



Universidade Norte do Paraná

MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE

TARLLIS CAROLINA ALVARES DA SILVA CAMPOS

**UTILIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO NA PRODUÇÃO DE
ETANOL POR *SACCHAROMYCES FRAGILIS* E
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Londrina
2012

TARLLIS CAROLINA ALVARES DA SILVA CAMPOS

**UTILIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO NA PRODUÇÃO DE
ETANOL POR *SACCHAROMYCES FRAGILIS* E
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade
Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia
do Leite.

Orientador: Prof. Dr. Hélio H. Suguimoto

Londrina
2012

TARLLIS CAROLINA ALVARES DA SILVA CAMPOS

**UTILIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO NA PRODUÇÃO DE
ETANOL POR *SACCHAROMYCES FRAGILIS* E
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Dissertação aprovada, apresentada à UNOPAR - Universidade Norte do Paraná, no Mestrado Acadêmico de Ciência e Tecnologia do Leite, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite, com nota final igual a _____, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto
Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Cláudio Takeo Ueno
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig, Ph.D.
Universidade Norte do Paraná

Londrina, 06 de dezembro de 2012.

Dedico este trabalho aos meus familiares que tanto me apoiaram na realização e conclusão deste curso.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Hélio Sugimoto, meu orientador que me auxiliou durante este trabalho.

À Professora Flávia Clochet que, com paciência e disponibilidade ajudou-me na revisão deste trabalho.

A todos os professores que contribuíram e apoiaram este projeto.

À minha família e amigos que, com paciência estiveram ao meu lado neste período da minha vida.

Ao meu noivo Rafael Tomazi Vilela pelo incentivo e compreensão.

A todos os estagiários que estiveram ao meu lado, trabalhando nas análises deste projeto: Bruno, Geysi e Mariana.

À UNOPAR que cedeu equipamentos e materiais para a realização das análises, bem como seus funcionários que, direta ou indiretamente participaram deste momento acadêmico.

A Deus que nos permite todas as realizações.

“Tudo posso Naquele que me fortalece”
(Filipenses 4:13)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Seleção de linhagens de *Saccharomyces fragilis* em soro de queijo (A) e de *S. cerevisiae* em glicose 5% (B).....33
- Figura 2. Determinação do tempo de produção de etanol por *S. fragilis* a partir da lactose presente em soro de queijo.....33
- Figura 3. Determinação do tempo de produção de etanol por *S. cerevisiae* em glicose 5%.....34
- Figura 4. Produção de etanol por *S. fragilis* (SF) e *S. cerevisiae* (SC) em meios contendo diferentes açúcares.....36
- Figura 5. Produção de etanol por *S. cerevisiae* (linhagem SC4) em diferentes concentrações de glicose.....37
- Figura 6. Produção de etanol por *S. fragilis* (SF) e *S. cerevisiae* (SC) em lactose e soro de queijo hidrolisados e não-hidrolisados. * Concentração de lactose no leite foi de 4,8%.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de produção de etanol por <i>S. fragilis</i> e <i>S. cerevisiae</i> em diferentes meios de cultura.....	38
---	----

CAMPOS, Tarllis Carolina Alvares da Silva. **Utilização do soro de queijo na produção de etanol por *Saccharomyces fragilis* e *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite), Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2012.

RESUMO

O soro de queijo é um expressivo subproduto da indústria láctea, seja pelo volume gerado e sua carga poluidora quanto pelo baixo valor comercial. A utilização do soro como meio de fermentação é estudada há décadas, mas atualmente há um interesse maior, pois a produção de etanol por diferentes fontes de açúcares tem sido estimulada pela crescente necessidade mundial de energia. Este trabalho tem como objetivo avaliar a produção de etanol a partir de soro de queijo, pelas leveduras *Saccharomyces fragilis* (SF) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC). Das sete linhagens de *S. cerevisiae* testadas em meio de glicose 5%, cinco (SC1, SC4, SC5, SC7, SC8) apresentaram produção de etanol semelhante (4,72; 5,1; 4,9; 4,8 e 4,7%, v/v, respectivamente), sendo a linhagem SC4 selecionada para os demais testes. O tempo ótimo, ou seja, o período em horas em que a levedura atingiu a maior taxa de produção de etanol foi de 12 horas para SF e de 8 horas para SC. Quando comparados diferentes meios fermentativos (lactose, glicose, galactose, glicose+galactose, sacarose e sacarose+glicose), observou-se a especificidade das leveduras por alguns açúcares. *S. fragilis* apresentou boa capacidade de fermentação em todos os meios testados, porém com maior produção de etanol em lactose (3,6% v/v). De modo geral, *S. cerevisiae* apresentou menor produção de etanol (3% em sac+gli) e não teve atividade em meio contendo lactose, comprovando-se a inabilidade da levedura em consumir este dissacarídeo. Ao avaliar a atividade das leveduras em soro de queijo e lactose P.A. hidrolisados e não-hidrolisados, observou-se que *S. fragilis* apresentou boa atividade de fermentação em todos os meios, com produção máxima de etanol de 3,6% (v/v) em soro de queijo hidrolisado. *S. cerevisiae* só apresentou atividade de fermentação nos meios hidrolisados, porém com baixa produção de etanol (máximo de 1,3% v/v). Portanto, observou-se que em todas as avaliações, *S. fragilis* produziu mais etanol do que *S. cerevisiae*. Com os resultados obtidos pretende-se subsidiar o desenvolvimento de uma tecnologia que permita tornar viável, tecnológica e economicamente, a produção de etanol a partir do soro de queijo.

Palavras-chave: 1.Lactose 2.Soro de queijo3.Leveduras 4.Etanol

CAMPOS, Tarllis Carolina Alvares da Silva. **Use of cheese whey in ethanol production by *Saccharomyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite), Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Cheese whey is a significant by-product of the dairy industry, due the generated volume and the pollutant load, or its low commercial value. The use of whey as a fermentation medium has been studied for decades, but now there is more interest, because ethanol production by different sources of sugars has been stimulated by the increasing global need for energy. This study aims to evaluate the production of ethanol from cheese whey, by *Saccharomyces fragilis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. For seven *S. cerevisiae* strains tested, five (SC1, SC4, SC5, SC7, SC8) had similar ethanol production (4.72; 5.1; 4.9; 4.8 e 4.7% v/v, respectively), the strain SC4 was selected for other tests. The optimal time for ethanol production by SF was 12 hours, and by SC was 8 hours. Comparing different fermentative media (lactose, glucose, galactose, glucose+galactose, sucrose+glucose), we observed the specificity of some yeasts by sugars. *S. fragilis* showed good fermentation capacity in all media tested, but higher ethanol production was observed in lactose (3.6% v/v). In general, *S. cerevisiae* presented low production of ethanol (3% v/v in glucose+sucrose), and no activity in lactose, confirming the inability of these yeast to consume this disaccharide. The activity of the yeasts on cheese-whey and lactose (hydrolysed and non-hydrolyzed), was good for *S. fragilis* in all fermentation media, with maximal production of ethanol in whey hydrolyzed (3.6% v/v). Fermentation activity by *S. cerevisiae* occurred only in hydrolyzates media, with lower ethanol production (1.3% v/v). In general, *S. fragilis* produced more ethanol than *S. cerevisiae*. From these results, it is intended to support the development of a technology providing viable, technologically and economically, the production of ethanol from whey.

Key-words: 1.Lactose 2.Cheese whey 3.Yeast 4.Ethanol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 Geral	11
2.2 Específicos	11
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1 Aspectos gerais do soro de queijo	12
3.2 Lactose.....	14
3.3 Hidrólise da lactose	15
3.4 Fermentação	16
3.5 Produção de etanol e o uso de soro de leite como alternativa a demanda energética.....	17
REFERÊNCIAS.....	20
4 ARTIGO CIENTÍFICO	23
4.1 Introdução.....	25
4.2 Material e Métodos.....	26
4.2.1 Procedimentos experimentais.....	28
4.2.2 Determinações analíticas	30
4.3 Resultados e Discussão	32
4.4 Considerações Finais.....	39
Referências	40

1 INTRODUÇÃO

O soro de queijo é um expressivo subproduto da indústria láctea, seja pelo volume gerado e sua carga poluidora, quanto pelo baixo valor comercial. No passado, a maior parte deste resíduo era descartada como efluente sem que houvesse aproveitamento de seus constituintes, muitas vezes este descarte era feito sem antes passar por um tratamento, constituindo-se assim em poluente ambiental. Atualmente, esta prática é proibida pelas leis ambientais e uma alternativa é o uso de novas tecnologias disponíveis para o reaproveitamento do soro de queijo e de seus nutrientes, associada à diminuição de sua carga poluente.

A utilização do soro lácteo como meio de cultura tem sido estudada há décadas. Sua composição e seu alto teor em lactose fazem do soro um substrato de fermentação muito viável, desde que seja utilizado um microrganismo adequado.

A produção de etanol tem sido estimulada pela crescente necessidade mundial de energia. Neste sentido a fermentação do soro de queijo, apesar de ser um tema já estudado, ainda requer o desenvolvimento de melhores métodos e condições para a conversão do soro de queijo em etanol. Faz-se necessário melhorar a eficiência e o rendimento do produto, uma vez que a matéria prima é barata, podendo gerar retorno financeiro com a sua comercialização.

Entretanto, uma das dificuldades do processo fermentativo é a baixa tolerância de algumas espécies de leveduras fermentadoras de lactose, a altas concentrações de etanol. Deste modo, a associação de leveduras com diferentes níveis de tolerâncias ao etanol, surge como uma possibilidade viável para aperfeiçoar o processo de produção de etanol, a partir de soro de queijo. Porém, faz-se necessário elucidar os processos de crescimento destas leveduras em soro de queijo, bem como a produção de etanol em meio contendo lactose.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a produção de etanol a partir de soro de queijo pelas leveduras *Saccharomyces fragilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 Específicos

- Selecionar algumas linhagens de *Saccharomyces fragilis* e *Sacharomyces cerevisiae*, quanto a maior produção de etanol.
- Analisar a curva de crescimento e determinar o tempo ótimo, ou seja, o período em horas em que as leveduras *S. fragilis* e *S. cerevisiae* atingiram a maior taxa de produção de etanol através de fermentação em soro de queijo.
- Avaliar a produção de etanol das leveduras *S. fragilis* e *S. cerevisiae* em diferentes meios de cultura.
- Verificar o efeito da hidrólise da lactose P.A. e da lactose do soro de queijo na produção de etanol pelas leveduras *S. fragilis* e *S. cerevisiae*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais do soro de queijo

Dentre as atividades industriais, o setor de alimentos destaca-se pelo seu elevado consumo de água e pela expressiva geração de efluentes por unidade produzida. A indústria láctea é um exemplo, onde as operações geram grande volume de efluente com elevada carga poluidora (COSTA, 2008).

O soro de queijo é a fração solúvel do leite que se separa durante a precipitação da caseína ou da fabricação de queijos, cuja composição varia de acordo com a composição do leite e com o processo de fabricação dos diversos tipos de queijos (COSTA, 2008). Segundo dados da associação Brasileira das Indústrias de Queijo – ABIQ, para se fabricar 1Kg de queijo, cerca de 9Kg de soro são gerados (LENCASTRE, 2011).

Pode ser obtido na indústria ou no laboratório por três processos diferentes: a coagulação enzimática (enzima quimosina) resultando no coagulo de caseína, precipitação ácida no pH isoelétrico, resultando na caseína isoelétrica que é transformada em caseinatos e em soro ácido, e separação física das micelas por microfiltração, podendo obter-se concentrado de micelas e as proteínas do soro na forma de concentrado ou isolado protéico (OLIVEIRA, 2008).

A separação das caseínas do leite origina as proteínas do soro, definidas como as proteínas que permanecem solúveis após a coagulação das caseínas em pH 4,6 a 20°C. As proteínas do soro somam cerca de 20% das proteínas totais do leite, sendo 80% delas representadas pelas caseínas (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Estas proteínas solúveis possuem um dos mais altos índices de valor biológico em comparação a outras fontes de proteínas. O teor de aminoácidos essenciais é maior do que os de quaisquer outras fontes, contendo níveis extremamente altos de leucina e lisina, além de constituir uma boa fonte de cisteína e metionina (VALDUGA, 2006).

Aproximadamente 80% do volume de leite destinado à fabricação de queijos transformam-se em soro. O soro de queijo contém metade do extrato seco do leite, representado por lactose, proteínas solúveis e sais, sendo a lactose o constituinte presente em maior quantidade (LENCASTRE *et al.*, 2011).

Calculam-se uma produção de 75 milhões de toneladas anuais de soro

lácteo no continente Europeu, 27 milhões na América do Norte e 8 milhões em outras áreas do planeta, num total de aproximadamente 110 milhões de toneladas (RODRIGUES, 2012).

Entretanto, todo o potencial comercial do soro não tem sido bem explorado no Brasil devido ao alto custo das tecnologias para a obtenção das frações proteicas concentradas e isoladas. Dentre os derivados do soro, os mais importantes são: o soro desmineralizado por troca iônica ou eletrodialise, muito utilizado para o uso em formulações infantis, a lactose refinada, o concentrado protéico de soro obtido por ultrafiltração com um conteúdo protéico que varia de 35 a 80%, e o isolado proteico de soro que contém acima de 90% de proteína, obtido por troca iônica e diafiltração (VALDUGA, 2006).

A visão de que o soro de queijo é um subproduto mudou com a descoberta de propriedades funcionais e bioativas de seus componentes (BIASUTTI, *et al.*, 2008). Cada litro de soro contém cerca de 50g de lactose e 10g de proteína com elevado valor nutricional e funcional. Isso cria oportunidade para se pensar num processo de valorização do soro com simultânea redução da carga poluente (DOMINGUES *et al.*, 2006; LENCASTRE, 2011).

O valor comercial deste produto está diretamente relacionado com seu teor proteico, podendo servir como aditivo na indústria de panificação (DOMINGUES *et al.*, 2006) com a finalidade de melhorar as propriedades funcionais como: viscosidade, solubilidade, geleificação, emulsificação e estabilidade (VALDUGA *et al.*, 2006). Também é utilizado como ingrediente na confecção de alimentos infantis (DOMINGUES *et al.*, 2006). Com isso, o soro de queijo passou a ser tratado como produto de elevado valor agregado (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

O soro de queijo é fonte de muitos minerais, carboidratos e proteínas de alto valor biológico. As proteínas do soro são de fácil digestão e seu perfil de aminoácidos essenciais atende ou supera todas as exigências qualitativas ou quantitativas estabelecidas pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial da saúde (TERRA *et al.*, 2009).

O Lactossoro é composto basicamente de 94 a 95% de água, 3,8 a 4,2 de lactose, 0,8 a 1,0% de proteínas e 0,7 a 0,8% de minerais. Essa composição do soro varia de acordo com o procedimento de separação da caseína ou o tipo de queijo. O tratamento enzimático do soro de queijo contribui para a melhoria das atividades físicas, químicas, funcionais, organolépticas e nutricionais das proteínas, atuando,

especialmente, nas características de absorção proteica (BIASUTTI *et al.*, 2008).

Além das propriedades nutricionais das proteínas do soro, as mesmas apresentam expressivas propriedades funcionais. Com relação aos aminoácidos essenciais, as proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações, apresentam elevadas concentrações de triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina. As proteínas do soro de queijo são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais, classificadas com proteínas de metabolização rápida (SGARBIERI, 2004).

O soro de queijo também confere aos produtos formulados melhor aparência e melhores propriedades sensoriais, em virtude de suas propriedades funcionais, dentre elas: solubilidade, dispersibilidade, opacidade, ligação e retenção de gordura, retenção de água, emulsificação, viscosidade, estabilidade térmica e geleificação (TERRA *et al.*, 2009).

Adicionalmente a utilização da lactose, a maior fração dos sólidos do soro, ainda é pouco explorada, em especial pelas suas características físico-químicas.

3.2 Lactose

A α -lactose é o açúcar do leite, obtida na forma de cristais monohidratados que perdem a água de cristalização a 120°C (BOBBIO, 1995). É o principal carboidrato do leite dos mamíferos, classificado como um dissacarídeo redutor e composto por galactose e glicose. Existem poucas informações novas sobre as propriedades químicas da lactose, mas certos aspectos, especialmente modificações químicas e enzimáticas estão sendo estudadas (McSWEENEY, 2009).

A lactose é o componente quantitativamente mais importante dos sólidos não gordurosos do leite. Trata-se da condensação da β -galactose com a α ou β -glicose. O leite contém em torno de 5% de lactose, o leite em pó desnatado, 52% e o lactosoro em pó, 70% (OLIVEIRA, 2009).

O teor de lactose no leite é inversamente proporcional à concentração de lipídios e da caseína (McSWEENEY, 2009). Varia consideravelmente entre as espécies e de acordo com a alimentação do animal. A lactose decresce progressivamente durante a lactação (OLIVEIRA, 2009). É responsável por 50% da pressão osmótica do leite, que é isotônico com o sangue (McSWEENEY, 2009).

Nos produtos lácteos a lactose é um substrato para a fermentação pelas bactérias lácticas, que hidrolisam em galactose e glicose, e posteriormente as transformam em ácido láctico (OLIVEIRA, 2009).

A lactose tem como características o baixo poder edulcorante e baixa solubilidade em água (ORDOÑEZ, 2005) quando comparada a outros açúcares (GUIMARÃES, 2010). A lactose comercial, α -lactose, tem um poder edulcorante quatro vezes menor que o da sacarose. A β -lactose tem poder edulcorante mais elevado, além de ser mais solúvel que a α -lactose. Também é possível aumentar o poder edulcorante da lactose pela hidrólise que resulta em glicose e galactose (OLIVEIRA, 2009).

É utilizada como ingrediente alimentício em razão de sua propriedade de estabilizar proteínas. Pode ainda ser usada como substituto da sacarose em produtos gelados e coberturas para melhorar a textura. A lactose é uma importante fonte de energia na dieta e pode facilitar a absorção de cálcio (OLIVEIRA, 2009). Na indústria farmacêutica este dissacarídeo também pode ser usado como componente de fórmulas, revestimento de comprimidos e matéria prima para a produção de derivados de lactose, aumentando assim o valor agregado (GUIMARÃES, 2010).

A lactose é um açúcar redutor e quando aquecido pode reagir com substâncias nitrogenadas, desencadeando reações de Maillard, levando à formação de compostos coloridos, de odores anômalos e à redução nutritiva do leite (ORDOÑEZ, 2005). Essa reação envolve a interação entre um grupo aldeído do açúcar com o grupo amino das proteínas para formar glicosaminas. Embora essa reação seja desejável em muitos alimentos, suas consequências no leite são negativas, como escurecimento, aromas desagradáveis e perda da solubilidade (OLIVEIRA, 2009).

O alto teor de lactose presente no soro de queijo o faz um substrato de fermentação interessante, desde que seja utilizada a levedura adequada. Embora a utilização do soro de queijo como meio de cultura tem sido estudada há bastante tempo (FRIEND; SHAHANI, 1979), a sua utilização industrial para a produção de etanol ainda não é viável economicamente.

3.3 Hidrólise da Lactose

Hidrólise ácida

A hidrólise ácida, obtida em pH inferior a 2 e temperatura de 150°C, é pouco utilizada, pois apresenta o risco de formação de produtos secundários que podem alterar o sabor (OLIVEIRA, 2009).

Além de formar compostos inibidores para subsequente fermentação, também apresenta outros problemas, como condições de manuseio severas (pH e temperatura) e o alto custo de manutenção devido a problemas de corrosão (SILVA, 2010).

Hidrólise enzimática

As β -galactosidases, conhecidas como lactases, são responsáveis por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Esta enzima pode ser encontrada em vegetais, em órgãos de animais e também são produzidas por grande quantidade de microrganismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras, sendo as duas últimas, as fontes mais utilizadas para aplicações comerciais (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Segundo SCHLIMME&BUCHHEIM (2002), a hidrólise da lactose é cada vez mais importante, pois modifica a solubilidade da lactose, o dulçor, o poder redutor e a fermentabilidade.

As soluções de lactose hidrolisada possuem maior poder adoçante e têm grande utilização na indústria de alimentos, por exemplo, na indústria de doces e sorvetes. A tecnologia para produção de xarope de lactose hidrolisada é bem desenvolvida atualmente e é utilizada, por exemplo, para produzir produtos lácteos para indivíduos intolerantes à lactose (GUIMARÃES, 2010).

3.4 Fermentação

A fermentação é um processo no qual há liberação de energia, de açúcares ou moléculas orgânicas tais como aminoácidos, ácidos orgânicos, purinas e pirimidinas e que não necessita de oxigênio, embora possa ocorrer na sua presença (MOREIRA *et al.* 2008). O produto da fermentação depende diretamente do tipo de microrganismo que atua no processo, do substrato existente e das

enzimas ativas e presentes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

O etanol pode ser produzido de diferentes formas (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1987). A via que resulta na produção de etanol, chamada fermentação alcoólica ocorre em condições de anaerobiose e é realizada por microrganismos como leveduras (MOREIRA *et al.* 2008).

As leveduras são fungos especializados, monocelulares e desclorofilados, responsáveis pela fermentação alcoólica em muitos processos industriais (MENEZES, 1980).

A levedura *Saccharomyces* sp. pode ser usada na alimentação humana e animal, sob diversas formas e finalidades (PEIXOTO, 1996). O uso mais extenso é na panificação e também como agente de fermentação, nas indústrias de fabricação de cerveja, vinhos e álcool (VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000). A espécie *S. cerevisiae* é uma levedura mesofílica (20-40°C), utilizada em muitos processos industriais, tais como a produção de bebidas alcoólicas, biomassa (panificação, alimentos) e vários produtos do metabolismo (SOUZA, 2009).

A escolha da linhagem correta é fundamental para processo da fermentação. Apenas algumas espécies são utilizadas na fabricação do álcool. A *Saccharomyces cerevisiae* é mais usada nos processos industriais envolvendo fermentação alcoólica devido a boa capacidade de produção de etanol e de tolerância, permitindo produção de até 20% (v/v) de etanol. Todavia, a levedura *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar a lactose, pois não produz as enzimas β -galactosidase e lactose permease, entretanto pode usar eficazmente a glicose como substrato fermentativo e galactose (GUIMARÃES, 2010).

Portanto, vários estudos têm avaliado o uso associado de espécies de leveduras filogeneticamente relacionadas (CHAMPAGNE & GOULET, 1988; RODRIGUEZ; GALLARDO, 1993; CHEN, *et al.*, 2007; GUO, *et al.*, 2010) e de linhagens geneticamente recombinantes (TERRELL *et al.* 1984; TAHOUN, *et al.*, 1999), buscando-se otimizar o processo de fermentação da lactose. Desta forma, a levedura *Saccharomyces fragilis* vem sendo amplamente avaliada, devido aos bons resultados apresentados na produção de etanol a partir de soro de queijo (SUGUIMOTO, *et al.* 2006; COUTINHO, *et al.* 2009).

3.5 Produção de etanol e o uso de soro de leite como alternativa a demanda energética

Considerando a importância da produção de etanol para a economia mundial, cada vez mais, faz-se necessário conhecer as leveduras e os tipos de processo de fermentação que podem ser utilizados, a fim de promover a otimização na produção de etanol (SOUZA, 2009).

O etanol é conhecido desde a antiguidade, tanto como parte da cerveja dos egípcios como no vinho dos povos da Mesopotâmia e Grécia, o etanol ocupou espaço em inúmeras culturas. Tanto como produto resultante da fermentação do arroz, na China, quanto do milho, no Império Inca do Peru, o conhecimento envolvido na fabricação do etanol era guardado a sete chaves, dada a importância das bebidas, e seu uso no preparo de remédios, especialmente na conservação de plantas medicinais (SOUZA, 2009).

O etanol é produzido a partir de cana-de-açúcar, cereais, tubérculos como beterraba e mandioca, entre outros derivados agrícolas (SOUZA, 2009), bem como pela fermentação do soro de queijo por leveduras específicas. O álcool produzido por fermentação do soro pode ser empregado na produção de etanol combustível.

O Brasil foi o primeiro país a produzir bioenergia em larga escala, com a implementação do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) pelo decreto nº 76.596/73 do Governo Federal datado de 1973. Este programa trouxe diversos benefícios, como o desenvolvimento rural e a criação de um combustível que colabora com a redução da poluição ambiental. O Brasil lançou em 2003, o automóvel *flex-fuel* que é movido tanto pelo etanol quanto pela gasolina. Em 2004 este tipo de automóvel representou 21,6% do total de carros vendidos, enquanto que em 2005 a cifra de 61,7% de carros vendidos e atingiu em 2007 o correspondente a 90% das vendas de automóveis (SOUZA, 2009).

A produção de álcool etílico no Brasil chegou a 17,5 bilhões de litros na safra 2006/2007, das quais três bilhões de litros foram exportados, sendo o restante consumido pelo mercado interno. Devido ao alto custo da gasolina, o etanol está ganhando abertura para tornar-se uma importante matriz energética mundial e renovável (SOUZA, 2009).

A produção de álcool através da fermentação do soro de queijo tem sido estimulada pela crescente necessidade mundial de energia, além de representar uma forma simples de tratamento de grandes quantidades de soro produzido pela indústria láctea (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001). Apesar de ser um tema em

discussão nos últimos anos, é fundamental o desenvolvimento de melhores métodos e condições para a conversão do soro de queijo em etanol, buscando melhorar a eficiência e o rendimento do produto, viabilizando a produção de etanol em escala industrial.

REFERÊNCIAS

- BIASUTTI, E. A. R. *et al.* Ação da Pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.** v. 44, n. 1, p.51-60, 2008.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos.** 2 ed. São Paulo: Varela, 1995.
- CHAMPAGNE, C. P., GOULET, J. Growth of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in lactose-hydrolyzed chesse-whey ultrafiltrated. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, 21, 545–548, 1988.
- CHEN, J. *et al.* Biodegradation of polyvinyl alcohol by a mixed microbial culture. **Enzyme and Microbial Technology**, 40, 1686–1691, 2007.
- COSTA, A. M. G. **Desempenho do filtro anaeróbio no tratamento de efluente formulado com diferentes concentrações de soro de queijo.** Dissertação. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa: Minas Gerais, 2008.
- COUTINHO, M. R. V. *et al.* Produção de etanol em soro de queijo por *Saccharomyces fragillis*, *Kluyveromyces lactis* e *K. marxianus*. In: XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica - UEL/UEM/UNIOESTE/UNICENTRO/UEPG, 2009, Londrina-PR. **Anais do XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica.** Londrina: UEL, 2009.
- DOMINGUES, L., LIMA N., TEIXEIRA J. A. Novas metodologias para fermentação alcoólica do soro de queijo. **Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho.** Braga: Portugal, 2006.
- FRIEND, B. A., SHAHANI, K. M. Whey fermentation. **Journal Dairy Sci. Technol.** v. 14, n. 12, p. 143-155, 1979.
- GIROTO, J. M., PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos.** n. 10, set./out. 2001.
- 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, 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. **Appl Biochem Biotechnol**, 160:532–8, 2010.
- LENCASTRE *et al.* Potencial de bioaproveitamento do lactossoro para produção de

etanol. **Biocom**, 2011.

MCSWEENEY, P.L.H.; FOX, P.F. **Advanced Dairy Chemistry**. 3 ed. Ireland: Springer, 2009.

MEHAIA M. A., CHERYAN M. Ethanol from hydrolyzed whey permeate using *Saccharomyces cerevisiae* in a membrane recycle bioreactor. **Bioprocess Eng.** 5:57–61, 1990.

MENEZES, T. J. B. Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo: **Agronômica Ceres**. 1980.p. 141-178.

MOREIRA, A. L. *et al.* Dosagem de ácido láctico na produção de etanol a partir da cana de açúcar. **Revista Biológico**. v.70, n.1, p.35-42, jan./ jun., 2008.

O'LEARY V. S., *et al.* Alcohol production by selected yeast strains in lactase-hydrolyzed acid whey. **Biotechnol Bioeng.** 19:1019–35, 1977.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Utilização do soro de leite bovino como revestimento protetor em morangos. **B. Ceppa**, v. 26, n. 2, p. 187-196, jul./dez. Curitiba, 2008.

OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos**. Ribeirão Preto: Atheneu, 2009.

ORDOÑEZ, J. *et al.* **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PEIXOTO, N. Processamentos de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana: potencial mercado interno e externo. **Anais de Workshop sobre produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal**. Campinas, 1996.

RODRIGUES, F. **Ricota**. Disponível em: <<http://www.queijosnobrasil.com.br/fabricar-ricota.html>>. Acesso em: 21 set. 2012.

RODRIGUEZ, H., & GALLARDO, R. (1993). Single cell protein from bagasse pith by a mixed bacterial culture. **Acta Biotechnologica**, 13, 141–149.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, 1987.

SANTIAGO, P. A.; MARQUES, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.24, n.4, p. 567-572, 2004.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**. 17:397-409. 2004.

SHLIMME, E.; BUCHHEIM, W. **La leche y sus componentes: Propriedades químicas y físicas**. Zaragoza: Acribia, 2002.

SILVA, O. G. Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana de açúcar. **Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Tecnologia de Araçatuba**, 2010.

SOUZA, C. S. Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*. **Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP**. São Paulo, 2009.

SUGUIMOTO, H. H. ; FREITAS, D. ; ONUKI, G. N. . Estudos preliminares da produção de etanol por leveduras em soro de leite. In: 58 Reunião Anual da SBPC, 2006, Florianópolis. **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC**. Florianópolis, 2006.

TERRA, N. N. *et al.* Emprego do soro de leite líquido na elaboração da mortadela. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.3, p.885-890, 2009.

TERRELL S. L., BERNARD A., BAILEY R. B. Ethanol from whey: continuous fermentation with a catabolite repression-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. **Appl Environ Microbiol**. 48:577–80, 1984.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

VALDUGA, E. *et al.* Aplicação do soro de leite em pó na panificação. **Alim. Nutr.** v.17, n.4, p.393-400, out./dez. Araraquara, 2006.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C. ALVIM, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Rev. Nutr.**, v.13, n.3, p.185-192, set./dez. 2000.

4. ARTIGO CIENTÍFICO: UTILIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *SACCHAROMYCES FRAGILIS* E *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

CAMPOS, T. C. A. S.¹; SUGUIMOTO, H.H.²

¹ Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). Email: tarllis@hotmail.com

² Doutor em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Docente do Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). Email: heliohs@unopar.br

Utilização do soro de queijo na produção de etanol por *Saccharomyces fragilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. CAMPOS, T.C.A.S.; SUGUIMOTO, H.H.

RESUMO. O soro de queijo é um expressivo subproduto da indústria láctea, seja pelo volume gerado e sua carga poluidora quanto pelo baixo valor comercial. A utilização do soro como meio de fermentação é estudada há décadas, mas atualmente há um interesse maior, pois a produção de etanol por diferentes fontes de açúcares tem sido estimulada pela crescente necessidade mundial de energia. Avaliou-se diferentes meios fermentativos e a hidrólise da lactose na produção de etanol por linhagens de *Saccharomyces fragilis* (SF) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC). Das três linhagens de *S. fragilis* avaliadas, uma apresentou maior produção de etanol (SF IZ 275), com 3,8% (v/v). Das sete linhagens de *S. cerevisiae* testadas, cinco (SC1, SC4, SC5, SC7, SC8) apresentaram produção de etanol semelhantes (4,72; 5,1; 4,9; 4,8 e 4,7%, v/v, respectivamente), sendo a linhagem SC4 selecionada para os demais testes. O tempo ótimo de produção de etanol foi de 12 horas SF e de 8 horas para SC. Quando comparados diferentes meios fermentativos (lactose, glicose, galactose, glicose+galactose, sacarose e sacarose+glicose), observou-se a especificidade das leveduras por alguns açúcares. *S. fragilis* apresentou boa capacidade de fermentação em todos os meios testados, porém com maior produção de etanol em lactose (3,6% v/v). De modo geral, *S. cerevisiae* apresentou menor produção de etanol (3% em sac+gli) e não teve atividade em meio contendo lactose, comprovando-se a inabilidade da levedura em consumir este dissacarídeo. Ao avaliar a atividade das leveduras em soro de queijo e lactose P.A. hidrolisados e não-hidrolisados, observou-se que *S. fragilis* apresentou boa atividade de fermentação em todos os meios, com produção máxima de etanol de 3,6% (v/v) em soro de queijo hidrolisado. *S. cerevisiae* só apresentou atividade de fermentação nos meios hidrolisados, porém com baixa produção de etanol (máximo de 1,3% v/v). Portanto, observou-se que em todas as avaliações, *S. fragilis* produziu mais etanol do que *S. cerevisiae*.

Palavras-chave: *S. fragilis*, *S. cerevisiae*, etanol, lactose, soro de queijo.

ABSTRACT. Cheese whey is a significant by-product of the dairy industry, due the generated volume and the pollutant load, or its low commercial value. The use of whey as a fermentation medium has been studied for decades, but now there is more interest, because ethanol production by different sources of sugars has been stimulated by the increasing global need for energy. Were evaluated the effect of different fermentative media, and the hydrolysis of lactose on ethanol production by strains of *Saccharomyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. For *S. fragilis* the strain SF IZ 275, has produced 3.8% (v/v) of ethanol. For *S. cerevisiae* strains tested, five (SC1, SC4, SC5, SC7, SC8) had similar ethanol production (4.72; 5.1; 4.9; 4.8 e 4.7% v/v, respectively), the strain SC4 was selected for other tests. The optimal time for ethanol production by SF was 12 hours, and by SC was 8 hours. Comparing different fermentative media (lactose, glucose, galactose, glucose+galactose, sucrose+glucose), we observed the specificity of some yeasts by sugars. *S. fragilis* showed good fermentation capacity in all media tested, but higher ethanol production was observed in lactose (3.6% v/v). In general, *S. cerevisiae* presented low production of ethanol (3% v/v in glucose+sucrose), and no activity in lactose, confirming the inability of these yeast to consume this disaccharide. The activity of the yeasts on cheese-whey and lactose (hydrolysed and non-hydrolyzed), was good

for *S. fragilis* in all fermentation media, with maximal production of ethanol in whey hydrolyzed (3.6% v/v). Fermentation activity by *S. cerevisiae* occurred only in hydrolyzates media, with lower ethanol production (1.3% v/v). In general, *S. fragilis* produced more ethanol than *S. cerevisiae*.

Keywords: *S. fragilis*, *S. cerevisiae*, ethanol, lactose, cheese-whey.

4.1 Introdução

O soro de queijo é a fração solúvel do leite que se separa durante a precipitação da caseína ou da fabricação de queijos, cuja composição varia de acordo com a composição do leite e com o processo de fabricação de diversos tipos de queijo (COSTA, 2008). Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo - ABIQ, para se fabricar 1Kg de queijo, cerca de 9 Kg de soro são gerados (LENCASTRE, 2011). Calcula-se uma produção de 75 milhões de toneladas anuais de soro lácteo no continente europeu, 27 milhões na América do Norte e 8 milhões em outras áreas do planeta, num total de aproximadamente 110 milhões de toneladas (RODRIGUES, 2012).

Aproximadamente 80% do volume de leite destinado à fabricação de queijos transforma-se em soro. O soro de queijo contém metade do extrato seco do leite, representado por lactose, proteínas solúveis e sais, sendo a lactose o constituinte presente em maior quantidade (LENCASTRE, 2011). É fonte de muitos minerais, carboidratos e proteínas de alto valor biológico. As proteínas do soro são de fácil digestão e seu perfil de aminoácidos essenciais atende ou supera todas as exigências qualitativa ou quantitativamente exigidas pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde. Além disso, possuem um dos mais altos índices de valor biológico em comparação com outras fontes de proteínas e, apresentam propriedades funcionais altamente significativas, como: solubilidade, dispersibilidade, opacidade, ligação a retenção de gordura, retenção de água, emulsificação, viscosidade, estabilidade térmica e emulsificação (VALDUGA, 2006; TERRA, 2009).

Desta forma, a visão de que o soro de queijo seria um subproduto mudou com a descoberta das propriedades funcionais e bioativas de seus componentes, passando a ser tratado como produto de alto valor agregado (BIASUTTI, *et al.* 2008; OLIVEIRA, 2008). Para cada litro de soro são desperdiçados cerca de 50g de

lactose e 10g de proteína com elevado valor nutricional e funcional criando condições para se pensar um processo de valorização do soro com simultânea redução de carga poluente (GIROTO, PAWLOWSKY; 2001; DOMINGUES, *et al.* 2006; LENCASTRE, 2011).

Neste âmbito, a produção de álcool através da fermentação do soro de queijo tem sido estimulada pela crescente necessidade mundial de energia, somado ao fato do etanol estar ganhando abertura para tornar-se uma importante matriz energética mundial e renovável e menos poluente (SOUZA, 2009). O alto teor de lactose presente no soro de queijo o faz um substrato de fermentação com grande potencial para a produção de etanol em escala industrial (FRIEND; SHAHANI; 1979).

Entretanto, uma das dificuldades do processo fermentativo é a baixa tolerância que algumas espécies de leveduras apresentam ao etanol (DOMINGUES, LIMA & TEIXEIRA, 1999; GUIMARÃES, 2010). Deste modo, a utilização associada de leveduras com padrões variados de fermentação, surge como uma possibilidade viável para aperfeiçoar o processo de produção de etanol, a partir de soro de queijo (CHAMPAGNE & GOULET, 1988; TERRELL *et al.* 1984; RODRIGUEZ; GALLARDO, 1993; TAHOUN, *et al.*, 1999; SUGUIMOTO *et al.* 2006; CHEN, *et al.*, 2007; COUTINHO *et al.* 2009; GUO, *et al.* 2010). Portanto, o presente estudo buscou avaliar algumas linhagens de *Saccharomyces fragilis* e *Saccharomyces cerevisiae* quanto ao desempenho em produzir etanol em diferentes meios fermentativos.

4.2 Material e Métodos

Os estudos foram realizados nos Laboratórios de Fermentação e Microbiologia da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, PR. Os experimentos foram conduzidos no período de julho de 2011 a março de 2012.

Reagentes utilizados

Foram utilizados lactose P.A. (Biotec[®]), sacarose P.A. (Synth[®]), galactose P.A (Synth[®]), enzima β -galactosidase comercial (MAXILACT[®] LX5000) e soro de queijo obtido a partir da fabricação do queijo frescal com leite pasteurizado padronizado (Cativa[®]).

Microrganismos utilizados

Foram utilizadas três linhagens de *Saccharomyces fragilis*, denominadas de SF1 (CCT7585 – IZ275A), SF2 (CCT 7586 – IZ 275A) e SF3 (CCT 7586 – IZ 275B), fornecidas pelo Departamento de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual de Londrina e da Fundação André Tosello.

Foram utilizadas sete linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo quatro delas isoladas de marcas comerciais utilizadas em panificação (SC1, SC2, SC4, SC8), e três fornecidas pela Fundação André Tosello (SC5 [CCT4370 ATCC9763], SC6 [CCT2618] e SC7 [CCT5124]).

Manutenção das Leveduras e Preparo dos Inóculos

As leveduras *Saccharomyces fragilis* (SF) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC) foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) inclinados e armazenados a 6°C. No preparo do inóculo foi utilizado frasco Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL de caldo Extrato de Malte (DIFCO[®]), esterilizado por 15 minutos a 121°C. O frasco inoculado foi incubado em agitador orbital (TECNAL[®]) na temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, por 24 horas para SC e 48 horas para SF.

Hidrólise da Lactose e Pré-tratamento do Soro de Queijo

A reação de hidrólise da lactose P.A. e da lactose presente no soro de queijo foi realizada adicionando-se a enzima β -galactosidase comercial (MAXILACT[®] LX 5000), de origem microbiana, *Kluyveromyces lactis*, na forma líquida. A hidrólise da lactose e do soro de queijo foi realizada na temperatura de 40°C, durante três horas e utilizando 0,8g/L da enzima β -galactosidase, conforme indicação do fabricante.

Após o processo de hidrólise da lactose, o soro de queijo foi aquecido a 93°C e adicionado de ácido láctico até pH 4,8 conforme descrito por SANTIAGO *et al.* (2004). Após a precipitação a fração protéica foi removida por filtração, realizada com gaze hidrófila. O soro obtido neste pré-tratamento foi utilizado nas avaliações.

4.2.1 Procedimentos Experimentais

Seleção das linhagens de Saccharomyces fragilis e Saccharomyces cerevisiae

Para selecionar linhagens de SF foi utilizado como substrato soro de queijo pré-tratado e suplementado com 12g/L de extrato de levedura, 5g/L de fosfato de potássio monobásico, 6g/L de sulfato de amônio e 0,6g/L de sulfato de magnésio, conforme descrito por SANTIAGO *et al.* (2004). O pH inicial foi corrigido para 5,5 com solução de NaOH 0,1N. Os frascos contendo 100 mL deste substrato foram pasteurizados por 30 minutos em autoclave aberta, resfriados, adicionados separadamente 1mL de inóculo e incubados por 18 horas, 150 rpm a 35°C.

Para a seleção das linhagens de SC foram utilizados frascos com 100 mL de meio contendo 5% de glicose e suplementada, seguindo procedimento igual ao adotado para SF. O pH inicial foi corrigido para 5,5 com solução de NaOH 0,1N. Depois de autoclavado por 15 minutos a 121°C, foi adicionado 1mL de inóculo no meio e incubado por 18 horas, 150 rpm a 35°C.

Para cada meio de cultura foram utilizadas duas repetições e as determinações analíticas foram realizadas em triplicata. Decorridos o tempo de fermentação foi analisada a concentração de etanol (item 4.2.2). As linhagens selecionadas foram utilizadas nos demais experimentos.

Determinação do tempo de fermentação de Saccharomyces fragilis e Saccharomyces cerevisiae e produção de etanol

Para determinar a produção de etanol em função do tempo de fermentação por *Saccharomyces fragilis* (SF) foi utilizado meio contendo soro de queijo pré-tratado e suplementado, conforme descrito no ensaio anterior. O pH inicial foi corrigido para 5,5 com solução de NaOH 0,1N. Os frascos contendo 100 mL de meio foram pasteurizados por 30 minutos em autoclave aberta, devido ao fato de ser um produto derivado do leite para que não perca as propriedades naturais, mas elimine os micro-organismos patogênicos. Após a pasteurização foram resfriados, adicionados 1mL de inóculo e incubados por 18 horas, 150 rpm, a 35°C.

Para SC foi utilizado meio contendo glicose 5% e suplementado, conforme descrito anteriormente. O pH inicial foi corrigido para 5,5. Os frascos

contendo 100 mL de meio foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C, devido ao fato de ser um meio de cultura a base de água, cujo procedimento correto para eliminar os micro-organismos é a esterilização. Após este processo foram resfriados, adicionados 1mL de inóculo e incubados por 18 horas, 150 rpm, a 35°C.

Para determinação da concentração de etanol, foram retiradas amostras (cerca de 10mL) a cada 2 horas, durante 18 horas de frascos diferentes. Decorrido o tempo de fermentação foram analisadas as concentrações de etanol, lactose e glicose (item 4.2.2).

Para cada meio de cultura foram utilizadas duas repetições e as determinações analíticas foram realizadas em triplicata.

Avaliação da produção de etanol pelas leveduras Saccharomyces fragilis e Saccharomyces cerevisiae em meio com diferentes açúcares

Para avaliação da produção de etanol pelas leveduras SF e SC com diferentes açúcares foram testados 4 meios: sacarose 5%; glicose 5%; galactose 5%; sacarose 2,5% + glicose 2,5%; e galactose 2,5% + glicose 2,5%. Os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Optou-se pela utilização desses meios levando em consideração que a glicose e galactose são componentes da lactose (presente no soro de queijo) e a sacarose é um carboidrato conhecido e utilizado para produção de etanol, a partir da cana-de-açúcar.

O preparo dos meios e a inoculação das leveduras seguiu metodologia descrita anteriormente. Decorridos o tempo de fermentação, foram analisados as concentrações de etanol, lactose e glicose. Para cada meio de cultura foram utilizadas duas repetições e as determinações analíticas foram realizadas em triplicata.

Produção de etanol por Saccharomyces cerevisiae (linhagem SC4) em diferentes concentrações de glicose

Para a produção de etanol por *S. cerevisiae* (linhagem SC4) em diferentes concentrações de glicose foram testados 4 meios : glicose 5%, glicose 7,5%, glicose 10% e glicose 12,5%. Os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

O preparo dos meios e a inoculação das leveduras seguiu metodologia descrita anteriormente. Decorridos o tempo de fermentação, foi analisada a concentração de etanol. Para cada meio de cultura foram utilizadas duas repetições e as determinações analíticas foram realizadas em triplicata.

*Efeito da hidrólise da lactose na produção de etanol pelas leveduras *Saccharomyces fragilis* e *Saccharomyces cerevisiae**

Soro de queijo

Para determinação do efeito da hidrólise da lactose do soro de queijo na produção de etanol por SF e SC foi utilizado soro de queijo hidrolisado e não hidrolisado. A hidrólise foi realizada conforme descrito anteriormente.

O preparo dos meios e a inoculação das leveduras seguiu metodologia semelhante aos experimentos anteriores. Decorridos o tempo de fermentação, foi analisada a concentração de etanol. Para cada meio de cultura foram utilizadas duas repetições e as determinações analíticas foram realizadas em triplicata.

Lactose P.A.

Para comparação com os resultados obtidos no teste em meio de soro de queijo foi realizada análise em meio de Lactose P.A. Foi determinado efeito da hidrólise da lactose na produção de etanol por SF e SC em Lactose P.A. hidrolisada e não hidrolisada. A hidrólise foi realizada conforme descrito anteriormente.

O preparo dos meios e a inoculação das leveduras seguiu metodologia semelhante aos experimentos anteriores. Decorridos o tempo de fermentação, foi analisada a concentração de etanol. Para cada meio de cultura foram utilizadas duas repetições e as determinações analíticas foram realizadas em triplicata.

4.2.2 Determinações Analíticas

Determinação da concentração de etanol

A determinação da concentração de etanol seguiu o método descrito por Kaye e Haag (1954) com adaptações. O método baseia-se na oxidação do etanol a ácido acético pelo excesso de dicromato ácido de potássio (cor amarela), com consequente formação de sulfato crômico (cor verde). A intensidade da cor verde é

proporcional à concentração de etanol.

A modificação do método consistiu na utilização do microdestilador de etanol (Tecnal[®]), o que garantiu uma diminuição no tempo de análise. Além disso, houve redução na quantidade de dicromato de potássio utilizada para a determinação espectrofotométrica, o que acarretou em menor agressão ao meio ambiente, considerando a toxicidade do crômio. Os valores da concentração de etanol foram calculados e expressos em porcentagem, de acordo com a fórmula:

$$[\% \text{ Etanol}] = (\text{Volume de Etanol} \times \text{Volume de Meio Utilizado}^{-1}) \times 100.$$

Determinação da concentração de glicose

A determinação da concentração de glicose foi realizada segundo método enzimático-colorimétrico de glicose oxidase (Analisa[®]). A glicose oxidase (GOD) catalisou a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reagiu com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância medida em 505 nm, foi diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

Determinação da concentração da lactose

A determinação da lactose foi feita segundo o método descrito por Nickerson, Vukicic e Lin (1975). O método baseia-se na reação da lactose com ametilamina em solução alcalina quente, para formar um composto de cor vermelha. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540nm Abs.

Determinação do valor de pH

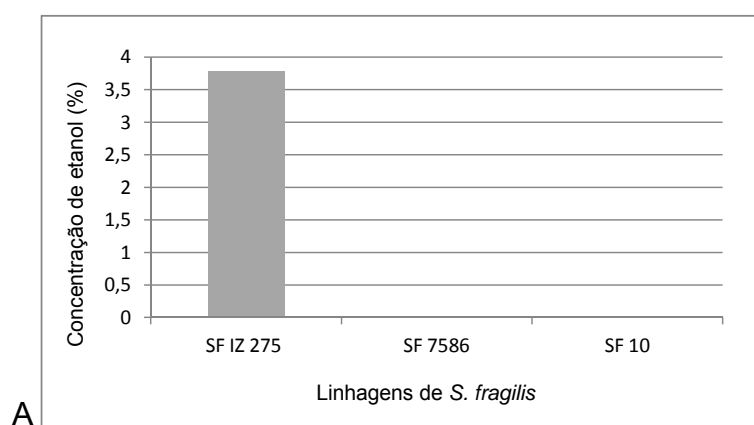
O pH foi determinado pela medida direta com potenciômetro digital, modelo TEC-2, da marca (TECNAL[®]), introduzindo-se o eletrodo de vidro diretamente nas amostras, segundo metodologia descrita por IAL (2008).

4.3 Resultados e Discussão

Seleção das linhagens de Saccharomyces fragilis e Saccharomyces cerevisiae

Ao comparar diferentes linhagens de *S. fragilis*, observou-se que a linhagem SF IZ 275 foi a que apresentou maior produção de etanol (3,8% v/v) a partir de soro de queijo (Fig. 1A). Embora *S. fragilis* metabolize eficazmente a lactose, não foi observada produção pelas linhagens SF 7586 e SF 10, mesmo com repicagens sucessivas. Isto pode ter ocorrido devido à redução da atividade fermentativa dessas cepas durante o período de armazenamento das colônias em laboratório. É possível que este fator também tenha influenciado no valor baixo de produção de etanol observado para a linhagem SF IZ 275 (apenas 3,8%), comparado com estudos semelhantes que obtiveram cerca de 5% de produção (COUTINHO *et al.*, 2009).

Das sete linhagens de *S. cerevisiae* avaliadas em glicose 5%, cinco (SC1; SC4; SC5; SC7; SC8) apresentaram produção de etanol semelhante, com Desvio Padrão de 0,14 e Coeficiente de Variação de apenas 2,8%. O maior valor foi observado para a linhagem SC4, com produção de 5,1% v/v de etanol. O menor valor de produção de etanol foi observado para a linhagem SC2 (3,4%) (Fig. 1B).



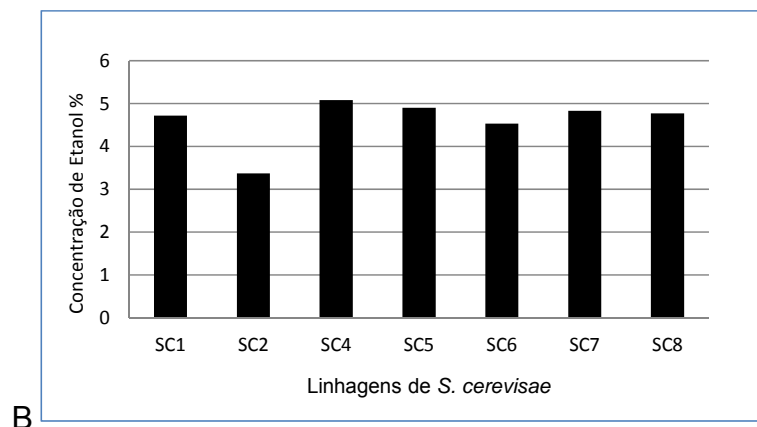


Figura 1. Seleção de linhagens de *S. fragilis* em soro de queijo (A) e de *S. cerevisiae* em glicose 5%(B).

Determinação do tempo de fermentação de Saccharomyces fragilis e Saccharomyces cerevisiae e produção de etanol

A produção de etanol por *S. fragilis* em soro de queijo chegou a 4%v/v, com 12 horas de fermentação. Ao final do processo de fermentação, observou-se que as concentrações de açúcares residuais apresentaram resultados nulos (curvas de lactose e glicose), indicando que todo o açúcar foi consumido pelo microrganismo (Fig. 2).

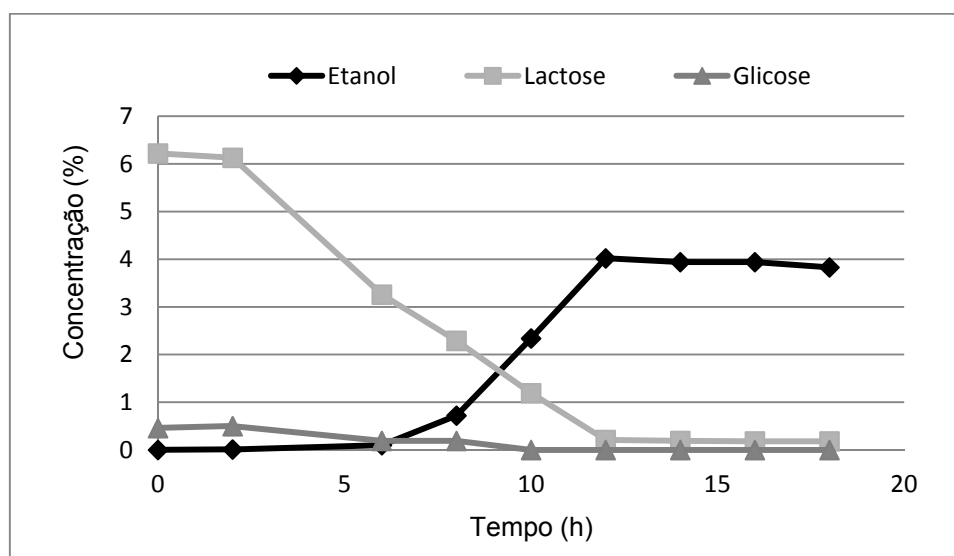


Figura 2. Determinação do tempo de produção de etanol por *S. fragilis* a partir da lactose presente em soro de queijo.

A fermentação por *S. cerevisiae* em glicose 5%, foi crescente até 8 horas,

a partir deste tempo manteve-se praticamente estável, atingindo o ponto máximo de produção (4,26% v/v de etanol) com aproximadamente 16 horas de fermentação (Fig. 3).

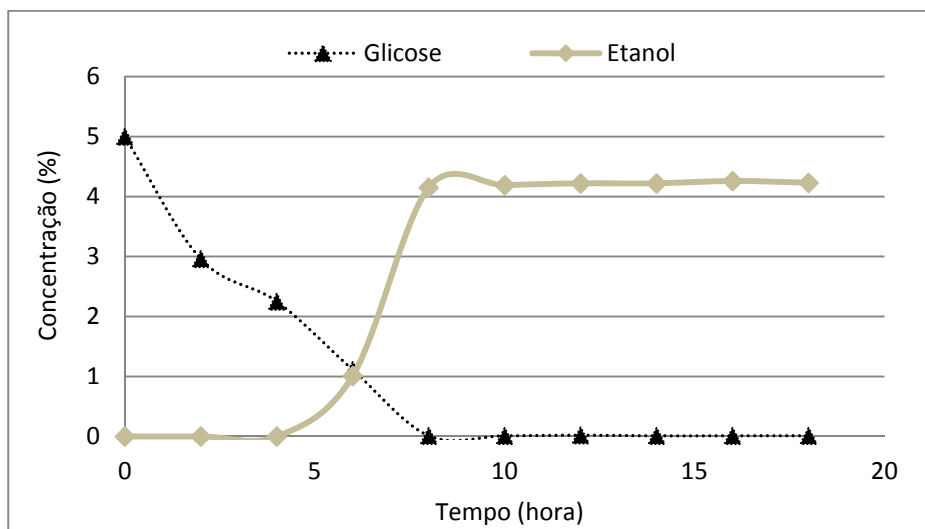


Figura 3. Determinação do tempo de produção de etanol por *S. cerevisiae* em glicose 5%.

Em estudo semelhante, SOUZA *et al.*, (2005) observaram que *S. cerevisiae* apresentou produção máxima de etanol entre 8 e 10 horas de fermentação, coincidindo com o esgotamento da concentração de açúcares no meio. VIEIRA (1992) salienta que após as 3 primeiras horas de cultivo o consumo de açúcar é extremamente rápido, sendo que em aproximadamente 8 horas, 90% deste carboidrato é utilizado pelas leveduras e que, após 15 horas de fermentação os parâmetros apresentam pouca modificação.

Comparando as duas leveduras através de seus perfis cinéticos de fermentação, é possível observar que *S. fragilis* apresentou tempo maior para iniciar a fermentação (8h), do que *S. cerevisiae* (5h). Além disso, é possível observar que SF diminui a produção de etanol após 12 horas de fermentação, enquanto que SC levou 8h. Esses parâmetros podem estar relacionados a diversos fatores, como maior tempo de adaptação da levedura as condições experimentais, como relatada por SILVA e CASTRO-GOMEZ (1995) em estudo com *Kluyveromyces fragilis*. Além disso pode estar relacionado ao tipo de meio fermentativo utilizado e principalmente, as especificidades metabólicas das leveduras avaliadas.

Apesar dessas especificidades, nas condições estudadas, a produção

final de etanol após 16 horas de fermentação, foi muito semelhante para ambas leveduras (cerca de 4% v/v).

Avaliação da produção de etanol pelas leveduras Saccharomyces fragilis e Saccharomyces cerevisiae em meio com diferentes açúcares

Ao avaliar a fermentação de *S. fragilis* e *S. cerevisiae* em diferentes açúcares, observou-se que SF fermentou em todos os meios testados, com produção de etanol variando de 1,7% v/v em galactose, a 3,6% v/v em lactose (Fig. 4). Em termos gerais, *S. fragilis* apresentou taxas de produção de etanol semelhante ao observado em estudos anteriores com esta levedura (COUTINHO *et al.*, 2009; SUGUIMOTO *et al.*, 2006).

Verificou-se que *S. cerevisiae* não fermenta em lactose, devido a sua incapacidade de hidrolisar este dissacarídeo. Adicionalmente, observou-se baixa taxa de fermentação em galactose (um dos monossacarídeos originados da hidrólise da lactose) (Fig. 4). Geralmente, isto acontece quando esta levedura é colocada em meios com concentrações elevadas de glicose + galactose, provocando um crescimento diáuxico. Ou seja, primeiro ocorre um crescimento fermentativo rápido em glicose e em seguida, um crescimento mais lento em galactose, ocasionado baixa produção de etanol (TERRELL *et al.*, 1984), além de fermentações prolongadas (O'LEARY *et al.*, 1977; MEHAIA, CHERYAN, 1990), indicando baixa afinidade de *S. cerevisiae* pela galactose.

No presente estudo, esta característica metabólica de *S. cerevisiae* foi comprovada também, pela baixa capacidade de fermentação nos meios contendo glicose+galactose, cuja produção de etanol foi menor (1,2%v/v) do que no meio contendo apenas glicose (2%v/v) (Fig. 4).

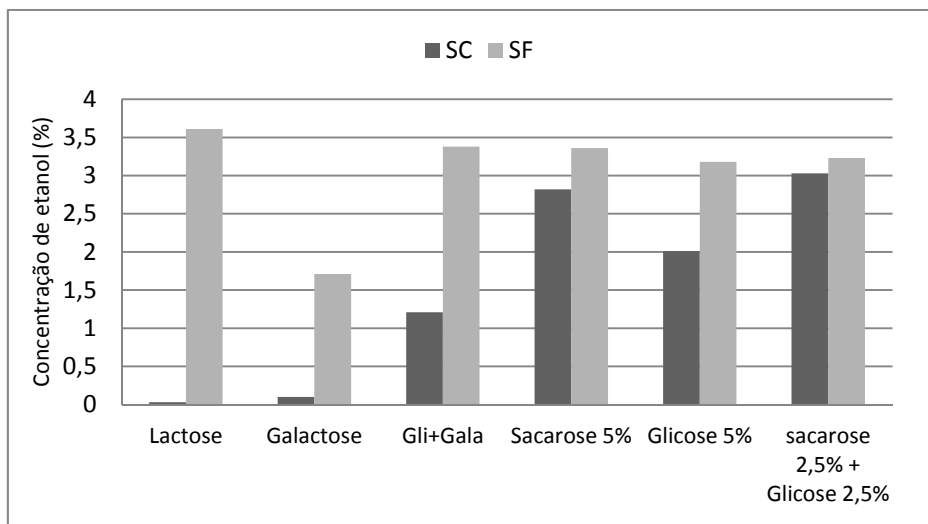


Figura 4. Produção de etanol por *S. fragilis* (SF) e *S. cerevisiae* (SC) em meios contendo diferentes açúcares.

Ao comparar a produção de etanol por *S. cerevisiae* em diferentes concentrações de glicose, observou-se que de 5 a 10% de concentração ocorreu aumento crescente da produção de etanol, com esgotamento total da concentração de glicose. Nas concentrações de 5% e 7,5% de glicose, a produção foi de 4,8% e 7,1% v/v de etanol. A maior produção foi observada na concentração de 10% de glicose, com produção de 7,3% v/v de etanol. Na concentração de 12,5% de glicose observou-se redução da produção (4,9% v/v de etanol) e não houve utilização de toda glicose presente no meio, com 2% de glicose residual ao final da fermentação (Fig. 5).

Segundo Barbosa *et al.* (2010), estudos de concentração de açúcares para produção de etanol por leveduras fermentativas como *S. cerevisiae* também foram realizados, porém utilizando sacarose, e demonstraram que os efeitos da concentração da sacarose foram significativos.

Portanto, nas condições avaliadas, a levedura *S. cerevisiae* mostrou-se sensível às altas concentrações de glicose, indicando que não é viável aumentar o teor deste monossacarídeo em meios de cultivo, visando obter maior rendimento na produção de etanol.

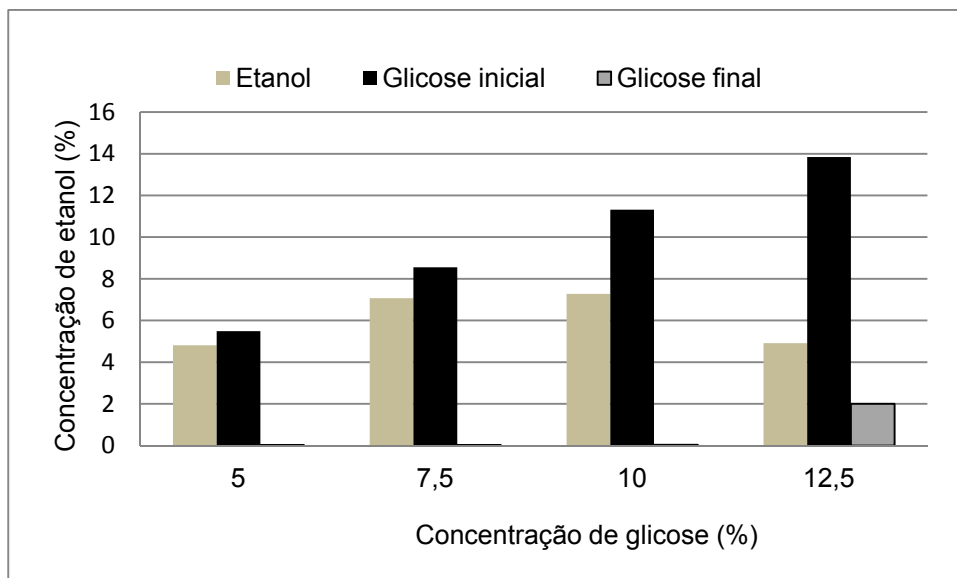


Figura 5. Produção de etanol por *S. cerevisiae* (linhagem SC4) em diferentes concentrações de glicose.

Efeito da hidrólise da lactose P.A. e da lactose do soro de queijo na produção de etanol pelas leveduras Saccharomyces fragilis e Saccharomyces cerevisiae

Soro de queijo

A produção de etanol por *S. fragilis* foi semelhante nos diferentes meios testados. No soro de queijo hidrolisado foi de 3,6% v/v, e no soro não-hidrolisado foi de 3,4% v/v.

Saccharomyces cerevisiae não apresentou fermentação nos meios não-hidrolisados de soro de queijo, comprovando-se a incapacidade de metabolizar a lactose. Nos meios hidrolisados observou produção de 1,3% v/v de etanol no soro de queijo e 1,1% v/v de etanol na lactose (Fig. 6). A baixa produção de etanol observada para *S. cerevisiae* nos meios hidrolisados, está relacionada ao seu padrão de crescimento e atividade metabólica em meios com glicose e galactose, conforme discutido anteriormente.

Comparando a fermentação de duas espécies de leveduras em soro de queijo hidrolisado e não hidrolisado, O'LEARY *et al.*, (1977) observaram que *S. cerevisiae* produziu etanol a partir da glicose mais rapidamente do que a espécie *Kluyveromyces fragilis*, porém *S. cerevisiae* só foi capaz de fermentar a galactose quando foi pré-cultivada neste meio.

Portanto, apesar da pré-hidrólise da lactose ser vantajosa na medida em

permite o uso de espécies de microrganismos incapazes de fermentar a lactose, deve-se considerar o problema de utilização de galactose por essas leveduras.

Lactose P.A.

No meio contendo lactose hidrolisada (LH) observou-se produção de 3,1% v/v de etanol, comparado a 3,4% v/v na lactose não-hidrolisada (LNH) (Fig. 6).

Saccharomyces cerevisiae não apresentou fermentação nos meios não-hidrolisados de lactose P.A.

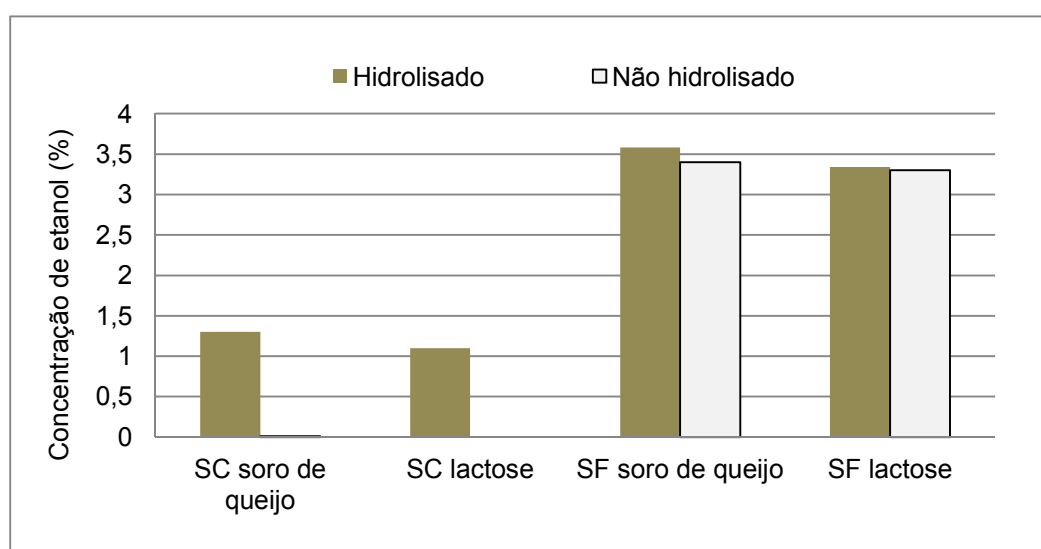


Figura 6. Produção de etanol por *S. fragilis* (SF) e *S. cerevisiae* (SC) em lactose e soro de queijo hidrolisados e não-hidrolisados. * Concentração de lactose no leite foi de 4,8%.

As leveduras *S. fragilis* e *S. cerevisiae* apresentaram diferenças de fermentação e produção de etanol nos diferentes meios de cultura utilizados (Tabela1).

Tabela 1. Porcentagem de produção de etanol por *S. fragilis* e *S. cerevisiae* em diferentes meios de cultura.

Meios de cultura	Produção de Etanol (%)	
	<i>Saccharomyces fragilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Glicose 5%	N/A	4,81
Glicose 7,5%	N/A	7,07
Glicose 10%	N/A	7,28
Glicose 12,5%	N/A	4,91
Lactose 5%	3,61	0,03
Lactose hidrolisada	3,34	1,10
Soro de queijo	3,40	0,01
Soro de queijo hidrolisado	3,58	1,30
Sacarose 5%	3,36	2,82
Glicose 5%	3,18	2,01
Galactose 5%	1,71	0,10
Sacarose 2,5 + Glicose 2,5%	3,23	3,03
Galactose 2,5 + Glicose 2,5%	3,38	1,21

4.4 Considerações Finais

Quando utilizadas as leveduras corretas para fermentação, o soro de queijo é uma alternativa para a produção de etanol. Observou-se que *Saccharomyces fragilis* e *Saccharomyces cerevisiae* possuem especificidades metabólicas quanto ao tempo de fermentação e o rendimento na produção de etanol.

Uma das razões para que em alguns momentos a produção de etanol não tenha sido eficiente, pode ser o fator aeração. Segundo alguns autores, a aeração é necessária na fase de propagação, facilitando o aumento do número de células, porém, em alguns casos, o aumento do oxigênio faz com que o lêvedo transforme o açúcar em ácido acético ao invés de etanol (SOUSA, MONTEIRO; 2011).

S. cerevisiae pode utilizar o soro de queijo como meio fermentativo somente após a pré-hidrólise da lactose. Esta levedura mostrou-se sensível a altas concentrações de glicose, indicando que não é viável aumentar o teor deste carboidrato visando maior rendimento na produção de etanol por *S. cerevisiae*.

Comparando-se as duas espécies de leveduras, observou-se que de modo geral, *S. fragilis* apresentou melhor desempenho para a produção de etanol do que *S. cerevisiae*. Entretanto, estudos devem ser intensificados a fim de elucidar outros fatores envolvidos no processo de fermentação e produção de etanol por essas leveduras.

Futuramente, estudos mais detalhados sobre o perfil cinético de fermentação por *S. fragilis* e *S. cerevisiae*, somados aos métodos baseados no uso de cepas recombinantes e/ou de cultivos mistos de colônias dessas leveduras, poderão colaborar para o desenvolvimento de tecnologias que elevem a rentabilidade da produção de etanol a partir de soro de queijo.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, A. S. *et al.* Estudo cinético da fermentação do soro de queijo de coalho para produção de aguardente. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa**. V.5, n.3, p.237-254. Jul./set. Mossoró, 2010.

BIASUTTI, E. A. R. *et al.* Ação da Pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v. 44, n. 1, p.51-60, 2008.

CHAMPAGNE, C. P., GOULET, J. Growth of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in lactose-hydrolyzed chesse-whey ultrafiltrated. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, 21,545–548, 1988.

CHEN, J. *et al.* Biodegradation of polyvinyl alcohol by a mixed microbial culture. **Enzyme and Microbial Technology**, 40, 1686–1691, 2007.

COSTA, A. M. G. Desempenho do filtro anaeróbio no tratamento de efluente formulado com diferentes concentrações de soro de queijo. **Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa. Universidade Federal de Viçosa**. Viçosa: Minas Gerais, 2008.

COUTINHO, M. R. V. *et al.* Produção de etanol em soro de queijo por *Saccharomyces fragilllis*, *Kluyveromyces lactis* e *K. marxianus*. In: XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica - UEL/UEM/UNIOESTE/UNICENTRO/UEPG, 2009, Londrina-PR. **Anais do XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica**. Londrina: UEL, 2009.

DOMINGUES, L., LIMA N., TEIXEIRA J. A. Novas metodologias para fermentação alcoólica do soro de queijo. **Centro de Engenharia Biológica**, Universidade do Minho. Braga: Portugal, 2006.

FRIEND, B. A., SHAHANI, K. M. *Whey fermentation*. **Journal Dairy Sci. Technol.** v. 14, n. 12, p. 143-155, 1979.

GIROTO, J. M., PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, n. 10, set./out. 2001.

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, 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. **Appl Biochem Biotechnol**.160:532–8, 2010.

IAL-Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Anvisa. 2008. Cap. IV.p104.

KAYE, S.; HAAG, H. B. Determination of ethyl alcohol in blood. **Journal of Forensic Medicine**. v. 1. n. 6. Out. / dez. p. 373-381, 1954

LENCASTRE *et al.* Potencial de bioaproveitamento do lactossoro para produção de etanol. **Biocom**,2011.

MEHAIA M. A., CHERYAN M. Ethanol from hydrolyzed whey permeate using *Saccharomyces cerevisiae* in a membrane recycle bioreactor. **Bioprocess Eng.** 5:57–61, 1990.

NICKERSON, T. A.; VUJICIC, I. F.; LIN, A. Y. Colorimetric estimation of lactose and hydrolytic products. Department of Food Science and Technology. **Journal of Dairy Science**, vol. 59. n. 3. P.386-390, 1975.

O'LEARY V. S. Alcohol production by selected yeast strains in lactase-hydrolyzed acid whey. **Biotechnol Bioeng.** 19:1019–35, 1977.

OLIVEIRA, C. M. et al. Utilização do soro de leite bovino como revestimento protetor em morangos. **B. Ceppa**, v. 26, n. 2, p. 187-196, jul./dez. Curitiba, 2008.

RODRIGUES, F. **Ricota**. Disponível em: <<http://www.queijosnobrasil.com.br/fabricar-ricota.html>>. Acesso em: 21 set. 2012.

RODRIGUEZ, H.; GALLARDO, R. Single cell protein from bagasse pith by a mixed bacterial culture. **Acta Biotechnologica**, v.13, p. 141–149, 1993.

SANTIAGO, P. A.; MARQUES, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.24, n.4, p. 567-572, 2004.

SILVA, C. A.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Estudo de um processo fermentativo utilizando soro de leite e a levedura *Kluyveromyces fragilis*. **Semina: Ci. Agr.** v.16, n.1, p. 17-21, 1995.

SOUSA, J. L. U.; MONTEIRO, R. A. B. Fatores que interferem na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **Cadernos de Pós-Graduação da Fazu.** v.02. 2011.

SOUZA, C. S. Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*. **Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP.** São Paulo, 2009.

SOUZA, K. M.; ANDRADE, A. C.; ARAÚJO, E. H. Estudo da Fermentação Simultânea a Hidrólise, de Soro de Queijo Utilizando Lactase e *Saccharomyces cerevisiae*. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química e m Iniciação Científica.** 2005.

SUGUIMOTO, H. H.; FREITAS, D.; ONUKI, G. N. Estudos preliminares da produção de etanol por leveduras em soro de leite. In: 58 Reunião Anual da SBPC, 2006, Florianópolis. **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC.** Florianópolis, 2006.

TAHOUN, M. K.; NEMR, E. M. T.; SHATA, O. H. Ethanol from lactose in salted cheese whey by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Z Lebensm Unters Forsch A** (1999), 208:60-64.

TERRA, N. N. *et al.* Emprego do soro de leite líquido na elaboração da mortadela. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.3, p.885-890, 2009.

TERRELL S. L., BERNARD A., BAILEY R. B. Ethanol from whey: continuous fermentation with acatabolite repression-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. **Appl Environ Microbiol.** 48:577–80, 1984.

VALDUGA, E. *et al.* Aplicação do soro de leite em pó na panificação. **Alim. Nutr.** v.17, n.4, p.393-400, out./dez. Araraquara, 2006.

VIEIRA, M. A. S. **Otimização do crescimento de *Kluyveromyces fragilis* em soro de queijo.** Dissertação. Mestrado em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual

de Londrina. Londrina, 1992.