CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LEVEDURA *Kluyveromyces spp.* PARA BIOTRANSFORMAÇÃO DA LACTOSE DO SORO DE RICOTA E PERMEADO DE SORO DE QUEIJO EM ETANOL

Elvio Leandro Burlani

Lajeado, março de 2014

Elvio Leandro Burlani

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LEVEDURA *Kluyveromyces spp.* PARA BIOTRANSFORMAÇÃO DA LACTOSE DO SORO DE RICOTA E PERMEADO DE SORO DE QUEIJO EM ETANOL

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia do Centro Universitário Univates como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza

Coorientadora: Dra. Júlia Elisabete Barden

Lajeado, março de 2014

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

DEDICATÓRIA

Essa dissertação é dedicada aos meus amores, esposa Sônia e filha Emanuele que vai nascer entre os dias 24/03 e 07/04/2014, (nasceu dia 09/04).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

AGRADECIMENTO

A minha amada esposa, Sônia, pela paciência, incentivo, apoio e carinho incondicional durante o decorrer de meu mestrado.

A meus pais Antonio e Beatriz pela educação e minha irmã Heloise obrigado por tudo, amo vocês.

A orientadora, prof. Dra. Claucia Fernada Volken de Souza, pela paciência em orientar e proporcionar a oportunidade em realizar essa dissertação.

A prof. Dra. Júlia Elisabete Barden coorientadora desta dissertação por sua paciência e ajuda, na realização desse trabalho.

A prof. Dra. Giandra Volpato do IFRS pela contribuição e ajuda na realização das análises.

A empresa 4G no centro Tecnológico da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por disponibilizar espaço e equipamento para realização das análises.

A Monica Jachetti Maciel doutoranda da UFRGS, pela ajuda e dedicação no desenvolvimento de todo o trabalho.

A bolsista de iniciação científica Angélica Vicenzi, pela ajuda, organização e na realização desse trabalho.

Aos colegas de laboratório, Adriano Genari e Júlio Bald pela amizade.

Ao amigo de mestrado Luiz P. Machado e sua família por terem me acolhido em sua casa diversas vezes.

Ao colega Alexandre da central analítica da Univates pela ajuda na realização das análises.

A Capes pela disponibilização da taxa.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução dessa dissertação, obrigado, a Deus por tudo.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

RESUMO

No setor industrial muitos resíduos gerados são tratados e posteriormente descartados nos cursos hídricos. Na indústria láctea para produção de um quilo de queijo são gerados nove litros de soro de queijo, resíduo de elevada carga orgânica, rico em aminoácidos essenciais e vitaminas de importância nutricional. Algumas formas de aproveitamento do soro de queijo são a produção de ricota e de concentrado proteico de soro. Porém esses processos geram outros dois resíduos, respectivamente, o soro de ricota e o permeado de soro de queijo, que são importantes contaminantes ambientais devido à sua elevada carga orgânica. O principal constituinte desses resíduos é a lactose, açúcar que pode ser transformado através de processos fermentativos com auxílio de leveduras, em etanol. Este trabalho teve como objetivo utilizar o soro de ricota e o permeado de soro de queijo para a produção de bioetanol, através do emprego de diferentes cepas da levedura *Kluyveromyces spp.* Inicialmente foi selecionada entre cinco cepas de leveduras, quatro *Kluyveromyces marxianus* e uma *Kluyveromyces lactis,* a que apresentava maior produção de etanol a partir do soro de ricota e permeado de soro de queijo. Nessa etapa foi avaliado também o emprego dos subprodutos, soro de ricota e permeado de soro, nas formas autoclavado e não autoclavado. Posteriormente, empregando a cepa selecionada e a metodologia de planejamento experimental, foram estudados os efeitos do pH inicial, temperatura de incubação e concentração inicial de lactose sobre a produção de etanol, tanto para o soro de ricota e permeado de soro de queijo. Após, avaliou-se em biorreator de 3 L a conversão da lactose em etanol pela cepa selecionada para ambos os subprodutos. Como última etapa do trabalho realizou-se a estimativa de investimento em uma estação de tratamento de efluentes (ETE) e em uma usina de biotransformação de soro de ricota e permeado de soro de queijo. A melhor produção de etanol foi com soro de ricota e permeado de soro de queijo autoclavados utilizando a cepa da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, que produziu 15,75 e 10,40 g/L de etanol, respectivamente. No planejamento experimental foi observada que a fermentação da lactose presente no soro de ricota e permeado de soro de queijo foi mais eficiente com temperaturas entre 35 e 45º C e pHs entre 4 e 5. Com esse estudo foi possível estimar que o investimento de uma usina pode ser viável ao longo de 10 anos, mesmo com um custo elevado de investimento. Além disso, a usina gera lucro, já na ETE o investimento para a instalação é alto e não gera lucro. Os resultados obtidos indicam que é possível obter etanol a partir da lactose presente no soro de ricota e no permeado de soro de queijo empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537.

Palavras-chave: *Kluyveromyces marxianus.* Soro de ricota. Permeado de soro de queijo. Bioetanol. Lactose.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

ABSTRACT

In the industrial sector much waste, after treated, is thrown into water courses. In the dairy industry, to produce a pound of cheese, nine liters of cheese whey is generated. This substance presents high organic loads, essential amino acids and important nutritional vitamins. Some forms of cheese whey utilization are the production of ricotta and the concentrated whey protein. However, these processes generate other two residues, ricotta cheese whey and whey permeated which are important environmental contaminants due to their high chemical oxygen demands. The main component of these residues is lactose, which is a kind of sugar that can be transformed by the fermentation with the aid of yeast in ethanol. This study aimed to use whey permeated and ricotta cheese's whey for the production of bioethanol, by applying different strains of the yeast *Kluyveromyces spp*. regarding to the potential of the biotransformation of lactose in ethanol. Initially from five yeast strains it was selected four *Kluyveromyces marxianus and one Kluyveromyces lactis* that showed the higher ethanol production from ricotta cheese whey and whey permeate. At this stage it was also rated the sub products, ricotta cheese whey and permeate, in autoclaved and non-autoclaved forms. Subsequently, using the selected strains as well as applying the methodology of experimental design, the effects of initial pH, incubation temperature and initial concentration of lactose on ethanol production were studied for both the ricotta cheese whey and permeate cheese. After, the conversion of lactose into ethanol by the sub products selected for both strains was evaluated in a 3L bioreactor. As the final stage of this study, it was estimated the investment to be done to treat water effluents as well as the implantation of a biotransformation plant of whey ricotta cheese and whey permeate. The best ethanol production attained was from ricotta cheese whey and from permeate cheese whey using autoclaved yeast strain *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537, which produced 15.75 and 10.40 g/L ethanol, respectively**.** In the experimental design it was observed that fermentation of lactose present in ricotta cheese whey and permeate cheese was more efficient with temperatures between 35ºC and 45 °C and pH 4 and 5. Through this study, it was possible to estimate that the investment of a biotransformation plant may be feasible over 10 years, even with a high investment cost. In addition, the plant generates incomes, while in ETE, the investment for the facility is high and does not generate profits. The results indicate that it is possible to obtain ethanol from whey ricotta present in lactose and cheese whey and permeate using the yeast *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537).

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*. Ricotta cheese Whey. Whey permeated. Bioethanol. Lactose.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de Figuras

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção de queijo e etapas onde é gerado o soro de queijo..... 6
Figura 2 - Rota metabólica considerada no modelo de bioconversão anaeróbia de lactose por *k. marxianus*. 10
Figura 3 - Fluxograma do processo de ultrafiltração do soro de queijo (água, sal e açúcar compõe o permeado, proteínas e gorduras geram o retentado) 17
Figura 4 - Fluxograma do aproveitamento do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol..... 21
Figura 5 - Estrutura da membrana para detecção etanol pelo analisador bioquímico 40
Figura 6 - Cromatograma da diluição do padrão de etanol, 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100 ppm..... 44
Figura 7 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: A) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) não autoclavado; B) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) autoclavado; C) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) não autoclavado; D) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) autoclavado. Resultados de biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★)..... 51

Figura 8 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: E) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 16045) não autoclavado; F) *Kluyveromyces marxianus* (16045) autoclavado; G) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC CBS 6556) não autoclavado; H) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC CBS 6556) autoclavado. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★). 52

Figura 9 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: I) *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176) não autoclavado; J) *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176) autoclavado. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★) 53

Figura 10 - Fermentação do permeado de soro de queijo com as leveduras: A) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) não autoclavado; B) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) autoclavado; C) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) não autoclavado; D) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) autoclavado. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★)..... 55

Figura 11 - Fermentação do permeado de soro de queijo com as leveduras: E) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 16045) não autoclavado; F) *Kluyveromyces marxianus* (16045) autoclavado; G) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC CBS 6556) não autoclavado; H) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC CBS 6556) em soro de ricota autoclavado. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★)..... 56

Figura 12 - Fermentação do permeado de soro de queijo com as leveduras: I) *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176) não autoclavado; J) *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176) autoclavado. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★) 57

Figura 13 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em soro de ricota autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 51 g/L, pH inicial 4, temperatura 29º C; (B) Lactose 51 g/L, pH inicial 4, temperatura 41º C; (C) Lactose 51 g/L, pH inicial 5,5 temperatura 29º C; (D) Lactose 51 g/L, pH inicial 5,5, temperatura 41º C. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★) 59

Figura 14 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em soro de ricota autoclavado a 150 rpm: (A)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Lactose 73 g/L, pH inicial 4, temperatura 29º C; (B) Lactose 73 g/L, pH inicial 4, temperatura 41º C; (C) Lactose 73 g/L, pH inicial 5,5 temperatura 29º C; (D) Lactose 51 g/L, pH inicial 5,5, temperatura 41º C. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★). 60

Figura 15 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: da levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em soro de ricota autoclavado a 150 rpm: (A) concentração de lactose 44 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º C e (B) concentração lactose 80 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º C. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★)..... 61

Figura 16 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em soro de ricota autoclavado a 150 rpm (A) Lactose 62 g/L, pH inicial 3,5, temperatura 35º C; (B) Lactose 62 g/L, pH inicial 6, temperatura 35º C; (C) Lactose 62 g/L, pH inicial 4,75 temperatura 25º C; (D) Lactose 62 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 45º C; (E), lactose 62 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★)..... 62

Figura 17 – Cromatograma de amostra de etanol, pico principal, nas laterais interferencia de tendencia a outros picos detectada por (CLAE)..... 63

Figura 18 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em permeado de soro de queijo autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 67,85 g/L, pH inicial 4, temperatura 29º C; (B) Lactose 67,85 g/L, pH inicial 4, temperatura 41º C; (C) Lactose 67,85 g/L, pH inicial 5,5 temperatura 29º C; (D) Lactose 67,85 g/L, pH inicial 5,5, temperatura 41º C. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★). 64

Figura 19 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em permeado de soro de queijo autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 129,1 g/L, pH inicial 4, temperatura 29º C; (B) Lactose 129,1 g/L, pH inicial 4, temperatura 41º C; (C) Lactose 129,1 g/L, pH inicial 5,5 temperatura 29º C; (D) Lactose 129,1 g/L, pH inicial 5,5, temperatura 41º C. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★)..... 66

Figura 20 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: *Kluyveromyces*

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

marxianus (ATCC 46537) em permeado de soro de queijo autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 47 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º C, (B) Lactose 150 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º C. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★)..... 67

Figura 21 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em permeado de soro de queijo autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 98,5 g/L, pH inicial 3,55, temperatura 35º C; (B) Lactose 98,5 g/L, pH inicial 6, temperatura 35º C; (C) Lactose 98,5 g/L, pH inicial 4,75 temperatura 25º C; (D) Lactose 98,5 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 45º C; (E), lactose 98,5 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★). 68

Figura 22 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) com soro de ricota autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 100 g/L, pH 4,8, temperatura 37º C; e com permeado de soro de queijo em (B) Lactose 100 g/L, pH inicial 4,8, temperatura 37º C. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★). 70

Figura 23 - Resultados de DQO inicial e final para soro de ricota e permeado de soro de queijo após 24 horas de fermentação em biorreator.....71

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa dos valores para instalação de diferentes sistemas de tratamento de efluentes de laticínio que processam entre 80.000 e 120.000 litros/dia..... 22
Tabela 2 - Estimativa do custo para operação dos diferentes sistemas 23
Tabela 3 - Estimativa de valor para instalação de usina para produção de 34.000 litros/dia de etanol..... 24
Tabela 4 - Diferentes cenários de retorno econômico para produção 34.000 l/dia etanol..... 24
Tabela 5 – Ordem dos tubos e suas devidas concentrações para preparação da curva padrão..... 31
Tabela 6 - Condições de cultivo em *shaker* com soro de ricota 41
Tabela 7 - Condições de cultivo em *shaker* com permeado de soro de queijo ... 42
Tabela 8 – Exemplo do cálculo empregado para estimar custos de instalação de empreendimento 47
Tabela 9 – Resultados das análises físico-químicas dos diferentes lotes de soro de ricota coletados em uma indústria de laticínios da região do Vale do Taquari 48
Tabela 10 – Resultados das análises físico-químicas do lote de permeado de soro de queijo reconstituído em laboratório 50
Tabela 11 – Diferença de valores da implantação mais custo operacional durante 10 anos..... 73
Tabela 12 – Estimativa de investimento necessário para instalar uma usina para fermentação de 100.000 litros/dia de resíduos lácteos.....75

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO – Demanda bioquímica de oxigênio
DQO – Demanda química de oxigênio
DNS - Ácido 3,5 – dinitrosalicílico
EMBRAPA – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
ETE – Estação tratamento efluentes
FAO - *Food and Agricultural Organization*
FEE - Fundação Economia Estatística
FISPIQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos
HCl – Ácido clorídrico
IAL - Instituto Adolfo Lutz
KOH – Hidróxido de potássio
MAPA – Ministério da agricultura pecuária e abastecimento
NaOH – Hidróxido de sódio
OECD - The Bioeconomy to 2030 Designing a Policy Agenda
UF – Ultrafiltração
WPC - Concentrado proteico de soro - *whey protein concentrated*

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **5**
2.1 Produção de leite 5
2.2 Produção de queijo e geração de soro de queijo 6
2.3 Bioetanol 8
2.4 Aproveitamento do soro de queijo 11
2.5 Aproveitamento do soro de ricota 14
2.6 Aproveitamento do permeado de soro de queijo 16
2.7 Importância econômica do aproveitamento do soro de ricota e permeado de soro de queijo 19
2.8 Metodologia do planejamento experimental 25

3 MATERIAL E MÉTODOS **27**
3.1 Material 27
3.2 Métodos 28
3.2.1 Análise das matérias-primas soro de ricota e permeado de soro de queijo 28
3.2.1.1 Análise de proteína bruta total 28
3.2.1.2 Análise de gordura 30
3.2.1.3 Análise de lactose 31
3.2.1.4 Análise de cinza 32
3.2.1.5 Análise de umidade 32

3.2.1.6 Determinação de pH 33
3.2.1.7 Análise de acidez titulável 33
3.2.1.8 Análise de demanda química de oxigênio (DQO) 34
3.2.1.9 Análise de carbono total e nitrogênio total 36
3.2.2 Preparação da amostra e análise do permeado de soro de queijo 36
3.2.3 Seleção das leveduras para produção de bioetanol 37
3.2.3.1 Preparação do inóculo 37
3.2.3.2 Padronização do inóculo e inoculação 37
3.2.3.3 Seleção das leveduras com soro de ricota 38
3.2.3.4 Seleção das leveduras com permeado de soro de queijo 38
3.2.3.5 Análises realizadas ao longo do cultivo 39
3.2.3.5.1 Análise lactose 39
3.2.3.5.2 Análise de etanol em analisador bioquímico 39
3.2.3.5.3 Determinação de pH 40
3.2.3.5.4 Determinação da biomassa 40
3.2.4 Planejamento experimental para condições de cultivo e produção de etanol em shaker 41
3.2.4.1 Condições de cultivo para produção de bioetanol com soro de ricota 41
3.2.4.2 Condições de cultivo para produção de bioetanol com permeado de soro de queijo 42
3.2.4.3 Análises realizadas ao longo dos cultivos 43
3.2.4.3.1 Análise etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 43
3.2.5 Determinação das condições de cultivo para produção de etanol em biorreator 44
3.2.5.1 Determinação do etanol fermentado em biorreator 45
3.2.6 Custo da implantação de uma ete comparado a uma usina de bioetanol 45

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 48
4.1 Caracterização físico-química do soro de ricota 48
4.2 Caracterização físico-química do permeado de soro de queijo 49
4.3 Resultados da seleção das leveduras com soro de ricota 50
4.4 Resultados da seleção das leveduras com permeado de soro de queijo 54
4.5 Resultados da avaliação das condições de cultivo em *shaker* com soro de ricota 58

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

4.6 Resultados da avaliação das condições de cultivo em shaker com permeado de soro de queijo 64
4.7 Resultado da fermentação do soro de ricota e permeado de soro de queijo em biorreator 69
4.8 Estimativa de investimento para instalação e operação de ete para o setor lácteo..... 72
4.9 Estimativa de investimento em equipamentos para produção de etanol..... 73

5 CONCLUSÕES **76**

6 BIBLIOGRAFIA **77**

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

1 INTRODUÇÃO

A população mundial deverá aumentar entre os anos de 2005 e 2030, aproximadamente 28%, passando dos 6,5 bilhões para 8,3 bilhões. Consequentemente aumentará a demanda por serviços de saúde, consumo de recursos naturais e necessidade por alimentos, rações, fibras, habitação, água, energia e combustíveis (OECD, 2009).

Diante dessa perspectiva, o consumo de combustíveis já é uma preocupação mundial. A sua produção ocorre basicamente a partir de matéria-prima fóssil que está diminuindo. Uma solução é substituir combustíveis fósseis por biocombustíveis, com reduzida emissão de CO_2, produzidos normalmente a partir de matérias-primas ricas em açúcares (cana-de-açúcar e beterraba) e culturas ricas em amido (milho ou trigo) (CHRISTENSEN et al., 2010; KÁDÁR et al., 2011).

A exploração de vegetais para produção de biocombustível pode não ser a melhor alternativa, pois leva à exploração excessiva de solo, contribuindo para o aumento dos preços dos alimentos. Dessa forma, torna-se necessário identificar fontes renováveis não vegetais para a produção de biocombustíveis (SANSONETTI ‘et al., 2009).

Nesse contexto, a biotecnologia tem como desafio desenvolver novos processos para o aproveitamento dos resíduos industriais (MENEZES, 2009). Segundo Zafar e Owais (2006), a crescente geração de resíduos industriais, como por exemplo, o soro de queijo, a diminuição das reservas de combustíveis fósseis e a preocupação com contaminações ambientais, proporcionam um estímulo ao avanço na produção de combustíveis alternativos a partir de resíduos industriais. O desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de biocombustíveis

é importante, conforme apresentado no livro *The Bioeconomy to 2030 Designing a Policy Agenda* (OECD, 2009), que é uma ferramenta de previsões para um futuro próximo.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2010), a biotecnologia utilizada na indústria pode auxiliar na decomposição, na transformação de resíduos, na produção de combustíveis, em biomassa e nos alimentos. Diante desses fatos, a aplicação de métodos biotecnológicos tem contribuído na resolução de problemas ambientais, na estruturação de novos modelos econômicos e no desenvolvimento de países.

Destaca-se, nesse sentido, a produção de alimentos com o emprego da biotecnologia, gerando resíduos, os quais podem ser transformados em combustíveis por meio de métodos biotecnológicos. A indústria láctea, por exemplo, utiliza grandes volumes de leite para produção de queijos, produzindo quantidades expressivas de soro de queijo. O aproveitamento do soro de queijo na indústria de alimentos é importante, pois auxilia na redução da quantidade de resíduo e consequentemente minimiza problemas de contaminações ambientais, uma vez que o soro de queijo apresenta uma elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO). Segundo Prazeres et al. (2012), a DBO e a DQO variam entre 27.000 a 60.000 mg/L e 50.000 a 102.000 mg/L, respectivamente. Já para Guimarães et al. (2010), a variação está entre 30.000 a 50.000 mg/L e 60.000 a 80.000 mg/L, respectivamente.

Esse soro pode ser utilizado na produção da ricota, originando aproximadamente 95% de um subproduto denominado soro de ricota. Outro método empregado para o aproveitamento do soro de queijo é o processo mecânico de ultrafiltração por membrana, produzindo o concentrado protéico de soro - *whey protein concentrated* (WPC) utilizado na alimentação humana, gerando o subproduto permeado de soro de queijo (BALDASSO et al., 2011).

O soro de ricota é composto por proteínas (0,15–0,22%), lactose (4,8-5,0%), sais (1,0-1,3%) e ácidos orgânicos (0,22-0,25%) (SANSONETTI et al., 2010a). Apresenta DBO e DQO de aproximadamente 50.000 e 80.000 mg/L, respectivamente (SANSONETTI et al., 2009). Já o subproduto permeado de soro de

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

queijo é composto principalmente por lactose (5%), água (93%), minerais (0,53%), gordura (0,36%) e proteína (0,85%). Na forma seca, essas concentrações são de 65 a 85% de lactose, 8 a 20% de sais minerais, 1,5% de gordura e 3 a 8% de proteína (BEUCLER et al., 2005). Conforme Baldasso et al.(2009) e Andrade e Martins (2002), o permeado de soro de queijo apresenta DQO e DBO com aproximadamente 80.000 mg/L e 60.000 mg/L, respectivamente.

Esses subprodutos devem ser tratados para posteriormente serem lançados nos corpos hídricos. O tratamento representa custo para os laticínios que, muitas vezes, sem alternativas, descartam incorretamente os resíduos que poderiam ser aproveitados. Uma forma de reduzir o potencial poluidor desses subprodutos e ao mesmo tempo produzir uma substância de valor agregado é converter a lactose, pincipal constituinte desses subprodutos, em etanol, empregando leveduras do gênero *Kluyveromyces spp.* (SANSONETTI et al., 2011; LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; OZMIHCI e KARGI, 2009).

No Brasil,o emprego do soro de ricota e do permeado de soro de queijo para a conversão da lactose em bioetanol não é explorada comercialmente. O bioetanol, a partir destes resíduos, pode apresentar vantagens ambientais, econômicas e competitividade para as indústrias do setor lácteo com a valoração dos resíduos gerados.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo estudar a viabilidade de utilizar o soro de ricota e o permeado de soro de queijo para a produção de bioetanol por meio do emprego de cepas da levedura *Kluyveromyces spp.*

Para atingir esse objetivo foram propostos os seguintes objetivos específicos:

a) Caracterizar quimicamente o soro de ricota e o permeado de soro de queijo empregados no bioprocesso;

b) Realizar *screening* com cinco cepas de leveduras, quatro *Kluyveromycesmarxianus* e uma *Kluyveromyces lactis,* para identificar qual levedura apresenta maior produção de etanol, a partir do soro de ricota e permeado de soro de queijo;

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

c) Avaliar a produção de etanol com soro de ricota e permeado de soro de queijo autoclavado e não autoclavado;

d) Avaliar a influência das variáveis: pH inicial, temperatura e concentração de lactose para soro de ricota e também para permeado de soro de queijo, para produção de etanol pela cepa da levedura selecionada;

e) Avaliar em biorreator, em termos laboratoriais, a conversão da lactose em etanol pela cepa selecionada, com soro de ricota e permeado de soro de queijo;

f) Comparar o custo de implantação de uma estação de tratamento de efluentes (ETE) para resíduos lácteos e de uma usina de bioprodução de etanol a partir de soro de ricota e permeado de soro de queijo.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de leite

Segundo Maganha (2008), o setor lácteo é caracterizado pela diversidade de produtos derivados do leite. Por definição do ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e conforme a Normativa Mercosul do Setor Lácteo, o leite é definido como produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene de vacas leiteiras sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2010).

A produção de leite no Brasil, conforme MILKPOINT (2013), teve um aumento nos últimos anos, passando de 22.860 para 29.480 mil toneladas/ano entre 2003 e 2010, firmando-se em quinto lugar na produção mundial. Entre os maiores produtores da bebida estão a União Europeia, em primeiro lugar, com 134.500 mil toneladas/ano, e em segundo os Estados Unidos da América, seguidos pela Índia e Rússia.

No Brasil, conforme dados apresentados pela EMBRAPA (2013),o estado de Minas Gerais, em 2011, representou 27,3% da produção leite, seguido do Rio Grande do Sul com 11,8% e Paraná com 11,7%. Conforme Diniz (2009), no Brasil aproximadamente 33% do leite industrializado é destinado à fabricação de queijo, gerando como subproduto o soro de queijo, o qual se compõe de 93% de água, 5% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,3% de lipídios, 0,2% de ácido láctico, entre outros minerais e vitaminas.

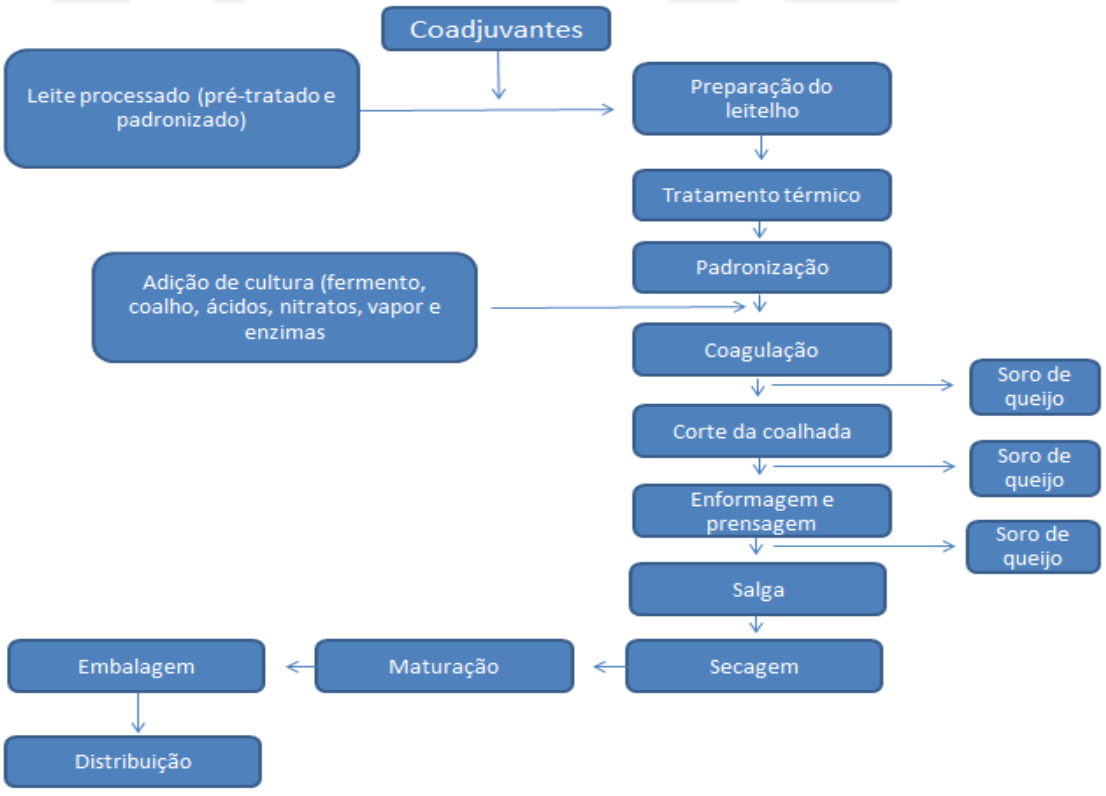
No Rio Grande do Sul, o Vale do Taquari representa 8% da produção total de leite (KIRSCH et al., 2006). Destaca-se na região a elaboração de derivados lácteos,

em que aproximadamente 500 mil litros de leite são processados diariamente, dos quais em torno de 40% são transformados em diversos tipos de queijos.

2.2 Produção de queijo e geração de soro de queijo

Aproximadamente há 4.000 anos, textos bíblicos do antigo testamento fazem referência a este alimento, mencionando os antigos egípcios conhecidos como criadores de gado e produtores de queijos (ALBUQUERQUE e CASTRO, 1995). Por séculos, a produção de queijos foi realizada de forma artesanal, porém a partir do século XX começou a ser produzido em escala industrial. Novas tecnologias foram desenvolvidas, estas levaram a novos métodos de fabricação que começaram a ser utilizados para aumentar a vida útil desse alimento (ORNELLAS, 1988). Na Figura 1 é apresentado o fluxograma do processo da fabricação de queijos e a geração de soro de queijo.

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção de queijo e etapas em que o soro de queijo é gerado.



Fonte: adaptado de Maganha (2008).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

O queijo pode ser definido como produto fresco ou maturado, que é obtido por separação parcial do soro de queijo ou de soros lácteos coagulados pela ação do coalho, enzimas, bactérias específicas, ácidos orgânicos isolados ou combinados, aptos para o uso alimentar (MAGANHA, 2008).

Pesquisa realizada entre os anos de 1992 e 2006 apresentaram um aumento expressivo no mercado de queijos no país. Em 1994 foram comercializadas 206,6 mil toneladas e passou para aproximadamente 550 mil toneladas em 2006 (SEBRAE, 2008). Segundo estudos realizados, entre 2000 e 2007, foi possível evidenciar um crescente aumento na média do consumo de queijo por habitante no Brasil. Foram consumidos 2,6 e 3,1 kg/pessoa/ano em 2000 e 2007, respectivamente (EMBRAPA, 2013). Essa elevada produção de queijos gera um volume de soro de queijo, que deve ser tratado para descarte ou aproveitado como matéria-prima no desenvolvimento de novos produtos.

O soro de queijo ou lactossoro é um fluido opaco amarelo-esverdeado rico em aminoácidos e lactose. O uso de ácidos orgânicos na fabricação do queijo resulta em um soro com pH< 5,0, já o emprego de enzimas proteolíticas produz um resíduo que apresenta pH entre 6 e 7, denominado de soro doce (TEIXEIRA, 2002; BALDASSO et al., 2011). A relevância do soro de queijo provém do volume produzido, do seu potencial poluidor e de sua composição nutricional. Em média, a fabricação de um quilo de queijo necessita de dez litros de leite e fornece nove litros de soro (KOSIKOWSKI, 1979; OZMIHCI e KARGI, 2007). Considerando que o Brasil é o quinto produtor mundial com aproximadamente 450 mil toneladas por ano, tem-se o equivalente a 4,05 bilhões de litros de soro de queijo/ano sendo produzidos no país, desse volume somente 10% é aproveitado industrialmente (KIENDL, 2005; BARBOSA et al., 2010).

Conforme Carvalho (2005), um fato que chama a atenção no Brasil são os dados sobre a disponibilidade do soro de queijo, que são imprecisos. Isso é causado pela grande produção de queijo por pequenas indústrias e a disponibilização desse resíduo como alimento para animais. Outro fato relevante é o desinteresse da indústria em aproveitar esse subproduto como complemento alimentar, causado principalmente pelo alto investimento em tecnologia para a realização dos

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

processos. Aliado a isso, a falta efetiva de fiscalização faz com que muitas empresas eliminem o excedente diretamente nos corpos hídricos (MENEZES, 2009).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

2.3 Bioetanol

O uso de etanol como combustível veicular apresenta vantagens em relação à gasolina, dentre as quais se destacam: a queima do álcool produz menor quantidade de gases poluentes, como monóxido de carbono, dióxido de carbono e óxido de nitrogênio (CHRISTENSEN et al., 2010; KÁDÁR et al., 2011). A gasolina comum, conforme a FISPIQ BR 0051 (2012), apresenta em sua composição: hidrocarbonetos saturados 27-45%, hidrocarbonetos olefínicos 15-28%, hidrocarbonetos aromáticos 26-35%, benzeno <1% e álcool etílico anídrico combustível 13-25%. Já o etanol combustível, conforme a FISPIQ BR 0029 (2011), apresenta em sua composição: etanol 92,6-93,8%, água 6,2-7,4% e gasolina no máximo 30 mL/L.

Em relação ao poder calorífico da gasolina e etanol,Goldemberg e Macedo (1994) apresentam as seguintes especificações: gasolina 32.180 kj/L, etanol 22.350 kj/L, com uma temperatura de ignição de 220º C e 420º C, respectivamente. O poder de combustão da gasolina e do etanol, representado pelo índice deoctanagem, é de 80-92 e 89-96MON(*motor octane number*), respectivamente. A solubilidade em água da gasolina é de 0% e do etanol é de 100%.No Brasil, a porcentagem de álcool anidro adicionado na gasolina é de 20%, conforme lei 10.203/2001, Art. 1º (BRASIL, 2001).

O consumo de combustíveis já é uma preocupação mundial para países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Na atualidade, sua produção ocorre basicamente a partir de matéria-prima fóssil que está diminuindo. Uma solução é substituir combustíveis fósseis por biocombustíveis, com reduzida emissão de CO_2, produzidos normalmente a partir de matérias-primas ricas em açúcares (cana-de-açúcar e beterraba) e culturas ricas em amido (milho ou trigo) (LIN e TANAKA, 2006; CHRISTENSEN et al., 2010; KÁDÁR et al., 2011). Segundo Zafar et al. (2006), o aproveitamento de resíduos industriais como alternativa para a diminuição das reservas de combustíveis fósseis e a crescente preocupação com contaminações

ambientais proporcionam um estímulo ao avanço na produção de etanol a partir de fontes alternativas. Nesse campo, apesar da produção de bioetanol ter melhorado através do uso de novas tecnologias, ainda há etapas que precisam de mais investigações.

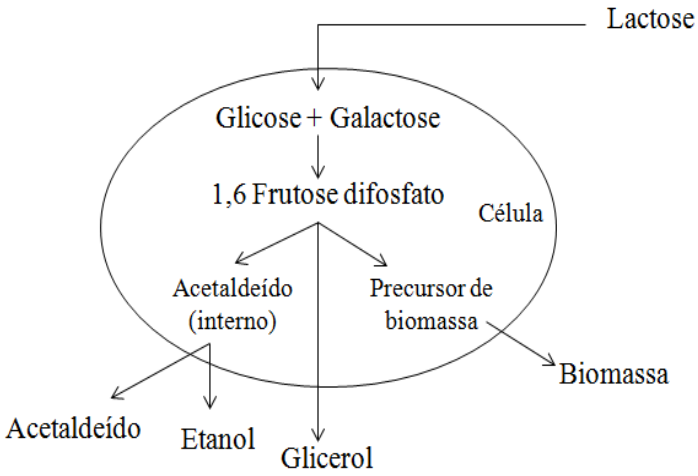
Uma melhor conversão do etanol por meio de fermentações necessita ser alcançada. Esta avaliação incidirá sobre o *status* atual da fermentação de etanol, incluindo recursos de biomassa, microrganismos, tecnologia, observação de exemplos práticos e especialmente perspectivas futuras (LIN e TANAKA, 2006).

O combustível alternativo é à base de vegetais, que contribui com o aumento excessivo do uso do solo (SANSONETTI et al., 2009). Essa alternativa está em desacordo com as políticas de sustentabilidade ambiental. Conforme Cruz (2011), os aspectos positivos na utilização de vegetais como combustíveis fazem surgir preocupações, como a perspectiva de desvio de áreas destinadas à produção de alimentos para a produção de matéria-prima voltada para o biocombustível.

A produção de etanol através da fermentação de resíduos surge como uma alternativa, vislumbrando novos cenários econômicos ambientalmente sustentáveis. O emprego de leveduras do gênero *Kluyveromyces spp.* em fermentações para catalisar produtos de interesse como lactose do soro de queijo, soro de ricota e permeado do soro de queijo em etanol foram pesquisadas por Barile et al. (2009), Guimarães et al. (2010), Kádár et al. (2011), Koushki et al. (2011), Sansonetti et al. (2011) e Silveira et al. (2005). Todos destacam como vantagem dessa levedura a rapidez na multiplicação celular, além disso, Belém e Lee (1998) mencionam a aceitabilidade como microrganismo seguro (GRAS-*Generally Recognized as Safe*). O interesse pelo gênero *Kluyveromyces spp.* tem ganhado destaque por apresentar leveduras como *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*, que hidrolisam a lactose, produzindo etanol, aromas, oligosacarídeos e biomassa. Na Figura 2, representação da degradação da lactose em etanol e biomassa.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Figura 2 - Rota metabólica considerada no modelo de bioconversão anaeróbia de lactose por *K. marxianus.*



Fonte: adaptado de Sansonetti et al. (2011).

Para determinação de etanol em processos fermentativos, o método que emprega cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é normalmente o mais utilizado. Diversos autores, tais como Sansonetti et al. (2010a), Dragone et al. (2009), Kádár et al. (2011) e Oda et al. (2010) empregaram esse método para a determinação de etanol. Já o método de detecção de etanol em analisador bioquímico YSI 2700 Select (Biochemistry Analyser, Yellow, Spring) com membrana enzimática específica para esse analito é seletivo e específico para a determinação de etanol (Souza et al., 2008). O método analítico realizado em densímetro digital Mettler/Paar (DMA45) é o procedimento oficial para determinação de etanol em bebidas alcoólicas, tais como vinhos e aguardentes.

As leveduras do gênero *Kluyveromyces spp.* são classificadas como termotolerantes por se multiplicarem em temperaturas de até 48º C (BANAT et al.,1998). Pesquisas realizadas por Banat et al. (1992) destacam o emprego de leveduras termotolerantes que se multiplicaram a uma temperatura de 52º C produzindo etanol entre 45 e 50 º C.

Contudo, Silveira et al. (2005) descrevem que a tolerância a diferentes concentrações de etanol ainda não está totalmente compreendida. Dessa forma, o processo catalítico de conversão da lactose em etanol pode ser influenciado pela

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

concentração de lactose do meio de fermentação ou o etanol produzido pode alterar o metabolismo do microrganismo. Mesmo assim, a levedura *Kluyveromyces marxianus* vem sendo empregada com sucesso em pesquisas, demonstrando ser potencialmente viável no processo de conversão da lactose em etanol.

Diante da importância no desenvolvimento de combustíveis alternativos, o soro de queijo é utilizado por algumas destilarias da Irlanda e Estados Unidos, mas especialmente da Nova Zelândia, onde um quinto do soro de queijo é convertido em etanol, desse total 10% são adicionados na gasolina (MAWSON 1994).

2.4 Aproveitamento do soro de queijo

O soro de queijo é um dos principais poluentes das indústrias lácteas, que pode causar instabilidade em plantas de tratamento de esgoto ou se infiltrar no lençol freático causando problemas de contaminação no solo, na água subterrânea e superficial, podendo ocasionar problemas à saúde (GHALY et al., 2003). Segundo a *Food and Agricultural Organization* (FAO), o queijo é um dos principais produtos agrícolas em todo o mundo. Independentemente do tipo de queijo produzido, as fábricas geram um efluente de considerável impacto (CARVALHO et al. 2013).

O elevado potencial poluidor está relacionado à demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e à demanda química de oxigênio (DQO), respectivamente, com 27.000 a 60.000 mg/L e 50.000 a 102.000 mg/L (PRAZERES et al., 2012). Conforme Guimarães et al. (2010), o soro de queijo apresenta uma DBO de aproximadamente 30.000 a 50.000 mg/L e uma DQO de 60.000 a 80.000 mg/L, sendo considerado um importante contaminante ambiental.

O potencial poluidor do soro de queijo é destacado por Siso (1996). Segundo esse autor, o processamento de 100 toneladas de leite para a fabricação de queijo gera a mesma quantidade de matéria orgânica que uma cidade de 55.000 habitantes produz diariamente. Estudos realizados por Ozmihci e Kargi (2007) apresentam dados sobre a quantidade total de soro produzida no mundo, que é de aproximadamente 10^8 toneladas/ano.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

O excesso do soro de queijo quando descartado adequadamente é tratado e lançado em cursos hídricos, juntamente com águas residuais dos laticínios ou utilizado na alimentação de suínos. Em virtude da disponibilidade desse subproduto, está a busca por soluções economicamente viáveis, pois o descarte não é uma sugestão atraente devido à necessidade de tratamento, que torna a sua produção dispendiosa, principalmente para empresas de pequeno porte (GRBA et al., 2002). Para Ozmihci e Kargi (2006), o tratamento convencional através de lama ativada é de aproximadamente cinquenta centavos de dólar/kg soro de queijo, o que representa um custo elevado para as indústrias, considerando o volume gerado.

Em razão da grande disponibilidade do soro de queijo e sua oferta gratuita ou baixo preço, muitos produtores utilizam-no na alimentação animal ou na fabricação de doces, pudins, ricota, entre outros alimentos. Sua importância na alimentação se deve à sua composição, que contém, aproximadamente, 6,9% de sólidos totais, 0,6% de sais minerais, 0,3% de gordura, 0,9% de proteínas, 5% de lactose e 0,1% de ácido láctico (FLORENTINO, 2006). Conforme Furtado e Pombo (1988), a composição do soro pode variar de acordo com o leite e os processos tecnológicos empregados na fabricação dos queijos.

Considerando a importância nutricional e a possibilidade de desenvolver diferentes produtos, Behmer (1991) e Dallas (1999) destacam a presença de algumas vitaminas na composição do soro de queijo, como tiamina, riboflavina, vitaminas B6 e B12 e ácido pantotênico, além de alguns aminoácidos essenciais. Para Rosenberg (1995), a importância do soro de queijo se deve à presença de proteínas com características funcionais, como emulsificante, espumante e geleificante, sendo um ingrediente de valor tecnológico, que pode ser empregado na produção de alimentos. Em razão de sua composição química, pode ser utilizado como meio de cultura para cultivo de diferentes microrganismos tendo em vista a produção de distintas biomoléculas.

Como opção ao aproveitamento dos resíduos do setor lácteo, estudos publicados por Kassa et al. (2008) sugerem que o soro de queijo possa ser utilizado como substrato para produção de fungos entomopatogênicos. Distintas pesquisas destacam o aproveitamento do soro de queijo para a produção de metano (ANTONOPOULOU et al., 2008; NAJAFPOUR et al., 2010), polissacarídeos

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

(MESOMO et al., 2009), acido láctico (GHASEMI et al., 2009), enzimas (RECH e AYUB, 2007; PARONDO et al., 2009; BRAGA et al., 2012) e etanol (LEWANDOWSKA e KUJAWSKI, 2007; OZMIHCI e KARGI, 2009). Entre as possibilidades de utilização do soro de queijo está o interesse na produção de carotenóides com soro de queijo mozzarella e soro pré-tratado como meio de fermentação por *Sporidiobolus salmonicolor* (VALDUGA et al., 2009). Vazquez et al. (2008) exploraram a produção de gás hidrogênio através da fermentação de lactose e glicose com um misto de microrganismos anaeróbicos, como alternativa ao combustível fóssil. Em relação ao emprego na indústria de alimentos, vários autores como Lukondeh et al. (2003), Mazutti et al. (2010), Loser et al. (2011), Guo et al. (2008) e Longhi et al. (2004) apresentam resultados significativos sobre o aproveitamento do soro de queijo na produção de etanol, biomassa e produção de alimentos.

Grba et al. (2002) realizaram experimentos com soro de queijo em sistema de batelada, avaliando o rendimento de biomassa e etanol, em cultivo com 50, 100 e 150 g/L de lactose em soro de queijo. Foram utilizadas cinco cepas da levedura *Kluyveromyces marxianus* (VST 144, CC4, ZIM75, ZIM1867 e DS12) em condições aeróbicas a temperaturas de 30, 34 e 37° C. Foi possível evidenciar produção de etanol nas diferentes concentrações e temperaturas, porém a de melhor resposta à produção de etanol foi a concentração de 150 g/L de lactose a uma temperatura de 34º C com a cepa ZIM75 da levedura *Kluyveromyces marxianus*.

Ao empregar a levedura *Kluyveromyces marxianus* para metabolizar soro de queijo bruto em etanol, Zafar e Owais (2006) obtiveram 2,10 g/L de etanol e 8,9 g/L de biomassa após 22 horas de fermentação, a partir de uma concentração de lactose de 35 g/L. Já Kargi e Ozmihci (2006) em experimento realizado com a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-1150 com soro de queijo em pó, avaliaram cinco diferentes níveis de pH, 3, 4, 5, 6 e 7 e três concentrações de lactose 28, 33 e 35 g/L em frascos Erlenmeyer, incubados a 28 ± 2º C com uma agitação de 150 rpm. Em ambos os trabalhos foi possível chegar a uma conclusão positiva em relação à transformação de soro de queijo em etanol.

Entre as pesquisas realizadas para produção de etanol, utilizando sistema de batelada e soro de queijo como meio de cultura, destacam-se Christensen et al.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

(2010), que obtiveram rendimento de 0,50 gramas de etanol/g de lactose a partir de fermentação com a levedura *K. marxianus,* em temperaturas de 30 e 40º C e pH inicial de 4,5 não controlado ao longo da fermentação. Esse valor de rendimento é elevado considerando que a máxima conversão teórica é 0,54 gramas de etanol/g de lactose. Em fermentações de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus* Dragone et al. (2009) obtiveram 35,4% v/v de etanol. Entre outros autores que empregaram soro de queijo para produção de etanol, Koushki et al. (2011), Silveira et al. (2005), Kargi e Ozmihci (2006) e Ozmihci e Kargi (2008) ressaltam a produção de etanol a partir do soro de queijo através de fermentações com a levedura *Kluyveromyces marxianus.* Concluíram que a fermentação de soro de queijo com *K. marxianus*é é uma solução importante para o setor lácteo, diante do tratamento dos resíduos gerados pelo setor.

2.5 Aproveitamento do soro de ricota

A ricota é uma alternativa para o aproveitamento do soro de queijo, obtida a partir da precipitação das proteínas do soro de queijo com o emprego de calor e ácidos orgânicos, esse processo gera o soro de ricota que contém considerável concentração de lactose (SANSONETTI et al., 2011). No Brasil, a produção de ricota aumentou de 4.430 para 9.059 toneladas, conforme indicam estudos realizados entre 1992 e 2005 (SEBRAE, 2006). Conforme Mills (1986), para cada quilo de ricota produzida são empregados entre 15 a 20 litros de soro de queijo que geram entre 14 a 19 litros de soro de ricota. Uma pequena porção desse soro é destinada à dieta suplementar do gado, mas grande parte deixa de ser utilizada pelos laticínios.

O soro de ricota é composto basicamente por proteínas (0,15-0,24%), lactose (4,5-5,0%), sais (1,0-1,3%) e ácidos orgânicos (0,22-0,25%) com uma DQO e DBO de aproximadamente 80.000 e 50.000 g/L, respectivamente (SANSONETTI et al., 2010a; SANSONETTI et al., 2010b; SANSONETTI et al., 2009;SARACENO et al., 2010). Essa composição acaba gerando problemas ambientais, pois quando o soro é incorporado às águas residuais dos laticínios, produz um aumento na quantidade de carga orgânica do efluente, principalmente em razão da concentração de lactose.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

O soro de ricota é o principal subproduto do processo de produção de ricota, representando um potencial risco ao meio ambiente. Uma das alternativas de descarte do soro de ricota é a sua utilização como suplemento dietético para o gado, mesmo assim a baixa composição de proteína é pouco atraente para valorização comercial como fonte nutricional (SANSONETTI et al., 2010a).

Para Ozmihci (2008) e Barbosa et al. (2010), a fermentação da lactose para produção de etanol pode ser viável em razão de que uma considerável quantidade desse açúcar possa ser biotransformado por meio de processos fermentativos, com emprego de leveduras. Praticamente todo bioetanol é obtido a partir de produtos vegetais, porém essa alternativa não é a mais adequada, pois pode causar problemas relacionados à disponibilidade e exploração excessiva de solo, o que contribui para o aumento dos preços dos alimentos. Dessa forma, torna-se necessário identificar fontes renováveis não vegetais para a produção de etanol (SANSONETTI et al., 2009).

O soro de ricota utilizado como meio de cultura, fermentado por *K. Marxianus,* torna-se atraente para ser usado na produção de bioetanol. Em temperatura de 37ºC, com agitação em *shaker* de 150 rpm por 24 horas e uma concentração de lactose de 50 g/L foi possível obter uma concentração de 23 g/L de etanol, representando um rendimento de aproximadamente 97%, podendo o etanol ser detectado após uma hora de fermentação (SANSONETTI et al., 2009). Os mesmos autores ressaltam que o consumo total da lactose presente no soro de ricota e a máxima produção de etanol ocorreram em aproximadamente 13 horas de cultivo.

Ao empregar soro de ricota como meio de cultura, Sansonetti et al. (2010a) realizaram fermentação em duas etapas. A primeira com o objetivo de avaliar o comportamento do sistema para identificar intervalos adequados de análise. A segunda etapa para determinar os efeitos das variáveis sobre o processo de fermentação, para alcançar a otimização das reações e estimar o melhor conjunto de condições na operação do processo de fermentação. Nos ensaios foram consideradas quatro fermentações realizadas em diferentes temperaturas, 34, 37, 40 e 45º C, mais três variações distintas de agitação, 100, 200 e 300 rpm, respectivamente, com pH 5 ajustado no início da fermentação e concentração de lactose de 50 g/L. Cada ensaio foi realizado em duplicata e a média dos valores das

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

concentrações de lactose, etanol e de biomassa foram calculados e monitorados. A melhor resposta foi obtida após 18 horas, com resultado de produção de etanol de 21,29 g/L, representando 84% da lactose consumida a uma agitação de 200 rpm em temperatura de 37º C.

Em planejamento experimental realizado por Sansonetti et al. (2010b) foram avaliadas as variáveis temperatura, pH, agitação e concentração de lactose em cinco diferentes níveis. As temperaturas utilizadas foram 32 e 40º C, com pH 4 e 6 com uma agitação de 100 e 300 rpm e concentração inicial de lactose de 40 e 80 g/L. Nessas condições foi possível observar que o pH interfere diretamente no resultado da fermentação sendo considerado efeito significativo de primeira ordem, enquanto temperatura, agitação e concentração de lactose são considerados efeitos de segunda ordem, não interferindo diretamente na fermentação. Além disso, os resultados dos experimentos indicam que os efeitos de interações entre os parâmetros são negligenciáveis em condições anaeróbicas de fermentação. A fermentação do etanol sob condições anaeróbicas é um típico exemplo no qual o consumo da fonte de carbono não pode ser dividido em dois processos diferentes, crescimento da biomassa e formação de etanol, visto que o etanol é um produto secundário do metabolismo microbiano e está diretamente relacionado com o crescimento da biomassa (SANSONETTI et al., 2011).

Esses dados confirmam que o soro de ricota pode ser considerado uma matéria-prima atraente para a produção de etanol. Nas duas últimas décadas, foram realizados vários estudos sobre a utilização do soro de queijo para produção de etanol e a levedura *Kluyveromyces marxianus* tem se destacado como fundamental bioconversor da lactose para este bioprocesso (DRAGONE et al., 2009). Porém, o soro de ricota ainda não foi estudado tanto quanto o soro de queijo como matéria-prima potencial para a obtenção de etanol.

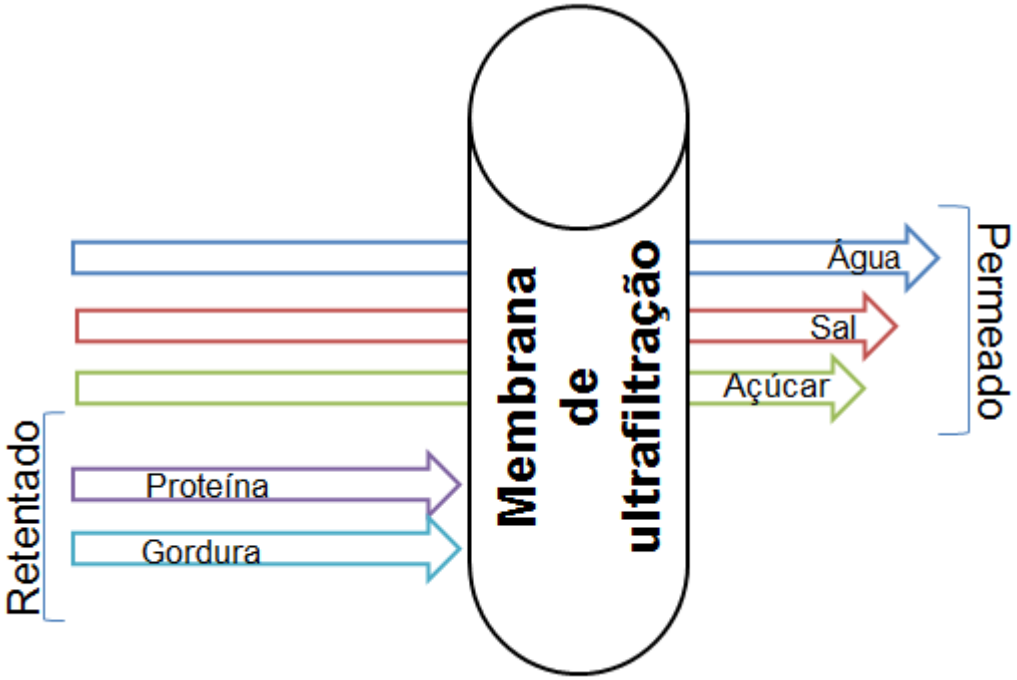
2.6 Aproveitamento do permeado de soro de queijo

O permeado é obtido pelo processo de ultrafiltração (UF), em que produtos de interesse alimentar são retidos formando o retentado, principalmente proteínas e gordura. As partículas com diâmetro menor que 0,1 µm passam pela membrana

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

filtrante, gerando o subproduto permeado de soro de queijo, formado por água, sais e açúcares, conforme Figura 3 (FELLOWS, 2006).

Figura 3 - Fluxograma do processo de ultrafiltração do soro de queijo (água, sal e açúcar compõe o permeado, proteínas e gorduras geram o retentado)



Fonte: o autor.

No processo de ultrafiltração do soro de queijo, as partículas maiores geram o concentrado proteico de soro (*Whey Protein Concentrate*, WPC), que pode ser utilizado na fabricação de alimentos devido às suas características funcionais (BALDASSO et al., 2011). Segundo Silveira et al. (2005), a ultrafiltração do soro de queijo permite a recuperação das proteínas de importância nutricional, mas a lactose do soro de queijo continua no permeado e contribui para a alta DQO e DBO com aproximadamente 80.000 mg/L e 60.000 mg/L, respectivamente (ALMEIDA, 2004; BALDASSO et al., 2009). Segundo Andrade e Martins (2002), o permeado de soro de queijo apresenta uma DQO, em torno de, 50.000 mg/L.

A composição química é apresentada de duas formas; na forma líquida é constituído principalmente por lactose 5%, água 93%, minerais 0,53%, gordura 0,36% e proteína 0,85%. Na forma seca, estes conteúdos são concentrados para os seguintes valores, lactose 65-85%, minerais 8-20%, gorduras 1,5% e proteínas 3-8%

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

(BEUCLER et al., 2005). O permeado na forma seca com altos índices de lactose é empregado na alimentação, porém o excedente pode ser biotransformado através de fermentação por *Kluyveromyces marxianus* produzindo etanol, ampliando as oportunidades de utilização desse produto, além de aumentar o valor econômico (BARILE et al., 2009). A importância no aproveitamento do permeado de soro de queijo aumenta conforme a disponibilidade do produto. Consequentemente diferentes pesquisas com leveduras do gênero *Kluyveromyces spp.* vêm sendo realizadas para compreender a fisiologia, a genética e o seu potencial na produção de alimentos (SCHAFFRATH & BREUNING, 2000; MESOMO et al., 2009).

Empregando duas cepas de leveduras, *Kluyveromyces marxianus e Candida kefyr,* Koushki et al. (2011) avaliaram a produção de etanol com permeado de soro de queijo. No planejamento experimental foram avaliadas duas concentrações de lactose, 4,9% e 9,8%, em temperaturas de 25, 28, 30 e 37° C, e pH de 4,1; 4,8; 5,4 e 5,8. Para esse modelo experimental os resultados mais expressivos ocorreram para os dois microrganismos em pH 4,8 na concentração de lactose de 9,8%. O consumo de lactose de 99,5% e 96,7% apresentou uma produção de etanol de 6,2% v/v e 5,5% v/v, respectivamente para as duas leveduras. Utilizando permeado em diferentes condições para avaliar a eficiência das leveduras, *Candida kefir* e *Kluyveromyces marxianus,* foi possível evidenciar que o uso de microrganismos é uma alternativa ao tratamento do permeado de soro de queijo. A levedura *Kluyveromyces marxianus* foi mais eficiente ao converter lactose em etanol. Em condições adequadas, esse microrganismo produz enzimas que agem como catalisadores convertendo lactose em etanol.

Em pesquisas realizadas por Silveira et al. (2005) empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 com lactose nas concentrações de: 1, 5, 10, 25, 50, 65, 85, 130, 170 e 240 g/L em condição aeróbica com reduzida concentração de oxigênio, foi possível observar que a fermentação ocorre de forma linear até a concentração de lactose de 50 g/L. A partir dessa concentração ocorreu uma oscilação representando inibição da multiplicação celular. A produção de etanol nas três condições foi mais expressiva na ausência de oxigênio, sendo obtido 80,04 g/L de etanol, a uma concentração de 170 g/L de lactose. Em concentração reduzida de oxigênio, a melhor resposta foi 76,0 g/L de etanol para uma concentração de 130 g/L

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

lactose, e na fermentação aeróbica a produção de etanol foi de 57 g/L na concentração de lactose de 240 g/L.

Para Vienne e Stockar (1984), o emprego do permeado como matéria-prima na produçãp de etanol é um estímulo ao setor industrial, causado pela caracteristica da sua composição. Pesquisas realizadas por Ozmihcl e Kargi (2008) concluíram que a composição do permeado de soro, além de outros nutrientes essenciais para fermentações alcoólicas, rendem altas concentrações de etanol por fermentação.

Diante disso, o permeado obtido do soro de queijo pode representar vantagem competitiva sobre os produtos vegetais utilizados como matéria-prima para produção de etanol. Além da disponibilidade desse subproduto para a biotransformação em etanol ser atraente, as empresas podem avaliar segundo sua especificidade a melhor forma de gerenciar os resíduos gerados no processo (GUIMARÃESet al., 2010).

2.7 Importância econômica do aproveitamento do soro de ricota e permeado de soro de queijo

O registro e o controle sistemático de informações contábeis têm contribuído de forma positiva na área de proteção ambiental, através de dados econômicos e financeiros (AZEVEDO et al., 2007). Dessa forma, Tinoco e Kraemer (2008) ressaltam que a importância econômica tem ganhado atenção especial quando se trata de investimentos em proteção ambiental e viabilização de novos projetos, motivados pela constante fiscalização ambiental e necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos. Para Hansen e Mowen (2003), gastos com resíduos ambientais representam despesas para as indústrias, sendo fundamental mensurar essas despesas que podem ser reduzidas ou eliminadaspor meio de uma gestão moderna e eficaz.

Procurar novos modelos de gestão empresarial envolve a adoção de métodos produtivos mais eficientes que integrem questões ambientais e econômicas, como incorporação de resíduos ao processo produtivo. Um exemplo da utilização de resíduos no Brasil é o adotado pelo setor sucroalcooleiro, no qual se destaca o uso

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

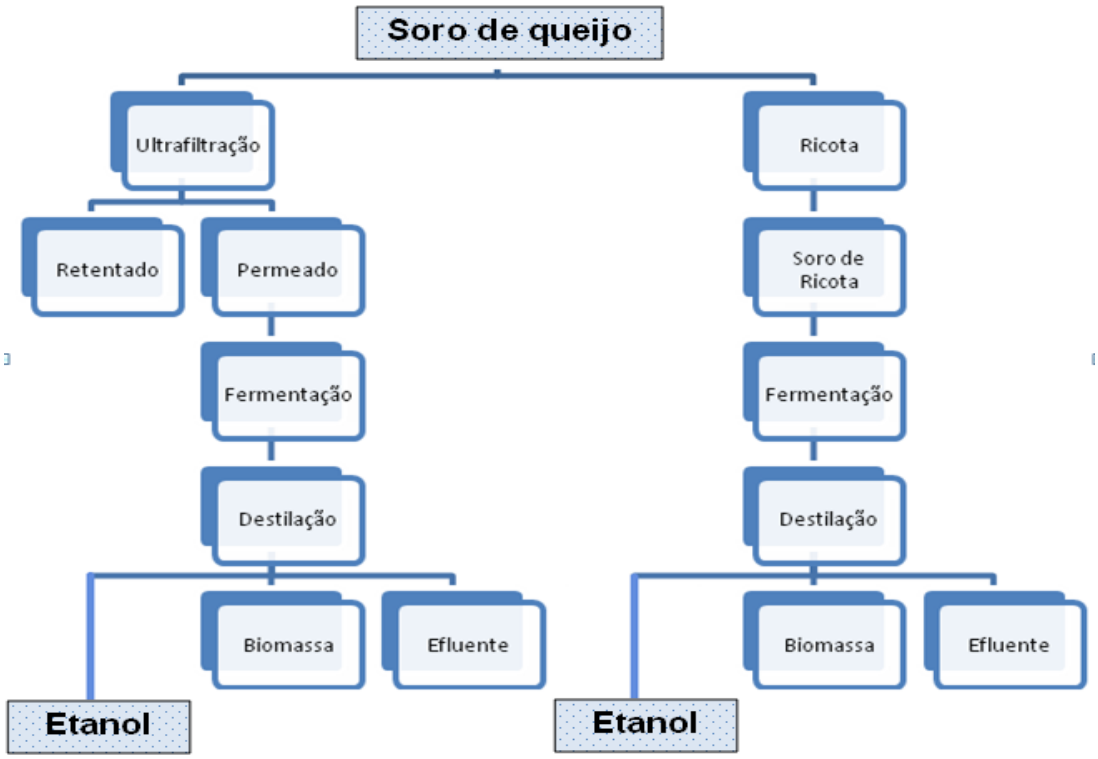
do bagaço da cana-de-açúcar e do vinhoto. Esses resíduos, antes um problema ambiental, pela falta de alternativa para o tratamento e descarte, acabava sendo dispendioso para a indústria, que precisava disponibilizar recursos financeiros para cumprir os requisitos da legislação ambiental. Atualmente esses resíduos são incorporados ao processo produtivo das próprias indústrias, na alimentação de caldeiras que movem usinas e na produção de biogás tornando-se matéria-prima de importância econômica (SEBRAE, 2008).

Diante dos problemas com resíduos, as indústrias inovam desenvolvendo tecnologias para reduzir, através de soluções sustentáveis, a quantidade de resíduos gerada, que significa desperdício de matéria-prima. Novas tecnologias facilitam as adequações ambientais, tornando as empresas mais competitivas e rentáveis (WISSMANN et al., 2012). Segundo Faaij (2006), o aproveitamento dos resíduos nos processos industriais ou na produção de energia pode ser uma opção de curto e médio prazo que pode beneficiar economicamente a indústria e o meio ambiente. Dessa forma, destaca-se uma visão ampla sobre a avaliação de recursos renováveis de modo que não sejam apenas conceitualmente renováveis, mas também sejam importantes economicamente (NOGUEIRA, 2008).

Diante do setor sucroalcooleiro e sua demanda de resíduos, apresenta-se o setor lácteo gerador de grandes volumes de soro de queijo, que mesmo sendo processado industrialmente, origina a ricota e o retentado. O emprego do soro de queijo na produção do retentado pelo processo de ultrafiltração gera o permeado de soro de queijo e na produção da ricota é gerado o soro de ricota (Figura 4). Esses resíduos são ricos em lactos que, se processado pelas indústrias, pode ser transformado em produto (LING 2008). Outra forma de aproveitar a lactose presente nos resíduos da indústria láctea é a fermentação, processo pelo qual é possível transformar a lactose em etanol, fato que vem despertando interesse do setor industrial (PESTA et al., 2007; BARILE et al., 2009; DRAGONE et al., 2009; GRBA et al., 2002; MUNARI et al., 2013). Além do etanol, no processo fermentativo é gerada a biomassa, que pode ser explorada comercialmente em face de suas características físicas e químicas, após o processo de destilação uma quantidade de efluente com carga orgânica inferior ao original é gerada.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Figura 4 -Fluxograma do aproveitamento do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol



Fonte: O autor.

Ao fermentar a lactose presente nos resíduos lácteos, que são um dos principais responsáveis pela contaminação de mananciais causada pela alta DQO, consequentemente diminui o custo das indústrias por ter um resíduo de menor carga orgânica e tem como resultado o etanol (SANSONETTI et al., 2010a). Isso provoca nas indústrias um estímulo ao agregar valor em novos produtos a partir de resíduos que precisam ser tratados para atender a legislação ambiental brasileira, que defineas indústrias como responsáveis pelo tratamento dos seus efluentes, estabelecendo padrões de qualidade dos corpos receptores para cada tipo de efluente gerado. A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente n° 430, de 13 de maio de 2011 (CONAMA, 2011), estabelece os padrões e as condições de lançamentos dos efluentes nos corpos hídricos que complementa a resolução nº 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005).

Para atender à legislação, costumeiramente as indústrias buscam uma alternativa mais prática, que normalmente são sistemas de tratamento de efluentes

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

ETE para diminuir os poluentes industriais antes do descarte. Segundo Serpa et al. (2009), os métodos mais empregados em (ETEs) são sistemas tradicionais com percolador, sistemas tradicionais com biofiltro aeróbico, disposição final dos resíduos no solo e lodo (Tabela 1). Os métodos que empregam filtro anaeróbico, percolador ou biofiltro aeróbico, geralmente utilizam o sistema de gradeamento no início do processo para reter coágulos do leite e gorduras. Em seguida, o resíduo passa por um decantador, que tem a finalidade de retirar os sólidos suspensos e posteriormente ser direcionado às lagoas de fermentação da matéria orgânica para redução de DQO (FERREIRA 2007). Para tratamento através do sistema de lodo ativado, conforme Von Sperling et al. (2005), são indispensáveis tanque de aeração e tanque de sedimentação. Este processo pode ser facilitado pelo método da separação por membrana que é usado em alguns países no tratamento avançado de efluente de grandes ETEs. O tratamento de águas residuais e redução do volume do lodo, com emprego de membrana é seletivo, separando somente o material de interesse comercial, o restante deve ser encaminhado para tratamento adicional pelo método convencional ou lodo ativado (LAUTENSCHLAGER, 2006).

Todos esses processos de tratamento de efluentes demandam investimentos para atingir os padrões estabelecidos pela legislação. Gomes (2006) estimou investimento em tratamento de efluentes para uma empresa de laticínios que trata entre 80.000 a 120.000 litros de resíduos/dia. Nessa estimativa foi considerada a construção e a implantação de quatro sistemas de tratamento mais utilizados em laticínios, os quais são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Estimativa dos valores para instalação de diferentes sistemas de tratamento de efluentes de laticínio que processam entre 80.000 e 120.000 litros/dia

Sistema Tratamento	Valor
Filtro Anaeróbico com Filtro Biológico e Percolador	R$ 1.197.134,78
Filtro Anaeróbico com Biofiltro Aeróbico Submerso	R$ 766.928,84
Filtro Anaeróbico com Disposição Final dos Resíduos no Solo	R$ 690.315,04
Lodo Ativado	R$ 665.116,60

Fonte: adaptado pelo autor de Gomes 2006. Valores atualizados segundo Fundação Economia Estatística (FEE) 2014.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

O mesmo autor estimou o custo da operação do sistema mais caro após implantação (filtro anaeróbico com filtro biológico e percolador) e o sistema mais barato (lodo ativado) (Tabela 2). O valor para o tratamento dos resíduos para o primeiro sistema contempla custos com mão de obra e disposição final do resíduo, para o segundo sistema estima o custo com tratamento envolvendo energia, disposição final do resíduo, mão de obra e manutenção de equipamentos. Os valores foram estimados para um período de operação dos sistemas de 01 ano considerado curto prazo e 10 anos longo prazo, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Estimativa do custo para operação dos diferentes sistemas

Sistema Tratamento	Itens contemplados	Estimativa para 1 ano	Estimativa para 10 anos
Filtro Anaeróbico com Filtro Biológico e Percolador	Mão de obra, disposição final resíduo	R$ 31.743,62	R$ 317.436,20
Lodo Ativado	Energia, disposição final resíduo, mão de obra, manutenção equipamento	R$ 114.334,66	R$ 1.143.346,60

Fonte: adaptado pelo autor de Gomes 2006. Valores atualizados, (FEE) 2014.

O valor necessário para a operação do sistema de lodo ativado é considerado alto em relação ao sistema que emprega filtro biológico e percolador, porém ao comparar ao valor do investimento mais as despesas com tratamento nos diferentes sistemas, ao longo de 10 anos, os valores se equivalem, sendo de R$ 1.514.570,98 para filtro biológico e percolador e R$ 1.811.462.32 para lodo ativado.

O alto custo estimado para implantação de uma ETE e o custo elevado da manutenção desperta nas indústrias o interesse em sistemas. A necessidade em sistemas mais atraentes para as indústrias e a expectativa em produzir etanol com o resíduo dos laticínios, fez com que Araújo (2001) estimasse o custo da implantação de uma usina para produção de 34.000 litros etanol/dia (Tabela 3). A capacidade fermentativa estimada para a usina foi de aproximadamente 100.000 litros de resíduos lácteos/dia. Os valores estimados pelo autor são para o ano de 2001 e na Tabela 3 foram atualizados para o ano de 2014.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Tabela 3 - Estimativa de valor para instalação de usina para produção de 34.000 litros/dia de etanol

Descrição de Materiais	Custo estimado em R$
Três dornas de aço, seis bombas centrífugas, um filtro, quatro decantadores, uma coluna de absorção, uma coluna de destilação, um trocador de calor, um compressor, uma peneira estática e três hidrociclones	R$ 616.180,47
Instalação de equipamentos, instrumentação e controles, tubulação, redes elétricas, edificações e instalações úteis para funcionamento	R$ 1.416.648,7
Despesas com engenharia, supervisão e construção	R$ 445.847,94
Despesas de contingência e com empreiteiros	R$ 373.302,75
Total	**R$ 2.851.979,16**

Fonte: adaptado de Araújo (2001). Valores atualizados, (FEE) 2014.

Após estimar o investimento, Araújo (2001) vislumbrou três situações de retorno, considerando que o investimento foi realizado sem financiamento, com uma estimativa de retorno apresentados em três cenários, considerando o lucro bruto (Tabela 4): no primeiro cenário pessimista (condições definidas como extremamente desfavoráveis para a empresa); o segundo cenário (uma situação intermediária, considerando não existirem interferências externas ao mercado) e o terceiro cenário, (o mais favorável, sendo considerado ideal). Os valores do lucro bruto foram mantidos conforme os calculados por Araújo (2001).

Tabela 4 - Diferentes cenários de retorno econômico para produção 34.000 L/dia etanol.

Cenários	Ganho Bruto/L R$	Lucro Bruto/dia R$	Lucro Bruto/mês R$	Lucro Bruto 120 meses R$
1	0,10/L	3.400,00	102.000,00	12.240.000,00
2	0,20/L	6.800,00	204.000,00	24.480.000,00
3	0,30L	10.200,00	306.000,00	36.720.000,00

Fonte: Adaptado pelo autor de Araújo (2001).

Para Araújo (2001), o investimento em uma empresa para produção de etanol a partir de resíduos lácteos é viável economicamente ao longo de 10 anos, mesmo

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

em um cenário pessimista. A viabilidade do projeto é atraente na medida em que a demanda por combustíveis se torna cada vez mais intensa.

Historicamente usinas para produção de etanol a partir de resíduos lácteos começaram a operar em abril de 1978, na Irlanda (LING, 2008). Depois disso, o processo foi adotado em outras plantas industriais na Nova Zelândia e nos Estados Unidos. Na Nova Zelândia a empresa Anchor Ethanol Ltda opera três usinas de etanol com uma produção anual total de cerca de 5 milhões de litros (KISIELEWSKA, 2012). A produção de etanol, a partir da lactose presente em resíduos lácteos, é interessante para empresas do setor lácteo que produzem mais de 100.000 litros de resíduos lácteos por dia. O custo do investimento é elevado e deve ser estruturado para uma operação de longo prazo, para ser economicamente viável para a indústria.

2.8 Metodologia do planejamento experimental

O planejamento experimental ou delineamento experimental, como também é denominado, é formado por um conjunto de ensaios criteriosamente estabelecido cientificamente através de modelo estatístico, com o objetivo de determinar a influência de diferentes variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo. Esse objetivo maior pode ser dividido em outros objetivos conforme o propósito dos ensaios: determinar quais variáveis são mais influentes nos resultados; atribuir valores às variáveis para otimizar os resultados; minimizar a variabilidade dos resultados e a influência de variáveis incontroláveis (MONTGOMERY e RUNGER, 1994).

Já para Rodrigues e Iemma (2009), o planejamento experimental representa uma otimização de custos, processos e tempo, maximizando rendimentos. Os mesmos autores ainda destacam que o planejamento consciente dos experimentos deve ser realizado para determinar e quantificar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas,sendo indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos. Além disso, as repetições podem ser reduzidas, pois a qualidade dos resultados obtidos é mais significativa.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Segundo Santos et al. (2008), para execução do planejamento experimental é preciso determinar quais os fatores e respostas de interesse estão sendo procurados para o sistema que está sendo analisado. É necessário definir quais objetivos pretende-se alcançar com os experimentos, pois isso definirá como o planejamento deverá ser utilizado. Na implementação do planejamento, cada fator é estudado em níveis máximo e mínimo, para a obtenção de uma superfície de resposta satisfatória.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

No presente trabalho foram avaliadas cincodiferentes cepas de leveduras do gênero *Kluyveromyces spp*., quanto ao potencial na conversão de lactose do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol. As cepas utilizadas na pesquisa foram *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537, ATCC 16045, ATCC 12424 e CBS 6556) e *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176). As leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* foram escolhidaspor apresentarem potencial conversão de lactose em etanol, segundo pesquisas realizadas porOdaet al. (2010); Grba et al. (2002); Silveiraet al.(2005); Ozmihci e Kargi (2006); Guo et al. (2008); Koushki et al. (2011); Fonseca et al. (2008).

Para a fermentação dos microrganismos foram utilizados dois subprodutos derivados do setor lácteo, soro de ricota e permeado de soro de queijo. O soro de ricota foi doado por uma empresa do Vale do Taquari. As coletas foram realizadas em bariletes de 10 litros e levadas ao laboratório, foram homogeneizadas e fracionadas em embalagens plásticas de 2 litros e congeladas. O permeado de soro de queijo foi adquirido da empresa Arla Foods e reconstituído no laboratório com água deionizada para uma concentração de lactose de aproximadamente 50 g/L.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise das matérias-primas soro de ricota e permeado de soro de queijo

Para caracterização físico-química do soro de ricota e permeado de soro de queijo foram realizadas as análises de proteína bruta total, gordura, lactose, cinzas, umidade, pH,acidez titulável,demanda química de oxigênio (DQO),carbono total e nitrogênio total.

3.2.1.1 Análise de proteína bruta total

A análise de proteína bruta total do soro de ricota e do permeado de soro de queijo foi realizada conforme metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL, 2008).Esse método utiliza ácido sulfúrico para oxidar a amostra, o calor na presença de catalisadores rompe as ligações peptídicas, liberando o nitrogênio na forma de amônio. Na sequência é adicionado hidróxido de sódio para liberar amônia pelo processo de destilação, que é coletado no ácido bórico. O produto da destilação é titulado com ácido clorídrico. Para realização dessa análise são necessários os seguintes reagentes e equipamentos:

- Ácido sulfúrico P.A.
- Mistura catalítica na proporção de 10/1, (10 gramas de sulfato de potássio e 1 grama de sulfato de cobre, misturar em liquidificador).
- Indicador misto.
- Fenolftaleína.
- Ácido bórico 4%, (40g de ácido em 1000 mL de água.
- Ácido clorídrico 0,1 M.
- Hidróxido de sódio 50%.
- Bloco digestor.
- Destilador de nitrogênio.

Outros materiais necessários para a análise:papel filtro, algodão, proveta 50 mL, pipeta volumétrica de 20 mL e bureta de 25 mL.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Para amostras líquidas foi usado um pedaço pequeno de algodão na etapa de pesagem. O algodão foi colocado sobre o papel filtro e dispensado 1 grama de amostra com pipeta. Quando atingiu o peso desejado, o papel foi dobrado e colocado no fundo do tubo de vidro do digestor. Foram adicionadas duas espátulas da mistura catalítica. Para preparar obranco foi usado papel, algodão e mistura catalítica.

Em capela, foi adicionado 15 mL de ácido sulfúrico P.A. em cada amostra, como auxílio de uma proveta vertendo lentamente no tubo inclinado. A abertura do tubo foi fechada com papel alumínio, foi feito um pequeno furo no meio para saída do vapor. As amostras devem ser colocadas no bloco digestor a 400° C, até que fiquem sem cor, esse processo demora no mínimo 3horas. Em seguida, as amostras podem ser colocadas em outra capela se disponível, foi aguardado o tubo atingir a temperatura ambiente para então adicionar 50 mL de água deionizada. Em seguida, foi conduzido o processo para iniciar destilação da amostra.

Para coletar o produto da destilação da amostra foram preparados Erlenmeyer com 20 mL de ácido bórico, 80 mL de água deionizada e 8 gotas de indicador misto (vermelho). O NaOH foi adicionado lentamente até que o líquido da amostra do tubo de digestão ficou com uma coloração escura. Foi ligado o aquecimento e aguardada a destilação da amostra, até que o volume do líquido do Erlenmeyer atingisse aproximadamente 200 mL. O aquecimento foi desligado, o Erlenmeyer retirado do compartimento para não dar refluxo, esperando gotejar o restante.

Para titulação da amostra foi utilizado HCl 0,1 M e bureta de 25 mL. O HCl foi adicionado lentamente no Erlenmeyer até que o conteúdo apresente coloração avermelhada. Foi anotado o volume gasto de HCl e aplicado na equação para cálculo de proteína bruta.

Cálculo Proteína Bruta % = (Va-Vb) x M x 6,38 x 0,014 x 100/ P
Onde:
Va= Volume de HCl 0,1 M gasto na titulação
Vb= Volume de HCl 0,1 M gasto na prova em branco
M= Molaridade do HCl
6,38= Fator de transformação do nitrogênio em proteína para produtos lácteos.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

0,014= Miliequivalente grama do nitrogênio
P= Peso da amostra em gramas

3.2.1.2 Análise de gordura

A análise de gordura do soro de ricota e permeado de soro de queijo foi relizada conforme metodologia do IAL (2008). Nesse método, as proteínas que estão fundidas com a gordura são dissolvidas pelo ácido. A densidade da fase aquosa aumenta, devido à diminuição da viscosidade do meio, fundindo a gordura pela liberação de calor, esse processo favorece à separação da gordura.

Para realização da análise de gordura em soro de ricota e permeado de soro de queijo foram necessárias a preparação de dois reagentes, ácido sulfúrico a uma densidade entre 1,820 a 1,825 e álcool isoamílico ($C_5H_{12}O$) p.a. com densidade de 0,81 a 20°C. Outros materiais indispensáveis para a análises são pipetador automático de 1 a 10 mL, butirômetros e rolhas.

Em capela de fluxo, foi adicionado 10 mL do ácido sulfúrico no butirômetro com pipeta automática, em seguida foi pipetado1 mL do álcool isoamílico lentamente no mesmo butirômetro. Na sequência foram adicionados 11 mL da amostra lentamente, cuidando para não misturar aos reagentes, o butirômetro foi fechado com rolha. Após bem vedado, a tampa foi pressionada com o dedo polegar e vertendo lentamente até misturar a amostra e os reagentes e até obter coloração escura.

Os butirômetros foram centrifugados em centrífuga de Gerber por 5 minutos com a rolha para baixo, depois de realizada a centrifugação os tubos foram transferidos para banho-maria (aprox. 65°C) por 5 minutos com a rolha para baixo. Os dois últimos passos foram repetidos até ser obtida leiturada quantidade de gordura que foi realizada a partir da base do menisco inferior na coluna do butirômetro. A parte escura fica embaixo e a clara em cima, cada linha do butirômetro vale 0,1% o valor máximo a ser lido é 8%.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

3.2.1.3 Análise de lactose

A determinação de lactose no soro de ricota e no permeado de soro de queijo foi realizada por espectrofotometria seguindo o método de determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959).O princípio da determinação ocorre através de uma molécula chamada Ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS) que, quando puro, apresenta uma coloração alaranjada, este ácido é facilmente reduzido por açúcares. Quando reduzido, o DNS se torna ácido 3-amino – 5 – nitro salicílico, e passa a apresentar-se com uma coloração acastanhada.

Para realização da análise foi pipetado 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) previamente preparado em um tubo ependorff de 2 mL, em seguida foi pipetado 1 mL de amostra no mesmo tubo e levado ao banho-maria a 100º C por 10 minutos. Ao atingir o tempo, as amostras foram retiradas do banho-maria e acondicionadas até alcançarem temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada leitura em espectrofotômetro com absorbância de 570 nm. Para a realização da análise foi necessário preparar uma curva padrão com cinco diluições conforme Tabela 5.

Tabela 5 – Ordem dos tubos e suas devidas concentrações para preparação da curva padrão

Número dos tubos	Volume de solução de lactose 5 mg/mL (µL)	Volume de água deionizada(µL)	Concentração final (mg/mL)
0-Branco	0	1000	0
1	200	800	1
2	400	600	2
3	600	400	3
4	800	200	4
5	1000	0	5

O cálculo da concentração de lactose da amostra é calculado a partir da equação da curva padrão:

Equação da reta: y = ax+ b

a e b= valores fornecidos pelo equação da reta

y= absorbância da amostra

x= valor da concentração de lactose

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

3.2.1.4 Análise de cinza

A análise de cinzas em soro de ricota e permeado de soro de queijo foi relizada conforme metodologia do IAL (2008). Esse método tem como princípio a manutenção dos resíduos inorgânicos remanescentes após a completa destruição da matriz orgânica do alimento. Para determinação de cinzas, foi preciso cerca de 48 horas de análises, sendo indispensável cadinho, mufla e dessecador. Os cadinhos foram aquecidos até 550º C para eliminar riscos de contaminação, em seguida a temperatura foi reduzida para 300º C. Os cadinhos foram acondicionados em dessecador até atingir temperatura ambiente, para posteriormente serem pesados em balança. Na sequência, foram pesadas em triplicata 5 g de amostra em cada cadinho e aquecidas até 550º C, quando o material atingiu característica branca acinzentada a temperatura foi reduzida para 300º C. Após os cadinhos, foram colocados em dessecador até atingir temperatura ambiente, para o material ser novamente pesado. O cálculo é realizado através do peso da massa do cadinho com amostra menos massa do cadinho sem amostra.

3.2.1.5 Análise de umidade

A análise de umidade do soro de ricota e permeado de soro de queijo foi determinada pela metodologia do IAL (2008). Este método é o mais utilizado em alimentos e está baseado na remoção da água por aquecimento, em que o ar quente é absorvido por uma camada muito fina do alimento e é então conduzido para o interior por condução. Como a condutividade térmica dos alimentos é geralmente baixa, costuma levar entre 6e 18 h a 100 – 102° C, até peso constante. Foram necessárias cápsulas de porcelana, dessecador, esferas de vidro e estufa, inicialmente as cápsulas foram aquecidas em estufa a 105°C por 1 h, posteriormente foram acondicionadas em dessecador até atingir temperatura ambiente. Na sequência, as esferas foram colocadas nas cápsulas, para pesar o conjunto, tarar a balança e pesar em triplicata 5 g da amostra. Em seguida as amostras foram acondicionadas em estufa por 5 h a uma temperatura de 105º C, posteriormente foram retiradas e acondicionadas em dessecador até atingir temperatura ambiente para pesar.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

O cálculo para determinação de umidade é a massa da cápsula com amostra e pérolas menos massa da cápsula com pérolas, que corresponde à perda de peso sofrida pela amostra quando aquecida a 105º C.

Cálculo:

X = (Amostra úmida + cápsula + pérolas) – (Amostra seca + cápsula + pérolas)

Peso inicial Peso final após 5h na estufa

X/massa de amostra pesada (g) x 100= % de umidade

3.2.1.6 Determinação de pH

A análise de pH do soro de ricota e do permeado de soro de queijo foi realizada em uma alíquota de aproximadamente 30 mL da amostra. O pH metro foi previamente calibrado com solução pH 7 e pH 4, em seguida o eletrodo foi mergulhado na amostra para leitura. O equipamento utilizado foi um pH metro digital DM-20 da Digimed.

3.2.1.7 Análise de acidez titulável

A análise da acidez titulável em soro de ricota e permeado de soro de queijo foi relizada conforme metodologia do IAL (2008). Esse método consiste na titulação de determinada massa da amostra reconstituída, por uma solução alcalina de concentração conhecida, utilizando como indicador a fenolftaleína. Na análise de acidez é utilizada pipeta volumétrica de 20 mL, Erlenmeyer de 250 mL (três por amostra), fenolftaleína 0,1%, bureta de 25 mL e solução de NaOH 0,1 M.

Em cada Erlenmeyer da triplicata pipetar 20 mL de amostra e dispensar 3 gotas de fenolftaleína 0,1%. Adicionar o NaOH 0,1 M na bureta e titular no Erlenmeyer até atingir a tonalidade rosa por pelo menos 30 segundos. Anotar a quantidade de NaOH gasta para cada amostra da triplicata e fazer a média.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Cálculo:

$$\% \text{ de ácido lático} = \frac{V \times f \times 0,9}{m}$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

0,9 = fator de conversão para ácido láctico;

m = massa da amostra, em gramas.

3.2.1.8 Análise de demanda química de oxigênio (DQO)

Para analisar DQO, foi utilizada metodologia StandardMethods(2005). A análise de DQO corresponde à oxidação química da matéria orgânica, obtida através de um oxidante forte, como por exemplo, dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em meio ácido que elevaa temperatura. Durante a determinação de DQO, a matéria orgânica é convertida a CO_2 e H_2O. Alguns compostos orgânicos não são oxidados pelo dicromato, a menos que se utilize um catalisador, neste caso, o sulfato de prata (Ag_2SO_4).

Para análise de DQO são necessários sulfato de mercúrio e ácido sulfúrico, além dos seguintes materiais e equipamentos;

- Erlenmeyer de fundo chato e boca esmerilhada (em duplicata para cada amostra).
- Condensadores.
- Chapa aquecedora dupla.
- Mangueiras de silicone para conectar os condensadores.
- Vita veda rosca.
- Garras suporte para condensadores.
- Indicador de ferroína.
- Pipetador de 1 mL.
- Pipetador de 10 mL.
- Pisseta.
- Espátula.
- Cadinho

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

- Ponterias de 1 e 10 mL.
- Becker 100 mL.
- Balão volumétrico de 200 e 500 mL.
- Buretas de 50 mL.
- Provetas 50 mL.
- Provetas 250 mL.
- KOH 6%.
- Erlenmeyer de 250 mL para padrão.

Para realização das análises, as amostras de soro de ricota e permeado de soro de queijo foram diluídas na proporção de 1:200. Nos Erlenmeyer de fundo chato foi pesado 0,4 g de sulfato de mercúrio, pipetado 20 mL de amostra diluída (no branco adicionar água) e adicionado 10 mL de dicromato de potássio 0,25 N. Em capela foi adicionado 30 mL de ácido sulfúrico/sulfato de prata lentamente pelas laterais. Em seguida, foi colocado no refluxo, encaixando os Erlenmeyer no condensador de modo que fiquem bem ajustados sobre a chapa. Após todos os frascos estarem encaixados no condensador, a água foi liberada para passar pelo condensador e a chapa de aquecimento foi acionada com a temperatura regulada para de 150°C.

Foi necessário deixar no aquecimento por 2 horas, a partir do momento em que o líquido começa a borbulhar ou escorrer pelas paredes dos Erlenmeyer. Após 2 horas no refluxo, a chapa foi desligada para esfriar (fechar a água). Após atingir temperatura ambiente, foram adicionadas 140 mL de água deionizada em cada Erlenmeyer e, dispensadas 5 gotas de indicador ferroína em cada Erlenmeyer. Para preparo do padrão foi adicionado em uma proveta de 100 mL, 25mL de dicromato de potássio 0,25N e 75mL de água deionizada. Essa composição foi vertida para um Erlenmeyer de 250 mL e adicionado lentamente 30 mL de ácido sulfúrico P.A., não dispensar no padrão as 5 gotas de indicador ferroína.

Em seguida, a vidraria com a amostra ficou em repouso até atingir temperatura ambiente, para posteriormente ser titulada com sulfato ferroso amoniacal $Fe(SO_4)(NH_4)$ até mudar a cor para um marrom avermelhado. Os cálculos são realizados conforme fórmula a seguir.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Molaridade de sulfato ferroso amoniacal (M): Titulação do padrão

$$\frac{\text{Volume (ml) de dicromato de potássio 9sempre 25 ml x 0,2500}}{\text{Volume (mL) de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do padrão}}$$

Determinação da DQO

$$\frac{\text{DQO (mg/L)} = \text{(A-B) x M x 8000 x D}}{\text{Volume de amostra (m/L)}}$$

Onde:
A= volume da solução de sulfato ferroso amoniacal gasto para titulação do BRANCO (mL)
B= volume da solução sulfato ferroso amoniacal gasto para titulação da AMOSTRA (mL)
M= Molaridade da solução de sulfato ferroso amoniacal
D= fator de diluição – (soro de ricota 200) (soro de queijo 500)
8000= equivalente a gramas de oxigênio (valor padrão calculado)

3.2.1.9 Análise de carbono total e nitrogênio total

Para analisar carbono e nitrogênio, as amostras de soro de ricota e permeado de soro de queijo foram diluídas 30 vezes com água deionizada (1 mL de amostra em 29 mL de água). As amostras diluídas foram injetadas a cada 30 minutos, em equipamento Total Organic Carbon Analyzer (TOC –V CPH/ TNM-1) (Shimadzu), o método de detecção foi combustão por infravermelho.

3.2.2 Preparação da amostra e análise do permeado de soro de queijo

O permeado de soro de queijo foi reconstituído no laboratório a partir do produto em pó fornecido pela empresa Arla Foods. Foram pesados 57,32 g de permeado e diluído em 1 litro de água deionizada, dessa forma o permeado diluído apresentou uma concentração de lactose similar ao soro de ricota, de aproximadamente 47 g/L de lactose. Para caracterização físico-química do permeado de soro de queijo foram realizadas as análises de proteína bruta total,

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

gordura, lactose, cinzas, umidade, pH,acidez titulável, demanda química de oxigênio (DQO),carbono total e nitrogênio total, como descrito no ítem 3.2.1.

3.2.3 Seleção das leveduras para produção de bioetanol

Para seleção das leveduras foram avaliadas diferentes cepas do gênero de leveduras *Kluyveromyces spp*. quanto ao potencial na conversão de lactose do soro de ricota e do permeado de soro de queijo em bioetanol. As cepas utilizadas foram *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537, ATCC 16045, ATCC 12424 e CBS 6556), *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176).

3.2.3.1 Preparação do inóculo

Para a preparação do inóculo foi utilizado o Caldo Sabouraud Maltose (Himedia, India), 50 g diluído em 1000 mL de água deionizada, o pH foi ajustado entre 4,5 e 5. Em seguida foramtransferidos 200 mL para cada Erlenmeyer de 250 mL e autoclavados a 121º C por 15 minutos. Ao atingir temperatura ambiente foi armazenado em geladeira. A preparação do inóculo foi realizada em capela de fluxo laminar, previamente higienizada com álcool 70% e exposta a luz ultravioleta.

Para a inoculação foi retirada uma colônia da levedura com alça de platina das placas de Petry previamente preparadas com ÁgarSabouraud. A colônia foi transferida para Erlenmmeyer contendo 200 mL de Caldo Sabouraud e mantidas em incubadora com agitação orbital (*shaker*) (Marconi, MA830) a 30º C por aproximadamente 12 horas (*over night*).

3.2.3.2 Padronização do inóculo e inoculação

A padronização do número de células do inóculo foi realizada por meio da densidade ótica (DO) no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro (Tecnal, SP 2000 UV) DO_{600}=1,0.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL do meio de fermentação foram inoculados com 10% (v/v) do inóculo com DO_{600}=1,0.

3.2.3.3 Seleção das leveduras com soro de ricota

O cultivo das cinco cepas da levedura *Kluveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de soro de ricota. Para cada levedura testou-se o soro de ricota esterilizado a 121ºC por 15 minutos (denominado de soro autoclavado) e não esterilizado (denominado de soro não autoclavado). O pH inicial do meio de fermentação foi ajustado em uma faixa entre 4,5 e 4,8. Depois de inoculados, os frascos foram mantidos em incubadora com agitação orbital de 150 rpm a 34º C por 52 horas. Periodicamente foram coletadas amostras do cultivo fermentado, sendo que cada Erlenmeyer correspondia a uma amostra. Alíquotas de 10 mL foram centrifugadas a 3500 rpm, por 15 minutos a 4º C. O sobrenadante, livre de células, foi usado para a determinação de lactose, etanol, pH, carbono total e nitrogênio total. As células do cultivo foram utilizadas para realização da análise de biomassa.

3.2.3.4 Seleção das leveduras com permeado de soro de queijo

O cultivo das cinco cepas das leveduras *Kluveromyces marxianus* e*Kluyveromyces lactis* foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de permeado de soro de queijo. Para cada levedura testou-se o permeado de soro de queijo esterilizado a 121º C por 15 minutos (denominado de permeado de soro de queijo autoclavado) e não esterilizado (denominado de permeado de soro de queijo não autoclavado). O pH inicial do meio de fermentação foi ajustado entre 4,5 e 4,8. Depois de inoculados, os frascos foram mantidos em incubadora com agitação orbital de 150 rpm a 34º C por 52 horas. Periodicamente foram coletadas amostras do cultivo fermentado, sendo que cada Erlenmeyer correspondia a uma amostra. Alíquotas de 10 mL foram centrifugadas a 3500 rpm, por 15 minutos a 4º C. O sobrenadante, livre de células, empregado para realização das análises de lactose, etanol, pH. As células do cultivo foram utilizadas para a realização da análise de biomassa.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

3.2.3.5 Análises realizadas ao longo do cultivo

Durante a seleção das leveduras com soro de ricota e permeado de soro de queijo, foram realizadas as análises de lactose, etanol, pH e biomassa descritas a seguir.

3.2.3.5.1 Análise lactose

A determinação de lactose foi realizada por espectrofotometria seguindo o método de determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959), conforme descrito no item 3.2.1.3.

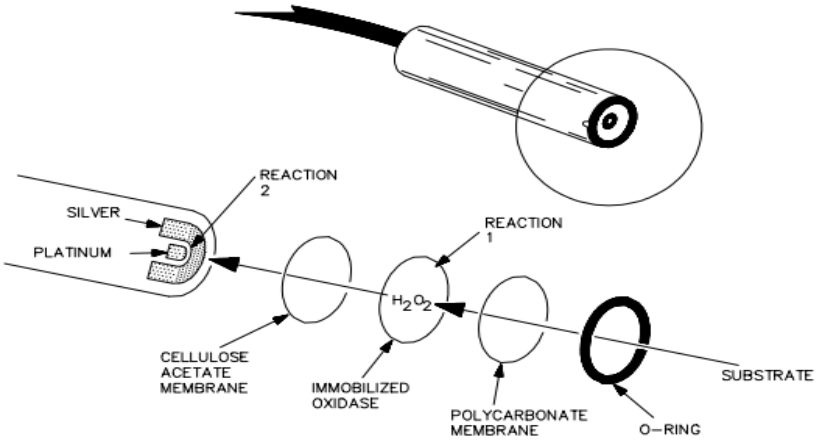
3.2.3.5.2 Análise de etanol em analisador bioquímico

As análises de etanol foram realizadas em analisador bioquímico YSI modelo 2700, que emprega como detector de etanol a membrana modelo YSI 2786.As análises foram realizadas no laboratório da empresa Quatro G P&D Ltda do Parque Científico e Tecnológico da Pontíficia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Nessa análise, 25 µL de amostra foi aspirada pelo coletor, posteriormente a amostra passa pela membrana para detecção do etanol em g/L. Para essa análise não é necessária preparação prévia das amostras, com leituras até 2 g/L de etanol, acima desse valor as amostras devem ser diluídas para diminuir o limite de detecção e aumentar a precisão do equipamento. A Figura 5 mostra o sensor do equipamento onde é acoplada a membrana para detecção de etanol.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Figura 5 - Estrutura da membrana para detecção etanol pelo analisador bioquímico



Fonte: Adaptado manual equipamento, 2000.

3.2.3.5.3 Determinação de pH

A análise de pH foi realizada em uma alíquota de aproximadamente 30 mL da amostra. O pH metro foi previamente calibrado com solução pH 7 e pH 4, em seguida o eletrodo foi mergulhado na amostra para leitura. O equipamento utilizado foi um pH metro digital DM-20 da Digimed.

3.2.3.5.4 Determinação da biomassa

Para determinação da biomassa total foi utilizada a técnica do peso seco. Tubos falcon previamente identificados foram acondicionados em estufa a 60º C por 48 horas, quando retirados da estufa foram resfriados em dessecador até atingir temperatura ambiente e após pesados em balança analítica.

Alíquotas de 10 mL de amostras dos cultivos em triplicata foram centrifugadas em centrifuga marca Hitachi CR21GIII a 3500 rpm por 15 min a 4º C. As células foram lavadas com água destilada gelada e centrifugadas. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Os tubos foram colocados em estufa a vácuo a 60ºC até atingirem peso constante. Após foram pesados em balança analítica e o cálculo foi

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

realizado subtraindo o peso do tubo com as células secas menos o peso do tubo vazio.

3.2.4 Planejamento experimental para condições de cultivo e produção de etanol em *shaker*

Para o presente trabalho foi realizado planejamento experimental com a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) para fermentação da lactose em soro de ricota e permeado de soro de queijo. A definição das concentrações máximas e mínimas de lactose, pH e temperatura foram definidas com base em alguns trabalhos realizados por Lukondeh et al.(2005); Kargi e Ozmihci (2005); Sansonetti et al.(2010a); Saraceno et al.(2010) e Sansonetti et al.(2011).

3.2.4.1 Condições de cultivo para produção de bioetanol com soro de ricota

Foram avaliadas 15 diferentes combinações de pH inicial, concentração inicial de lactose e temperatura do cultivo conforme Tabela 6, para a produção de etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537), empregando soro de ricota autoclavado como meio de cultivo.

Tabela6 - Condições de cultivo em *shaker* com soro de ricota

Experimento	Concentração de lactose (g/L)	pH inicial do meio	Temperatura de fermentação (ºC)	Concentração de lactose (g/L)	pH inicial do meio	Temperatura de fermentação (ºC)
1	-1,00	-1,00	-1,00	51	4,0	29
2	-1,00	-1,00	1,00	51	4,0	41
3	-1,00	1,00	-1,00	51	5,5	29
4	-1,00	1,00	1,00	51	5,5	41
5	1,00	-1,00	-1,00	73	4,0	29
6	1,00	-1,00	1,00	73	4,0	41
7	1,00	1,00	-1,00	73	5,5	29
8	1,00	1,00	1,00	73	5,5	41
9	-1,68	0,00	0,00	44	4,75	35
10	1,68	0,00	0,00	80	4,75	35
11	0,00	-1,68	0,00	62	3,5	35
12	0,00	1,68	0,00	62	6,0	35
13	0,00	0,00	-1,68	62	4,75	25
14	0,00	0,00	1,68	62	4,75	45
15	0,00	0,00	0,00	62	4,75	35

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Os cultivos foram realizados durante 58 horas com agitação orbital a 150 rpm em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. As etapas de preparação e padronização do inóculo são descritas nos ítens 3.2.3.1 e 3.2.3.2, respectivamente.

3.2.4.2 Condições de cultivo para produção de bioetanol com permeado de soro de queijo

Foram avaliadas 15 diferentes combinações de pH inicial, concentração inicial de lactose e temperatura no cultivo conforme Tabela7, para a produção de etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537), empregando permeado de soro de queijo autoclavado como meio de cultivo.

Tabela7 - Condições de cultivo em*shaker* com permeado de soro de queijo

Experimento	Concentração de lactose (g/L)	pH inicial do meio	Temperatura de fermentação (ºC)	Concentração de lactose (g/L)	pH inicial do meio	Temperatura de fermentação (ºC)
1	-1,00	-1,00	-1,00	67,85	4,0	29
2	-1,00	-1,00	1,00	67,85	4,0	41
3	-1,00	1,00	-1,00	67,85	5,5	29
4	-1,00	1,00	1,00	67,85	5,5	41
5	1,00	-1,00	-1,00	129,1	4,0	29
6	1,00	-1,00	1,00	129,1	4,0	41
7	1,00	1,00	-1,00	129,1	5,5	29
8	1,00	1,00	1,00	129,1	5,5	41
9	-1,68	0,00	0,00	47	4,75	35
10	1,68	0,00	0,00	150	4,75	35
11	0,00	-1,68	0,00	98,5	3,5	35
12	0,00	1,68	0,00	98,5	6,0	35
13	0,00	0,00	-1,68	98,5	4,75	25
14	0,00	0,00	1,68	98,5	4,75	45
15	0,00	0,00	0,00	98,5	4,75	35

Os cultivos foram realizados durante 58 horas com agitação orbital a 150 rpmemErlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. As etapas de preparação e padronização e inoculação são idênticas às descritas nos itens 3.2.3.1 e 3.2.3.2, respectivamente.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

3.2.4.3 Análises realizadas ao longo dos cultivos

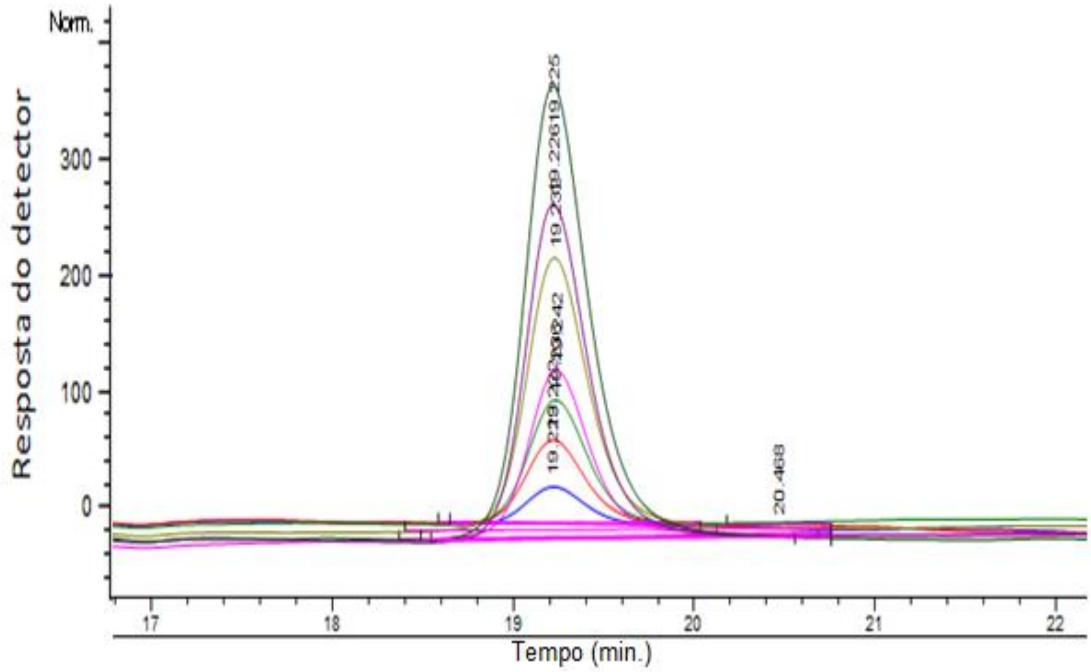
Durante as diferentes condições de cultivo realizadas em *shaker* para o soro de ricota e permeado de soro de queijo foram coletadas amostras periodicamente para realização das análises de lactose, pH e biomassa descritas no item 3.2.3.5. A análise de etanol foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), descrito em 3.2.4.3.1 Cada amostra coletada correspondeu a um Erlenmeyer com 50 mL de meio de cultivo.

3.2.4.3.1 Análise etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O etanol foi determinado através de cromatografia líquida de altaeficiência(CLAE), em cromatógrafo Agilent Technologies 1200 séries, com detector de índice de refração (RID), com coluna Supelco gel C-610H, com 300 mm por 7.8 mm ID.A análise foi realizada naCentral Analítica da Univates (UNIANÁLISES). Para realização das análises, foi preparada curva padrão de etanol absoluto P.A. nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100 ppm (Figura 6). A fase líquida utilizada foi a descrita por Sansonetti et al.(2010a) que empregou ácido fosfórico 0,1%. As condições para os padrões e as amostras foram de 35º C para coluna e detector, com um volume de injeção de 20 µL ecom um fluxo de 0,7 mL/min de fase móvel. As amostras foram diluídas 1000 vezes em água ultra pura(25 µl amostra em balão volumétrico de 25 mL), em seguida com auxílio de seringa foram injetadas em frasco vials passando por filtro de acetato de celulose com 0,45 µM PTFE.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Figura 6 - Cromatograma da diluição do padrão de etanol, 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100 ppm



Fonte: o autor

3.2.5 Determinação das condições de cultivo para produção de etanol em biorreator

Os cultivos com soro de ricota e permeado de soro de queijo em biorreator foram realizados com concentração inicial de 100 g/L de lactose, temperatura de 37º C e pH ajustado para 4,8 controlado ao longo do cultivo, empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537). A concentração de lactose para a fermentação em biorreator foi determinada conforme resultados das análises da fermentação da lactose obtidas no planejamento experimental. Os cultivos foram realizados durante 24 horas em equipamento da marca Marconi, modelo MA502/5, com agitação controlada em 150 rpm por uma turbina Rushtoncom seis lâminas planas e aeração de 12L/min. Temperatura e pH foram controlados por *software* acoplado ao biorreator.

No biorreator com capacidade de 3 L foi utilizada uma capacidade de 2,5 L para fermentação de soro de ricota ou permeado de soro de queijo. A preparação do

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

inóculo foi realizada conforme descrito no item 3.2.3.1 e a padronização do inóculo foi realizada conforme descrito no 3.2.3.2. O volume do inóculo padronizado e adicionado foi de 200 mL. Amostras de 30 mL do meio de cultivo foram coletadas a cada 4 horas e submetidas às análises de lactose e biomassa conforme descrito no item 3.2.3.5. A análise da DQO foi realizada no início e no final do cultivo conforme descrito no item 3.2.1.8 A análise de etanol da fermentação em biorreator foi realizada conforme descrito nos itens 3.2.3.5.3. O líquido fermentado, ao final do processo, também foi submetido à análise de etanol, conforme descrito no ítem 3.2.5.1.

3.2.5.1 Determinação do etanol fermentado em biorreator

A análise do etanol da fermentação do soro de ricota e permeado de soro de queijo foi realizada após a destilação de 100 mL do caldo fermentado em destilador enológico Super DEE Gibertini com 5 m/L de óxido de cálcio, e 3 gotas de anti espumante. A análise de etanol foi realizada em densímetro digital Mettler / Paar Calculating Digital Density Meter (DMA45) no laboratório da Embrapa Uva e Vinho.

3.2.6 Custo da implantação de uma ETE comparado a uma usina de bioetanol

A comparação de valores para a implantação de uma usina para produção de etanol proposta por Araújo (2001) e a implantação de uma ETE proposta por Gomes (2006), teve os valores ajustados conforme FEE (2014). O método empregado foi o proposto por Peter e Timmerhaus (1991) que define a avaliação do custo em estimativas de investimento que são variáveis, dividindo-as em cinco níveis, classificadas pela ordem de precisão, definidas como:

- Estimativa de ordem de grandeza, que é baseada em um custo anterior semelhante, com uma estimativa de precisão aproximadamente 30%.

- Estimativa de estudo é realizada com base nos principais equipamentos necessários, tem uma precisão de mais ou menos 30%.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

- Estimativa preliminar é baseada em informações suficientes para solicitar orçamentos, com uma margem de erro de aproximadamente 20%.

- Estimativa definitiva é montada com dados que praticamente completam todas as informações, porém são anteriores à conclusão e tem uma margem de erro de 10%.

- Estimativa detalhada é realizada com base em um modelo de engenharia que contempla todas as especificações necessárias, mas ainda tem uma margem de erro de mais ou menos 5% no projeto.

Para comparar os custos no presente projeto foi utilizada a estimativa por ordem de grandeza, proposto por Peter e Timmerhaus (1991), em que 100% é o máximo valor estimado com equipamentos e o restante dos valores é calculado pela porcentagem que representa o investimento em instalações, instrumentos de controle, tubulação instalada, instalação elétrica, edificações, instalação para utilidades, custo com engenharia e supervisão, despesas de construção, contingência e despesas com empreiteiros. Entretanto Araújo (2001) destaca que para alcançar níveis precisos em estimativa é necessário um detalhamento rigoroso dos projetos.

A estimativa de investimento em equipamentos equivale a 100 % dos gastos, para calcular o restante dos valores foram usados valores estimados por Peters e Timmerhaus (1991), conforme apresentado na Tabela 5 o cálculo é realizado conforme exemplo:

Exemplo: R$ 600.000,00 * 0,47 = R$ 282.000,00

Onde:

Valor dos equipamentos: R$ 600.000,00

Porcentagem do custo estimado da instalação: 0,47%

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Tabela 8 – Exemplo do cálculo empregado para estimar custos de instalação de empreendimento

Componentes	Porcentagem	Custo R$
Compra de equipamentos	100	R$ 600.000,00
Instalações dos equipamentos	0,47	R$ 282.000,00
Instrumentação e controles	0,18	-
Tubulação instalada	0,66	-
Instalação elétrica	0,11	-
Edificações	0,18	-
Instalações para utilidades	0,7	-
Custo com engenharia e supervisão	0,33	-
Despesas de Construção	0,41	-
Contingência	0,1	-
Despesas com empreiteiros	0,05	-
Total Investimento		**R$ -**

Fonte: Adaptado de Peters e Timmerhaus (1991)

Os autores estimaram que o investimento em instalações de equipamentos representa (0,47) do total necessário para implantação de uma usina. Na Tabela 8, caso o valor dos equipamentos seja R$ 600.000,00, representa que R$ 282.000,00 serão gastos para a instalações dos equipamentos ou refletindo 47% a mais no investimento.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização físico-química do soro de ricota

As análises de caracterização físico-química do soro de ricota foram realizadas para os diferentes lotes de soro de ricota coletados em uma indústria de laticínios da região do Vale do Taquari. A identificação do lote indica o dia e o mês da coleta. Os resultados das análises realizadas para os diferentes lotes são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9–Resultados das análises físico-químicas dos diferentes lotes de soro de ricota coletados em uma indústria de laticínios da região do Vale do Taquari

Lote / Análise	20/07	09/08	16/08	06/09	11/10	29/11	13/12	22/01
Proteína bruta (%)	0,54	0,00	0,36	0,89	0,45	0,09	0,00	0,34
Gordura (%)	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cinzas (%)	0,52	0,46	0,53	0,84	0,54	0,47	0,53	0,44
Umidade(%)	95,38	94,98	96,71	95,13	94,02	94,82	95,64	95,33
Acidez Titulável (% ácidolático)	1,63	1,63	1,81	1,39	1,91	2,00	1,44	1,86
pH	6,42	5,22	4,99	5,56	5,23	4,62	5,14	4,43
DQO (mg/L)	54.621	61.126	23.109	50.420	60.924	111.344	56.722	48.319
Lactose (mg/L)	43.430	51.050	65.020	44.630	47.630	49.390	33.334	37.830
Carbono total (mg/L)	20.238	20.016	22.287	16.445	24.489	19.734	11.730	16.713
Nitrogênio total (mg/L)	599,7	606,3	680,1	539,3	708	570,9	336,3	456,3

Fonte: o autor

Ao comparar os resultados de proteína bruta, cinzas, umidade, pH, carbono e nitrogênio total dos soros de ricota dos lotes 20/07 e 29/11 verifica-se que o segundo lote apresenta menores valores para os parâmetros citados. Já para esses mesmos lotes verificou-se que os resultados de acidez titulável, DQO e lactose foram maiores

para o lote 29/11. Essas variações provavelmente são consequência da composição do leite empregado na fabricação do queijo e da ricota.

Os dados encontrados na literatura sobre caracterização físico-química do soro de ricota são poucos, gerados principalmente pelo interesse em estudos com soro de queijo. Ao comparar os resultados das análises físico-químicas da Tabela 6 com os resultados de Sansonetti et al. (2009) e Sansonetti et al. (2010a) os valores são semelhantes para proteína 0,15-0,22%, lactose 4,8-5% e cinzas 1-1,3%. Já Pisponen et al. (2013) obtiveram resultados similares para proteína 0,5%, lactose 4,14%, pH 5,51 e cinzas 0,44% apresentando diferença somente para gordura que apresentou 0,26% quando comparada aos resultados obtidos pelos lotes analisados.

Ao comparar as características físico-químicas do soro de queijo descritas por Behemer (1991) e Ordóñez (2005) com as do soro de ricota, foi observada uma diferença no percentual de proteína, que apresenta uma concentração de 0,8-1% em soro de queijo e 0,0-0,54% em soro de ricota.

Os valores de DQO para soro de queijo são de 50.000 mg/L e 102.000 mg/L (PRAZERES et al., 2012). Esses valores diferem aos encontrados no soro de ricota, que oscilou entre 23.109 mg/L a 111.344 mg/L.

4.2 Caracterização físico-química do permeado de soro de queijo

As análises da caracterização físico-química do permeado de soro de queijo foram realizadas em triplicata, para o lote 01/01 que foi reconstituído em laboratório a partir da base seca conforme 3.2.2. Os resultados das análises são apresentados na Tabela 10.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Tabela 10 – Resultados das análises físico-químicas do lote de permeado de soro de queijo reconstituído em laboratório

Lote / Análise	01/01	Líquida	Seca
Proteína bruta (%)	0,82*	0,85**	3-8***
Gordura (%)	0,00*	0,36**	1-5***
Acidez Titulável (% ácidolático)	1,12*	-	4,82****
Cinzas (%)	0,32*	-	10,54****
Umidade (%)	94,62*	93**	0***
pH	6,11*	-	-
Lactose (mg/L)	65.980*	50.000**	65.000 - 85.000***
DQO (mg/L)	60.546*	50.000*	-
Carbono total (mg/L)	21.078*	-	-
Nitrogênio total (mg/L)	178,68*	-	-

Fonte: o autor*. Resultados obtidos por Beucler et al. (2005)**; Ficha produto Arla Foods***, Andrade e Martins 2002****

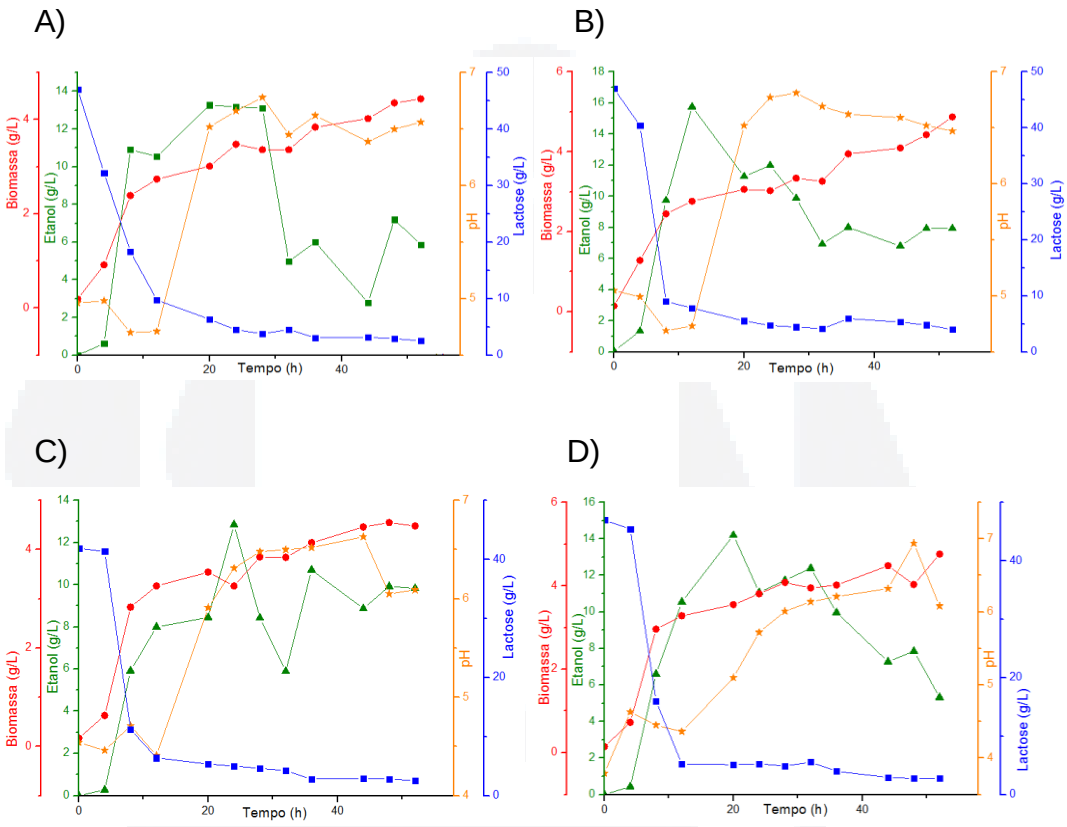
Os resultados da análise de lactose do permeado de soro de queijoreconstituído (lote 01/01)são similares aos obtidos por BEUCLER et al.(2005).

4.3 Resultados da seleção das leveduras com soro de ricota

A fermentação da lactose presente no soro de ricota foi realizada em agitador orbital *Shaker* a 150 rpm, em temperatura de 37º C, com soro de ricota autoclavado e não autoclavado. Para esse experimento foram utilizados os microrganismos *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537, ATCC 16045, ATCC 12424, CBS 6556) e *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176). A Figura 7 apresenta os resultados de cada uma das leveduras: produção de etanol, a variação do pH, consumo de lactose e produção de biomassa durante 52 horas de fermentação. Esses experimentos foram realizados com a finalidade de selecionar a levedura que apresentasse maior produção de etanol.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Figura 7–Fermentação do soro de ricota com as leveduras: A) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) não autoclavado; B) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) autoclavado;C) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) não autoclavado; D) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) autoclavado.Resultados de biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).



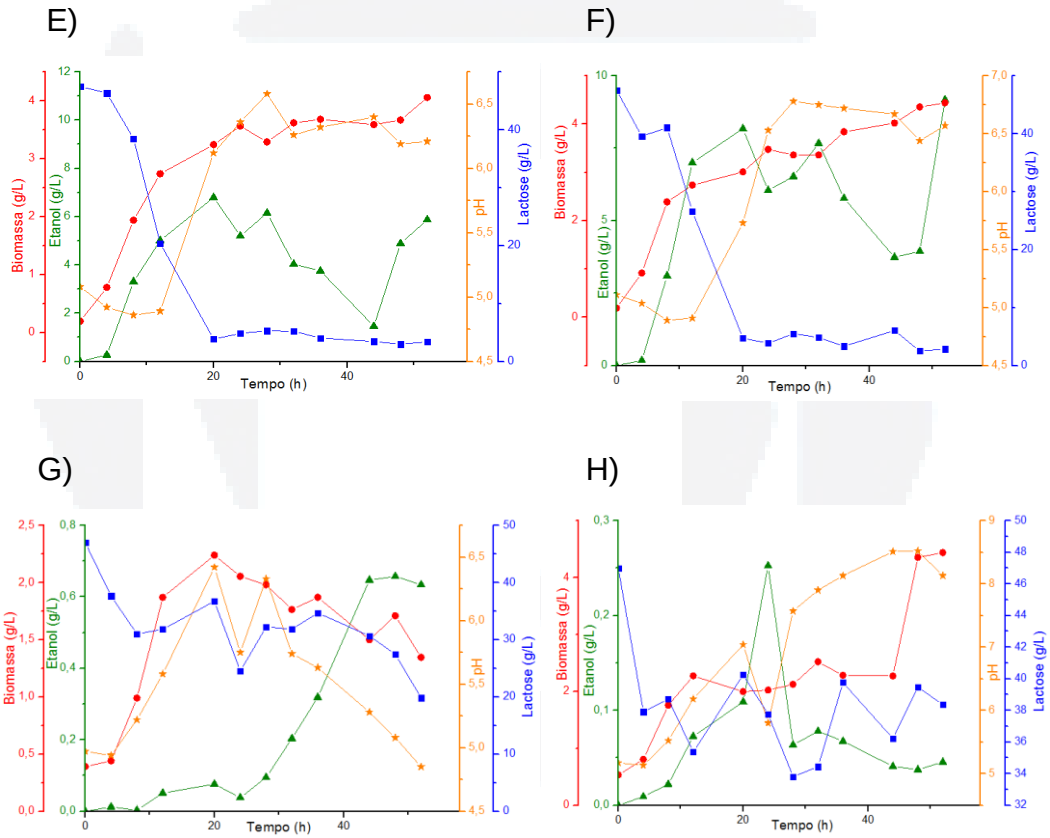
Na Figura 7, é possível observar que a fermentação da lactose do soro de ricota foi eficiente ao serem empregadas as leveduras *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537, 12424), entretanto o melhor rendimento na produção de etanol em relação ao tempo de fermentação ocorreu com soro de ricota autoclavado, Figura 7 (B, D).

O soro de ricota não autoclavado apresentou máximo rendimento de 13,27 g/L de etanol em 20 horas, com a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537), a mesma levedura em 12 horas apresentou rendimento de 15,75 g/L de etanol em soro de ricota autoclavado. Já com a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424), a produção de etanol ocorreu em 24 horas com soro de ricota não

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

autoclavado produzindo 12,85 g/L de etanol, com soro de ricota autoclavado o rendimento foi de 14,20 g/L de etanol em 20 horas.

Figura 8–Fermentação do soro de ricota com as leveduras: E) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 16045) não autoclavado; F) *Kluyveromyces marxianus* (16045) autoclavado;G) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC CBS 6556) não autoclavado; H) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC CBS 6556) autoclavado. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).

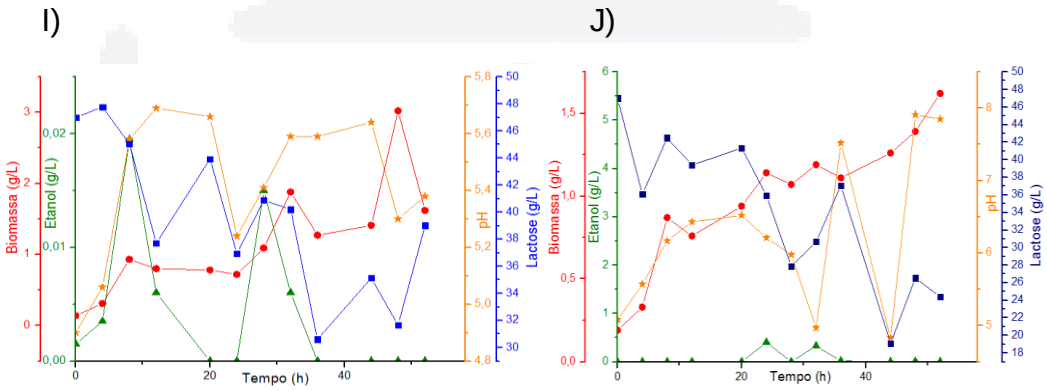


Na Figura 8 são apresentados resultados da fermentação da lactose com as leveduras *Kluyveromyces marxianus* (CBS 6556 eATCC 16045) com soro de ricota não autoclavado e autoclavado. Com a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 16045) em soro de ricota não autoclavado foi possível atingir um rendimento de 6,15 g/L de etanol em 28 horas, em soro de ricota autoclavado, a máxima produção de etanol foi de 9,75 g/L ao final da fermentação. A levedura *Kluyveromyces marxianus* (CBS 6556) fermentou lactose, mas ao final do experimento ainda restavam 20 g/L para ser fermentada no melhor desempenho (Figura 8) (B), esse desempenho

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

refletiu em uma produção de etanol abaixo de 1 g/L tanto para o soro de ricota não autoclavado como autoclavado. Possivelmente, a fisiologia desse microrganismo pode estar adaptada para utilizar outros nutrientes na multiplicação celular e produção de outros compostos.

Figura 9–Fermentação do soro de ricota com as leveduras:I) *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176) não autoclavado; J) *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176) autoclavado.Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).



Na Figura 9 é possível observar que a fermentação da lactose do soro de ricota pela levedura *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176) para soro de ricota não autoclavado e autoclavado não representou produtividade significativa de etanol, que resultante de um baixo consumo de lactose, possivelmente pela fisiologia, pode estar adaptada para utilizar outros nutrientes na multiplicação celular.

A produção de etanol está relacionada com a fermentação da lactose, como pode ser observado nas Figuras 7, (A, B,C, D), 8 (E, F) em pH abaixo de 5. Já nas Figuras 8 (G, H) e 9 (I, J), a lactose apresentou reduzida fermentação e a produção de etanol não aconteceu. Nas condições em que a lactose atingiu a máxima fermentação tornando-se reduzida no meio de cultivo foi possível observar uma redução do PH, que volta a aumentar após a máxima fermentação da lactose e a produção de etanol começou a oscilar. Isso possivelmente ocorre em razão de a adaptação da levedura a outros nutrientes para continuar a multiplicação celular, visto que a produção de biomassa continua aumentando em pH acima de 5 com as leveduras *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537, 12424 e 16045).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

O melhor rendimento na produção de etanol foi com soro de ricota autoclavado, essa resposta pode estar relacionada com a competição da levedura com outros microrganismos presentes no soro de ricota não autoclavado, que pode diminuir a eficiência da fermentação causada pela produção de outros compostos no meio de cultura. Entre as três leveduras de melhor produção de etanol, a que teve melhor produção foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) exposta ao soro de ricota autoclavado, conforme pode ser observado na Figura 7 (B). Na sequência, a mesma levedura fermentada em soro de ricota não autoclavado foi a de melhor produção de etanol, Figura 7 (A).

Os resultados obtidos após as fermentações da lactose presente no soro de ricota com a leveduras *Kluyveromyces marxianus (*ATCC 46537), corroboram com resultados obtidos em pesquisas realizadas por Sansonettiet al. (2011), com a levedura *Kluyveromyces marxianus*com cepa CBS 397, que após 15 horas de fermentação produziu 22,68 g/L de etanol, 4,41 g/L de biomassa a partir de uma concentração inicial de lactose de 43,99 g/L. Em testes preliminares Sansonetti et al. (2010a) empregando soro de ricota com concentração de lactose de 47,06 g/L obtiveram o consumo máximo da lactose após 18 horas de fermentação, com uma produção de 21,29 g/L de etanol e uma produção de biomassa de 4,92 g/L. Em experimento usando soro de ricota e concentração de lactose de 45 g/L (SANSONETTI et al. 2009) obteve a conversão da lactose em aproximadamente 13 horas, com produção de etanol de 23 g/L, porém não considerou nessa pesquisa a produção de biomassa.

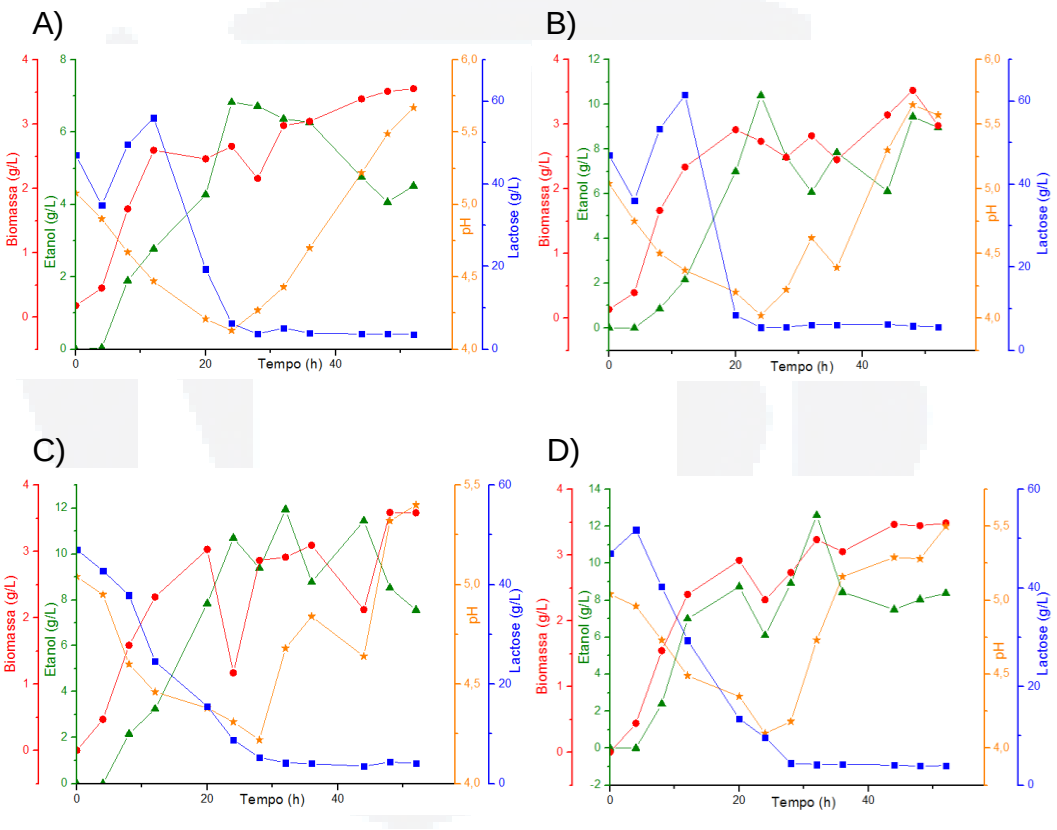
4.4 Resultados da Seleção das Leveduras com Permeado de Soro de Queijo

A fermentação da lactose foi realizada em agitador orbital (*Shaker)* a 150 rpm, em temperatura de 37º C com permeado de soro de queijo autoclavado e não autoclavado. Para esses experimentos foram utilizados os microrganismos *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537, ATCC 16045, ATCC 12424, CBS 6556) e *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176). A Figura 10 apresenta os resultados de cada uma das leveduras e a produção de etanol, variação do pH, consumo de lactose e produção de biomassa após 52 horas de fermentação. Esses experimentos foram

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

realizados com a finalidade de selecionar a levedura que apresentar maior produção de etanol em permeado de soro de queijo.

Figura 10 - Fermentação do permeado de soro de queijo com as leveduras: A) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) não autoclavado; B) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) autoclavado; C) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) não autoclavado; D) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) autoclavado. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).

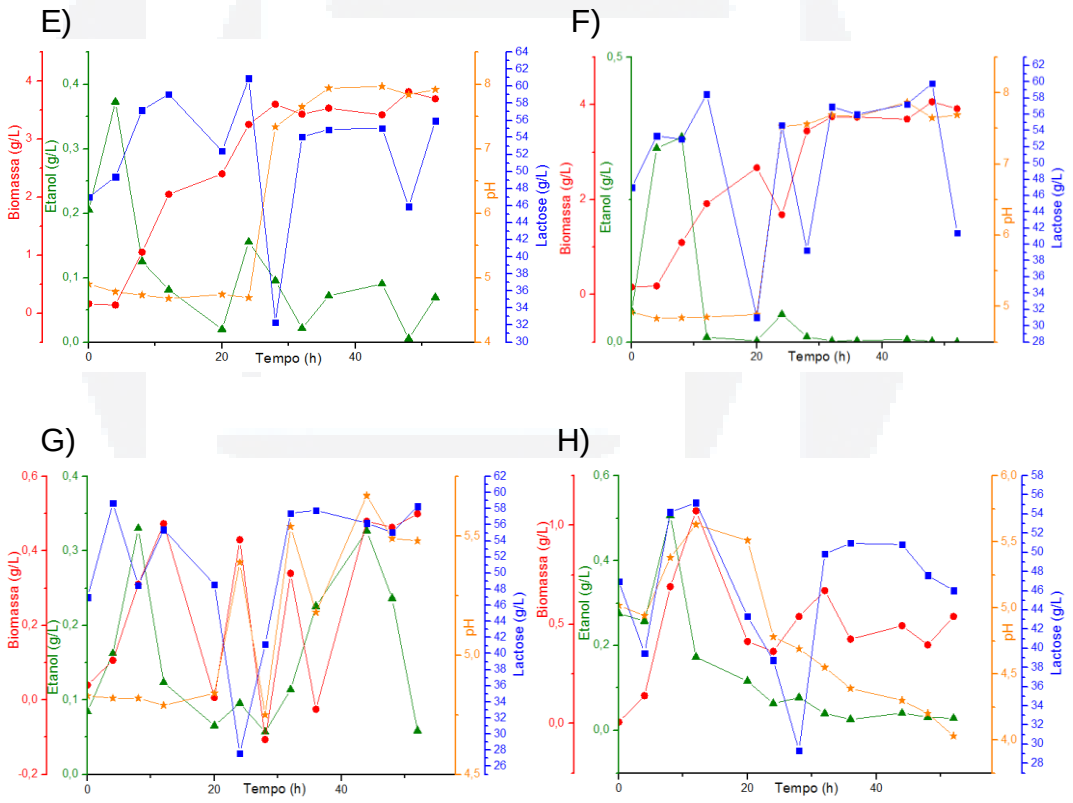


Conforme Figura 10, a fermentação da lactose presente no permeado de soro de queijo foi mais eficiente com as leveduras *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537, 12424). Com permeado de soro de queijo não autoclavado o melhor rendimento de etanol foi de 11,95 g/L em 32 horas de fermentação com a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) e para a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) a produção de etanol foi de 6,83 g/L em 24 horas, Figuras 10 (A e C). Já com as mesmas leveduras em permeado de soro de queijo autoclavado, a produção de etanol foi de 12,6 g/L e 10,4 g/L em 32 e 24 horas de fermentação respectivamente. O pH baixou até o momento em que a lactose atingiu

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

a máxima redução, aumentando ao longo da fermentação como observado na Figuras 10 (A, B, C e D), refletindo diretamente na produção de etanol. O pH baixo pode ser relacionado à produção de ácidos orgânicos por essas leveduras, porém a multiplicação celular continuou ao longo do cultivo, gerando uma biomassa de aproximadamente 3,55 g/L para as duas leveduras no final do experimento.

Figura 11 - Fermentação do permeado de soro de queijo com as leveduras: E) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 16045) não autoclavado; F) *Kluyveromyces marxianus* (16045) autoclavado; G) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC CBS 6556) não autoclavado; H) *Kluyveromyces marxianus* (ATCC CBS 6556) em soro de ricota autoclavado. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).

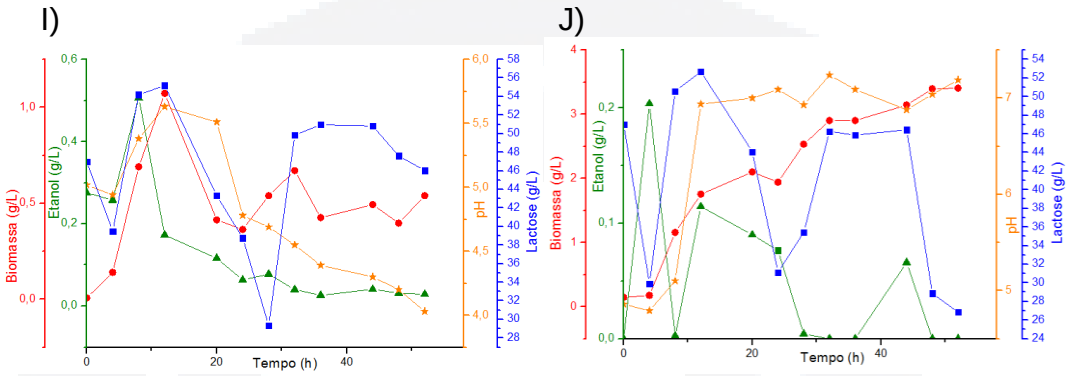


As leveduras *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 16045, CBS 6556) não apresentaram uma fermentação de lactose linear e a produção de etanol foi reduzida, não atingiu 1 g/L Figuras 11 (E, F, G, H). Entretanto ocorreu produção de biomassa para a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 16045) atingindo uma produção de 3,69 e 3,91 g/L em permeado de soro de queijo não autoclavado e autoclavado no final da fermentação, Figuras 11 (E e F). A produção de biomassa

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

pode estar relacionada à utilização de outros nutrientes do meio de cultura para multiplicação celular, não sendo somente a lactose o precursor na geração da biomassa.

Figura 12 - Fermentação do permeado de soro de queijo com as leveduras: I) *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176) não autoclavado; J) *Kluyveromyces lactis* (ATCC 24176) autoclavado.Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).



A levedura *Kluyveromyces lactis*(ATCC 24176) em permeado de soro de queijo autoclavado produziu 3,40 g/L de biomassa Figura 12 (I), porém não apresentou fermentação de lactose satisfatória da mesma forma não produziu etanol.

As leveduras *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424 e 46537) utilizadas na fermentação da lactose do permeado de soro de queijo autoclavado produziram etanol em 32 e 24 horas de fermentação, atingindo 12,6 e 10,4 g/L. Para selecionar a melhor levedura para seguir com os experimentos foi considerado o tempo de fermentação e a máxima produtividade de etanol. Como a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) produziu 10,4 g/L de etanol em 24 horas, isso gera uma produção de 0,43 g/L/h enquanto a *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424) produziu 12,6 g/L em 32 horas, que representa uma produção de 0,39 g/L/h, sendo nesse caso o tempo um fator limitador fundamental para definir qual a levedura é mais eficiente.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Após analisar os resultados, a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) foi selecionada para continuar os experimentos, mesmo que o melhor desempenho teórico na conversão da lactose em etanol tenha sido com a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 12424). A preferência pela primeira foi definida por ter um desempenho melhor frente ao tempo de fermentação, que foi de 24 horas, enquanto a cepa (ATCC 12424) apresentou máxima fermentação somente em 32 horas. Outro fator relevante na escolha foi o melhor desempenho (ATCC 46537) com soro de ricota, ao trabalhar com a mesma levedura facilita a análise comparativa quanto ao rendimento, tempo de fermentação, comportamento de agitação e temperatura nos dois meios de cultura, soro de ricota e permeado de soro de queijo. Os resultados mais expressivos nas fermentações foram observados quando o meio de cultura foi autoclavado, pois a levedura é favorecida nessa situação por não ter que competir com outros microrganismos que possam utilizar os mesmos nutrientes para se multiplicarem, ou a produção de outros compostos que possam retardar a adaptação ao emprego da lactose na multiplicação celular do microrganismo.

Os resultados obtidos por Silveira et al. (2005) confirmam que a levedura *Kluyveromyces marxianus* tem potencial para fermentar a lactose do permeado de soro de queijo, convertendo-a em etanol. Porém Silveira et al. (2005) obtiveram resultados mais expressivos ao produzir 80,04 g/L de etanol, em sistemas com baixos níveis de oxigênio, com uma concentração de 170 g/L de lactose em temperatura de 30º C. Já Koushki et al. (2011) em experimento utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* obtiveram resultados satisfatórios empregando permeado de soro de queijo como meio de cultura para produção de etanol. Em uma concentração de 9,8% de lactose, teve uma eficiência de 91,3% de etanol com uma conversão de 96,55% da lactose.

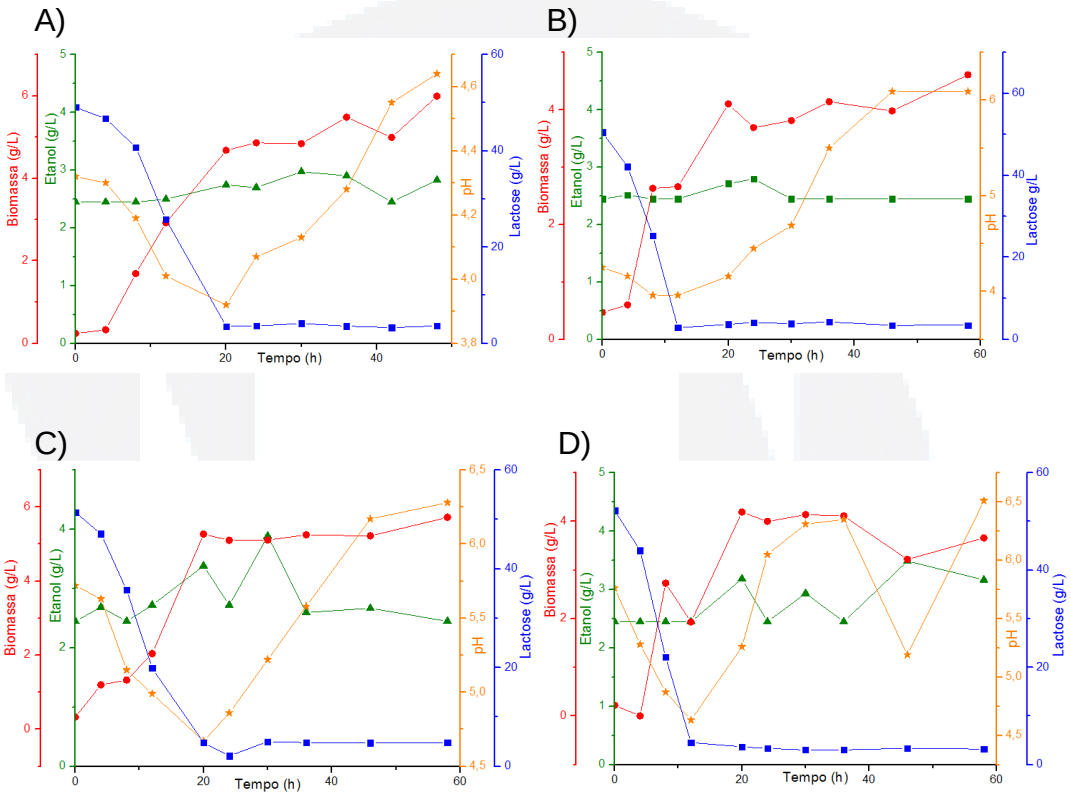
4.5 Resultados da avaliação das condições de cultivo em *shaker* com Soro de Ricota

Os experimentos em shaker foram conduzidos por 58 horas a fim de avaliar diferentes concentrações iniciais de lactose, pH e temperatura utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) selecionada no item 4.3. Esse

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

planejamento experimental possibilita a identificação da melhor condição para realização de testes mais específicos em biorreator.

Figura 13 –Fermentação do soro de ricota com as leveduras:*Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em soro de ricota autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 51 g/L, pH inicial 4, temperatura 29º C; (B) Lactose 51 g/L, pH inicial 4, temperatura 41º C; (C) Lactose 51 g/L, pH inicial 5,5 temperatura 29º C; (D) Lactose 51 g/L, pH inicial 5,5, temperatura 41º C.Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).

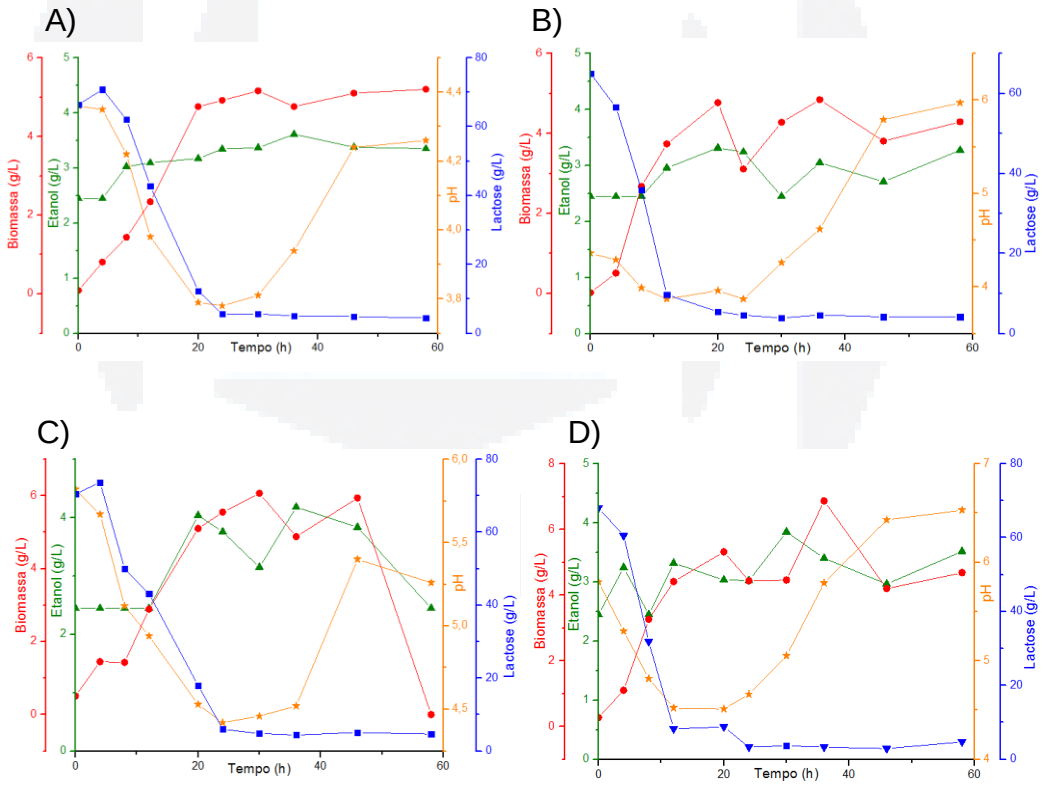


Na Figura 13 é possível identificar a redução de lactose nas quatro condições testadas, porém em temperatura de 29º C a fermentação da lactose ocorreu em 20 horas, Figuras (A e C). Com temperatura de 41º C, a fermentação aconteceu em 12 horas, Figuras (B e D), a redução da lactose coincidiu com a diminuição do pH nas quatro condições que, após a máxima redução da lactose, aumentou e foi mantida até o final da fermentação. A biomassa teve produção mais intensa em até 20 horas, porém continuou a ser produzida até o final do experimento. O aumento do pH após a máxima redução da lactose pode ser causada pela utilização de outros compostos presentes no meio de cultura pela levedura. Isso pode ser relacionado com a

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

produção de biomassa que mesmo após a redução da lactose continuou a ser produzida, entretanto mais lentamente. A produção de etanol mais representativa pode ser observado na Figura 13 (C), com 4 g/L, sendo uma quantidade inferior aos resultados obtidos para a mesma levedura nos testes realizados na seleção da levedura. Os resultados de etanol não foram significativos, possivelmente devido ao método empregado para detecção (CLAE).

Figura 14 –Fermentação do soro de ricota com as leveduras:*Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em soro de ricota autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 73 g/L, pH inicial 4, temperatura 29º C; (B) Lactose 73 g/L, pH inicial 4, temperatura 41º C; (C) Lactose 73 g/L, pH inicial 5,5 temperatura 29º C; (D) Lactose 51 g/L, pH inicial 5,5, temperatura 41º C.Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).

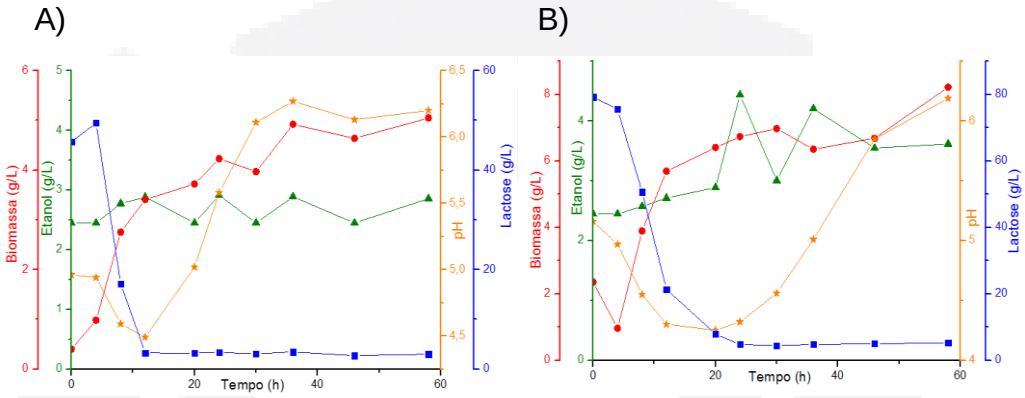


Na Figura 14 A e C é possível analisar a velocidade da fermentação da lactose, que em temperaturas de 29º C é mais lenta, ocorrendo entre 20 e 24 horas. Para temperaturas de 41º C, Figuras 14 (B e D) a fermentação da lactose ocorreu em aproximadamente 12 horas. No mesmo período em que ocorreu a fermentação da lactose o pH baixou, voltando a aumentar assim que a lactose atingiu a menor concentração. A produção da biomassa ocorreu mais intensamente nas primeiras 20

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

horas, porém continuou a ser produzida mais lentamente até o final do experimento. O etanol produzido na fermentação foi de aproximadamente 4 g/L, ficando abaixo da quantidade produzida na seleção da levedura com soro de ricota.

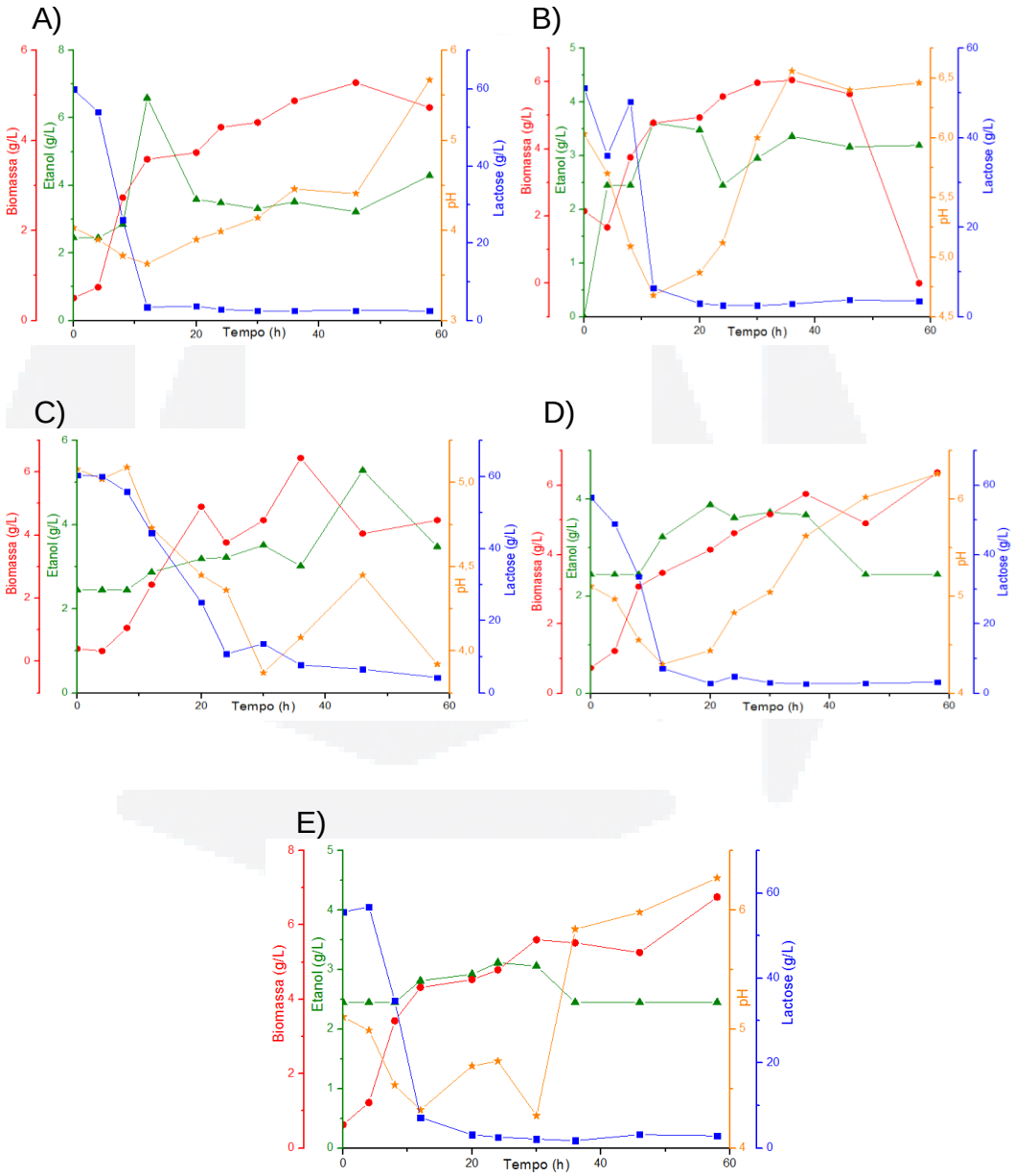
Figura 15 – Fermentação do soro de ricota com as leveduras: da levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em soro de ricota autoclavado a 150 rpm: (A) concentração de lactose 44 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º C e (B) concentração lactose 80 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º C.Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).



Na Figura 15 (A e B) são apresentados os resultados das condições do planejamento experimental com a concentração mais baixa 44 g/L e mais alta 80 g/L de lactose respectivamente. Na Figura A a lactose foi fermentada em 12 horas coincidindo com a redução de pH, que a partir da estabilização da lactose aumentou constantemente até o final do experimento. A fermentação da lactose na Figura B foi mais lenta até atingir a estabilidade em 20 horas de fermentação, momento em que o pH voltou a aumentar. Na concentrações de lactose mais baixa, a fermentação da lactose foi mais rápida, possivelmente pela facilidade dos microrganismos em se adaptar ao meio com menores quantidades de lactose, já na concentração de 80 g/L nas mesmas condições, os microrganismos tiveram uma fase adaptativa mais lenta. A máxima produção de biomassa para concentração de lactose de 44 g/L foi de 5,05 g/L no final da fermentação, enquanto na concentração de lactose com 80 g/L em 12 horas de fermentação a biomassa produzida foi de 5,69 g/L e atingiu no final da fermentação 8,22 g/L Figura 11 (B). O etanol gerado não foi satisfatório quando comparado com os valores obtidos na seleção da levedura.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Figura 16 –Fermentação do soro de ricota com as leveduras: *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em soro de ricota autoclavado a 150 rpm (A) Lactose 62 g/L, pH inicial 3,5, temperatura 35º C; (B) Lactose 62 g/L, pH inicial 6, temperatura 35º C; (C) Lactose 62 g/L, pH inicial 4,75 temperatura 25º C; (D) Lactose 62 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 45º C; (E), lactose 62 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º.Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).



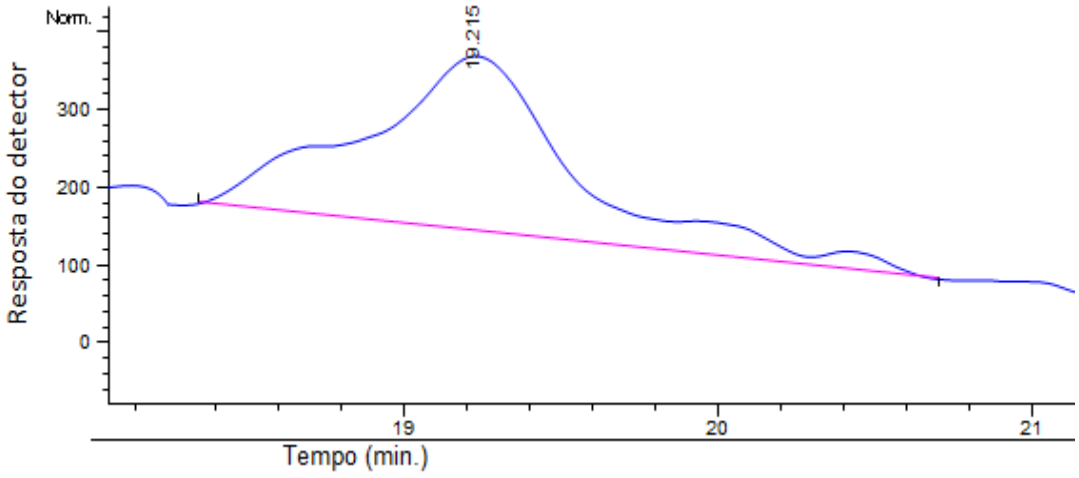
Na Figura 16 (C), em temperatura de 25º C a fermentação ocorreu em 30 horas, enquanto nas temperaturas de 35º C Figuras (A, B, E e D) e 45º C a fermentação aconteceu em 12 horas. O pH baixou em todas as temperaturas até o

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

momento da máxima redução da lactose, voltando a aumentar durante o restante da fermentação. Na Figura B, com pH 6, a fermentação aconteceu em 12 horas, observou-se que a concentração de lactose não influencia na velocidade da fermentação, podendo a temperatura ser fator limitante no processo. O etanol produzido não foi expressivo, porém a biomassa apresentou produção máxima de 6,75 g/L Figura (E) ao final da fermentação.

Uma situação que pode ser considerada na análise de etanol do planejamento experimental é o método que foi empregado na análise (CLAE). A detecção de etanol por esse método pode ter sido influenciada por outros compostos presentes nas amostras. Na Figura 13 é possível observar o pico principal de etanol, mas a linha de base está extensa, influenciada por outros compostos, dificultando dessa forma uma leitura específica do etanol. Já a detecção por analisador bioquímico empregada na etapa da seleção da levedura detecta somente etanol, sendo um método seletivo, mais eficiente e rápido para esse tipo de amostra.

Figura 17 – Cromatograma de amostra de etanol, pico principal, nas laterais interferência de tendência a outros picos detectados por (CLAE)



Fonte: o autor

Os resultados do planejamento experimental com soro de ricota não foram satisfatórios, pelo fator da baixa produção de etanol, quando comparado com resultados de Sansonetti et al. (2009), Sansonetti et al. (2010a), Sansonetti et al. (2010b), que conseguiram máxima produção de etanol de 23 g/L. O mesmo autor destaca que a produção de etanol está relacionada à produção de biomassa, no

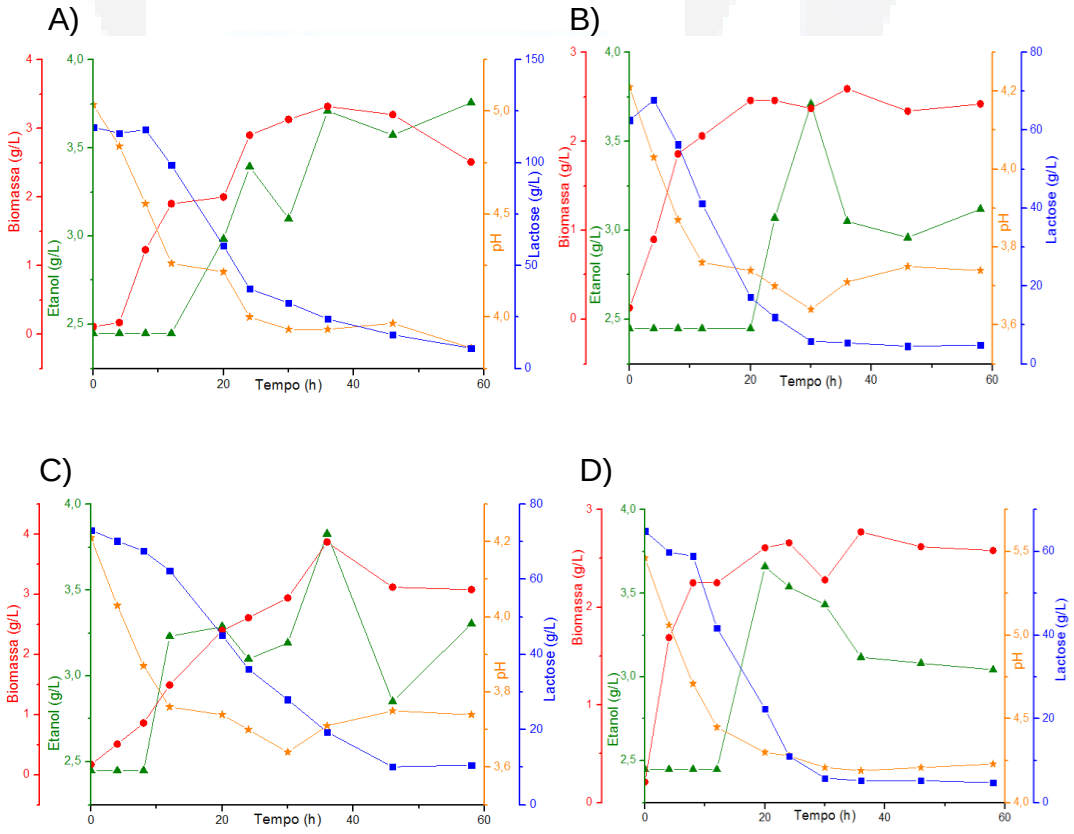
BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

entanto não é possível confirmar essa comparação em razão de os valores de etanol serem muito reduzidos.

4.6 Resultados da avaliação das condições de cultivo em *shaker* com permeado de soro de queijo

O planejamento experimental com permeado de soro de queijo foi realizado a partir da seleção da levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537), conforme descrito no item 4.4. Os dados obtidos em quinze testes distintos do planejamento experimental conforme apresentado no item 3.2.4.2, Quadro 2 com permeado de soro de queijo são apresentados nas Figuras (14, 15, 16 e 17).

Figura 18 –Fermentação do soro de ricota com as leveduras: *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em permeado de soro de queijo autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 67,85 g/L, pH inicial 4, temperatura 29º C; (B) Lactose 67,85 g/L, pH inicial 4, temperatura 41º C; (C) Lactose 67,85 g/L, pH inicial 5,5 temperatura 29º C; (D) Lactose 67,85 g/L, pH inicial 5,5, temperatura 41º C. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).

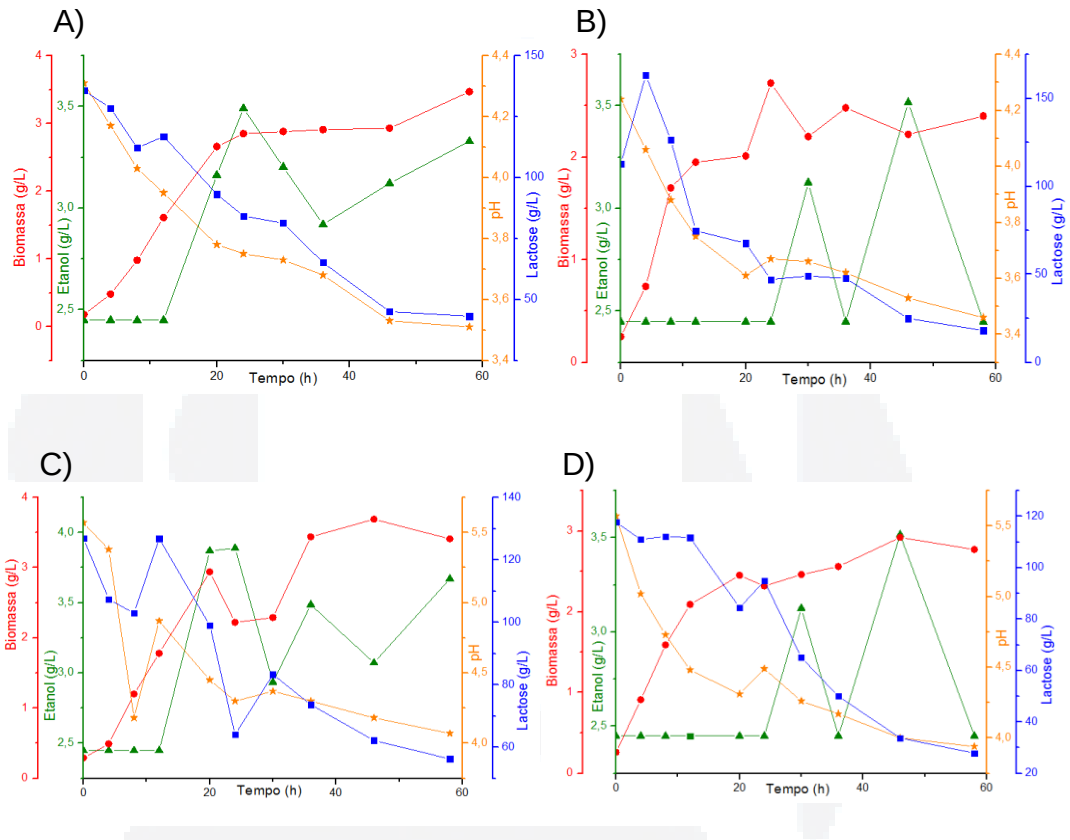


BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Na Figura 18 são apresentados os resultados da fermentação da lactose presente no permeado de soro de queijo, que aconteceu em aproximadamente 30 horas, como pode ser evidenciado nas Figuras (A, B e D). Durante a fermentação da lactose, o pH baixou mantendo-se estável até o final do experimento. Na Figura (C) é possível observar que a fermentação ocorreu em 42 horas, nesse mesmo tempo o pH baixou e a demora na fermentação pode ser influenciada pela temperatura de 29º C e pH 5,5. Em temperatura idêntica e pH 4 Figura 18 (A) a fermentação foi mais rápida, sendo nesse caso o pH um limitador na velocidade da fermentação. Nas mesmas concentrações de lactose em temperaturas de 41º C a máxima fermentação aconteceu em 30 horas, tanto em pH 4 e 5,5. Isso indica que fermentações com temperaturas mais altas, mesmo com pH distintos, têm respostas semelhantes, indicando uma melhor adaptação da levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) a temperaturas mais elevadas. Em temperaturas mais baixas, o pH pode influenciar no tempo de fermentação, porém a produção de biomassa aconteceu em todos os experimentos, ainda assim não foi possível relacionar com a produção de etanol que foi reduzida, não atingindo as concentrações da seleção da levedura com o mesmo meio de cultura.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Figura 19 –Fermentação do soro de ricota com as leveduras:*Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em permeado de soro de queijo autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 129,1 g/L, pH inicial 4, temperatura 29º C; (B) Lactose 129,1 g/L, pH inicial 4, temperatura 41º C; (C) Lactose 129,1 g/L, pH inicial 5,5 temperatura 29º C; (D) Lactose 129,1 g/L, pH inicial 5,5, temperatura 41º C.Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).

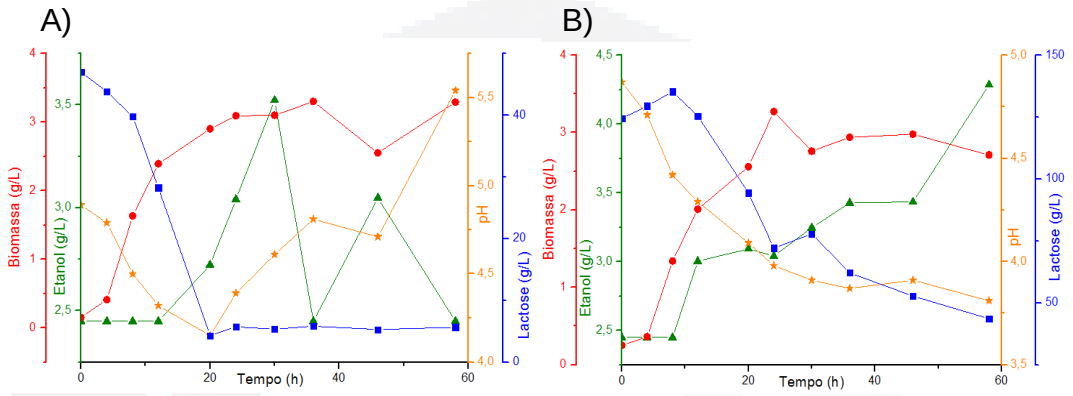


Nas Figuras 19 são apresentados os resultados da fermentação da lactose na concentração de 129,1 g/L lactose. Na temperatura de 29º C em pH 4 (Figura A) e pH 5,5 (Figura C) a máxima fermentação ocorreu em aproximadamente 58 horas, restando aproximadamente 50 g/L de lactose nos dois meios de cultura. Na temperatura de 41º C e mesma concentração inicial de lactose Figuras 19 (B e D), verificou-se a maior redução da lactose em pH 4, restando ao final das 58 horas 18,16 g/L de lactose em pH 5,5, ao final da fermentação restava 27 g/L de lactose para ser fermentada. Em condições mais concentradas, a lactose tem um tempo maior de fermentação. A produção de biomassa foi estável quando comparada aos outros experimentos, mesmo com mais lactose no meio de cultura. O pH continuou a baixar até o final do experimento, não sendo evidenciado o seu aumento como em

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

outras condições. A produção de biomassa foi de 2,92 g/L em pH 5,5 e 2,44 e pH 4, com uma produção de etanol inferior a que foi encontrada na seleção da levedura.

Figura 20 –Fermentação do soro de ricota com as leveduras:*Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em permeado de soro de queijo autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 47 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º C, (B) Lactose 150 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º C.Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).

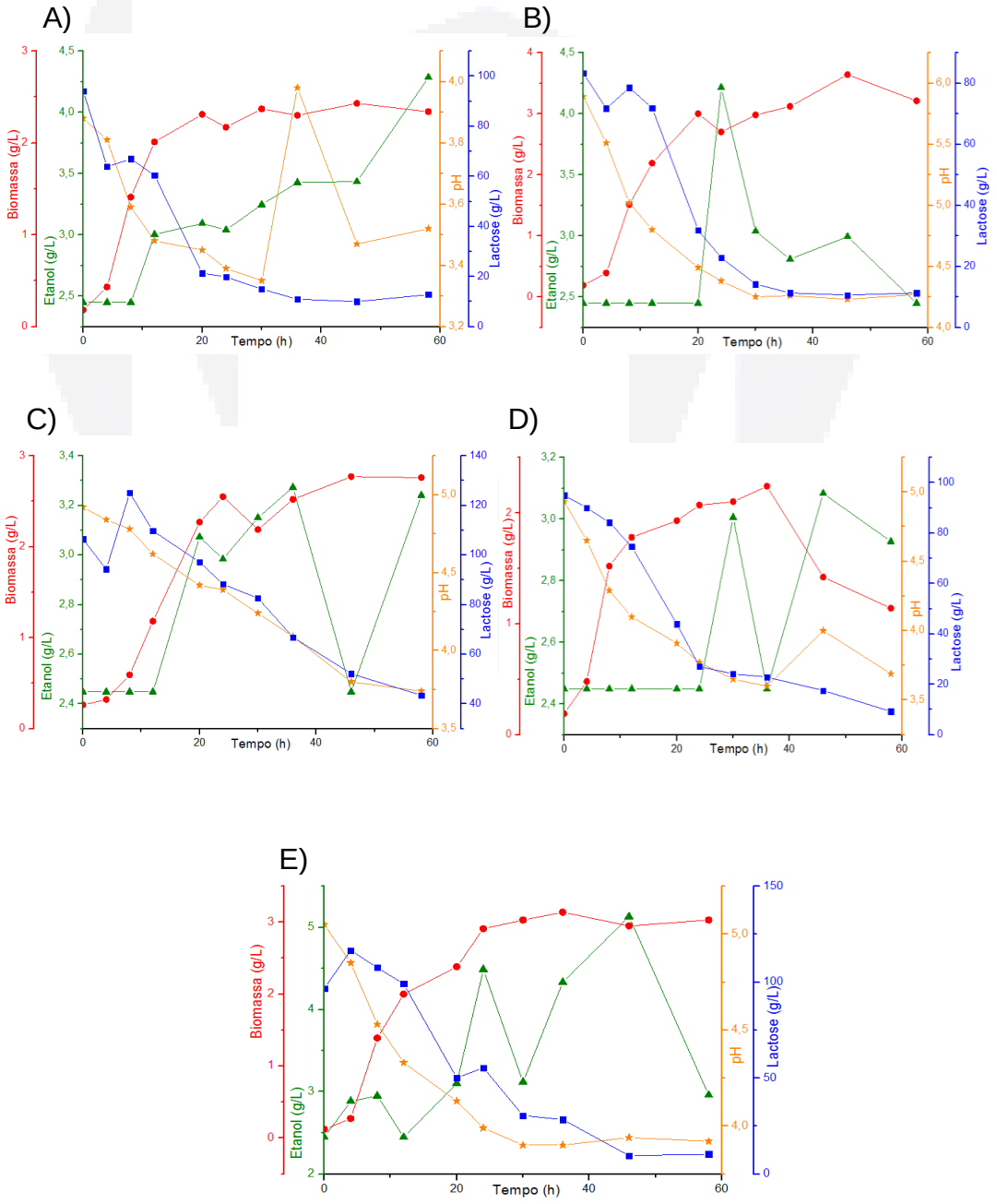


Na Figura 20 são apresentados os resultados com a máxima e mínima concentração de lactose empregada no experimento com permeado de soro de queijo. Na Figura 20ª, a fermentação da lactose de 47 g/L ocorreu em 20 horas com redução do pH. Após a concentração de lactose estabilizar, o pH voltou a aumentar até o final do experimento, possivelmente nesse período a levedura se adaptou a uma condição reduzida de lactose utilizando outros nutrientes para continuar sua multiplicação. Na Figura 20 B a maior concentração de lactose atingiu a máxima fermentação em 58 horas, ao mesmo tempo, o pH diminuiu constantemente. Ao comparar os dois experimentos é possível observar que, em concentrações reduzidas de lactose, o tempo de fermentação é mais rápido, meios mais concentrados possivelmente necessitam de maior tempo para atingir a máxima fermentação da lactose. A produção de biomassa foi mais intensa quando a lactose estava menos concentrada (Figura A), mas mesmo após a redução da lactose, a biomassa continuou a ser produzida. Na Figura 20 B, a biomassa atingiu a máxima produção em 24 horas, 3,27 g/L, em seguida oscilou mantendo-se praticamente constante até o final do experimento com 2,98 g/L. A produção de etanol não foi

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

satisfatória, em nenhuma das condições, quando observados os valores da seleção da levedura.

Figura 21 –Fermentação do soro de ricota com as leveduras:*Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) em permeado de soro de queijo autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 98,5 g/L, pH inicial 3,55, temperatura 35º C; (B) Lactose 98,5 g/L, pH inicial 6, temperatura 35º C; (C) Lactose 98,5 g/L, pH inicial 4,75 temperatura 25º C; (D) Lactose 98,5 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 45º C; (E), lactose 98,5 g/L, pH inicial 4,75, temperatura 35º. Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).



BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Na Figura 21, a fermentação da lactose foi mais eficiente em temperaturas de 35º C e 45º C, como pode ser analisado nas Figuras A, B, D e E. Na temperatura de 25º C Figura C, a fermentação máxima da lactose aconteceu em 58 horas, porém restaram ao final da fermentação aproximadamente 40 g/L de lactose para ser fermentada. A produção máxima de etanol foi de aproximadamente 5 g/L (Figura E), inferior aos resultados encontrados no processo de seleção da levedura. A produção de biomassa refletiu a fermentação da lactose, mas na Figura D em temperatura de 45º C, a biomassa ao final da fermentação foi de aproximadamnte 1 g/L, após uma produção máxima de 2 g/L em 36 horas. Em temperaturas mais altas, a produção de biomassa pode ser comprometida, possivelmente pela menor multiplicação celular e a lenta fermentação da lactose pela levedura.

Os resultados do planejamento experimental com permeado de soro de queijo não atingiram a produção de etanol desejada quando comparados com o etanol produzido na seleção da levedura com permeado de soro de queijo. Resultados obtidos em experimentos realizados por Koushki et al. (2011) e Silveira et al. (2005) com permeado de soro de queijo foram superiores aos resultados obtidos no presente trabalho nos cultivos com permeado de soro de queijo. Uma possível hipótese sobre os níveis de etanol abaixo do esperado podem ser relacionados ao método analítico empregado na detecção do etanol (CLAE) descrito no item 3.2.3.5.3 que pode não ser o mais indicado. Para seleção da levedura, as análises foram realizadas em Analisador Bioquímico, conforme descrito em 3.2.3.5.2 e os resultados foram satisfatórios.

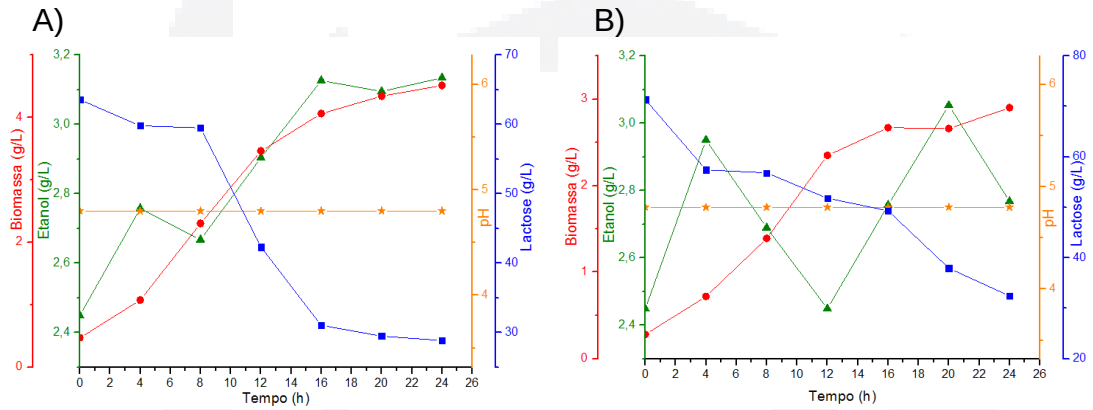
4.7 Resultado da fermentação do soro de ricota e permeado de soro de queijo em biorreator

Após concluído o planejamento experimental foram realizados dois testes em biorreator com a levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) empregando soro de ricota e permeado de soro de queijo autoclavados. A lactose dos dois meios de cultura foi ajustada para 100 g/L, porém após ser autoclavado e adicionado o inóculo foi realizada análise da lactose que apresentou concentração inicial de 63,54 g/L para soro de ricota e 71,36 g/L para o permeado de soro de queijo. Essa redução na lactose após ser autoclavada pode acontecer em razão de a hidrólise da

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

molécula e produção de outros compostos ou açúcares. Foram coletadas amostras a cada 4 horas e os resultados da fermentação da lactose, produção de etanol e biomassa em soro de ricota e permeado de soro de queijo são apresentados na Figura 18 A e B.

Figura 22 –Fermentação do soro de ricota com as leveduras:*Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) com soro de ricota autoclavado a 150 rpm: (A) Lactose 100 g/L, pH 4,8, temperatura 37º C; e com permeado de soro de queijo em (B) Lactose 100 g/L, pH inicial 4,8, temperatura 37º C.Resultados biomassa (●), lactose (■), etanol (▲) e pH (★).



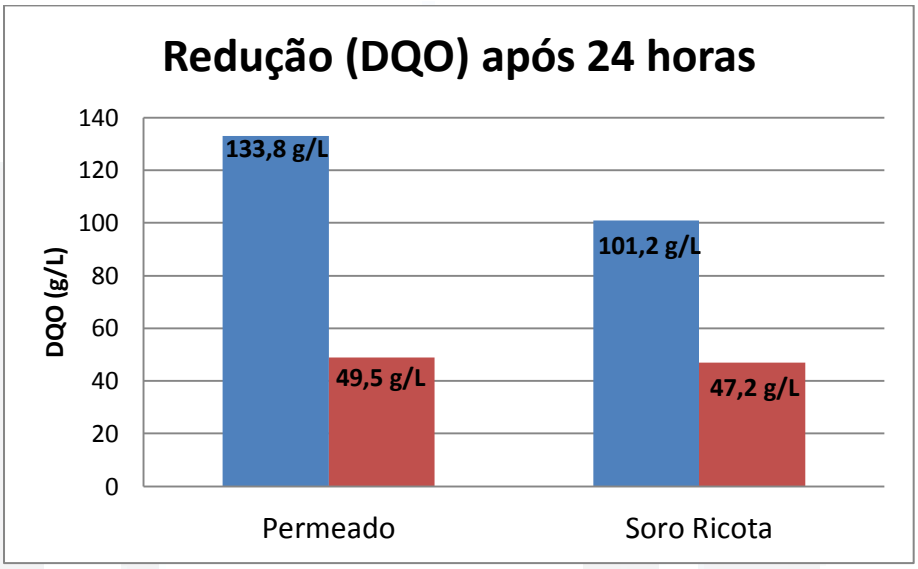
A fermentação da lactose presente no permeado de soro de queijo atingiu máxima fermentação em 24 horas, restando no meio de cultura 31,02 g/L. Com soro de ricota a fermentação da lactose atingiu máxima fermentação em 16 horas, restando ao final das 24 horas 32,43 g/L de lactose para ser fermentada. A produção de biomassa foi de 4,3 g/L com soro de ricota e 3 g/L com permeado de soro de queijo, a produção de etanol foi de 3,13 g/L e 3,05 g/L analisado por (CLAE) sendo detectado em concentrações reduzidas.

Ao final da fermentação foi coletada uma amostra composta do fermentado de soro de ricota e uma amostra de permeado de soro de queijo para análise de etanol. O rendimento foi de 32,6 mL de etanol/L para soro de ricota e 37,9 mL de etanol/L para permeado de soro de queijo, analisado por densímetro digital Mettler/Paar (DMA45).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

No início da fermentação foram coletadas duas amostras, uma de cada meio de cultura, para realização da análise de DQO, ao final da fermentação esse processo foi realizado novamente e os resultados da DQO em soro de ricota e permeado de soro de queijo são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Resultados de DQO inicial e final para soro de ricota e permeado de soro de queijo após 24 horas de fermentação em biorreator.



Fonte: o autor.

A análise do permeado de soro de queijo realizada no início da fermentação apresentou 133,8 g/L de DQO, após a fermentação de 24 horas a DQO detectada foi de 49,5 g/L. Já com soro de ricota a DQO de 101,2 g/L foi detectada no início da fermentação e ao final das 24 horas a DQO reduziu para 47,2 g/L. Nos dois cultivos foi possível observar a redução da DQO, porém ao final das 24 horas de fermentação ainda restava uma DQO elevada que possivelmente pode ser reduzida com o aumento do tempo de fermentação, atingindo níveis abaixo ou muito próximos ao limite estabelecido pela legislação CONSEMA nº 128 de 2006.

Ao avaliar a redução da DQO do soro de queijo Munari et al. (2013) alcançaram uma redução de aproximadamente 45% em 24 horas de fermentação. No presente trabalho, nesse mesmo período, foi possível atingir uma redução de 63% da DQO para fermentação da lactose em permeado de soro de queijo e em soro de ricota uma redução de 52,8%. A maior redução observada com permeado de soro de queijo e soro de ricota pode ser relacionada ao tipo de tratamento

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

empregado para preparação da fermentação e a matéria-prima ter passado por diferentes tratamentos.

A DQO mais elevada no permeado de soro de queijo no início da fermentação pode ser relacionada com a quantidade de lactose que era de 71,36 g/L, quando comparada ao soro de ricota, que apresentava lactose de 63,54 g/L. A redução da DQO nos dois meios de cultura pode ser relacionada com a fermentação da lactose, que é o principal precursor da DQO elevada nos resíduos lácteos.

4.8Estimativa de investimento para instalação e operação de ETE para o setor lácteo

Ao analisar o setor lácteo, um dos problemas mais aparentes está relacionado aos resíduos gerados pelos laticínios, entre eles o soro de ricota e permeado de soro de queijo. Esses resíduos não são tratados separadamente nas ETEs, sendo incorporados nas águas de lavagem dos equipamentos e a outros resíduos para tratamento. Segundo Matcalf e Eddy (2004), o custo de energia estimado para tratamento dos resíduos de laticínios é de aproximadamente R$ 0,11/m³. Uma empresa que gera 100 m³ de resíduo/dia em 30 dias terá um custo estimado de R$ 330,00 ao mês, acumulando em um ano R$ 3.960,00, com gastos em energia elétrica, sendo negligenciado nesse caso mão de obra e produtos químicos empregados no tratamento.

O investimento em instalação e em manutenção de ETE para tratamento de resíduos lácteos demanda de recursos financeiros e não gera receita para indústria (GOMES 2006). O mesmo autor, ao comparar investimento de dois sistemas para tratamento para 80.000 a 120.000 litros/dia de resíduos, considerou o sistema mais caro e o mais barato, que estão entre os quatro mais empregados mundialmente Tabela 1. Ao comparar os valores de investimento mais os valores de operação ao longo de 10 anos, Gomes (2006) constatou que o tratamento com filtro anaeróbico se torna viável, mesmo sendo mais cara a sua implantação Tabela 11.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Tabela 11 – Diferença de valores da implantação mais custo operacional durante 10 anos.

Sistema Tratamento	Investimento Instalação	Custo Tratamento 10 anos	Total 10 anos
Filtro Anaeróbico com Filtro Biológico e Percolador	1.197.134,78	R$ 317.436,20	1.514.570,98
Lodo Ativado	665.116,60	R$ 1.143.346,60	1.808.463,20

Fonte: adaptado pelo autor de (Gomes 2006). Valores atualizados segundo Fundação Economia Estatística (FEE) 2014.

A estimativa de custo é uma etapa importante para se conhecer a viabilidade de um processo industrial através da análise econômica que deve estar aliada à análise técnica do processo. A análise econômica de um processo estima os custos envolvidos no projeto, como: instalação, matéria-prima, mão de obra e utilidades (FORTUNATO 2012). A otimização mais eficiente deve incluir sempre custos de investimento e de operação de todas as unidades operacionais, isso é possível através da estimativa dos custos (SANTO 2007).

Segundo Nascimento e Ferrero (2007), na implantação de um sistema de tratamento de efluentes é necessário considerar diferentes aspectos para se obter uma eficiência favorável para a indústria. Entre os quais deve estar relacionada à área onde será instalada a ETE juntamente com outros fatores importantes como topografia do terreno e localização, pois deve estar próxima de um corpo receptor para o lançamento dos resíduos tratados, o solo tem que ser favorável à compactação para evitar maiores gastos com transposição. Além da análise da viabilidade econômica, que é fator extremamente importante no estudo, sendo necessário avaliar o tipo de resíduo e o custo para operação.

4.9 Estimativa de investimento em equipamentos para produção de etanol

A produção de etanol a partir da lactose presente no soro de ricota e permeado de soro de queijo surge como uma nova alternativa ao setor lácteo.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Diante disso foi realizada estimativa de investimento em equipamentos e instalação para fermentação de 100.000 litros/dia de soro de ricota ou permeado de soro de queijo para produção de etanol, que é apresentado na Tabela 12. A estimativa para instalação de usina para produção de etanol foi realizada conforme método sugerido por Peter e Thimerhaus (1991). Foi considerado que a usina deve ser instalada nos arredores da indústria, para evitar despesas com compra de terreno, desapropriação e transporte de resíduos.

No Anexo 1 é apresentada lista de equipamentos de laboratório pra manutenção da levedura, para o preparo do inóculo e equipamentos para implantação da usina com um investimento estimado de R$ 2.567.279,33. Já Araújo (2001) estimou o valor para implantação de usina semelhante e os valores atualizados pela FEE (2014) foram de R$ 2.851.979,16, sendo possível observar uma diferença nos valores, de R$ 284.699,83, porém essa diferença pode ser considerada aceitável por ser uma estimativa.

A estimativa para instalação da usina para produção de etanol foi realizada a partir do método proposto por Peter e Thimmeraus (1991), conforme Tabela 5, a partir de valores obtidos em pesquisa de preços realizada com fornecedores de equipamentos, conforme Anexo 1.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Tabela 12 – Estimativa de investimento necessário para instalar uma usina para fermentação de 100.000 litros/dia de resíduos lácteos

Componentes	Porcentagem	Custo R$
Compra de equipamentos*	100	R$ 612.715,83
Instalações dos equipamentos	0,47	R$ 287.976,44
Instrumentação e controles	0,18	R$ 110.288,85
Tubulação instalada	0,66	R$ 40mic4.392,74
Instalação elétrica	0,11	R$ 67.398,74
Edificações	0,18	R$ 110.288,85
Instalações para utilidades	0,7	R$ 428.901,08
Custo com engenharia e supervisão	0,33	R$ 202.196,22
Despesas de Construção	0,41	R$ 251.213,49
Contingência	0,1	R$ 61.271,58
Despesas com empreiteiros	0,05	R$ 30.635,79
Total Investimento		**R$ 2.567.279,33**

Fonte: Adaptado ao método de Peter e Timmerhaus (1991).

Se considerar a fermentação diária de 100.000 litros/dia com uma produção máxima de 37 mL/litro de etanol conforme resultado obtido em biorreator com permeado de soro de queijo, é possível produzir 3.700 litros de etanol/dia e 1.110.000 litros de etanol/mês. Estimando um lucro bruto de R$ 0,20 por litro geraria uma receita de R$ 22.200,00 mês. Em 10 anos a receita gerada atingiria R$ 2.660.400,00. Com soro de ricota e uma fermentação de 100.000 litros/dia a produção de etanol seria de 3.200 litros, considerando que em biorreator foram produzidos 32 mL/litro etanol por litro de soro. Com uma produção de 30 dias a produção de etanol atingiria 960.000 litro/etanol com uma receita mensal de R$ 19.200,00 mês.

A implantação do projeto baseado nas estimativas apresentadas se torna viável ao longo de 10 anos, para uma empresa que produz aproximadamente 100.000 litros de resíduo dia, mas é importante ressaltar que são necessários estudos mais detalhados quanto aos valores de investimento. O presente trabalho apresenta uma estimativa comparando valores da literatura para implantação de ETE e valores reais para a implantação da usina para produção de etanol. Apontando, ainda, a viabilidade do projeto na produção de etanol.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados no presente trabalho foi possível concluir que:

- As variações observadas em relação à composição físico-química dos diferentes lotes analisados de soro de ricota podem ser consequência da composição do leite empregado para fabricação do queijo e da ricota.

- A levedura *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 46537) teve a melhor resposta na conversão da lactose do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol.

- A fermentação da lactose presente no soro de ricota e permeado de soro de queijo apresentou melhor rendimento com meio de cultura autoclavado.

- Tanto para o soro de ricota como para o permeado de soro de queijo a melhor resposta da fermentação ocorreu em temperaturas entre 35 e 45º C com pH inicial entre 4 e 5, nessas condições a fermentação da lactose foi mais rápida e a produção de etanol foi maior.

- A fermentação da lactose em etanol no biorreator de bancada diminuiu consideravelmente a DQO do soro de ricota e do permeado de soro de queijo.

- A estimativa de investimento em uma ETE é inferior em relação à estimativa de implantação de uma usina para produção de etanol, porém a usina pode ser viável pela possibilidade de geração de receita, na ETE os resíduos são tratados e descartados, a usina os resíduos são beneficiados e transformados em novos produtos.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

6. BIBLIOGRAFIA

ALBUQUERQUE, L. C.; CASTRO, M. L. D. **Queijos finos: origem e tecnologia – estatística do mercado de leite e queijos.** Juiz de Fora: EPAMIG/CEPE/ILCT, 1995.

ALMEIDA, E. S. **Tratamento do efluente da indústria de queijos por processos biológicos e químicos**. 2004. 81 f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Estadual de Campinas, 2004.

ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; VENETSANEAS, K.; LYBERATOS, G. **Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process.** Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 47, n. 15, p. 5227-5233, 2008.

ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P. **Influência da Adição da Fécula de Batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) Sobre a Viscosidade do Permeado de Soro de Queijo.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 22, n. 3, p. 249-253, 2002.

ARAÚJO, E. H. **Redução na poluição dos laticínios, pela transformação da lactose do soro de queijo em etanol.** XXIX Cobenge: Congresso Brasileiro de Educação em Engenharia, PUCRS, 2001, Porto Alegre.

AZEVEDO, D. B.; GIANLUPPI, L. D. F.; MALAFAIA, G. C. **Os custos ambientais como fator de diferenciação para as empresas.** Perspectiva Econômica, v. 3, n. 1, p. 82-85, 2007.

BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; RUVER, G. S. **Desmineralização do soro de leite através da eletrodiálise.** In: Seminário do programa de pós-graduação em engenharia química, 2009, Porto Alegre. Anais VIII Oktoberforum – PPGEQ, 2009.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. **Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration.** Desalination, v. 278, n. 1-3, p. 381–386, 2011.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, A. P. **Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentration: Part I – Yeasts in general.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 14, n. 6, p. 809-821, 1998.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R**. Isolation of termotolerant, fermentative yeasts growing at 52º C and producing ethanol at 45º C and 50º C.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 8, n. 3, p. 259-263, 1992.

BARBOSA, A. S.; FLORENTINO, E. R.; FLORENCIO, I. M.; ARAUJO, A. S. **Utilização do Soro como Substrato para produção de Aguardente: Estudo Cinético da Produção de Etanol.** Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil) v. 5, n.1, p. 07, 2010.

BARILE, D.; TAO, N.; LEBRILLA, C. B.; COISSON, J. D.; ARLORIO, M.; GERMAN, B. J. **Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides.** International Dairy Journal, v. 19, n. 12, p. 524-530, 2009.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite.**15º ed., São Paulo. Ed. Nobel. 1991. 320p.

BELÉM, M. A. F.; LEE, B. H. **Oligosaccharides extracted from cell walls of *Kluyveromyces marxianus* grow on whey.** v. 12, n. 3, p. 229-233, 1998.

BEUCLER, J.; DRAKE, M.; FOEGEDING, A. E. **Design of a Beverage from whey permeate.** Journal of Food Science,v. 70, n. 4, p. 277-285, 2005.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A.; KALIL, S. J. **Formulation of culture médium with agroindustrial waste for r β-Galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045.** Food Bioprocess Technology, v. 5, n. 5, p. 1653-1663, 2012.

Biochemistry Analyser. **YSY 2700 select.** User's Manual. http://biomed.tamu.edu/BioSyM/2700_select_manual.pdf . Acesso em 5 agosto 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Boletim Técnico Biotecnologia Agropecuária**, 2010.

BRASIL. LEI Nº 10.203, DE 22 DE FEVEREIRO DE 2001. Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos, 2001.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. **Cheese whey wastewater: Characterization and treatment.** Science of the total Environment, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

CARVALHO, M. P. **Soro de leite uma oportunidade desperdiçada in: A cadeia produtiva do leite 40 capítulos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 2005

CHRISTENSEN, A. D.; KÁDÁR, Z.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; THOMSEN, M. H. **Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*.** Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, v 38, n. 2, p. 283-289, 2010.

CONAMA - **CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução Nº 357, de 17 de Março de 2005.** Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.

CONAMA - **CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução Nº 430, de 13 de Maio de 2011.** Publicada no DOU nº 92 de 16/05/2011, págs. 89.

CONSEMA – **CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução Nº 128, 2006.** Publicado no DOE do dia 07 de dezembro de 2006. Secretaria de Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul.

CRUZ, J. C. F. **Produção de Biocombustíveis: Consideração de Alguns Possíveis Impactos do Aumento da Produção e Área Plantada Sobre a Economia Leiteira.** VII EMPPEX. 2011.

DALLAS, P. **Uso de Derivados do Soro em Aplicações de Produtos de Consumo.** Revista Leite e Derivados, v. 8, n. 46, p. 48-50, 1999.

DINIZ, R. H. S. **Metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV e *Kluyveromyces lactis JA6.*** Dissertação de mestrado, 2009.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A. **Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation.** Food Chemistry, v. 112, n. 4, p. 929-935, 2009.

EMBRAPA. Disponível em http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao.php. Acesso em 15/14/2013.

FAAIJ, A. P. C. **Bio-energy in Europe: changing technology choices.** Energy Policy, v. 34, n. 3, p. 322-342, 2006.

FAO, Food and Agricultural Organization. Disponível em http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e10.htm. Acesso 30 de agosto de 2013.

FEE, Fundação de Economia e Estatística. Disponível em http://www.fee.tche.br/sitefee/pt/content/capa/index.php. Acesso 28/01/2014.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e Práticas** - 2 ed. – Tradução: Oliveira, F. C. et al; Porto Alegre: Artmed, pp. 153 – 181, 2006.

FERREIRA, I. C. S. **Tratamento terciário da indústria de laticínios através da adsorção de lactose em argila esmectítica.** 2007. 94 f. dissertação mestrado – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2007.

FISPQ - **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico, Produto: Álcool Etílico Hidratado e Combustível**. 03/01/2011 Nº FISPQ: BR0029.

FISPQ - **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico, Produto Gasolina Comum**. 06/09/2012 Nº FISPQ: BR0051.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

FLORENTINO, E. R. **Aproveitamento do soro de queijo de coagulação enzimática.** Tese de Doutorado em Engenharia Química, 150 f. – UFRN, Natal, RN, 2006.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. **The yeast *Kluyveromyces marxianus,* and its biotechnological potential.** Applied Microbiology Biotechnology, v. 79, n. 3, p. 339-354, 2008.

FORTUNATO, M. R. C. **Utilização do simulador superpro designer® para avaliação do aproveitamento de soro de queijo para a produção de etanol.** Escola de Química/UFRJ. Dissertação de mestrado, 2012.

FURTADO, M. A. M.; POMBO, W. **Quantificação do soro de queijo adicionado ao leite pasteurizado através da determinação do número de caseína.** Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes, n. 42, n. 206, p. 3-11, 1988.

GHALY, A. E.; KAMAL, M.; AVERY, A. **Influence of temperature rise on kinetic parameters during batch propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey under ambient conditions.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 19, n. 7, p. 741-749, 2003.

GHASEMI, M.; NAJAFPOUR, G.; RAHIMNEJAD, M.; BEIGI, P. A.; SEDIGHI, M.; HASHEMIYEH, B. **Effect of different media on production of lactic acid from whey by Lactobacillus bulgaricus.** African Journal of Biotechnology, v. 8, n. 1, p. 81-84, 2009.

GOLDEMBERG, J.; MACEDO, I. C. **The Brazilian alcohol program – An overview".** Energy for Sustainable Development, v. 1, n.1, p. 17-22, 1994.

GOMES, A. L. **Análise técnica e econômica de filtro anaeróbico utilizado para tratamento de efluentes líquidos de uma indústria de laticínios – Estudo de caso.** Dissertação de mestrado, 2006, Belo Horizonte.

GRBA, S.; STEHLIK-TOMAS, V.; STANZER, D.; VAHÈIAE, N.; ŠKRLIN, A. **Selection of Yeast Strain *Kluyveromyces marxianus* for Alcohol and Biomass Production on Whey.** Chemistry & Biochemistry Engineering Quarterly, v.16, n.1, p.13–16, 2002.

GUIMARÃES, P. M.; R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. **Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey.** Biotechnology Advances, v. 28, n. 3, p. 375-384, 2010.

GUO, X.; ZHOU, J.; XIAO, D. **Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation.** Applied Biochemistry Biotechnology, v. 160, n. 2, p. 532-538, 2008.

HANSEN, D. R.; MOWEN, M. M. **Gestão de custos: contabilidade e controle.** 1º edição, São Paulo 2003.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4º ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1018 p. 2008.

KÁDÁR, Z.; CHRISTENSEN, A. D.; THOMSEN, M. H.; BJERRE, A. B. **Bioethanol production by enzymes from rye and wheat with addition of organic farming cheese whey.** Fuel, v. 90, n. 12, p. 3323 – 3329 2011.

KARGI, F.; OZMIHCI, S. **Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters.** Enzyme and Microbial Technology, v. 38, n. 7, p. 711-718, 2006.

KASSA, A.; BROWINBRIDGE, M.; PARKER, B. L.; SKINNER, M.; GOULI, V.; GOULI, S.; GUO, M.; LEE, F.; HATA, T. **Whey Form Mass Production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae.*** Mycological Research, v.112, n. 12, p. 583-591, 2008.

KIENDL, P. Dairy: World Markets and Trade. **United States Department of Agriculture**, 2005. Disponível em http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2005/05-12dairy/cheesep.pdf. Acesso em 17.07.2013.

KIRSCH C.; STIEVEN A.; SOUZA, C. F. V.; BECCHI, C. S.; LEHN, D. N. **Avaliação Físico Química e Microbiológica de Queijo Prato Produzido no Vale do Taquari.** Disponível em: http://www.pucrs.br/research/salao/2006-VIISalaoIC/Arquivos2006/CienciasExatasedaTerra/36394%20-%20CLAUDETE%20KIRSCH.pdf. Acesso 13/01/2014.

KISIELEWSKA, M. **Biogas. Feasibility of Bioenergy Production from Ultrafiltration Whey Permeate Using the USAB Reactors.** Intech, 2012.

KOSIKOWSKI, F. V. **Whey utilization and products.** Journal Dairy Science. v. 62, n. 7, p. 1149-1160, 1979.

KOUSHKI, M.; JAFARI M.; AZIZI, M. **Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains.** Association of Food Scientists & Technologists, Índia, v. 49, n. 5, p. 614 - 619, 2011.

LAUTENSCHLAGER, S. R. **Otimização do processo de ultrafiltração no tratamento avançado de efluentes e águas superficiais.** Tese de Doutorado, 2006, São Paulo.

LEWANDOWSKA, M.; KUJAWSKI, W. **Ethanol production from lactose in a fermentation/pervaporation system.** Journal of Food Engineering, v. 79, n. 2, p 430-437, 2007.

LIN, Y.; TANAKA, S. **Ethanol fermentation from biomass resouces: current state and prospects.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2006.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

LING, K. C. **Whey to Ethanol: A Biofuel Role for Dairy Cooperatives?** USDA Rural Development, Research Report 214, 2008.

LONGHI, L. G. S.; LUVIZETTO, D. J.; FERREIRA, L. S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; SECCHI, A. R. **A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 31, n.1, p. 35-40, 2004.

LOSER, C.; URIT, T.; NEHL, F.; BLEY, T. **Screening of *Kluyveromyces marxianus* strains for the production of ethyl acetate: Design and evaluation of a cultivation system.** Engineering in Life Sciences v. 11, n. 4, p. 369-381, 2011.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. **Fed-batch fermentatiom for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on lactose-based medium.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 32, n. 5, p. 284-288, 2005

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. **Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier.** Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, v. 30, n. 12, p. 715-720, 2003.

MAGANHA, M. F. B. **Guia Técnico Ambiental da Indústria de Produtos Lácteos Série P+L. São Paulo**: CETESB, 2008. 95 p.

MAZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; SKOVRONSKI, A.; OLIVEIRA, D.; LUCIO, M. D.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F.; TREICHEL, H. **Optimization of inulinaze production by solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor**. Journal of the food and agriculture, v. 85, n, 1, p. 109-114, 2010.

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

MENEZES, A. D. S. **Processo biotecnológico para aproveitamento do soro obtido na produção de queijo coalho**. Dissertação de mestrado, 88 p. Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, Sergipe. 2009.

MESOMO, M.; SILVA, M. F.; BONI, G. P. F. F.; MAZUTTI, M.; MOSSI, A.; O. D.; CANSIAN, R. L.; LUCCIO, M. D.; TREICHEL H. **Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* from cheese whey: production optimisation and rheological characterization.** Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, v. 89. n. 14, p. 2440-2445, 2009.

MILKPOINT. Disponível em http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/producao mundial.htm. Acesso em 31 de maio de 2013.

MILLER, G. L. **Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

MILLS, O. **Sheep dairying in Britain-a future industry.** International Journal of Dairy Technology, v. 39, n. 3, p. 88-90, 1986.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering Treatment and Reuse**. Fourth edition, International Edition, 2004.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G.,C. **Applied Statistics and Probability for Engineers.** John Wiley and Sons, 1994.

MUNARI, C. S.; MORAES, D. C.; BUENO, G. F.; DEL BIANCHI, V. L. **Avaliação da redução na poluição dos laticínio, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus.*** Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes, v. 68, n. 393, p. 42-50, 2013.

NAJAFPOUR, G. D.; KOMEILI, M.; TAJALLIPOUR, M.; ASADI, M. **Bioconversion of cheese whey to methane in an upflow anaerobic packed bed bioreactor.** Chemical and Biochemical Engineering, v. 24, n. 1, p. 111-117, 2010.

NASCIMENTO, M. S. F.; FERREIRA, O. M. **Tratamento de esgoto urbano: comparação de custos e avaliação da eficiência.** Departamento de Engenharia – Universidade católica de Goiás 2007.

NOGUEIRA, L. A. H. **Bioetanol de Cana-de-Açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. BNDES/ CGEE, 2008. Disponível em:<http://www.bioetanoldecana.org/>. Acesso em 14/01/14.

ODA, Y.; NAKAMURA, K.; SHINOMIYA, N.; OHBA, K. **Ethanol fermentation of sugar beet thick juice diluted with crude cheese whey by the flex yeast *Kluyveromyces marxianus* KD-15.** Biomass and Bioenergy, v. 34, n. 8, p. 1263-1266, 2010.

OECD. **The Bioeconomy to 2030 Designing a policy Agenda.** Organisation for economic co-operation and development, 2009.

ORNELLAS, L. H. **Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

OZMIHCI, S. KARGI, F. **Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: effects of hydraulic residence time.** Bioprocess Biosyst Biotechnology, v. 30, n. 2, p. 79-86, 2006.

OZMIHCI, S. KARGI, F. **Ethanol fermentation of cheese whey powder soluction by repeated fed-batch operation.** Enzyme and Microbial Technology, v. 41, n. 1-2, p. 169-174, 2007.

OZMIHCI, S. KARGI, F. **Ethanol production from cheese whey powder solution in apacked column bioreactor at different hydraulic residence times.** Biochemical Engineering Journal, v. 42, n. 2, p. 180-185, 2008.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

OZMIHCI, S. KARGI, F. **Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: effects of feed sugar concentration.** v. 84, n. 1, p. 106-111, 2009.

PARONDO, J.; GARCÌA, L.; DÍAS, M. **Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 26, n. 3, p 445-456, 2009.

PESTA, G.; MEYER-PITTROFF, R.; RUSS, W. **Utilization of whey.** Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry, v. 3, p. 193-207, 2007.

PETER, M. S.; TIMMERHAUS, K. D. **Plant Design and Economics For Chemical Engineers.** Fourth Edition, 1991, Singapore.

PISPONEN, A.; PAJUMÄGI, S.; MOOTSE, H.; KARUS, A. POIKALAINEM, V. **The lactose from ricotta cheese whey: the effect of pH and concentration on size and morphology of lactose crystals.** Dairy Science & Thecnology. v. 93, n. 4-5, p. 477-486, 2013.

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

RECH, R.; AYUB, M. A. Z. **Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey.** Process Biochemistry, v. 42, n. 5, p. 873-877, 2007.

RIBEIRO, M. S.; GRATÃO, Â. D. **Custos ambientais – o caso das empresas distribuidoras de combustíveis**. Anais do VII Congresso Brasileiro de Custos 2000, Recife.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento experimental & otimização de processos.** Campinas: 2º ed. Cárita, 2009.

ROSENBERG, M.; **Current and future applications for membrane processes in dairy industry.** Trends in Food Science and Technology, v. 6, n. 1, p. 12-19, 1995.

SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRO, V. IORIO, G. **Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source.** Biomass and Bioenergy, v. 33, n.12, p. 1687-1692, 2009.

SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRO, V. IORIO, G. **Optimization of ricotta cheese whey (RCW) fermentation by response surface methodology.** Bioresource Technology, v. 101, n. 23, p. 9156-9162, 2010a.

SANSONETTI, S.; CURCIO, S; CALABRO, V. IORIO, G. **Evaluation of the parameters effects on the bio-ethanol production process from Ricotta Cheese Whey.** Chemical Engineering Transactions, v. 20, p. 13-18, 2010b.

SANSONETTI, S.; HOBLEY, T. J.; CALABRÒ, V.; VILLADSEN, J. SIN, G. **A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces***

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

***marxianus*: A batch fermentation and kinetic study.** Bioresource Technology, v.102, n. 16, p. 7513-7520, 2011.

SARACENO, A.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V. IORIO, G. **A hybrid neural approach to model batch fermentation of "ricota cheese whey" to ethanol.** Computers and Chemical Engineering, v. 34, n. 12, p. 1590-1596, 2010.

SANTOS, L. M. G.; GONÇALVES, J. M.; JACOB, S. C. **Determinação simultânea de As, Cd e Pb em amostras de água purificada para hemodiálise por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, após otimização multivariada baseada no uso de planejamento experimental.** Química Nova, v. 31, n. 5, p. 975-979, 2008.

SANTO, I. A. C. P. E. **Desenho óptimo de estações de águas residuais através da modelação de funções custo.** Universidade do Minho. Tese de doutorado, 2007.

SCHAFFRATH, R.; BREUNIG, K. D. **Genetic and Molecular Physiology of the Yeast *Kluyveromyces lactis.*** Fungal Genetic and Biology, v. 30, n. 3, p. 173-190, 2000.

SEBRAE. **Uso de resíduos e dejetos como fonte de energia renovável.** Unidades Sebrae no Brasil, 2008.

SEBRAE. **Diagnóstico da Pecuária Leiteira**. Gurupi TO – Semear Consultoria, 2006.

SEBRAE. **Queijos Nacionais Estudos de Mercado Sebrae/ESPM**. **Serviço** Brasileiro de Apoio as Micro e Pequenas Empresas – Sebrae 2008.

SERPA, L.; PRIAMO, W. L.; REGINATTO, V. **Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijarias e Análise de Viabilidade Econômica.** 2º International Workshop Advances in Cleaner Production, 2009.

SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. J. V.; MONTOVANI, F. M. L.; PASSOS, F. M. L. **Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UHV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as function of lactose concentration and oxygen levels.** Enzyme and Microbial Thechnology, v. 36, n. 7, p. 930-936, 2005.

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

SOUSA, D. P.; MATTOS, W. R. S.; NUSSIO, L. G.; MARI, L. J.; RIBEIRO, J. L.; SANTOS, M. C. **Efeito de aditivo químico e inoculantes microbianos na fermentação e no controle da produção de álcool em silagens de cana-de-açúcar.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.37, n.9, p.1564-1572, 2008.

STANDARD METHODS for the examination of water and wastewater. Preparado e publicado por APHA/AWWA/WEF. 21 ed. 1368 p. 2005.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

TEIXEIRA, S. M. B. **Elaboração de Bebida Láctea Fermentada Utilizando Soro de Ricota.** 63pg. Dissertação Mestrado em Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

TINOCO, J. E. P.; KRAEMER, M. E. P. **Contabilidade Gestão Ambiental**. Editora Atlas, São Paulo 2008.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.; VANZO, L. T.; RAUBER, F.; LUCCIO, M. D.; TREICHEL, H. **Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 89, n. 6, p. 1060-1065, 2009.

VAZQUEZ, D. G.; MONDRAGÓN, A. F.; RODRIGUEZ, L. A.; FLORES, R. E. **Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH.** International Journal for Hydrogen Energy, v. 33, n. 19, p. 4989-4997, 2008.

VIENNE, P.; STOCKAR, U. V. **Metabolic, physiological and kinetic aspects of the alcoholic fermentation of whey permeate by *Kluyveromyces fragilis* NRRL 665 and *Kluyveromyces lactis* NCYC 57.** Enzyme Microbial Technology, v. 7, n. 6, p. 287-294, 1984.

VON SPERLING, M.; VAN HAANDEL, A. C.; JORDÃO, E. P.; CAMPOS, J.; R. CYBIS, L. F.; AISSE, M. M.; SOBRINHO, P. A. **Princípios do tratamento de águas residuárias.** 3º ed. , v. 1. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005.

WISSMANN, M. A.; FOLLMANN, A. F.; RACHOW, N. I. O. **Custos Ambientais: Análise de sua Incidência e Importância na Busca da Ecoeficiência em Uma Indústria de Queijo.** Custo e @gronegócio online – v. 8, n. 3, p., 2-22, 2012.

ZAFAR, S.; OWAIS, M. **Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*.** Biochemical Engineering Journal, v. 27, n. 3, p. 295-298, 2006.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

ANEXO 1

Equipamento	Quantidade	Investimento R$
Tanques de fermentação aço ASI 316	3	390.000,00
Biorreator laboratorial	1	94.364,00
Destilador álcool	1	76.000,00
Espectrofotômetro	1	19.173,00
Capela de fluxo	1	12.586,27
Autoclave	1	5.550,85
Destilador álcool laboratorial	1	4.372,00
Geladeira	1	3.861,47
Pipetadora automática de 1 mL	1	1.279,30
Agitador tubos	1	1.195,00
Balança	1	1.205,71
Destilador água	1	868,83
Banho-maria	1	603,35
Estufa bacteriológica	1	603,35
Barrilete para água destilada (capacidade 10 L)	1	362,00
Proveta de vidro de 1 L	5	210,55
Erlenmeyers de vidro (1000 mL) com tampa	5	176,00
Proveta de vidro (300 mL)	5	109,75
Erlenmeyers de vidro (250 mL)	10	66,90
Ponteiras para pipetadora automática de 1 mL	1000	45,00
Espátulas de pesagem	6	42,00
Alça de drigalski	3	24,00
Tubos de ensaio de vidro (20 mL)	10	16,50
	Total:	**612.715,83**