



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS**

GEYCI DE OLIVEIRA DA SILVA COLOGNESI

**PRODUÇÃO DE ETANOL EM ESCALA PILOTO A PARTIR
DA FERMENTAÇÃO DO SORO DE QUEIJO
DESPROTEINIZADO**

Londrina
2015

GEYCI DE OLIVEIRA DA SILVA COLOGNESI

**PRODUÇÃO DE ETANOL EM ESCALA PILOTO A PARTIR
DA FERMENTAÇÃO DO SORO DE QUEIJO
DESPROTEINIZADO**

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de catalogação-na-publicação
Universidade Norte do Paraná
Biblioteca Central
Setor de Tratamento da Informação

C679p Colognesi, Geyci de Oliveira da Silva
Produção de etanol em escala piloto a partir da fermentação do soro de queijo desproteínizado / Geyci de Oliveira da Silva Colognesi. Londrina: [s.n], 2016
40f.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite).
Universidade Norte do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto.
1 - Tecnologia do Leite - dissertação de mestrado - UNOPAR 2- Bioetanol 3- Lactose 4- Lactosoro industrial 5-*Saccharomyces fragilis* I- Suguimoto, Hélio Hiroshi; orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 637.1

GEYCI DE OLIVEIRA DA SILVA COLOGNESI

PRODUÇÃO DE ETANOL EM ESCALA PILOTO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO
DO SORO DE QUEIJO DESPROTEINIZADO

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, área e concentração em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Prof. Dr. Hélio Hiroshi Sugimoto
UNOPAR

Prof. Dr. Raul Jorge Hernan Castro Gómez
UNOPAR

Profa. Dra. Lyssa Setsuko Sakanaka
UTFPR

Londrina, 04 de Dezembro de 2015.

Dedico este trabalho a todos os meus familiares, especialmente aos meus pais Mario e Gemima, meu irmão Wilian e esposo Tiago pelo incentivo, amor incondicional e compreensão da minha ausência na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me amparado para a realização deste trabalho, e por ter me dado entendimento, sabedoria e discernimento na realização do mesmo.

Aos meus pais Gemima e Mario, pelo incentivo em nunca desistir dos nossos objetivos e sonhos, pelos conselhos, e amor depositado nos momentos difíceis.

Ao meu esposo Tiago que esteve partilhando de todos os momentos que vivi estes dois anos, me motivando para a realização deste trabalho, e por compreender a minha ausência.

Ao Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto pela orientação, apoio, motivação, confiança depositada e incentivo para prosseguir os estudos realizados.

Ao Prof. Dr. Raul Jorge Hernan Castro Gómez pelos conselhos e orientações.

Aos meus “Queridos Amigos” que conquistei José Renato, Flávia Kawahigashi, Evelyn Koga, Juliana Sukanuma, o meu agradecimento pelos momentos que vivemos no laboratório, e pela família que nos tornamos.

À todos os professores que estiveram conosco contribuindo para o nosso sucesso e crescimento como pessoa. Somos o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em Deus”

Profundo é o saber de Deus, Criador,
Saber sem igual, de grande esplendor;
O intento de Deus ninguém pode sondar;
Conselhos ninguém foi ao grande Deus ditar.

Ciência perfeita é só a de Deus,
Altíssimos são os pensamentos Seus;
Por Ele e d'Eele é tudo o que há;
É Deus que, aos homens, sustento sempre dá.

A sabedoria com Deus está,
O conhecimento não nos negará;
Riquezas perpétuas só Ele é que tem;
A Ele a glória eternamente. Amém.

CCB

COLOGNESI, Geyci de Oliveira da Silva. **Produção de etanol em escala piloto a partir da fermentação do soro de queijo desproteínizado**. 2015. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – Unidade Piza. Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2015.

RESUMO

A produção de bioetanol a partir de fontes alternativas, como caldo de cana, milho e beterraba, já são amplamente utilizados em substituição aos combustíveis fósseis, fortalecidos nos cenários econômicos ambientalmente sustentáveis. Assim, o soro de queijo apresenta-se como uma alternativa para a produção de etanol, por ser uma importante fonte para o crescimento de microrganismos, que biocatalisam a lactose diretamente para a produção de etanol e outros produtos, devido ao elevado teor em lactose e demais nutrientes, bem como pelo elevado volume produzido pelos laticínios. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência da adição de nutrientes na fermentação do soro de queijo, verificar a velocidade de produção de etanol a partir de frações de lactose hidrolisada do soro de queijo, e verificar a repetibilidade dos resultados da fermentação em escala laboratorial e piloto a partir da fermentação de soro de queijo concentrado utilizando-se a levedura *Saccharomyces fragilis*. Nos ensaios avaliando-se a adição de nutrientes, o Sulfato de Amônio e o Extrato de levedura não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey 5%, porém, exibiram uma produção positiva de 5,07 e 5,43%, em relação ao tratamento controle, cuja produção foi de 5,52% (m/v). Já o soro de queijo contendo lactose hidrolisada nas concentrações de 10 e 30%, foram as que exibiram uma maior conversão da lactose em etanol, no entanto, a partir de 40% de hidrólise, houve redução significativa na produção de etanol, devido a inibição do metabolismo da levedura por substrato. Em ambas as cinéticas, as produções de etanol foram de 5,6% (v/v), demonstrando que a utilização do soro de queijo desproteínizado para fermentações industriais é possível devida a reprodutibilidade dos resultados desde escala laboratorial à piloto, apresentando-se como uma forma de reduzir o potencial poluidor deste subproduto, e ao mesmo tempo obter produto de valor agregado.

PALAVRAS CHAVE: Bioetanol. Lactose. Lactossoro Industrial, *Saccharomyces fragilis*.

COLOGNESI, Geyci de Oliveira da Silva. **Produção de etanol em escala piloto a partir da fermentação do soro de queijo desproteínizado**. 2015. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – Unidade Piza. Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The production of bio-ethanol from alternative sources such as sugar cane juice, corn and beet, are already widely used as an alternative to fossil fuel, strengthened in environmentally sustainable economic scenarios. Thus, the whey is presented as an alternative for the production of ethanol, it is an important source for the growth of microorganisms, which biocatalisam lactose directly to ethanol and other products due to the high lactose content and other nutrients, as well as the high level produced by the dairy. Thus, the aim of this study was to analyze the influence of the addition of nutrients in the fermentation of cheese whey, check ethanol production speed from lactose fractions hydrolyzed whey cheese, and check the repeatability of the results of fermentation laboratory and pilot scale fermentation of cheese whey concentrate using the yeast *Saccharomyces fragilis*. In assays evaluating the nutrient addition, ammonium sulphate and yeast extract showed no significant difference at 5% Tukey test, however, showed positive production of 5.07 and 5.43%, in relation to the treatment control, whose production was 5.52% (v/v). Since the cheese whey containing hydrolysed lactose at concentrations of 10 and 30% were those that exhibited a higher conversion of lactose to ethanol, however, from 40% hydrolysis, a significant reduction in ethanol production due to inhibition the substrate for yeast metabolism. In both kinetic the ethanol yields were 5.6% (v/v), demonstrating that the use of deproteinized cheese whey for industrial fermentations is possible due to reproducibility of the results from laboratory to pilot scale, presenting as a way to reduce the pollution potential of this by-product, while obtaining value-added product.

KEY-WORDS: Bioethanol. Lactose. Whey Industrial. *Saccharomyces fragilis*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
1.1 Soro de queijo	10
1.2 Lactose	10
1.3 Fermentação alcoólica	11
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	19

INTRODUÇÃO

O soro de queijo é um subproduto da indústria láctea, obtido a partir da coagulação da caseína do leite e dessoragem do queijo (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010). Representa 90% do volume total do leite com elevada carga poluente e um expressivo problema ambiental e econômico, cujo tratamento representa 5,59% dos custos operacionais em um laticínio (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; WISSMANN et al., 2012).

A composição do soro em pó varia de acordo com o tipo de leite e do queijo produzido, com cerca de 7% de sólidos, 10-12% de proteínas, 74% de lactose, 8% de minerais e 3% de gorduras (FOX; McSWEENEY, 2009). Isso proporciona a aplicação em alguns produtos alimentares, pois contém cerca de 55% dos nutrientes totais do leite (DRAGONE et al., 2009).

Entretanto, representa um problema para os consumidores, principalmente os intolerantes à lactose, estimado em quase 70% da população mundial (MICINSKI et al., 2013). Adicionalmente, há outros problemas que envolvem a lactose, como a cristalização, baixa doçura quando comparada a glicose e sacarose, capacidade de reagir com aminas e formar glicosaminas, compostos característicos da reação de Maillard, e que conferem aos alimentos odores e aromas anômalos, bem como a perda de solubilidade (FOX; McSWEENEY, 2009).

A elevada disponibilidade de nutrientes faz do soro de queijo uma importante fonte para o crescimento de microrganismos (DRAGONE et al., 2009), como a *Saccharomyces fragilis* ou *Kluyveromyces marxianus* e *Candida pseudotropicalis* (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010), com a finalidade de obtenção de etanol e outros importantes bioprodutos.

O Brasil, embora com uma produção anual de aproximadamente 1 milhão de toneladas de queijo e 9 bilhões de litros de soro de queijo, ainda não possui planta industrial para produção de etanol a partir de soro de queijo, como nos Estados Unidos, Irlanda e Nova Zelândia que já empregam 50% do soro para este fim, minimizando os problemas ambientais associados ao seu tratamento e disposição (SADIK; HALEMA, 2014). Isso se deve ao menor custo para produção de etanol a partir do caldo de cana ou melação, tornando o soro pouco atrativo para este fim. O país, mesmo sendo o segundo maior produtor mundial de etanol (VALDES, 2011) ainda não possui tecnologia industrial para fermentar o soro de queijo e convertê-lo em etanol.

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Soro de queijo

O Brasil apresenta uma ampla diversidade de matéria-prima na área de alimentos, como o setor lácteo, com produção leiteira de 35 bilhões de litros em 2013 e uma estimativa de crescimento de 5% para 2014 (CIÊNCIA DO LEITE, 2014).

Neste setor a produção de queijos em 2013 foi de um milhão de toneladas (FIGUEIREDO, 2014), que representa nove bilhões de litros de soro de queijo produzido, isto é, 80 a 90% do volume total de leite utilizado (BARBOSA et al., 2010; KIENDL, 2005; WISSMANN et al., 2012).

O soro de leite ou soro de queijo é a porção aquosa obtida durante a fabricação de queijo (OLIVEIRA; SERRA; MAGALHÃES, 2012) por coagulação ácida ou enzimática das caseínas do leite. É composto por 55% dos nutrientes do leite (MICINSKI et al., 2013), com aproximadamente 7% de sólidos, 10-12% de proteínas, 74% de lactose, 8% de minerais e 3% de gorduras na formulação em pó (FOX; McSWEENEY, 2009).

Há várias formas de tratamento e aproveitamento do soro de queijo, que pode ser comercializado como subproduto ou utilizado como matéria prima em outros produtos lácteos (WISSMANN et al., 2012).

No entanto, quando não aproveitado o soro de queijo é eliminado em lagoas de tratamento (WISSMANN et al., 2012), devido a elevada capacidade poluente. Comparativamente o volume de 50.000 litros de soro de queijo pode ser comparado a um esgoto de uma cidade de 25.000 habitantes. Assim, este resíduo precisa ser tratado para atender a legislação ambiental brasileira, que define as indústrias como responsáveis pelo tratamento dos seus efluentes, estabelecendo padrões de qualidade dos corpos receptores para cada topo de efluente gerado (CONAMA, 2011).

O tratamento representa 5,59% dos custos operacionais (WISSMANN et al., 2012), ou 0,5 dólar/kg soro de queijo (OZMIHCI; KARGI, 2007), o que tem estimulado as indústrias a buscarem alternativas para o aproveitamento do soro.

1.2 Lactose

Dois importantes constituintes do soro de queijo podem ser aproveitados: as

proteínas que, embora em menor quantidade podem ser aplicadas em indústrias alimentícias, pois são ricas em aminoácidos essenciais (FLORENCIO et al., 2013) e a lactose, maior porção sólida do soro, que fermentada produz derivados de elevado valor agregado. A lactose pode ainda ser desidratada e usada como ingrediente em formulações de outros produtos.

No entanto, quando empregada em alimentos a lactose representa um problema para os consumidores que são intolerantes a este açúcar, já que quase 70% da população mundial apresenta este distúrbio (MICINSKI et al., 2013). Há também problemas como cristalização, baixa doçura quando comparada a glicose e sacarose, reage com aminas para formar glicosaminas, compostos característicos da reação de Mailhard, que conferem aos alimentos odores e aromas anômalos, e perda de solubilidade (FOX; McSWEENEY, 2009).

Assim, é mais interessante o uso da lactose, um dissacarídeo redutor, composto de glicose e galactose unidos por ligação $\beta 1 \rightarrow 4$, em processos fermentativos, como substrato para a produção de uma variedade de produtos. Isso reduz o custo das indústrias por gerar um resíduo de menor carga orgânica, tendo como produtos o etanol, ácido láctico, acético e propiônico (FOX; McSWEENEY, 2009; SANSONETTI et al., 2010).

1.3 Fermentação alcoólica

A produção de etanol através da fermentação de matérias-primas como o melaço ou caldo de cana (cana-de-açúcar), milho e glicose (beterraba) já são amplamente usados em substituição aos combustíveis fósseis, fortalecidos nos cenários econômicos ambientalmente sustentáveis (SOUZA et al., 2014; IGLECIAS; SESMERO, 2015). Isso tem proporcionado um estímulo ao avanço na produção de bioetanol a partir de outras fontes alternativas (ZAFAR; OWAIS, 2006).

Assim, devido ao elevado teor em lactose e demais nutrientes, bem como pelo elevado volume produzido pelos laticínios, o soro de queijo, apresenta-se como uma alternativa para a produção de etanol, por ser uma importante fonte para o crescimento de microrganismos (DRAGONE et al., 2009), que biocatalisam a lactose diretamente para a produção de etanol e outros produtos (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010; JEON; CHOI, 2010).

Entretanto Silveira et al., (2005) destaca que o processo catalítico de conversão da lactose em etanol pode ser influenciado pela concentração de lactose

do meio de fermentação, e do etanol produzido, quando em elevadas concentrações torna-se tóxico à levedura alterando o seu metabolismo.

A levedura mais utilizada para a produção industrial de etanol é a *Saccharomyces cerevisiae* (CHRISTENSEN et al., 2011), pela boa capacidade fermentativa, tolerância ao etanol produzido até 20% (v/v), capacidade de crescer em condições anaeróbicas e servir como ingrediente de ração animal (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010).

No entanto, é incapaz de metabolizar diretamente a lactose por não apresentar o gene LAC12, que permeia a lactose para o interior da célula, e o gene LAC4, que hidrolisa este dissacarídeo (ZOU et al., 2013). Assim, espécies que utilizam a lactose diretamente como *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* ou *Saccharomyces fragilis* estão sendo utilizadas na fermentação deste açúcar (BACH et al., 2014).

Enquanto a *Saccharomyces cerevisiae* necessita de glicose como principal fonte de carbono (RUBIO-TEIXEIRA, 2005), a *Kluyveromyces* spp. apresenta a capacidade de biocatalisar a lactose presente no soro de queijo (DRAGONE et al., 2009), além de elevada tolerância ao etanol de 10% (v/v), e pressão osmótica de 22% (m/v) (LÓPEZ-ALVAREZ et al., 2012). Destaca-se por sua diversidade metabólica e seu substancial grau de polimorfismo, traços que são refletidas pelos diversos ambientes a partir da qual foi isolada (Lane et al., 2011).

Assim, a levedura *Kluyveromyces marxianus* está ganhando considerável atenção devido às suas propriedades desejáveis na fermentação industrial, incluindo uma ampla absorção de carboidratos para fermentação, crescimento rápido, termotolerância ao meio fermentescível e produção da enzima β -galactosidase, tornando-se uma levedura atraente para a produção de etanol industrial a partir de substratos de baixo custo, como o soro de queijo (LANE; MORRISSEY, 2010).

O uso de *Kluyveromyces marxianus* na conversão do soro de queijo em etanol é também promissor, pela ótima adaptação da levedura a uma ampla faixa de temperatura, pH e concentração de lactose (DINIZ et al., 2014).

Entretanto o ótimo desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras é afetado por diversas variáveis, como a temperatura, agitação, pH, concentração inicial de inóculo e substrato, sendo estes fatores importantes para a obtenção de produtos com alta qualidade (DRAGONE et al., 2011).

Hadiyanto, Aini, Pinundi (2014) concluíram que a temperatura ideal para a

produção de etanol a partir do soro de queijo, em sistema de batelada com a *Kluyveromyces marxianus*, foi de 30°C, com uma produção de 0,796% (v/v) de etanol e uma taxa de crescimento de 0,186/h.

Guo, Zhou e Xiao (2010), nos ensaios com soro de queijo com mistura de culturas de *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* produziram, 4,6% (v/v) de etanol após 72 horas de fermentação. Koushki, Jafari e Azizi (2012) também fermentaram o soro de queijo com 4,9 e 9,8% de lactose e *Kluyveromyces marxianus*, e obtiveram 2,8% (v/v) e 5,8% (v/v) de etanol, respectivamente, após 60 horas de fermentação.

Já Guimarães, Teixeira e Domingues (2010), Christensen et al., (2011), Koushki, Jafari e Azizi, (2011), Sansonetti et al., (2010) destacam a vantagem da utilização da *K. marxianus* pela rapidez na multiplicação celular.

Além disso, Belém e Lee (1998) citam que o interesse pelo gênero *Kluyveromyces* spp. tem ganhado destaque por apresentar leveduras como *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*, que fermentam a lactose em temperaturas ideais de hidrólise enzimática (BABIKER et al., 2010), produzindo etanol, aromas, oligossacarídeos e biomassa.

Assim, os estudos para a utilização do soro de queijo como meio para fermentação são realizados há bastante tempo, entretanto, a sua aplicação industrial ainda não é viável economicamente pelo baixo rendimento na conversão da lactose a etanol. Desta forma, o presente trabalho tem como principal objetivo estudar a fermentação do soro de queijo desproteínizado, em escala piloto (50 litros), utilizando a levedura *Saccharomyces fragilis*, a fim de reproduzir a produção de etanol da escala laboratorial em escala piloto, e viabilizar o seu emprego em alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos, cosméticos e indústrias.

REFERÊNCIAS

BABIKER, M, ABDEL-BANAT, A; HUSHIDA, H; ANO, A; NONKLANG, S; AKADA, R. High temperature fermentation: how can process for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 861-867, jan., 2010.

BACH, F; FIORESE, M. L; HASAN, S. D. M; MOREJON, C. F. M. Estudo da influência de variáveis no processo de produção de bioetanol de soro de queijo. **Engevista**, v. 16, n. 3, p. 392-409, set., 2014.

BARBOSA, A. S; FLORENTINO, E. R; FLORÊNCIO, I. M; ARAÚJO, A. S. Utilização do soro de queijo como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 1, p. 7-25, jan./mar., 2010.

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

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

CHRISTENSEN, A. D; KÁDÁR, Z; OLESKOWICZ-POPIEL, P; THOMSEN, M. H. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 283-289, jul. 2011.

CIÊNCIA DO LEITE. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/?action=1&type=0&a=591>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011.** Publicada no DOU nº 92 de 16/05/2011.

DINIZ, R. H. S; RODRIGUES, M. Q. R. B; FIETTO, L. G; PASSOS, F. M. L; SILVEIRA, W. B. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 111-117, abr., 2014.

DRAGONE, G; MUSSATO, S. L; ALMEIDA E SILVA, J. B; TEIXEIRA, J. A. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1977-1982, maio, 2011.

DRAGONE, G; MUSSATTO, S. I; ALMEIDA E SILVA, J. B; TEIXEIRA, J. A. Characterization of volatile compounds in as alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 929-935, fev., 2009.

FIGUEIREDO, S. A. Desafios e oportunidades para as indústrias de queijo. **Leite e Derivados**, ano XXII, n. 148, p. 50-51, jul., 2014.

FLORENCIO, I. M; FLORENTINO, E. R; SILVA, F. L. H; MARTINS, R. S; CAVALCANTI, M. T; GOMES, J. P. Produção de etanol a partir de lactosoro industrial. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1088-1092, jul., 2013.

FOX, P. F; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry**: lactose, water, salts and minor constituents. 3. ed, v. 3, New York: Springer, 2009.

GUIMARÃES, P. M. R; TEIXEIRA, J. A; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeast as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 375-384, maio/jun., 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 Biochemical and Biotechnology**, v. 160, n. 2, p. 532-538, jan., 2010.

HADIYANTO, D. A; AINI, A. P; PINUNDI, D. S. Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-Batch Fermentation Using *Kluyveromyces marxianus*. **Energy Procedia**, v. 47, p. 108-112, 2014.

IGLECIAS, C; SESMERO, J. P. Economic analysis of supplementing sugarcane with corn for ethanol production in Brazil: a case study in Uberaba. **Bioenergy Research**, v. 8, n. 2, p. 627-643, jun., 2015.

JEON, J. R.; CHOI, J. H. Lactic acid fermentation of germinated barley fiber and proliferative function of colonic epithelial cells in loperamide-induced rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 4, p. 950-960, ago. 2010.

KIENDL, P. Dairy: World Markets and Trade. **United States Department of Agriculture**, 2005. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/>>. Acesso em: 06 jan. 2015.

KOUSHKI, M.; JAFARI, M.; AZIZI, M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast trains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 614-619, set./out., 2012.

LANE, M. M; BURKE, N; KARREMAN, R; WOLFE, K. H; O'BYRNE, C. P; MORRISSEY, J. P. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 4, p. 507-519, nov., 2011.

LANE, M. M; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 17-26, fev./maio, 2010.

LÓPEZ-ALVAREZ, A; DÍAZ-PÉREZ, A, L; SOSA-AGUIRRE, C; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L; CAMPOS-GARCÍA, J. Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPE-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 614–618, maio, 2012.

MICINSKI, J; ZWIERZVHOWSKI, G; KOWALSKI, I. M; SZAREK, J. Health-promoting properties of selected milk components. **Journal of Elementology**, v. 18, n. 1, p. 165-186, mar., 2013.

MURARI, C. S; MORAES, D. C; BUENO, G. F; BIANCHI, V. L. D. Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 393, p. 42-50, jul./ago., 2013.

OLIVEIRA, L. M; SERRA, J. C. V; MAGALHÃES, K. B. Estudo comparativo das diferentes tecnologias utilizadas para produção de etanol. **Geoambiente on-line**, Jataí, n. 19, p. 1-23, jul./dez., 2012.

OZMIHCI, S; KARGI, F. Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: effects of hydraulic residence time. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 2, p. 79-86, mar., 2007.

RUBIO-TEIXEIRA, M. A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 12, p. 1115-1128, dez., 2005.

SADIK, M. W; HALEMA, A. A. Production of ethanol from molasses and whey permeate using yeast and bacterial strains. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 804-818, mar., 2014.

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, dez., 2010.

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 Microbiology and Thechnology**, v. 35, n. 7, p. 930-936, jan., 2005.

SOUZA, A. P; GRANDIS, A; LEITE, D. C. C; BUCKERIDGE, M. Sugarcane as a bioenergy source: history, performance, and perspectives for second-generation bioethanol. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 1, p. 24-35, mar., 2014.

VALDES, C. **Can Brazil meet the world's growing need for ethanol?**. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/amber-waves/2011-december/can-brazil-meet-the-world%E2%80%99s-growing-need-for-ethanol.aspx>>. Acesso em: 10 set. 2014.

WISSMANN, M. A; HEIN, A. F; FOLLMANN, J; RACHOW, N. I. P. Environmental costs: analysis of its impact and importance in the pursuit of eco-efficiency in an industry of cheese. **Custos e Agronegócio**, v. 8, n. 3, p. 2-23, jul./set., 2012.

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

ZOU, J; GUO, X; SHEN, T; DONG, J; ZHANG, C; XIAO, D. Construction of lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* for lactose fermentation into ethanol fuel. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 3-4, p. 353-363, abr., 2013.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de etanol em escala piloto a partir de soro de queijo concentrado utilizando-se a levedura *Saccharomyces fragilis*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a influência da adição de nutrientes na fermentação do soro de queijo concentrado pela *Saccharomyces fragilis* para produção de etanol.
- Verificar o crescimento microbiano e a produção de etanol pela *Saccharomyces fragilis* a partir de diferentes concentrações de lactose hidrolisada do soro de queijo concentrado;
- Verificar a repetibilidade dos resultados da fermentação em escala laboratorial e piloto a partir da fermentação de 50 litros de soro de queijo.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

FERMENTAÇÃO DO SORO DE QUEIJO DESPROTEINIZADO POR *Saccharomyces fragilis* EM ESCALA PILOTO

COLOGNESI, G. O. S.¹; SUGUIMOTO, H. H.¹

¹ Universidade Norte do Paraná – UNOPAR – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Rua Marselha, 591, Jardim Piza, 86041-140, Londrina, PR, Brasil.

• Autor para correspondência:

Hélio Hiroshi Suguimoto

E-mail: helio.suguimoto@unopar.br

Rua Marselha, 591, Jardim Piza, 86041-140, Londrina, PR, Brasil

Tel: +55 43 3371-7834

RESUMO

A produção de bioetanol a partir de fontes alternativas, como caldo de cana, milho e beterraba, já são amplamente utilizados em substituição aos combustíveis fósseis, fortalecidos nos cenários econômicos ambientalmente sustentáveis. Assim, o soro de queijo apresenta-se como uma alternativa para a produção de etanol, por ser uma importante fonte para o crescimento de microrganismos, que biocatalisam a lactose diretamente para a produção de etanol e outros produtos, devido ao elevado teor em lactose e demais nutrientes, bem como pelo elevado volume produzido pelos laticínios. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência da adição de nutrientes na fermentação do soro de queijo, verificar a velocidade de produção de etanol a partir de frações de lactose hidrolisada do soro de queijo, e verificar a repetibilidade dos resultados da fermentação em escala laboratorial e piloto a partir da fermentação de soro de queijo concentrado utilizando-se a levedura *Saccharomyces fragilis*. Nos ensaios avaliando-se a adição de nutrientes, o Sulfato de Amônio e o Extrato de levedura não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey 5%, porém, exibiram uma produção positiva de 5,07 e 5,43%, em relação ao tratamento controle, cuja produção foi de 5,52% (m/v). Já o soro de queijo contendo lactose hidrolisada nas concentrações de 10 e 30%, foram as que exibiram uma maior conversão da lactose em etanol, no entanto, a partir de 40% de hidrólise, houve redução significativa na produção de etanol, devido a inibição do metabolismo da levedura por substrato. Em ambas as cinéticas, as produções de etanol foram de 5,6% (v/v), demonstrando que a utilização do soro de queijo desproteínizado para fermentações industriais é possível devida a reprodutibilidade dos resultados desde escala laboratorial à piloto, apresentando-se como uma forma de reduzir o potencial poluidor deste subproduto, e ao mesmo tempo obter produto de valor agregado.

Palavras-chave: Fermentação. Hidrólise. Lactossoro Industrial, Nutrientes. *Saccharomyces fragilis*.

INTRODUÇÃO

A produção de derivados lácteos, em especial os queijos cresce em média 11,4% ao ano no Brasil (WISSMANN et al., 2012). Gera, conseqüentemente, elevado volume de efluentes, como o soro de queijo, que representa 90 a 95% do volume de leite utilizado para a produção de queijos (SERPA; PRIAMO; REGINATTO, 2009; SPALATELU, 2012).

São produzidos por ano cerca de 160 milhões de toneladas de soro de queijo no mundo, com uma previsão de aumento de 1 a 2% anualmente (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010). A maior parte é subutilizado ou descartado, elevando custos de tratamento (GONZÁLEZ-SISO, 1996; SPALATELU, 2012).

O soro de queijo pode ser amplamente requisitado como precursor de ingredientes, ou como ingrediente na indústria de alimentos (GERNIGON, et al., 2010), devido à sua composição nutricional, pois retém 55% dos nutrientes do leite (SPALATELO, 2012). Pode ser classificado de acordo com o teor de proteínas, e ser aplicado em diversas áreas, agregando valor a produtos e seus derivados, desde ingrediente alimentício à produção de medicamentos (ALVES, et al., 2014).

Dentre as utilizações industriais, destacam-se a obtenção do isolado proteico do soro o qual pode ser usado como agente indutor da gelificação (ZHANG et al., 2014). Ainda no âmbito industrial, o soro pode servir de base para a extração de lactose, que é o substrato para a síntese de galacto-oligossacarídeos. Este composto possui reconhecida ação prebiótica, com grande benefício para a flora colônica (MALINOVSKA et al., 2012).

No entanto, a sua utilização na indústria alimentícia requer tratamentos prévios, como a concentração e desidratação, devido ao elevado conteúdo de água. Isso eleva os custos e pode tornar o seu uso economicamente inviável. Em estado líquido é perecível e arriscado o seu armazenamento prolongado (SERPA; PRIAMO; REGINATTO, 2009).

A lactose quando empregado em alimentos apresenta alguns problemas, como cristalização, baixa doçura, e, por ser um açúcar redutor, reage com aminas formando glicosaminas, compostos característicos da reação de Maillard, que conferem aos alimentos odores e aromas anômalos, bem como perda de solubilidade (FOX; McSWEENEY, 2009).

Um outro aspecto negativo da lactose é a sua baixa digestibilidade para os consumidores intolerantes a este açúcar, representado por 70% da população

mundial (MICINSKI et al., 2013).

Perante as restrições que o soro de queijo apresenta em alimentos, a sua utilização pode ser direcionada para a produção de biogás, etanol e proteínas concentradas (SERPA; PRIAMO; REGINATTO, 2009), evidenciando a ampla aplicação que este importante produto apresenta (SPALATELU, 2012).

A fermentação da lactose do soro de queijo para produção de etanol e outros produtos utilizando-se leveduras, é mencionada na literatura desde a década de 40 (GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010).

Países como Estados Unidos, Irlanda e Nova Zelândia já empregam 50% do soro de queijo para este fim, minimizando os problemas ambientais associados ao seu tratamento e disposição (SADIK; HALEMA, 2014), demonstrando-se como um sistema eficaz, limpo e seguro para a produção de biocombustíveis e outros produtos a partir de fontes sustentáveis (BECERRA; CERDÁN; GONZÁLEZ-SISO, 2015).

A primeira planta de produção de etanol a partir da lactose do soro de queijo com operação comercial foi implantada em 1978 na Irlanda por *Carbery Produtos Lácteos Ltd.*, iniciando, também, a partir de 1985, a produção de etanol combustível (LING, 2008). O processo desenvolvido pela empresa denominado “Processo Carbery”, foi adotado por indústrias nos Estados Unidos e na Nova Zelândia em Agosto de 2007, onde permanece implantada a *Anchor Ltd.*, maior companhia que utiliza esta técnica, produzindo cerca de 20 milhões de litros de etanol por ano (LING, 2008).

Atualmente existem duas plantas de produção de etanol a partir da fermentação do soro de queijo em escala industrial, nos Estados Unidos, Corona, Califórnia e Melrose. Ambas iniciaram suas operações em 1980, e são atualmente operados por cooperativas leiteiras. Estas produzindo juntas 8 milhões de galões de combustível por ano, equivalente a aproximadamente 30 milhões de litros (LING, 2008).

A estimativa de custos operacionais e de serviços para a produção de etanol a partir do permeado do soro de queijo, com uma taxa de conversão de substrato em produto de 100%, é de US \$1,60 a 1,85 por galão. Valores semelhantes são citados por fontes nos Estados Unidos de US \$ 1,50 a 4,00 por galão (LING, 2008).

Assim, para que uma usina de produção de etanol combustível seja bem sucedida, é necessário uma adequada seleção de tecnologia, engenharia, design, e

apoio de estudos de viabilidade, financiamento adequado, e um pessoal técnico gerencial especializado em processos bioquímicos (LING, 2008).

Desta forma, considerando a ótima adaptação que as leveduras do gênero *Saccharomyces* apresentam em soro de queijo, objetivou-se neste trabalho analisar a influência da adição de nutrientes na fermentação do soro de queijo, verificar o crescimento da levedura e a produção de etanol a partir de diferentes concentrações de lactose hidrolisada, e examinar o comportamento da levedura em escala laboratorial e piloto, a fim de viabilizar a produção de etanol.

MATERIAL E MÉTODOS

As etapas empregadas no tratamento do soro de queijo e fermentações, foram realizadas com base nos resultados de experimentos preliminares, a partir de um planejamento fatorial 3^3 para otimização da produção de etanol utilizando-se soro de queijo desproteínizado concentrado, obtido por (COLOGNESI et al., 2015), que avaliaram a concentração de soro de queijo desproteínizado, pH inicial e inóculo na produção de etanol por *Saccharomyces fragilis*.

Pré-tratamento do soro de queijo

O soro de queijo em pó (Confepar®) foi solubilizado em água destilada na concentração de 15% (m/v) em lactose. A solução foi pré-tratada pela adição de ácido láctico até pH 4,6, e aquecido por 30 minutos a 90°C. Após a precipitação, a fração proteica foi removida por filtração, o pH ajustado para 5,0 e o soro empregado nos experimentos, denominado soro de queijo desproteínizado (SQD) (COLOGNESI et al., 2015).

Preparo do Inóculo / Pré-Incubação

A levedura utilizada foi a *Saccharomyces fragilis* IZ 275, mantida em tubos de ensaio contendo Ágar Batata Dextrose (PDA) inclinado e armazenado a 6°C. No preparo do inóculo foi utilizado o soro de queijo desproteínizado (SQD), esterilizando-o por 15 minutos a 121°C em autoclave. O frasco foi inoculado com uma alça de platina em ambiente estéril, transferindo as colônias da levedura ao frasco com (SQD). Posteriormente, o frasco foi incubado em agitador orbital (TECNAL®) a 35°C, 100 rpm, por 24 horas, e empregado nas fermentações.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Efeito da adição de nutrientes no soro de queijo na produção de etanol por *Saccharomyces fragilis*

A partir de estudos prévios realizados por Santiago et al., (2004), que avaliaram a produção de β -galactosidase por fermentação do soro de queijo suplementado com nutrientes utilizando *Kluyveromyces marxianus*, realizou-se este delineamento experimental com sete tratamentos e duas repetições (Tabela 1), para avaliar o efeito destes nutrientes sobre a produção de etanol, empregando a levedura *Saccharomyces fragilis*. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de (SQD), inoculados com 5% (v/v) de inóculo, e os frascos incubados em agitador orbital (TECNAL®) a 100 rpm, 35°C durante 24 horas. Determinando ao final da fermentação o teor de etanol produzido.

Tabela 1. Concentração de fontes de nutrientes adicionadas ao soro de queijo

Tratamentos	Fontes de Nutrientes	(g/100mL)
T1	Controle	0,0
T2	Extrato de Levedura	1,0
T3	Fosfato de Potássio	0,5
T4	Peptona	1,0
T5	Sulfato de Amônio	0,6
T6	Sulfato de Magnésio	0,06
T7	(T2+T3+T4+T5+T6)	(1,0+0,5+1,0+0,6+0,06)

Efeito da hidrólise da lactose do soro de queijo no crescimento e produção de etanol por *Saccharomyces fragilis*

O experimento foi realizado com o soro de queijo desproteínizado e a hidrólise da lactose foi realizada com a enzima β -galactosidase de origem microbiana (MAXILACT LX5000) em pH 6,6 a 37°C durante 18 horas, seguido da inativação em banho-maria a 90°C por 15 minutos. A formulação do meio (Tabela 2) com diferentes proporções de soro de queijo com lactose hidrolisada foi fermentada por 24 horas em agitador orbital (TECNAL®) a 100 rpm e 35°C. Decorrido o tempo de fermentação foram analisados a porcentagem de etanol, glicose e lactose final e células de leveduras.

Tabela 2. Formulação de meio para fermentação contendo diferentes proporções de soro de queijo desproteínizado com lactose hidrolisada

Tratamentos	Soro de queijo desproteínizado com lactose hidrolisada (mL)	Soro de queijo desproteínizado não hidrolisado (mL)
H1	0	100
H2	10	90
H3	20	80
H4	30	70
H5	40	60
H6	50	50
H7	60	40
H8	70	30
H9	80	20
H10	90	10
H11	100	0

Cinética de fermentação do soro de queijo por *Saccharomyces fragilis*

As cinéticas de fermentação para a produção de etanol com *Saccharomyces fragilis* (SF) foram realizadas em escala laboratorial em frascos Erlenmeyer de 250mL com 100mL de soro de queijo desproteínizado em agitador orbital (TECNAL®).

Para avaliar a reprodutibilidade em escala piloto foi realizada a cinética de fermentação com as mesmas variáveis da cinética anterior, em fermentador orbital (SUCK MILK®), com 50 litros de soro de queijo previamente tratado.

Os meios foram pasteurizados a 90°C por 30 minutos e resfriados a 35°C. As fermentações foram realizadas durante 30 horas, utilizando como substrato 15% (m/v) de soro de queijo desproteínizado, com pH 5,0 e 5% (v/v) de inóculo, a 35°C e 100 rpm para a escala laboratorial e 70 rpm para a piloto. A cada duas horas amostras foram retiradas para a determinação de etanol, glicose e lactose residual, e número total de células de leveduras.

DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

O etanol produzido foi destilado em microdestilador de etanol (TECNAL®) e quantificado pelo método descrito por Kaye e Haag (1954), modificado por Castro Gómez (1985). A glicose residual das fermentações foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico de glicose oxidase (Analisa®). A lactose inicial e residual foi

determinado pelo método descrito por Nickerson, Vukicic e Lin (1975). A determinação do número total de células de levedura foi realizada segundo metodologia descrita por International Dairy Federation (IDF) n. 94B de 1990, e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo software STATISTICA (versão 8.0) da StatSoft. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da adição de nutrientes no soro de queijo na produção de etanol por *Saccharomyces fragilis* (SF)

As produções de etanol por SF em soro de queijo desproteínizado com adição de diferentes nutrientes apresentaram variações entre 2,57 a 5,82% (v/v). A maior produção de etanol foi obtida nos tratamentos T2 e T5, com adição de extrato de levedura e sulfato de amônio respectivamente, sem diferenças significativas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da adição de nutrientes no soro de queijo na produção de etanol (média \pm desvio padrão).

Nutrientes	Etanol (%) \pm Desvio Padrão
T1. Controle	5,52 ^c \pm 0,049
T2. Extrato de Levedura	5,80 ^{ab} \pm 0,014
T3. Fosfato de Potássio	5,40 ^d \pm 0,049
T4. Peptona	2,57 ^f \pm 0,035
T5. Sulfato de Amônio	5,82 ^a \pm 0,028
T6. Sulfato de Magnésio	4,80 ^e \pm 0,007
T7. Todos os Anteriores	5,67 ^b \pm 0,042

^{a,b,c,d}: letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os nutrientes adicionados a fermentação.

A menor produção de etanol foi obtida com a adição de peptona no soro de queijo, tratamento T4, com apenas 2,57% (v/v), demonstrando não ser um

suplemento adequado para a produção de etanol. No entanto, Santos et al., (2013), obtiveram em meios sintéticos de glicose e sacarose suplementados com 1% (m/v) de peptona, resultados favoráveis para a produção de etanol.

As fermentações T2 e T5 exibiram uma produção de +5,07 e +5,43%, em relação ao tratamento controle, cuja produção foi de 5,52% (m/v). Isso demonstra que os nutrientes do soro de queijo são suficientes para a fermentação, e pode ser utilizado como meio de cultura sem suplementação, na fermentação e produção de etanol com leveduras do gênero *Saccharomyces* (SANTIAGO et al., 2004).

Os nutrientes do meio são fundamentais por influenciarem no desenvolvimento das leveduras (SOUSA e MONTEIRO, 2011), afetando a velocidade de crescimento e a multiplicação (CAMILI; CABELLO, 2007), porém a concentração correta é importante, pois pode inibir o crescimento, e influenciar negativamente na eficiência de transformação do açúcar em etanol, quando presentes em quantidades insuficientes ou exageradas (CAMILI; CABELLO, 2007; SILVA, 2007).

Efeito da hidrólise da lactose do soro de queijo no crescimento e produção de etanol por *Saccharomyces fragilis*

Os diferentes níveis de hidrólise da lactose do soro de queijo desproteínizado, proporcionaram produções que variaram de 3,70 a 5,13% (v/v) de etanol. As maiores produções foram obtidas nos tratamentos H2, 4,97% a H4, 5,12% (v/v), sem diferenças significativas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% ($p < 0,05$). Assim, com 10 a 30% de lactose hidrolisada houve a maior produção de etanol, independentemente do crescimento celular, cujo maior valor foi observado a partir do tratamento H5 até H11, sem diferenças significativas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% ($p < 0,05$), exceto o tratamento H6.

O maior crescimento se deve a elevada disponibilidade de monossacarídeos como a glicose e galactose, que fazem com que a levedura se desenvolva mais rapidamente ao meio e inicie o processo fermentativo.

A partir do tratamento com 40% de hidrólise (H5) com 4,64% (v/v) de etanol, houve redução significativa na produção de etanol até T11 com 3,70% (v/v). Esta relação pode ser explicada pelo excesso de açúcares simples presentes no meio para fermentação, ocorrendo a inibição do metabolismo da levedura por repressão do catabolismo por substrato, que ocorre a partir de 16% (m/v) de glicose (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2004; MADDOX, 1989; VASCONCELOS, 1983).

Não houve residual de lactose após 24 horas de fermentação, exceto nas fermentações: controle (H1) e as com menor hidrólise H2 (10%) e H3 (20%) (Tabela 4). Também, no meio controle (H1), sem lactose hidrolisada, obteve-se o menor crescimento celular, 7×10^7 UFC/mL, devido a baixa disponibilidade de monossacarídeos. Nesta situação a levedura precisa inicialmente se adaptar ao meio para depois iniciar a conversão da lactose em açúcares simples e produção de etanol e outros compostos.

Tabela 2. Efeito da hidrólise da lactose no crescimento e produção de etanol (media \pm desvio padrão).

Tratamentos	Etanol (%)	Lactose Final (%)	Glicose Final (%)	UFC/mL 10^7
H1	4,73 ^{cd} \pm 0,042	0,263 ^c \pm 0,001	0,0036 ^{df} \pm 0,003	7 ^e \pm 2,121
H2	5,13 ^a \pm 0,035	0,381 ^a \pm 0,001	0,0033 ^f \pm 0,002	12 ^{cde} \pm 0,707
H3	4,92 ^b \pm 0,092	0,295 ^b \pm 0,002	0,0038 ^{df} \pm 0,003	11 ^{cde} \pm 1,414
H4	4,97 ^{ab} \pm 0,049	0,000 ^d \pm 0,000	0,0038 ^{df} \pm 0,003	10 ^{de} \pm 1,414
H5	4,64 ^{de} \pm 0,042	0,000 ^d \pm 0,000	0,0044 ^{bcd} \pm 0,003	16 ^{abc} \pm 1,414
H6	3,69 ^h \pm 0,021	0,000 ^d \pm 0,000	0,0053 ^{ab} \pm 0,003	13 ^{bcd} \pm 0,707
H7	4,12 ^g \pm 0,021	0,000 ^d \pm 0,000	0,0052 ^{abc} \pm 0,003	15 ^{abcd} \pm 0,707
H8	4,85 ^{bc} \pm 0,014	0,000 ^d \pm 0,000	0,0042 ^{cdf} \pm 0,003	17 ^{ab} \pm 1,414
H9	4,53 ^e \pm 0,028	0,000 ^d \pm 0,000	0,0040 ^{df} \pm 0,003	19 ^a \pm 1,414
H10	4,31 ^f \pm 0,028	0,000 ^d \pm 0,000	0,0041 ^{df} \pm 0,003	16 ^{abc} \pm 1,414
H11	3,70 ^h \pm 0,028	0,000 ^d \pm 0,000	0,0062 ^a \pm 0,002	16 ^{abc} \pm 0,707

^{a,b,c,d}: letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as frações de soro de queijo hidrolisada.

A hidrólise do soro de queijo acrescenta custos adicionais à fermentação, já que as leveduras do gênero *Saccharomyces*, em especial a espécie *marxianus* se destacam pela sua diversidade metabólica, por ser capaz de metabolizar uma variedade de carboidratos como pentoses, hexoses e dissacarídeos (LANE; MORRISSEY, 2010). Além de outros atributos para fermentação em processos industriais, como termotolerância, elevada taxa de crescimento quando comparada a *Kluyveromyces lactis* e capacidade de converter os substratos de baixo custo como a lactose do soro de queijo em etanol, com elevados rendimentos a baixos níveis de oxigênio (LANE et al., 2011; SILVEIRA et al., 2005).

Logo, a hidrólise prévia do soro de queijo torna-se economicamente inviável,

devido aos custos adicionais ao processo fermentativo, já que cada mL da enzima β -galactosidase custa R\$1,25, sendo suficiente para hidrolisar apenas 1 L de soro.

Cinética de fermentação do soro de queijo por *Saccharomyces fragilis*

Na cinética de fermentação em escala laboratorial, avaliou-se a produção de etanol, consumo de lactose, crescimento celular e teor de glicose no meio de cultivo durante as 30 horas do ciclo fermentativo (Figura 1).

A produção de etanol cresceu linearmente de 8 até 18 horas de fermentação na velocidade de $0,50\%.h^{-1}$ de etanol ($R^2 = 0,994$), quando alcançou a maior concentração, com 5,57% (v/v) de etanol. Neste período toda a lactose foi consumida, na velocidade de $0,80\%.h^{-1}$ de lactose ($R^2 = 0,962$) (Figura 1). Isso indica que, na escala laboratorial, a fermentação pode ser finalizada com 18 horas. Observou-se ainda que não houve diferenças significativas (Tukey, 5% de significância: $p < 0,05$) na concentração de etanol entre 14 e 30 horas de fermentação com 3,48 a 4,12% (v/v), respectivamente (Tabela 5).

A concentração de glicose residual permaneceu constante durante a fermentação entre 0,02 a 0,09% (v/v), indicando que a levedura hidrolisa a quantidade de lactose necessária para o seu metabolismo transformá-la em etanol e dióxido de carbono.

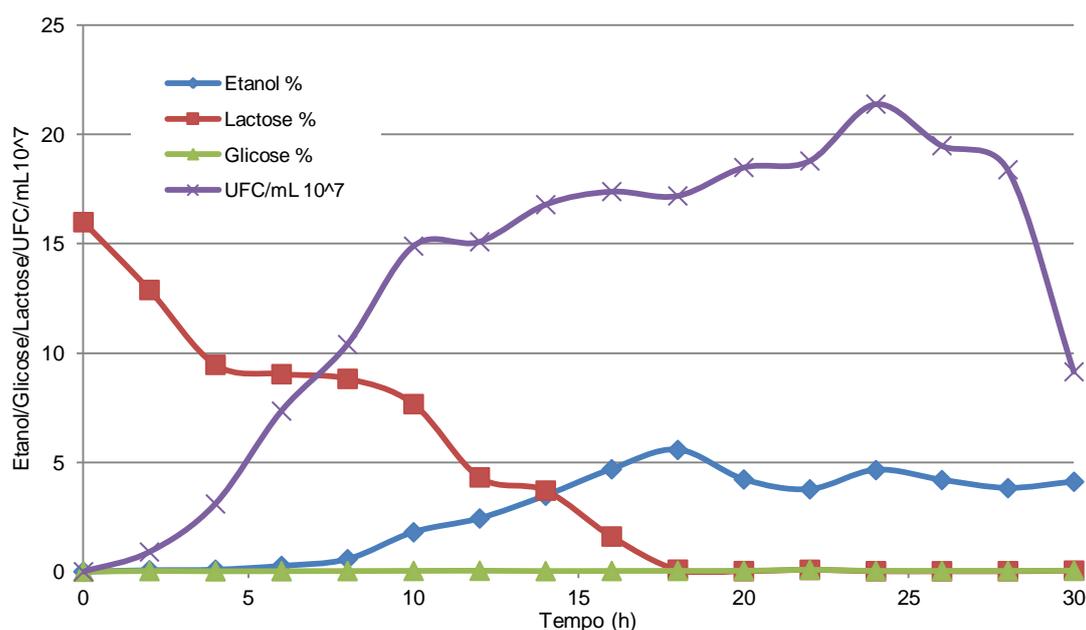


Figura 1. Cinética de fermentação do soro de queijo concentrado por *Saccharomyces fragilis* em escala laboratorial.

Na multiplicação celular a levedura teve um crescimento logarítmico até 10 horas de fermentação, quando alcançou $1,49 \cdot 10^8$ UFC/mL. A taxa de crescimento entre 12 e 24 horas foi menor, mesmo assim alcançou $2,1 \cdot 10^8$ UFC/mL. A partir das 26 horas de fermentação, a levedura iniciou a fase de declínio alcançando ao final, após 30 horas de fermentação $9 \cdot 10^7$ UFC/mL. Provavelmente a morte celular foi devido à ausência de lactose no meio de fermentação, já que após 18 horas de fermentação, praticamente toda lactose já havia sido consumida pela levedura.

O mesmo comportamento foi observado por Colognesi et al., (2015) e Murari et al., (2013), quando relataram que em suas fermentações a produção de etanol apresenta um declínio à medida que a lactose vai se esgotando, podendo a levedura tolerar uma concentração de 10,67% (v/v) de etanol. Assim, na maioria das vezes, a redução da multiplicação celular não está associada apenas à elevada concentração de etanol, mas à ausência de nutrientes.

Tabela 3. Valores dos parâmetros durante a cinética de fermentação por *Saccharomyces fragilis* em escala laboratorial (média \pm desvio padrão).

Tempo (h)	Etanol (%)	Lactose Final (%)	Glicose Final (%)	UFC/mL 10 ⁷
2	0,07 ^e \pm 0,005	12,9 ^a \pm 2,496	0,03 ^{abc} \pm 0,002	0,9 ^d \pm 0,000

4	0,09 ^e ±0,014	9,47 ^b ±0,460	0,02 ^c ±0,001	3,1 ^d ±0,071
6	0,26 ^{de} ±0,030	9,04 ^{ab} ±1,104	0,02 ^b ±0,003	7,35 ^{cd} ±0,354
8	0,57 ^{de} ±0,013	8,83 ^{ab} ±0,184	0,03 ^{abc} ±0,000	10,4 ^{bc} ±0,849
10	1,81 ^{cd} ±0,106	7,67 ^b ±0,002	0,04 ^{abc} ±0,001	14,9 ^{bc} ±1,768
12	2,44 ^{bc} ±0,088	4,32 ^b ±0,505	0,04 ^{abc} ±0,023	15,1 ^{bc} ±0,495
14	3,48 ^{abc} ±0,307	3,71 ^c ±0,001	0,03 ^{abc} ±0,014	16,8 ^{ab} ±1,697
16	4,69 ^{ab} ±1,063	1,61 ^{cd} ±0,323	0,04 ^{abc} ±0,008	17,4 ^{ab} ±1,273
18	5,57 ^a ±0,684	0,09 ^d ±0,001	0,04 ^{abc} ±0,003	17,2 ^{bc} ±4,101
20	4,22 ^a ±0,138	0,03 ^d ±0,002	0,04 ^{abc} ±0,003	18,5 ^{ab} ±0,884
22	3,77 ^a ±0,546	0,09 ^d ±0,002	0,09 ^a ±0,000	18,8 ^{ab} ±1,061
24	4,65 ^a ±0,146	0,02 ^d ±0,003	0,04 ^{abc} ±0,002	21,4 ^a ±4,101
26	4,19 ^{ab} ±0,481	0,02 ^d ±0,001	0,04 ^{abc} ±0,002	19,5 ^{ab} ±2,475
28	3,82 ^a ±0,592	0,02 ^d ±0,002	0,04 ^{abc} ±0,001	18,4 ^{ab} ±1,556
30	4,12 ^a ±0,085	0,05 ^d ±0,034	0,05 ^{ab} ±0,006	9,15 ^{bc} ±3,960

^{a,b,c,d}: letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) durante a cinética de fermentação.

Na cinética de fermentação em escala piloto, com 50 litros de soro de queijo desproteínizado, a produção de etanol foi crescente e linear, a uma velocidade de $0,20\% \cdot h^{-1}$ de etanol ($R^2 = 0,984$) até 28 horas, quando alcançou a concentração de 5,66% (v/v), (Figura 2), embora não houve diferenças significativas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% ($p < 0,05$), entre 26, 28 e 30 horas, com 5,19; 5,66 e 5,40% (v/v) de etanol respectivamente (Tabela 6).

Embora a produção de etanol nas cinéticas laboratorial (5,57% v/v) e piloto com (5,66% v/v), tenha sido próximas, o tempo de fermentação foi expressivamente maior na segunda, com 28 horas em comparação às 18 horas da fermentação laboratorial.

Por outro lado estes valores estão acima ao obtido em outros trabalhos, como a produção de etanol de 1,87% (v/v) obtidos a partir de 5,76% (m/v) de lactose, após 10 horas de fermentação com *Kluyveromyces marxianus* 229 (MURARI et al., 2013). Dahiya e Vij (2012), por sua vez, obtiveram uma produção de apenas 2,0 e 2,5% (v/v) no estado livre e imobilizado, respectivamente, após 72 horas de fermentação com a mesma levedura.

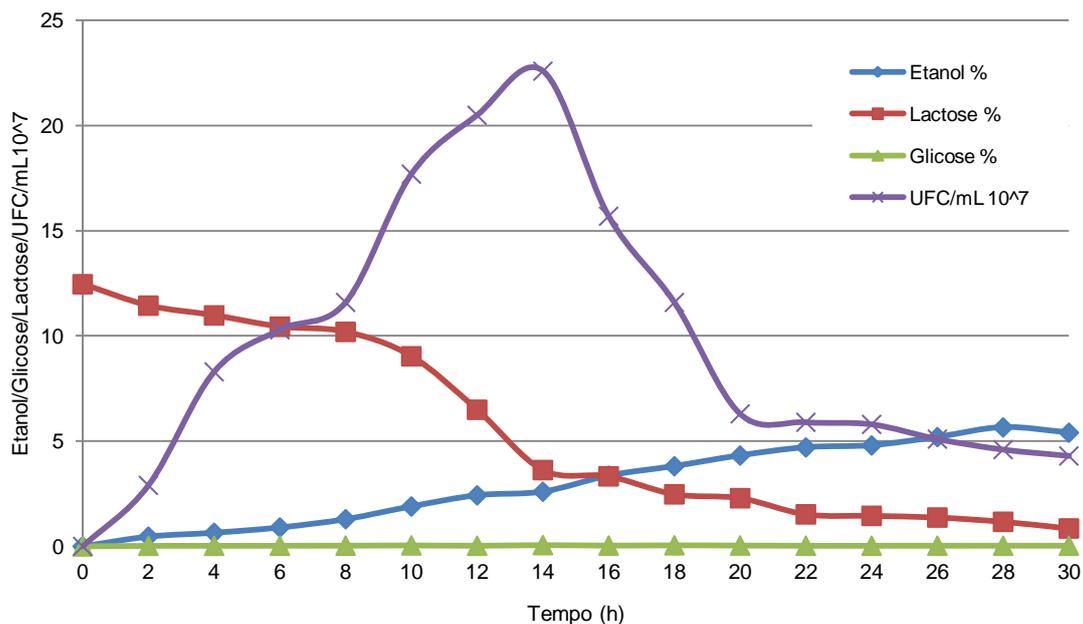


Figura 2. Cinética de fermentação do soro de queijo concentrado por *Saccharomyces fragilis* em escala piloto.

A curva de lactose foi decrescente na velocidade de $0,27\% \cdot h^{-1}$ de lactose ($R^2 = 0,945$), entre 0 e 8 horas. No tempo entre 8 e 14 horas o consumo de lactose foi maior, com velocidade de $1,11\% \cdot h^{-1}$ de lactose ($R^2 = 0,969$). Este rápido consumo neste período está relacionado com o maior crescimento celular. Já entre 14 e 30 horas o consumo foi menor, com velocidade de $0,17\% \cdot h^{-1}$ de lactose ($R^2 = 0,926$). Após o período de 30 horas de fermentação houve um resíduo de apenas 0,85% (v/v) de lactose. A concentração de glicose foi constante durante toda fermentação, variando entre 0,026 a 0,061% (v/v), (Tabela 6), reproduzindo o que foi observado na cinética laboratorial.

O crescimento celular foi linear a uma velocidade de $1,64 \text{ UFC/mL} \cdot h^{-1}$ ($R^2 = 0,983$) até 14 horas de fermentação, quando alcançou $2,2 \cdot 10^8$ UFC/mL. Após 16 horas houve uma redução acentuada na contagem da levedura chegando a $6,3 \cdot 10^7$ UFC/mL as 20 horas. A partir de 22 horas o declínio foi menor e após 30 horas de fermentação, a contagem foi de $4,3 \cdot 10^7$ UFC/mL (Tabela 6).

Tabela 4. Valores dos parâmetros durante a cinética de fermentação por *Saccharomyces fragilis* em escala piloto (média \pm desvio padrão).

Tempo (h)	Etanol (%)	Lactose Final (%)	Glicose Final (%)	UFC/mL 10 ⁷
-----------	------------	-------------------	-------------------	------------------------

2	0,46 ^k ±0,008	11,45 ^a ±0,078	0,026 ^d ±0,003	2,9 ^e ±0,636
4	0,65 ^{jk} ±0,010	10,98 ^b ±0,092	0,028 ^d ±0,001	8,3 ^{cde} ±0,071
6	0,90 ^{jk} ±0,016	10,44 ^c ±0,071	0,032 ^d ±0,004	10,3 ^{bcd} ±1,414
8	1,29 ^{jl} ±0,177	10,20 ^d ±0,064	0,033 ^{cd} ±0,001	11,6 ^{bcd} ±3,960
10	1,90 ^{hi} ±0,027	9,04 ^e ±0,078	0,047 ^{abc} ±0,004	17,7 ^{ab} ±2,828
12	2,43 ^{gh} ±0,010	6,50 ^f ±0,028	0,030 ^d ±0,003	20,5 ^a ±2,828
14	2,60 ^g ±0,261	3,63 ^g ±0,035	0,061 ^a ±0,004	22,6 ^a ±4,243
16	3,36 ^f ±0,035	3,33 ^h ±0,021	0,038 ^{bcd} ±0,004	15,7 ^{abc} ±1,414
18	3,81 ^{ef} ±0,088	2,48 ⁱ ±0,028	0,052 ^{ab} ±0,003	11,6 ^{bcd} ±1,273
20	4,32 ^{de} ±0,097	2,29 ^j ±0,049	0,040 ^{bcd} ±0,005	6,3 ^{de} ±0,849
22	4,70 ^{cd} ±0,146	1,52 ^j ±0,042	0,030 ^d ±0,004	5,9 ^{de} ±1,697
24	4,80 ^{cde} ±0,129	1,45 ^j ±0,007	0,031 ^d ±0,003	5,8 ^{de} ±2,121
26	5,19 ^{abc} ±0,330	1,37 ^{jk} ±0,127	0,032 ^d ±0,004	5,1 ^{de} ±1,061
28	5,66 ^a ±0,052	1,17 ^k ±0,007	0,032 ^d ±0,005	4,6 ^{de} ±1,414
30	5,40 ^{ab} ±0,432	0,85 ^l ±0,071	0,032 ^d ±0,006	4,3 ^e ±0,707

^{a,b,c,d}: letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) durante a cinética de fermentação.

O processo fermentativo origina uma série de compostos que podem atuar como inibidores potenciais. Entre eles está o etanol, um metabólito produzido em maior quantidade, que pode ser tóxico após uma determinada concentração, causando redução na viabilidade celular das leveduras, devido ao estresse causado pela exposição das mesmas ao etanol (SILVA et al., 2008), que provoca alterações na composição da camada lipídica da membrana, agindo de maneira sinérgica intoxicando a célula da levedura, levando-a a morte, com redução da viabilidade celular (OLIVA NETO, 2006).

No entanto, 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 concentração de lactose do meio de fermentação ou o etanol produzido pode alterar o metabolismo do microrganismo. Contudo, a levedura *Kluyveromyces marxianus* vem sendo empregada com sucesso em pesquisas, demonstrando ser potencialmente viável no processo de conversão da lactose em etanol (SILVEIRA et al., 2005).

Assim, tensões severas durante a fermentação, como alto teor alcoólico, elevada pressão osmótica do substrato e forte inibição do etanol durante a fase de produção, podem causar a perda da viabilidade celular com consequente morte

celular, e aumento do período de fermentação (CHRISTENSEN et al., 2011; LI et al., 2009; STANLEY et al., 2010).

Valores acima de 10% de etanol podem ocasionar uma diminuição da eficiência da levedura nas fermentações, pela sua desnaturação, cessando a produção de etanol devido à dissolução da membrana plasmática da célula, enquanto um teor abaixo de 7% prejudica o rendimento da fermentação (SOUSA; MONTEIRO, 2011; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2003).

Da mesma forma, a fermentação é afetada por outros fatores além da elevada concentração de etanol, tais como inibição pelo substrato ou concentração de sais, sendo reduzida pelo aumento de células mortas, déficit de nutrientes, baixa atividade de água, acúmulo de polissacarídeos e de outras macromoléculas, ou perdas indesejáveis de oxigênio no fermentador (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2004; KUMAR; GAYEN, 2011; MADDOX, 1989).

CONCLUSÃO

A suplementação do soro de queijo com extrato de levedura ou sulfato de amônio na fermentação do soro de queijo com *Saccharomyces fragilis* proporcionaram as maiores produções de etanol, com 5,80 e 5,82 respectivamente. No entanto, devido a elevada disponibilidade de nutrientes que o soro de queijo apresenta, a suplementação não demonstrou-se vantajosa perante os resultados obtidos, quando comparado com a fermentação controle.

Da mesma forma, a hidrólise parcial da lactose do soro de queijo apresentou melhor produção de etanol. Entretanto o pequeno aumento na produção do etanol proporcionado pela utilização desta tecnologia, em processos industriais, o torna inviável economicamente pelo elevado custo da enzima β -galactosidase, e pelos processos adicionais, como utilização adicional de energia e tempo de processamento.

As cinéticas, laboratorial e piloto, apresentaram semelhanças na produção de etanol, no entanto, a fermentação em escala piloto necessitou de um tempo maior de fermentação.

Assim, pode-se observar que as leveduras do gênero *Saccharomyces* são capazes de fermentar o soro de queijo desproteínizado em escala piloto, indicando possibilidades de uso em escala industrial, apresentando-se como uma forma de reduzir o potencial poluidor deste subproduto, e ao mesmo tempo obter produto de

valor agregado.

REFERÊNCIAS

ALVES, M. P; MOREIRA, R. O; RODRIGUES JÚNIOR, P. H; MARTINS, M. C. F; PERRONE, I. T; CARVALHO, A. F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista Instituto Cândido Tostes**, v. 69, n.3, p. 212-226, maio/jun., 2014.

BACH, F; FIORESE, M. L; HASAN, S. D. M; MOREJON, C. F. M. Estudo da influência de variáveis no processo de produção de bioetanol de soro de queijo. **Engevista**, 16, n. 3, p. 392-409, set., 2014.

BECERRA, M; CERDÁN, M. E; GONZÁLES-SISO, M. I. Biobutanol from cheese whey. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 1-29, mar., 2015.

CAMILI, E. A; CABELLO, C. **Produção de etanol de manipueira tratada com processo de flotação**. São Paulo, 2007.

CHRISTENSEN, A. D; KÁDÁR, Z; OLESKOWICZ-POPIEL, P; THOMSEN, M. H. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 2, n. 38, p. 283-289, fev., 2011.

COLOGNESI, G. O; DOS SANTOS, L. F; GOMEZ, R. J. H. C; ROIG, S. M; SUGUIMOTO, H. H. Ethanol production potential of *Saccharomyces fragilis* IZ 275 using cheese whey powder solution, **Agrociência**, v. 49, n. 3, p. 291-298, abr./maio, 2015.

DAHIYA, M. VIJ, S. Comparative analysis of bioethanol production from whey by diferente strains of immobilized thermotolerant yeast. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, n. 3, p. 1-5, mar., 2012.

EZEJI T. C; QURESHI, N; BLASCHEK, H. P. Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 6, p. 653–658, fev., 2004.

FOX, P. F; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry**: lactose, water, salts and minor constituents. 3. ed, v. 3, New York: Springer, 2009.

GERNIGON, G., SCHUCK P., JEANTET, R. Processing of mozzarella cheese wheys and stretchwaters: a preliminary review. **Dairy Science and Technology**, v. 90, n. 1, p. 27- 46, 2010.

GONZÁLEZ-SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 1-11, jul., 1996.

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

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and Milk products: Enumeration of yeast e moulds. **FIL-IDF Standard**, n. 94B, Brussels, Belgium, 1990.

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

KUMAR, M; GAYEN, K. Developments in biobutanol production: New insights. **Applied Energy**, v. 88, n. 6, p. 1999–2012, jun., 2011.

LANE, M. M; BURKE, N; KARREMAN, R; WOLFE, K. H; O'BYRNE, C. P; MORRISSEY, J. P. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 4, p. 507-519, nov., 2011.

LANE, M. M; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17-26, fev./maio, 2010.

LI, F; ZHAO, X. Q; GE, X. M; BAI, F. W. An innovative consecutive batch fermentation process for very high gravity ethanol fermentation with self-flocculating yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 1079-1086, oct., 2009.

LING, K. C. Whey to ethanol: a biofuel role for dairy cooperatives?. **USDA Rural Development**. Disponível em: <http://future.aae.wisc.edu/publications/rr214.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2015.

MADDOX, I. S. The acetone–butanol–ethanol fermentation: recent progress in technology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 7, n. 1, p. 189-220, 1989.

MALINOVSKA, R. J. et al. Galacto-oligosaccharides synthesis from lactose and whey by beta-Galactosidase immobilized in PVA. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 5, p. 1197-1211, 2012.

MICINSKI, J; ZWIERZVHOWSKI, G; KOWALSKI, I. M; SZAREK, J. Health-promoting properties of selected milk components. **Journal of Elementology**, v. 18, n. 1, p. 165-186, mar., 2013.

MURARI, C. S; MORAES, D. C; BUENO, G. F; DEL BIANCHI, V. L. Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 393, p. 42-50, jul./ago., 2013.

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**, v. 59, n. 3, p. 386-390, 1975.

OLIVA NETO, P. **Efeito de Fatores Inibidores na Fermentação Alcoólica.** Produção de Etanol: qualidade da matéria-prima. Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP, 2006.

SADIK, M. W; HALEMA, A. A. Production of ethanol from molasses and whey permeate using yeast and bacterial strains. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 804-818, mar., 2014.

SANTIAGO, P. A; MARQUEZ, L. D. S; CARDOSO, V. L; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4 p. 567-572, out./dez., 2004.

SANTOS, E. F. S; SCHAUTZ, L. C. A; CARDOSO, C. A. L; ERNANDES, J. R; BATISTOTE, M. O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. **Ciência e natureza**, v. 35, n. 2, p. 09-14, dez., 2013.

STANLEY, D; BANDARA, A; FRASER, S; CHAMBERS, P. J; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of applied microbiology**, v.109, n. 1 p.13-24, jul., 2010.

SERPA, L; PRIAMO, W. L; REGINATTO, V. Destino ambientalmente correto a rejeitos de queijaria e análise de viabilidade econômica. **In:** 2º Internacional Workshop - Advances in Cleaner Production, São Paulo, p. 1-10, maio, 2009.

SILVA, G. C.; MATA, C. M. R. E. M.; BRAGA, D. E. M.; QUEIROZ, S. V. Extração e fermentação do caldo da algaroba (*Prosopis juliflora*) para produção de aguardente. **Revista brasileira de produtos agroindustriais**, v.5, n.1, p.51-56, 2003.

SILVA, J. A; DAMASCENO, B. P. G. L; SILVA, F. L. H; MADRUGA, M. S; SANTANA, D. P. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073-1077, 2008.

SILVA, J. S. **Produção de álcool combustível na fazenda e em sistema cooperativo**. Viçosa, 2007.

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

SOUSA, J. L. U; MONTEIRO, R. A. B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para produção de etanol. **Cadernos de Pós-Graduação da Fazu**, v. 2, 2011.

SPALATELU, C. Biotechnological valorisation of whey. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 10, p. 1-8, mar., 2012

VASCONCELOS, J. N. **Fermentação etanólica**. Disponível em: <http://docente.ifrn.edu.br/samueloliveira/disciplinas/tecnologia-de-fabricacao-de-biocombustiveis/bioetanol/apostila-2-processo-de-producao-de-etanol-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 14 ago. 2015.

WISSMANN, M. A; HEIN, A. F; FOLLMANN, J; RACHOW, N. I. P. Environmental costs: analysis of its impact and importance in the pursuit of eco-efficiency in an industry of cheese. **Custos e Agronegócio**, v. 8, n. 3, p. 2-23, jul./set., 2012.

ZHANG, S. et al. Acid-induced gelation properties of heated whey protein-pectin soluble complex (Part I): Effect of initial pH. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 76-84, 2014.