis sp Lactis*.** 66 f. Tese de Mestrado, UFV, Viçosa, MG.1991.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. E.; CASTRO GOMES, R. J. H. **Soro de leite – Obtenção, características e aproveitamento: revisão.** Seminário Cia. Agr., Londrina, v. 13, n. 1, p, 92–96,1992.

PULITANO, V. M. S. E., **Produção contínua de etanol em um reator de alta produtividade utilizando célula imobilizada em pectina cítrica.** São Carlos, 93 p Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos,1990.

RAMOS, D. C., **Utilização do soro de queijo**. Instituto de Laticínios Candido Tostes, 1985.

SANTIAGO, P. A. *et al.*, **Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus***. Ciência de tecnologia e alimentos, Campinas, v. 24(4): p. 567-572, out.-dez. 2004.

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

STREMEL, D. P., **Apostila de cinética e biorreatores agroindustriais**. Universidade Federal do Paraná. p. 49, Palotina, 2013.

STREMEL, D. P., *et al.* **Avaliação de biocontroladores antifúngicos pelo método de cultivo pareado**. In: XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ) e IV Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada (CBTERMO), Recife, 2008.

USDA: United States Department of Agriculture, Disponível em: <<http://www.usda.gov>>, Acesso: junho de 2013.

VINHAL, E. F., **Hidrólise da lactose no leite por  $\beta$ -galactosidase de *kluyveromyces fragilis***. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

VIEIRA, S. R., **Uso de geoestatística em estudos de variabilidade espacial de propriedades do solo**. In: NOVAIS R. F., (Ed.), p. 1-54. **Tópicos em Ciência do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa, 2000.

## APÊNDICE

TABELA A1 - Simulação de custos e lucros para uma planta com laboratório

<b>CRONOGRAMA DO ORÇAMENTO</b>					
<b>MATERIAL DE CONSUMO</b>	<b>Justificativa</b>	<b>Valor Unitário</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Dolar</b>	<b>Valot Total</b>
Reagentes, microorganismos, padrões					R\$ 10.000,00
Micropipetas, Dispensadores, Buretas, etc					R\$ 5.000,00
Bibliografia					R\$ 5.000,00
<b>Subtotal1</b>					<b>R\$ 20.000,00</b>

<b>PLANTA DE PRODUÇÃO</b>	<b>Justificativa</b>	<b>Valor Unitário</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Dolar</b>	<b>Valot Total</b>
100 M2 de área de construção civil	ar, água, energia, bancadas, divisórias, acabamento, mobiliário básico	R\$ 1.500,00	100		R\$ 150.000,00
HPLC, Espectrofotômetro	Análises não destrutivas	R\$ 72.000,00	1	2,2	R\$ 158.400,00
Moinho, Centrífuga, Estufa, etc		R\$ 50.000,00	1	2,2	R\$ 110.000,00
Deionizador, Refrigerador, liofilizador		R\$ 100.000,00	1		R\$ 100.000,00
Biorreatores e shakers, BOD'S, autoclaves	Desenvolvimento de pesquisa	R\$ 150.000,00	1		R\$ 150.000,00
Capela de fluxo laminar e capela com exaustão		R\$ 60.000,00	1		R\$ 60.000,00
Microscópio com câmera acoplada		R\$ 10.000,00	1		R\$ 10.000,00
Computador, Impressora, móveis		R\$ 10.000,00	1		R\$ 10.000,00
Laboratório de Microbiologia e Preparo de Meios	Propagação de inóculo e preparo meio	R\$ 200.000,00	1		R\$ 200.000,00
Fermentador de 100L		R\$ 20.000,00	1		R\$ 200.000,00
Fermentadores de 5000L		R\$ 45.000,00	4		R\$ 180.000,00
Sistema de Instrumentação		R\$ 19.000,00	1		R\$ 19.000,00
Caldeira e Transmissão de vapor		R\$ 60.000,00	1		R\$ 60.000,00
Sistema de ar comprimido		R\$ 60.000,00	1		R\$ 60.000,00
Centrífuga	150 a 600L	R\$ 1.000.000,00	1		R\$ 1.000.000,00
Evaporador a Vácuo		R\$ 500.000,00	1		R\$ 500.000,00
Tubulações inox, bombas, instalações elétricas e hidráulicas		R\$ 100.000,00	1		R\$ 100.000,00
Trocadores de calor e recuperação de água	redução de energia na caldeira	R\$ 100.000,00	1		R\$ 100.000,00
<b>Subtotal2</b>		<b>4800</b>			<b>R\$ 2.319.000,00</b>

<b>RECEITA COM SUBPRODUTOS</b>	<b>Justificativa</b>	<b>Valor Unitário(R\$)</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Dolar</b>	<b>Valot Total</b>
Álcool a 82%( 8400L soro por semana fermentado), 17 000 Litros de soro diluído ou 17000 L de soro diluído	450 L de destilado/semana	R\$ 2,00	1800		R\$ 3.600,00
Soro excedente (200000 litros por semana)		R\$ 0,03	732000		R\$ 21.960,00
<b>Subtotal3</b>					<b>R\$ 25.560,00</b>

<b>RESUMO DOS CUSTOS</b>	<b>VALOR TOTAL</b>
MATERIAL DE CONSUMO	R\$ 20.000,00
PLANTA DE PRODUÇÃO	R\$ 2.319.000,00
RECEITA COM SUBPRODUTOS	R\$ 25.560,00
<b>Receitas - Despesas</b>	<b>-R\$ 2.339.000,00</b>

TABELA A2 - Lucro somente da venda do álcool em relação ao soro.

<b>RECEITAS COM ALCOOL PRODUZIDO</b>				
<b>RECEITA COM SUBPRODUTOS</b>	<b>Justificativa</b>	<b>Valor Unitário(R\$)</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valot Total</b>
Álcool a 82%( 8400L soro por semana fermentado), 17 000 Litros de soro diluído ou 17000 L de soro diluído	450 L de destilado/semana	R\$ 2,00	1800	R\$ 3.600,00
Soro para processamento de álcool (17000 litros por semana)		R\$ 0,03	68000	R\$ 2.040,00
<b>Lucro mensal adicional</b>				<b>R\$ 1.560,00</b>

## ANEXOS

TABELA A3 – Porcentagem de álcool em volume a 20° C(%v/v) correspondente à densidade relativa

D 20°C/20°C	% v/v						
0,89689	66,0	0,89401	67,2	0,89109	68,4	0,88814	69,6
0,89665	66,1	0,89376	67,3	0,89085	68,5	0,88789	69,7
0,89641	66,2	0,89352	67,4	0,89061	68,6	0,88765	69,8
0,89617	66,3	0,89328	67,5	0,89036	68,7	0,88740	69,9
0,89593	66,4	0,89304	67,6	0,89012	68,8	0,88715	70,0
0,89569	66,5	0,89280	67,7	0,88987	68,9	0,87437	75,0
0,89545	66,6	0,89255	67,8	0,88963	69,0	0,86082	80,0
0,89521	66,7	0,89231	67,9	0,88938	69,1	0,84639	85,0
0,89497	66,8	0,89207	68,0	0,88913	69,2	0,83071	90,0
0,89473	66,9	0,89183	68,1	0,88889	69,3	0,81288	95,0
0,89449	67,0	0,89158	68,2	0,88864	69,4	0,79074	100,0
0,89425	67,1	0,89134	68,3	0,88839	69,5	-	-

Fonte: (LUTZ, 2008, p. 413)