



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA À HIDRÓLISE, DE
SORO DE QUEIJO, UTILIZANDO LACTASE E *Saccharomyces
cerevisiae***

AILTON CESAR DE ANDRADE

**UBERLÂNDIA - MG
2005**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA À HIDRÓLISE, DE SORO DE
QUEIJO, UTILIZANDO LACTASE E *Saccharomyces cerevisiae***

Ailton Cesar de Andrade
Engenheiro Químico

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química, área de concentração
em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos
Químicos.**

UBERLÂNDIA - MG

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

A553e Andrade, Ailton Cesar, 1976-

Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae* / Ailton Cesar de Andrade. - Uberlândia, 2005.

110f. : il.

Orientador: Euclídes Honório de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

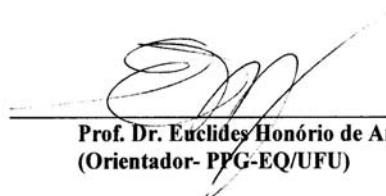
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Soro de queijo - Teses. 3. Fermentação alcoólica - Teses. 4. Hidrólise da lactose - Teses. I. Araújo, Euclídes Honório de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

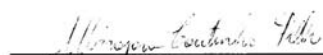
CDU: 66.0 (043.3)

**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de
AILTON CESAR DE ANDRADE, APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DE UBERLÂNDIA, EM 29/08/2005.**

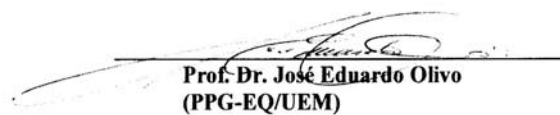
Banca examinadora:



Prof. Dr. Euclides Honório de Araújo
(Orientador- PPG-EQ/UFU)



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(PPG-EQ/UFU)



Prof. Dr. José Eduardo Olivo
(PPG-EQ/UEM)

*“Se todos os seus esforços
forem vistos com indiferença,
não desanime. Também o sol,
ao nascer, dá um espetáculo
todo especial e, no entanto, a
maioria da platéia continua
dormindo”.*

Provérbio chinês

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me iluminou e me deu forças em todos os momentos de dificuldades para que eu pudesse vencer as barreiras encontradas e chegar ao término de mais um etapa de minha vida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e pela força nos momentos difíceis.

Ao orientador Professor Euclídes Honório de Araújo, pela amizade e confiança em mim depositado, pela orientação, esforço e dedicação durante todo o trabalho.

A todos os professores da FEQUI, principalmente aos professores Ubirajara Coutinho e Márcia Gonçalves pela colaboração efetiva e ao professor da UEM, José Eduardo Olivo, pelas sugestões que foi de grande valia.

A todos, colegas de graduação, pós-graduação e aos amigos que direta e indiretamente, acompanharam o meu crescimento no desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – LEITE	3
2.2 – SORO DE QUEIJO	5
2.2.1 – Poder poluente do soro	7
2.2.2 – Dificuldades para aproveitamento do soro	8
2.2.3 – Formas de aproveitamento do soro.....	8
2.3 – LACTOSE	9
2.4 –HIDRÓLISE DA LACTOSE	11
2.5 – ENZIMA β -GALACTOSIDASE	13
2.6 – INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS ENZIMAS	16
2.7 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS ENZIMAS	17
2.8 – SORO COMO SUBSTRATO PARA FERMENTAÇÃO	18
2.9 – LEVEDURAS FERMENTATIVAS	20
2.10 – CINÉTICA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS	21
CAPÍTULO 3	23
MATERIAS E MÉTODOS	23
3.1 – MATERIAIS	23
3.1.1 – Soro de queijo em pó	23
3.1.2 – Enzima β -Galactosidase	23
3.1.3 – Microrganismo	24
3.1.4 – Unidade Experimental	24
3.1.5 – Centrífuga	25
3.1.6 – Banho termostatzado	25
3.1.7 – Espectrofotômetro	26
3.1.8 – Autoclave.....	26
3.1.9 – Micro-destilador	26
3.1.10 – Reagentes.....	26
3.2 – MÉTODOS.....	27
3.2.1 – Definição das variáveis.....	27
3.2.2 – Preparo do meio de fermentação	28
3.2.3 – Início da fermentação	29
3.2.4 – Cálculo do Rendimento e da Produtividade	30
3.2.5 – Modelo Experimental	30
2.2.7 – Cinética da fermentação: parâmetro k e ordem da reação.....	32

CAPÍTULO 4	34
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
4.1- RESULTADOS OBTIDOS	34
4.2 – RESULTADOS: CONCENTRAÇÃO DE SORO = 60G/L	36
4.3 – RESULTADOS: CONCENTRAÇÃO DE SORO = 90G/L	52
4.4 – PRODUTIVIDADE E RENDIMENTO DOS ENSAIOS.....	67
4.4.1 – Concentração de soro = 60g/L.....	67
4.4.2 – Concentração de soro = 90g/L.....	67
4.5 – EFEITO DA AGITAÇÃO NO RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO.....	68
4.6 – COMPARAÇÃO DO MODELO TEÓRICO COM O MODELO EXPERIMENTAL	69
4.7 – CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO: PARÂMETRO K E ORDEM DA REAÇÃO.....	75
CAPÍTULO 5	77
CONCLUSÕES E SUGESTÕES	77
5.1 – CONCLUSÕES	77
5.2 – SUGESTÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXO	83
ANEXO 1	83
TÉCNICAS UTILIZADAS DURANTE A EXECUÇÃO DOS ENSAIOS	83
ANEXO 2	87
MÉTODO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES	87
APÊNDICE	89
APÊNDICE 1	89
CURVA DE CALIBRAÇÃO: AÇÚCAR REDUTOR	89
APÊNDICE 2	91
PARÂMETROS E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO.....	91
APÊNDICE 3	94
RESULTADOS DOS ENSAIOS REALIZADOS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Composição média do leite (BLOWEY, 1992)	4
Figura 2.2: Estrutura molecular da lactose (WALSTRA & JENNESS, 1984)	9
Figura 2.3: Lactase catalisando a reação (LOPEZ-LEIVA & GUZMAN, 1985)	14
Figura 2.4: Representação esquemática de variações de concentrações em um processo fermentativo. P, concentração de produto; S, concentração de substrato; X, concentração do microrganismo (BORZANI et. al., 1975).....	22
Figura 3.1: Fermentador utilizado na execução dos ensaios	24
Figura 3.2: Centrífuga utilizada na separação das fases da fermentação	25
Figura 3.3: Banho Termostizado	26
Figura 4.1: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 1. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 30 g/L e agitação de 500 rpm.	36
Figura 4.2: Açúcar redutor e Glicose para o Ensaio 1.....	37
Figura 4.3: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 2. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 50 g/L e agitação de 300 rpm.	39
Figura 4.4: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 2.....	40
Figura 4.5: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 3. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 30 g/L e agitação de 300 rpm.	41
Figura 4.6: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 3.....	42
Figura 4.7: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 4. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 50 g/L e agitação de 300 rpm.	43
Figura 4.8: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 4.....	44
Figura 4.9: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 5. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 30 g/L e agitação de 300 rpm.	45
Figura 4.10: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 5.....	46
Figura 4.11: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 6. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 70 g/L e agitação de 300 rpm.	47
Figura 4.12: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 6.....	48
Figura 4.13: Concentração de etanol em função dos tempos de fermentação.....	49
Figura 4.14: Açúcares redutores em função dos tempos de fermentação	50
Figura 4.15: Concentração de glicose ao longo das fermentações.....	51
Figura 4.16: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 7. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 70 g/L e agitação de 300 rpm.	52
Figura 4.17: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 7.....	53
Figura 4.18: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 8. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 30 g/L e agitação de 500 rpm.	54
Figura 4.19: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 8.....	55

Figura 4.20: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 9. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 70 g/L e agitação de 300 rpm.	56
Figura 4.21: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 9.....	57
Figura 4.22: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 10. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 30 g/L e agitação de 500 rpm.	58
Figura 4.23: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 10.....	59
Figura 4.24: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 11. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 70 g/L e agitação de 500 rpm.	60
Figura 4.25: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 11.....	61
Figura 4.26: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 12. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 50 g/L e agitação de 300 rpm.	62
Figura 4.27: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 12.....	63
Figura 4.28: Concentração de etanol em função dos tempos de fermentação.....	64
Figura 4.29: Açúcares redutores em função dos tempos de fermentação	65
Figura 4.30: Concentração de glicose ao longo das fermentações.....	66
Figura 4.31: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 1.....	69
Figura 4.32: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 2.....	70
Figura 4.33: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 3.....	70
Figura 4.34: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 4.....	71
Figura 4.35: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 5.....	71
Figura 4.36: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 6.....	72
Figura 4.37: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 7.....	72
Figura 4.38: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 8.....	73
Figura 4.39: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 9.....	73
Figura 4.40: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 10.....	74
Figura 4.41: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 11.....	74
Figura 4.42: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 12.....	75
Figura AP-1: Curva de calibração para avaliar concentração de lactose	89

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição de certos alimentos em aminoácidos, expressos g/100g das proteínas de origem	6
Tabela 2.2: Composição de extrato seco	7
Tabela 2.3: Poder adoçante relativo e solubilidade de vários açúcares.....	10
Tabela 2.4: Propriedades comparativas da lactose e da lactose 90% hidrolisada	12
Tabela 2.5: Propriedades das lactases microbianas	15
Tabela 2.6: Caracterização de lactases de varias fontes em relação ao pH ótimo.....	17
Tabela 3.1: Composição do soro de queijo fornecido pela Vigor Alimentos S/A.	23
Tabela 3.2: Condições das variáveis avaliadas durante a realização dos experimentos.	28
Tabela 4.1: Condições e resultados obtidos nas fermentações.....	35
Tabela 4.2: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 1	38
Tabela 4.3: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 2	40
Tabela 4.4: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 3	42
Tabela 4.5: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 4	44
Tabela 4.6: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 5	47
Tabela 4.7: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 6	49
Tabela 4.8: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 7	53
Tabela 4.9: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 8	56
Tabela 4.10: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 9	58
Tabela 4.11: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 10	60
Tabela 4.12: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 11	62
Tabela 4.13: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 12	64
Tabela 4.14: Produtividade e Rendimento obtidos nos Ensaio 1 a 6.....	67
Tabela 4.15: Produtividade e Rendimento obtidos nos Ensaio 7 a 12.....	67
Tabela 4.16: Agitação e Rendimento obtidos nos Ensaio 1 a 6.....	68
Tabela 4.17: Agitação e Rendimento obtidos nos Ensaio 7 a 12.....	68
Tabela 4.18: Valores de k, n e R^2 para todos os ensaios	76

RESUMO

O objetivo deste trabalho é o estudo do processo de fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando uma levedura bem conhecida, *Sacharomyces cerevisiae*, juntamente com uma lactase obtido do fungo, *Aspergillus oryzae*, capaz de hidrolisar a lactose, nas condições de pH e temperatura respectivamente: 4,5 e 30°C. Foram utilizados como materiais: soro de queijo em pó desnatado; a enzima era β -Galactosidase (EC 3.2.1.23), da Sigma-Aldrich e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na forma de fermento da Fleischmann. A unidade experimental utilizada para conduzir a fermentação é da marca Biostat B-Braun, reator batelada, com volume útil de 1,5 L. Foram seguidas algumas metodologias, como o método da Oxidação pelo Dicromato de Potássio, para determinação do teor de álcool presente nas amostras; o Método do Ácido Dinitrossalicílico (DNS), para avaliar a quantidade de açúcares redutores presentes no decorrer dos ensaios e o Teste Enzimático Colorimétrico para determinação de Glicose nas amostras. A maior produtividade e rendimento alcançados nos ensaios conduzidos a 60 g/L de soro, foram de 2,85 g/L.h e 93,06 %; e para os ensaios conduzidos a 90 g/L de soro, foram de 3,68 g/L.h e 93,90 %.

PALAVRAS CHAVES: Soro de queijo, fermentação alcoólica, hidrólise da lactose.

ABSTRACT

The goal of this work was to study the process of simultaneous saccharification and fermentation of cheese whey, using a well-known yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, and a lactase obtained from *Aspergillus oryzae*. The conditions of pH and temperature were 4.5 and 30°C, respectively. Materials used: powder skimmed cheese whey, the enzyme β -Galactosidase (EC 3.2.1.23) by Sigma-Aldrich and the yeast *S. cerevisiae* manufactured by Fleischmann Co. The experimental unit used to carry out the fermentation was the Biostat B-Braun model, with net capacity of 1.5 L. The method of oxidation by potassium dichromate was used to determine the alcohol content in the samples, the dinitrosalicylic acid method (DNS) was used to evaluate the quantity of reducing sugars present during the experiments and the enzymatic colorimetric test was used to determine the glucose content in the samples. For 60 g/L of whey, the largest productivity and yield obtained were 2.85 g/L.h and 93.06%. And for 90 g/L of whey, they were 3.68 g/L.h and 93.90%, respectively.

Key words: cheese whey, alcoholic fermentation, lactose saccharification.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Há, atualmente, no mundo, uma crescente compreensão de que os compostos orgânicos podem ser utilizados como matéria-prima para produção de alimentos, energia e produtos químicos, substituindo, total ou parcialmente, as fontes fósseis de combustível. Já que, os combustíveis de origem fóssil são esgotáveis e não se renovam, sendo que o período para a sua formação não se mede em anos, mas avalia-se em períodos geológicos (MENEZES, 1980).

Os combustíveis fósseis mais utilizados e mais conhecidos são o carvão mineral e os derivados do petróleo, tais como: a gasolina e o óleo diesel.

Um combustível para veículos, originário de fonte renovável é o etanol, produzido principalmente a partir da cana-de-açúcar.

Com os crescentes preços dos combustíveis automotores tem-se chamado a atenção para a possibilidade de produzir etanol a partir de outras fontes renováveis. Neste contexto, o soro de queijo vem surgindo como uma alternativa viável na produção de etanol (DEMOTT, et. al.,1981; CHEN & ZALL, 1982).

O soro é o resíduo da fabricação do queijo, que antigamente era pouco valorizado e considerado apenas mais um poluente da indústria de alimentos.

O soro de queijo é o constituinte de maior importância, tanto pelo volume gerado, como pela sua carga poluidora. Aproximadamente 80% do volume do leite destinado à fabricação de queijos se transforma em soro (PAOLUCCI, 1991).

A principal preocupação com relação ao soro de queijo de uma maneira global é que, na maioria dos países, grande parte do soro é incorporada às águas residuárias dos laticínios, sendo despejada em cursos d'água, muitas vezes sem o tratamento adequado (KOSIKOWSKI, 1979). Estima-se que o potencial poluidor do soro de queijo é, aproximadamente, cem vezes maior que o do esgoto doméstico. Os níveis de DBO - Demanda Biológica de Oxigênio - são em média de 55.000 mg/L de soro, contra cerca de 500 mg/L do esgoto doméstico (RALPH, 1982 apud TORRES, 1988; COELHO et. al.,2002;FERREIRA,2003).

Atualmente, a legislação ambiental é cada vez mais severa, assim as indústrias de laticínios procuram alternativas para aproveitar o soro de queijo. Sendo que o aproveitamento do soro constitui uma forma para diminuir a capacidade poluidora desse resíduo atendendo assim os órgãos ambientais.

Dentre as várias técnicas de aproveitamento do soro de queijo, destaca-se (MINAS AMBIENTE, 1998): na alimentação animal e como substrato para a fermentação.

O aproveitamento do soro apresenta uma dupla vantagem (FERREIRA, 2003):

- O lucro advindo da comercialização dos produtos;
- A economia do investimento que se obtém ao dispensar o tratamento convencional do soro.

A produção de álcool através da fermentação do soro tem sido estimulada pela crescente necessidade mundial de energia, além de representar uma forma simples de tratamento e disposição de grandes quantidades de soro de leite produzido pela indústria de alimentos (KOSIKOWSKI, 1979).

O álcool produzido por fermentação do soro pode ser empregado tanto na fabricação de vinagre e vinhos (HOLSINGER et al., 1974; KOSIKOWSKI, 1979), quanto na produção de etanol combustível (CHEN & ZALL, 1982; COTON, 1985).

A conversão do soro de queijo em etanol pode ser uma alternativa para o aproveitamento de seus nutrientes. Pesquisas estão sendo desenvolvidas a fim de encontrar os melhores métodos e condições para conversão, buscando também melhorar a eficiência e rendimento do produto, uma vez que a matéria-prima é barata, podendo, neste contexto, alcançar retorno financeiro com a sua comercialização e diminuir a carga poluidora do soro.

O objetivo principal deste trabalho foi o estudo do processo de fermentação simultânea à hidrólise, do soro de queijo, utilizando uma levedura bem conhecida, *Sacharomyces cerevisiae*, juntamente com uma lactase produzida pelo fungo, *Aspergillus oryzae*, capaz de hidrolisar a lactose em um açúcar mais facilmente fermentável, nas condições pré-fixadas de pH e temperatura, 4,5 e 30°C.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – LEITE

O leite é uma mistura complexa, nutritiva e estável de gordura, proteínas e outros elementos sólidos, que se encontram suspensos em água. A gordura e as vitaminas lipossolúveis, A, D, E e K, encontram-se em forma de emulsão, ou seja, uma suspensão de pequenos glóbulos que não se misturam com a água. O leite bovino tem em média 4,8% de lactose, correspondendo a aproximadamente 50% dos sólidos totais do leite desnatado (VINHAL, 2001).

Pequenas quantidades de outros carboidratos são encontradas no leite, parcialmente ligadas a fosfatos, lipídeos e/ou proteínas e parcialmente livres, como por exemplo, os monossacarídeos glicose e galactose a uma concentração de aproximadamente 10 mg/L e os oligossacarídeos a aproximadamente 100 mg/L (RENNER, 1983).

A lactose, as proteínas do soro (albumina, imunoglobulinas, hormônios e enzimas), os minerais, as vitaminas hidrossolúveis (complexo B e C) e substâncias nitrogenadas não protéicas (amônia, uréia, ácido úrico, creatina, ácido hipúrico e outras) encontram-se completamente dissolvidas na água do leite, formando uma solução (BLOWEY, 1992)

A principal proteína do leite é a caseína, que apresenta uma excelente qualidade nutricional e é muito importante na fabricação de queijos. Apresenta-se na forma de partículas de tamanho muito reduzido (0,05 a 0,5 μm), que se distribuem uniformemente numa suspensão. Estas partículas são chamadas de micelas, que são agrupamentos de várias moléculas de caseína junto com sais de cálcio, fósforo e outros, e a sua dispersão no leite é conhecida como suspensão coloidal. (VINHAL, 2001).

A composição do leite varia entre as diferentes espécies de mamíferos e mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Dentro de uma espécie, a composição depende de muitos fatores, tais como: raça, período de lactação, tipo de alimento, manejo da alimentação, frequência de ordenha, entre outros. Assim, é difícil definir uma composição “normal” do leite. Entretanto, as relações entre os diversos constituintes do

leite são muito estáveis e podem ser usadas para indicar se houve qualquer adulteração na sua composição (BLOWEY, 1992). A composição média do leite é apresentada na Figura 2.1.

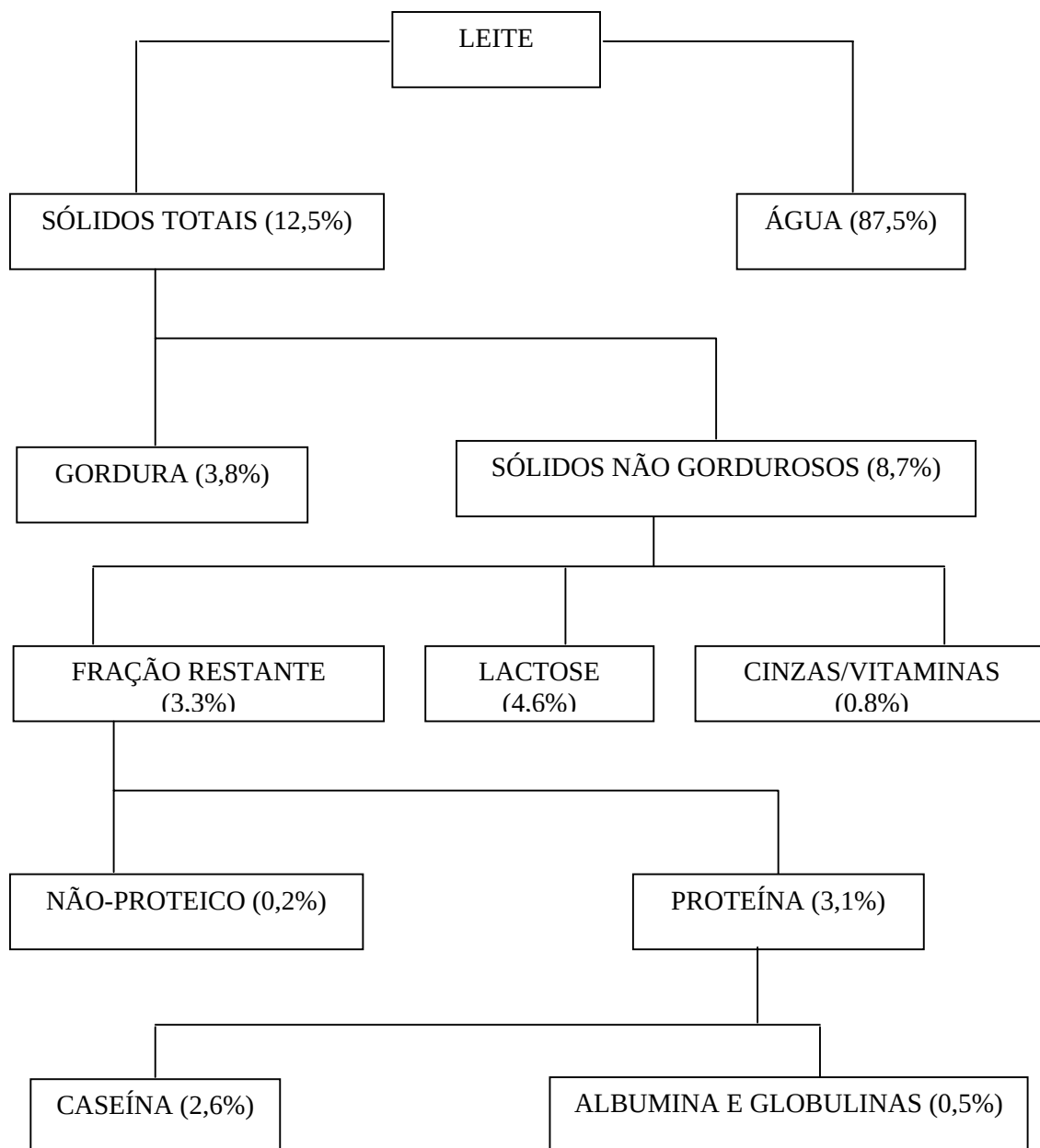


Figura 2.1: Composição média do leite (BLOWEY, 1992)

O leite fresco normal tem um sabor ligeiramente adocicado, devido principalmente ao seu conteúdo de lactose. Entretanto, todos os elementos do leite, inclusive as proteínas que são insípidas, participam de forma direta ou indireta na sensação de sabor. Possui uma cor definida como branco-amarelada e opaca, a qual se

deve principalmente à dispersão da luz pelas micelas de fosfocaseinato de cálcio. Os glóbulos de gordura também dispersam a luz, mas contribuem muito pouco para a cor branca do leite. O caroteno e a riboflavina contribuem para a cor amarelada (VINHAL, 2001).

O leite, sendo um alimento extremamente perecível e sujeito a se contaminar com microrganismos patogênicos ou não, pode trazer prejuízos à saúde do consumidor e causar problemas no processamento industrial. A população de coliformes, por exemplo, duplica a cada 20 a 30 minutos quando o leite é estocado temperatura de 25°C a 40°C; já, quando mantido sob temperaturas de 2°C a 5°C, é reduzida a possibilidade de multiplicação das bactérias capazes de transformar a lactose em ácido láctico (VINHAL, 2001).

2.2 – SORO DE QUEIJO

O soro de queijo pode ser definido como a parte líquida do leite, após a precipitação da caseína, seja para fabricação desta, seja na confecção de queijos. O soro engloba aproximadamente metade dos sólidos contidos no leite, dos quais a lactose é o constituinte presente em maior quantidade. A composição dos soros é variável, sendo função do leite empregado e também das perdas que ocorrem durante a fabricação do queijo. No entanto, é de se esperar que os componentes solúveis do leite estejam presentes nas mesmas proporções que se encontravam originalmente, uma vez que os mesmos permeiam juntos como soro durante a separação do mesmo. Deve-se levar em conta que as quantidades desses componentes que ficaria no queijo, depende, em grande parte, da quantidade de soro retida no mesmo (RAMOS, 1985).

O soro representa aproximadamente 85 a 95% do volume de leite e detém 55% dos nutrientes do leite. Dentre os nutrientes mais importantes destaca-se a lactose, proteínas solúveis, lipídios e sais minerais (MARWAHA & KENNEDY, 1988).

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

Com o desenvolvimento de novas tecnologias e a diversificação de uso cada vez maior, o soro e suas frações tornaram-se ingredientes alimentares muito valorizados.

Dos produtos que podem ser obtidos a partir do soro pode-se citar: o soro em pó, as proteínas do soro, o queijo, a lactose, o ácido láctico, o álcool, o vinagre e alimentos especiais (concentrado protéico, bebidas) (TORRES, 1988).

Com relação às proteínas presentes no soro, o mesmo constitui-se em uma importante fonte destas substâncias, quando comparado com outros alimentos. A Tabela 2.1 compara os aminoácidos presentes no soro de queijo com aqueles de outras proteínas (VIEIRA & NEVES, 1987, apud FERREIRA, 2003).

Tabela 2.1: Composição de certos alimentos em aminoácidos, expressos g/100g das proteínas de origem

Componentes do polímero	Ovo	Proteínas do soro	Caseína	Músculo de porco	Soja
Isoleucina	6,45	6,55	5,80	5,70	5,15
Leucina	8,30	14,00	9,50	9,00	7,85
Lisina	7,05	10,90	7,60	10,00	6,20
Metionina	3,40	2,35	2,95	3,00	1,35
Cisteína	2,25	3,15	0,40	1,40	1,35
Tirosina	4,05	4,80	5,70	3,95	3,40
Treonina	5,15	6,70	4,00	5,10	4,10
Triptofano	1,50	3,20	1,30	1,20	1,25
Valina	7,15	6,85	6,80	6,20	5,30
Sub-total	51,10	62,55	49,45	50,15	41,05

Fonte: VIEIRA & NEVES (1987)

As quantidades de proteínas, sais minerais, ácidos graxos, lactose e ácido láctico são bastante variáveis no soro de queijo, sendo afetada pelo tipo de queijo fabricado e pelo tratamento térmico, dentre outros fatores (PONSANO et. al., 1992).

Vários fatores influenciam na composição e, portanto, no valor nutricional do soro. São eles a qualidade e característica do leite, o tipo de queijo produzido, eventuais tratamentos térmicos do leite ou do soro. Aditivos e fermentos, tempo de ruptura do coágulo, valor final de acidez, desnate, adição de água, tempo de permanência na

fábrica de queijo, higiene e condições de transporte do soro (BERTOL & SANTOS FILHO, 1996).

Segundo RICHARDS (1997), pode-se classificar os diferentes tipos de soro de queijo da seguinte maneira:

- Soro doce, a partir da fabricação de queijos tipo cheddar, suíço e similares, obtidos através da coagulação enzimática do leite;
- Soro ácido, a partir da fabricação de queijo tipo cottage ou de caseína, obtidos através da coagulação utilizando-se ácido;
- Soro desproteínizado, obtido a partir da coagulação das proteínas a quente.

Dos constituintes da fração sólida do soro, a lactose é o que se encontra em maior quantidade, tanto no soro doce, quanto no soro ácido. Contudo, a sua quantidade no soro ácido pode ser menor, devido à fermentação durante a manufatura de queijos que produzem este tipo de soro (FERREIRA, 2003).

O soro na sua forma líquida apresenta um teor em água que varia entre 91 e 95%. A quantidade de extrato seco do soro é reduzida e representa em média 7% do peso total. Este extrato, no entanto, é bastante rico e sua composição média em peso é mostrada na Tabela 2.2, (PAOLUCCI, 1991).

Tabela 2.2: Composição de extrato seco

Componente	Composição (em peso)
Lactose	70 a 80%
Compostos Nitrogenados	10 a 14%
Sais Minerais	1,5 a 4,0%
Lipídeos	0,5 a 6%

Fonte: PAOLUCCI (1991)

2.2.1 – Poder poluente do soro

O soro de queijo quando lançado em cursos d'água pode produzir um efeito poluidor pronunciado, devido ao consumo do oxigênio dissolvido na água pelos microrganismos, diminuindo assim a concentração deste, podendo ocorrer a mortandade de peixes e outros seres do ecossistema aquático (ARAÚJO, 2001).

Estima-se que o potencial poluidor do soro é, aproximadamente, cem vezes maior que o do esgoto doméstico. Os níveis de DBO são em média de 55.000 mg/L de

soro, contra cerca de 500 mg/L do esgoto doméstico (RALPH, 1982 apud TORRES, 1988; COELHO et. al., 2002; FERREIRA, 2003).

O Descarte do soro diretamente no solo, no entanto, conduz ainda a outros sérios problemas ambientais: compromete a estrutura físico-química do solo e diminui o rendimento das colheitas (PONSANO et. al., 1992).

2.2.2 – Dificuldades para aproveitamento do soro

De modo geral, a visão do soro como um rejeito e não como uma matéria-prima dificulta bastante o aproveitamento deste valioso produto.

Dessa visão decorre o aproveitamento inadequado que o soro recebe na maioria dos locais onde é produzido, sendo na maior parte estocado de forma inadequada até que se realize o seu descarte.

O aproveitamento do soro encontra alguns obstáculos, tais como:

- A maioria das queijarias é de pequeno e médio porte, o que dificulta a implantação de uma política de aproveitamento ou tratamento;
- Nestas unidades a geração de soro é relativamente pequena;
- Falta de recursos humanos qualificados na maioria das unidades produtivas;
- Deficiente malha viária e grandes distâncias, que dificulta o rápido escoamento deste produto (MINAS AMBIENTE, 1998).

2.2.3 – Formas de aproveitamento do soro

Com vistas à crescente necessidade de aproveitamento do soro, um grande número de experimentos tem sido desenvolvido em todo o mundo. Os resultados tem sido satisfatórios na indústria de panificação, confeitos e sobremesas geladas. Um uso relativamente novo para os sólidos do soro é como substrato, após enriquecimento com substâncias promotoras de crescimento, no preparo de culturas lácticas (MINAS AMBIENTE, 1998).

Existem atualmente tecnologias disponíveis para aproveitar o soro de queijo e dentre estas pode-se, segundo MINAS AMBIENTE (1998) citar, além do uso para alimentação animal e como substrato para a fermentação, a fabricação de:

- Queijos de soro;

- Bebidas;
- Soro concentrado;
- Soro em pó;
- Soro desmineralizado;
- Concentrados protéicos por ultrafiltração;
- Proteínas do soro;
- Lactose.

2.3 – LACTOSE

A lactose, cujo nome sistemático é o 4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranoose, é o principal carboidrato do leite de todos os mamíferos, sendo formado nas glândulas mamárias a partir da glicose do sangue (FERREIRA, 1978; FREYER, 1972).

A lactose, presente no soro de queijo é chamada de açúcar do leite. Quimicamente, a lactose, que está apresentada na Figura 2.2, é um dissacarídeo redutor constituída por um radical D-glicose e outro D-galactose, unidos por uma ligação β -1 $\rightarrow$ 4 glicosídica (WALSTRA & JENNESS, 1984; HOLSINGER et al., 1974).

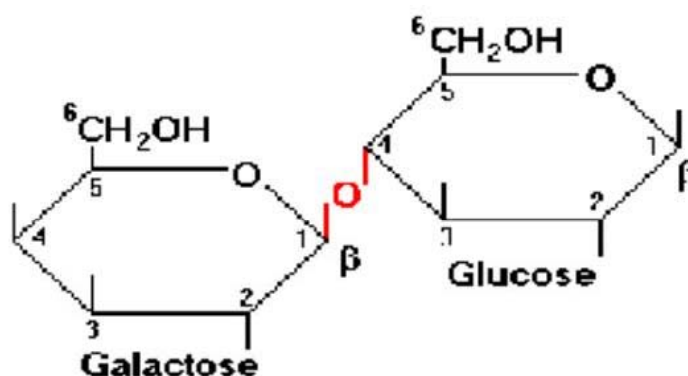


Figura 2.2: Estrutura molecular da lactose (WALSTRA & JENNESS, 1984)

Em relação a outros açúcares, a lactose possui baixo poder adoçante e baixa solubilidade (HOLSINGER et al., 1974). Contudo, seus componentes monossacarídeos, glicose e galactose, possuem um alto poder adoçante, além de outras características desejáveis. Adicionando-se a esta propriedade o problema da baixa solubilidade, a lactose não possui características para ser utilizada como adoçante (ZADOW, 1984). A Tabela 2.3 relaciona a doçura de vários açúcares e as suas solubilidades.

Tabela 2.3: Poder adoçante relativo e solubilidade de vários açúcares

Poder Adoçante Relativo		Solubilidade (%)		
		10°C	30°C	50°C
Sacarose	100	66	69	73
Lactose	16	13	20	30
D- Galactose	32	28	36	47
D-Glicose	74	40	54	70
D-Frutose	173	-	82	87

Fonte: ZADOW (1984)

A lactose representa cerca de 70% (m/m) dos sólidos do soro, e sua extração pode ser economicamente viável. O Brasil importa cerca de 120 toneladas de lactose por mês para uso em produtos farmacêuticos e em alimentos (MINAS AMBIENTE, 1998). A lactose também pode ser usada como matéria-prima para a produção de diversos produtos:

- Lactosil urea, que é preparado pela condensação de lactose e uréia, usado como alimento de ruminantes para síntese de proteínas;
- Lactitol, que é um adoçante não nutritivo semelhante ao sorbitol;
- Lactulose, que é um isômero da lactose obtido pelo tratamento do açúcar do leite em meio alcalino.
- Ligante em pó usado como ingrediente principal no processamento de finos de pó de minério de ferro capturado em equipamentos de controle de poluição, reduzindo o uso de energia gasto na formação de “pellets”.

A utilização fermentativa da lactose presente no permeado de soro de leite, pode fornecer vários produtos, de acordo com o organismo utilizado, como por exemplo: etanol, biomassa, acetona, butanol, ácido lático, lactato de amônio, ácido cítrico, ácido acético, ácido málico, gomas, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, enzimas e metano (PONSANO et. al., 1992).

O alto nível de lactose presente no leite restringe o consumo do mesmo por pessoas que apresentam intolerância a esse carboidrato, devido à deficiência da enzima lactase no intestino delgado. Essa enzima hidrolisa a lactose em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose. Essa intolerância à lactose é definida como uma síndrome clínica

de desconforto intestinal, diarreia e flatulência, após teste com ingestão de lactose (0,2 g de lactose por kg de massa corporal, ministrada em solução aquosa de 20%P/V) (MARIOTTI et al., 2000).

Um estudo apresentado pela Academia Americana de Nutrição, concluiu que cerca de 70% da população adulta mundial apresenta algum tipo de intolerância à lactose (PAIGE, 1971), sendo que essa aumenta com a idade e é mais acentuada nas populações negras e amarelas.

A intolerância à lactose é um fator que tem merecido destaque na literatura médica há décadas, uma vez que dietas à base de leite são importantes devido ao seu alto valor nutritivo. Nos Estados Unidos, estima-se que os produtos de laticínios, excluindo-se a manteiga, contribuem com 11% da energia alimentar consumida diariamente e ainda com 75% do cálcio, 39% da riboflavina, 35% do fósforo, 22% do magnésio, 20% da vitamina B₁₂ e substancial proporção de outros nutrientes (MARIOTTI, 2000).

2.4 –HIDRÓLISE DA LACTOSE

A hidrólise de lactose é um processo promissor nas indústrias alimentícias, principalmente no desenvolvimento de produtos sem lactose na sua composição (GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985). A hidrólise pode produzir um açúcar mais digerível, pois estima-se que boa parte da população mundial possua intolerância à lactose, a qual é atribuída a baixos níveis de lactase intestinal (RICHMOND et al., 1981; HOLSINGER et al., 1974).

A hidrólise da lactose ocasiona modificações físicas e químicas dos produtos. Na Tabela 2.4 compara as propriedades de soluções de lactose pura e hidrolisada (VINHAL, 2001).

Tabela 2.4: Propriedades comparativas da lactose e da lactose 90% hidrolisada

Propriedades	Lactose	Lactose Hidrolisada	Referência
Solubilidade (g/100mL) a 25°C	17	55	Talley e Hunger (1952)
Viscosidade (cP) de solução a 50% a 25°C	17	105	Hemme et al (1979)
Fermentabilidade	Limitada	Boa	-
Taxa relativa de escurecimento	1	3,4	Pomeranz et al (1962)
Doçura relativa à solução de sacarose	30-40	65-90	Guy e Edmonson (1978); Amerine et al (1965)
Propriedades umectantes	-	Comparável à sacarose	Shah e Nickerson (1978c)

Fonte: VINHAL (2001)

De acordo com LOURSEMA (1978), a hidrólise afeta principalmente as seguintes propriedades:

- Solubilidade: a lactose pura apresenta solubilidade máxima de 18% em água, a 25°C. A esta temperatura, a solubilidade da D-glicose e da D-galactose é, respectivamente, de 50% e 32%;
- Poder adoçante: conforme a Tabela 2.3 a lactose é um açúcar de baixo poder adoçante quando comparada à sacarose. Já a mistura de glicose e galactose é 2 a 3 vezes mais doce que a lactose;
- Viscosidade: o produto de hidrólise da lactose mostra uma alta viscosidade, o que permite uma alta concentração de sólidos sem problema de cristalização. É possível, por exemplo, concentrar o soro ou o leite em até 70-75% de sólidos, quando normalmente 50-55% seria o limite;
- Digestibilidade: a lactose não é digerível para grande número de indivíduos. A hidrólise da lactose torna os produtos mais digeríveis, até mesmo para pessoas intolerantes a esse açúcar;

- e) Corpo, textura e paladar: estas propriedades são modificadas, por causa da liberação da galactose, resultante da hidrólise. O sabor do produto fica mais acentuado;
- f) Escurecimento e caramelização: a temperaturas elevadas, e em meios com pH acima de 5, a glicose e a galactose são mais reativas que a lactose, em relação à proteína, de 2,5 e 5 vezes mais, respectivamente.

A lactose pode ser hidrolisada pelo método ácido ou pelo método enzimático, utilizando a enzima β -galactosidase (GEKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; MAHONEY, 1997; LADERO et. al., 2000).

A hidrólise ácida caracteriza-se por envolver soluções diluídas de ácidos fortes como ácido sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura ($1 < \text{pH} < 2$; $100 < \text{Temp.} < 150^\circ\text{C}$). Devido às suas características, a hidrólise ácida tem sua aplicação comercial na indústria alimentícia restrita, pois o uso de catalisadores ácidos acarreta alterações no sabor e cor dos alimentos, devido às reações paralelas de escurecimento, produção de sub-produtos indesejáveis e desnaturação de proteínas (SANTIAGO, 2002).

O método enzimático de hidrólise de lactose emprega a enzima β -galactosidase, a qual hidrolisa o referido dissacarídeo nos seus monossacarídeos constituintes, β -D-galactose e α -D-glicose (GEKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985). Realizada sob condições operacionais consideravelmente mais brandas ($3,5 < \text{pH} < 8,0$; $5 < \text{Temp.} < 60^\circ\text{C}$), reduz não só a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, bem como as necessidades energéticas, os efeitos de corrosão do meio sobre equipamentos e a formação de subprodutos indesejáveis (GEKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY & OLLIS, 1986).

2.5 – ENZIMA β -GALACTOSIDASE

A enzima β -Galactosidase (E.C.3.2.1.23), é usualmente chamada pelo nome de Lactase, ou ainda pelo nome sistemático β -D-galactosideo-galactohidrolase, é classificada como uma hidrolase, com capacidade transferase para grupos galactosil, catalisando o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e

galactose, além de enriquecer o produto hidrolisado com galactoligossacarídeos (Figura 2.3), (LOPEZ-LEIVA & GUZMAN, 1985).

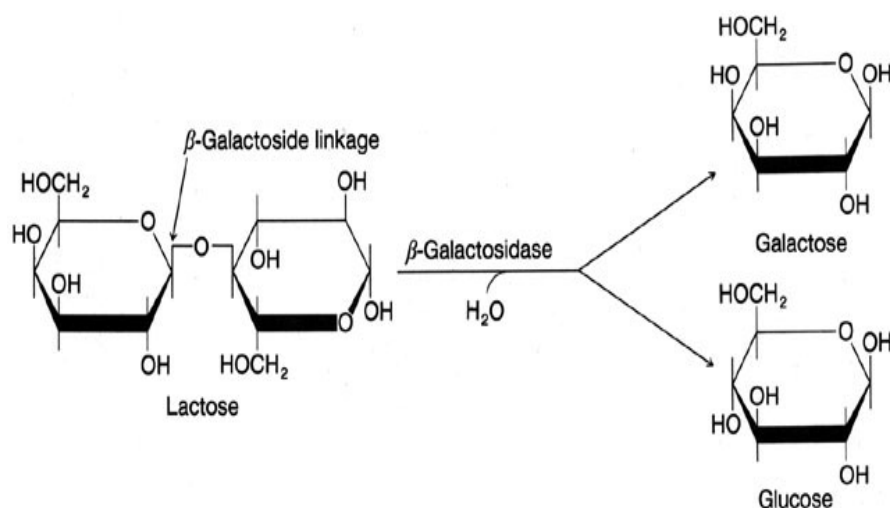


Figura 2.3: Lactase catalisando a reação (LOPEZ-LEIVA & GUZMAN, 1985)

O uso da β -Galactosidase para produzir quantidades pequenas de leite com baixo teor de lactose para alimentação de crianças e adultos foi feito durante anos em clínicas médicas. O interesse comercial no produto foi acentuado nos anos sessenta, estimulado pela oportunidade de vender mais leite e pela necessidade de encontrar novas aplicações para o soro de queijo. O soro é uma solução bruta de lactose, que contém aproximadamente 70 % desse açúcar em base seca. É um problema na área ambiental, quando descartado nos corpos receptores, devido a sua alta demanda química de oxigênio (DQO) e uma opção de alimentação pouco utilizada. A hidrólise da lactose presente nesse subproduto oferece soluções potenciais a este problema (MAHONEY, 1997).

As β -Galactosidases são distribuídas na natureza de acordo com suas múltiplas funções. As Lactases são encontradas em animais, plantas, bactérias, fungos e leveduras. Porém as mais utilizadas são as originárias de leveduras e fungos, as respectivamente mais importantes são: *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* (COUGHLIN & CHARLES, 1980; GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; MACHADO & LINARDI, 1990).

Como já mencionado, existem várias fontes de lactase, mas nem todas são recomendadas como seguras, quando a enzima está sendo usada em processos

alimentícios. Preparações enzimáticas a partir de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e de *Kluyveromyces sp* (*lactis* ou *marxianus*) são consideradas fontes seguras, porque já têm uma história de uso e têm sido submetidas a numerosos testes. A lactase bacteriana de *Escherichia coli*, embora seja uma espécie extensivamente estudada e usada em pesquisas, não é utilizada em processos alimentícios, devido aos problemas de toxicidade com extratos brutos de coliformes (GEKAS, 1985).

A Tabela 2.5 mostra as propriedades das enzimas microbianas, que variam consideravelmente com o microrganismo (SEGEL, 1993).

Tabela 2.5: Propriedades das lactases microbianas

Fonte	pH ótimo	pH estabilidade	Cofatores necessários	Temperatura ótima (°C)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	3,0 – 4,0	2,5 – 8,0	Nenhum	55 – 60	Widmer (1979)
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0	3,5 – 8,0	Nenhum	30 – 40	Park (1979)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6,6	6,5 – 7,5	Mn ²⁺ , K ⁺	37	Mahoney (1978)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,3	7,0 – 7,5	Mn ²⁺ , Na ⁺	35	Dickson (1979)
<i>Escherichia coli</i>	7,2	6,0 – 8,0	Na ⁺ , K ⁺	40	Wallenfels (1960)
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2	Não calculado	Não calculado	55	Singh (1979)
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	6,5	Não calculado	nenhum	60	Singh (1979)

Fonte: SEGEL (1993)

Como mostrado na Tabela 2.5, as melhores condições operacionais de temperatura e pH diferem de acordo com a fonte e quando a enzima encontra-se na forma imobilizada, com a técnica adotada na imobilização. Geralmente as lactases fúngicas apresentam a melhor condição de operação em pH ácido, sendo convenientes

para a hidrólise de soro ácido. Já as lactases de leveduras e bactérias apresentam melhor condição de operação em pH neutro, sendo usadas na hidrólise do leite.

2.6 – INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS ENZIMAS

O efeito do pH nas reações enzimáticas deve-se à ionização do substrato e resíduos de aminoácidos das enzimas. Esses efeitos são manifestados como mudanças na atividade catalítica das enzimas, estabilidade, interações com ligantes, ou mudança no equilíbrio da reação (REED, 1993).

O pH, ou faixa de pH de maior estabilidade da enzima depende de muitos fatores, tais como: a temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de vários preservativos, concentração de substrato, cofatores e concentração de enzimas. Em muitos casos o substrato pode induzir à mudança conformacional da enzima para uma forma que é mais resistente ou menos resistente ao pH e a temperatura de desnaturação. Os sítios ativos das enzimas são frequentemente compostos por grupos ionizáveis que encontram numa forma iônica adequada para se ligar ao substrato ou catalisar a reação. Os efeitos do pH na estabilidade de uma enzima devem ser levados em conta em qualquer estudo do efeito do pH na ligação do substrato e na catálise. A queda na atividade das enzimas pode ser devido à constituição de formas iônicas impróprias do substrato ou da enzima, ou ambos, ou como consequência da desativação das enzimas ou combinação desses efeitos (SEGEL, 1993).

A faixa de pH de maior atividade das enzimas pode variar de 2,0 até 10,0 e muitas exibem o pH próximo do neutro, como no caso da lactase de *Kluyveromyces marxianus*. A mesma enzima isolada, de fontes diferentes, pode exibir valores diferentes de pH ótimos, provavelmente refletindo a necessidade fisiológica do organismo de onde a enzima foi isolada (REED, 1993). Além disso, a técnica pela qual as preparações enzimáticas comerciais são elaboradas, como exemplo o tampão utilizado, pode influenciar diretamente em suas propriedades. Um resumo geral das propriedades das lactases em relação ao pH é mostrado na Tabela 2.6.

Tabela 2.6: Caracterização de lactases de varias fontes em relação ao pH ótimo

Fonte	Atividade máxima
<i>Bacillus spp (stearothermophilus)</i>	pH neutro
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6,5 < pH < 7,0 a 40 – 45°C
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,6 < pH < 6,8 a 35°C
<i>Aspergillus niger</i>	4,0 < pH < 5,0 a 35°C
<i>Aspergillus niger e oryzae</i>	2,5 < pH < 4,5

Fonte: REED (1993)

2.7 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS ENZIMAS

Na maioria das reações químicas ocorre o aumento da velocidade com a elevação da temperatura. Um aumento na temperatura implica maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. As reações catalisadas por enzimas se comportam, até certo ponto, de forma semelhante às outras reações (VINHAL, 2001).

O efeito da temperatura é muito complexo e pode ser devido a várias causas. Inicialmente, com o aumento de temperatura, a atividade molecular é aumentada, contribuindo conseqüentemente para a formação do complexo enzimático; com o aumento contínuo da temperatura, poderá haver uma inativação gradativa da enzima, até inativação total, causada pela desnaturação da proteína pelo calor (BOBBIO; BOBBIO, 1989 apud VINHAL, 2001).

A melhor temperatura de operação é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um longo período de tempo. Essa temperatura pode ser facilmente estabelecida pela pré-incubação da enzima em várias temperaturas, por uma ou duas vezes o tempo escolhido para a realização dos testes experimentais, e aí, medindo-se a atividade a uma temperatura suficientemente baixa para não causar desnaturação da enzima. A temperatura de estabilização da enzima depende de outros fatores com pH, força iônica do meio, presença ou ausência de ligantes (SEGEL, 1993).

2.8 – SORO COMO SUBSTRATO PARA FERMENTAÇÃO

A utilização do soro lácteo como meio de cultura tem sido estudada há bastante tempo. Sua composição e seu alto teor em lactose, açúcar fermentescível, fazem do soro líquido ou concentrado um substrato de fermentação bastante interessante. Acrescente-se a estes fatores o fato que o soro pode ser disponível em grande quantidade a custo relativamente baixo (MINAS AMBIENTE, 1998).

As principais utilizações do soro como substrato são (MINAS AMBIENTE, 1998):

- Produção de bactérias lácticas e propiônicas, para utilização na indústria de laticínios;
- Produção industrial de culturas de *Penicillium roqueforti*, o fungo responsável pela produção dos chamados “queijos azuis”;
- Produção de biomassa de leveduras. Existem em uso industrial, diversos processos para produção de leveduras, os quais empregam o soro lácteo como substrato.

Através da fermentação do soro é possível obter os seguintes produtos (MINAS AMBIENTE, 1998): beta-galactosidase; ácido láctico e lactatos; ácido propiônico e propionatos; etanol, vitaminas, principalmente riboflavina e vitamina B e bebidas fermentadas, alcoólicas ou não.

Nos Estados Unidos, Irlanda e particularmente na Nova Zelândia, cerca de 50% da produção de soro de queijo é utilizada para produção de etanol (MAWSON, 1994).

A utilização do soro na fabricação de produtos por fermentação depende, em geral, da disponibilidade de um microrganismo seguro para converter a lactose na substância desejada e da viabilidade do custo da fonte do carboidrato a ser fermentado, em comparação com o do melaço ou do milho (TORRES, 1988).

Na produção de etanol a partir do soro de queijo, a dificuldade está na escolha do microrganismo capaz fermentar diretamente a lactose presente no soro (CASTILHO, 1990). Atualmente a *Kluyveromyces marxianus* é o microrganismo mais utilizado na fermentação direta, com um rendimento entre 80-85% (MAWSON, 1994).

Há na literatura uma alternativa, a fermentação indireta, que consiste na hidrólise da lactose pela enzima β -Galactosidase, produzindo açúcares mais facilmente fermentáveis e conseqüentemente a fermentação dos monossacarídeos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (RUSSEL, 1986; CASTILLO, 1990; CHAMPAGNE & GOULET, 1988 apud SISO, 1996).

Um dos primeiros trabalhos sobre fermentação do soro de queijo foi realizado por ROGOSA et al. (1947), utilizaram diversas leveduras lactose-fermentativas e as fermentações mais rápidas ocorreram a 37°C, com a levedura *Torula cremoris*, fornecendo um rendimento 90,73%.

BERNSTEIN et al. (1977) utilizaram a *Saccharomyces marxianus* primeiramente em sistema aeróbico do soro de leite para a produção de biomassa, em seguida, sob condições anaeróbicas, o sistema foi utilizado para a produção de álcool. No final do processo, as células, as proteínas do soro e todos resíduos provenientes da fermentação foram secos por aspersão, fornecendo componentes para uso em ração animal.

A maioria dos trabalhos pioneiros sobre produção de etanol a partir de soro de queijo originou-se da produção de vinho e cerveja (CHEN & ZALL, 1982 apud POSANO, 1992).

POSANO (1992) também produziu etanol a partir do soro, utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus*. Durante a produção foram acompanhados os teores de etanol, lactose e conteúdo celular. Os melhores resultados foram em um tempo de 21 horas, com concentração de etanol de 14 g/L.

SILVA & CASTRO-GOMEZ (1995) cultivaram *Kluyveromyces marxianus* em soro de queijo. Durante o processo fermentativo seis parâmetros foram avaliados: pH, concentração de lactose, concentração de proteína, concentração de etanol, número de células de leveduras e a concentração de massa seca. Esta fermentação apresentou-se como um possível meio para reduzir o potencial poluente do soro de queijo.

GHALY & EL-TAWEEL (1997) desenvolveram um modelo cinético para fermentação contínua de etanol a partir do soro de queijo. O modelo avaliou principalmente o consumo de substrato e a produção de etanol. Os testes foram realizados no período de 18 a 42 h e com concentrações iniciais de lactose entre 50 a 150 g/L. Os dados experimentais eram utilizados para validar o modelo. De acordo com

o modelo, o melhor rendimento teórico foi de 99,6%, em 42 horas de fermentação e para uma concentração inicial de lactose de 150 g/L.

FERREIRA (2003) utilizou a levedura *Kluyveromyces marxianus* na produção de etanol a partir do soro. Foram avaliados durante a fermentação o consumo de substrato, produção de etanol e massa seca. Os melhores resultados foram com um pH de 6 e temperatura de 40°C, com um tempo de 8 horas de fermentação com uma produtividade de etanol de 2,73 g/L.h.

2.9 – LEVEDURAS FERMENTATIVAS

As espécies utilizadas na fermentação para produção de etanol são eumicetos, e exibem diversas formas de crescimento e multiplicação. Sob certas condições de cultivo, são capazes de utilizar uma variedade de substratos, dependendo da espécie em questão. Em geral, esses microrganismos são capazes de crescer e de produzir etanol eficientemente em valores de pH entre 3,5 e 6,0, e de temperatura entre 28 e 35°C (KOSARIC et. al., 1983).

Dentre os microrganismos produtores de álcool, destacam-se *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces sp* (MENEZES, 1980; KOSARIC et. al., 1983). Além desses, existe um grande número de organismos obtidos a partir de manipulações genéticas das várias linhagens dessas leveduras (STEWART, 1981 apud KOSARIC et. al., 1983)

A escolha do organismo a ser usado na produção de etanol depende do processo empregado, do substrato em questão e dos objetivos a serem alcançados. Por isso, dentre as espécies de leveduras produtoras de álcool, é importante a utilização de linhagens selecionadas e aclimatizadas para a realização da fermentação, devendo apresentar certos requisitos para que a eficiência do processo seja adequada (MENEZES, 1980; KOSARIC et. al., 1983).

Assim, os organismos escolhidos deverão fornecer alto rendimento do produto por unidade de substrato assimilada, alta taxa de fermentação, apresentar substancial tolerância ao etanol, possuir a habilidades de permanecer viável em altas temperaturas, possuir estabilidade sob condições adequadas de fermentação e apresentar tolerância a baixos valores de pH (MENEZES, 1980; KOSARIC et. al., 1983). Existem

relativamente poucas leveduras capazes de fermentar a lactose rápida e eficientemente, e que apresentem, ao mesmo tempo, uma boa tolerância ao etanol (WOYCHIK & HOLSINGER, 1977; CHEN & ZALL, 1982; KOSARIC & ASHER, 1982).

Uma levedura que merece destaque é a *Kluyveromyces marxianus*, ela se mostra uma das mais eficientes na conversão da lactose do soro de leite em etanol e na tolerância a este produto (WOYCHIK & HOLSINGER, 1977).

Dentre as leveduras de maior importância industrial encontram-se as linhagens fermentativas de *Saccharomyces*, empregadas na produção de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*), vinho (*Saccharomyces ellipsoideus*), produção industrial de etanol a partir de cana de açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*), além da indústria de panificação. (PARK & BARATTI, 1991).

2.10 – CINÉTICA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

No estudo da cinética de processos fermentativos, é necessário lançar mão de métodos analíticos seguros que permitam medir, com elevado grau de confiança, as variações de suas concentrações com o tempo (BORZANI et. al., 1975).

Durante fermentação, retira-se periodicamente uma amostra do material fermentado e em seguida determina-se às concentrações da substância que está sendo consumida (S), de um produto (P) e do microrganismo (X) (BORZANI et. al., 1975). As variações dessas concentrações com o tempo conduzirá a curvas do tipo das representadas na Figura 2.4.

A partir dessas curvas é possível determinar, em cada instante, as velocidades de consumo do substrato (dS/dT), de formação do produto (dP/dT) e de crescimento do microrganismo (dX/dT) (BORZANI et. al., 1975).

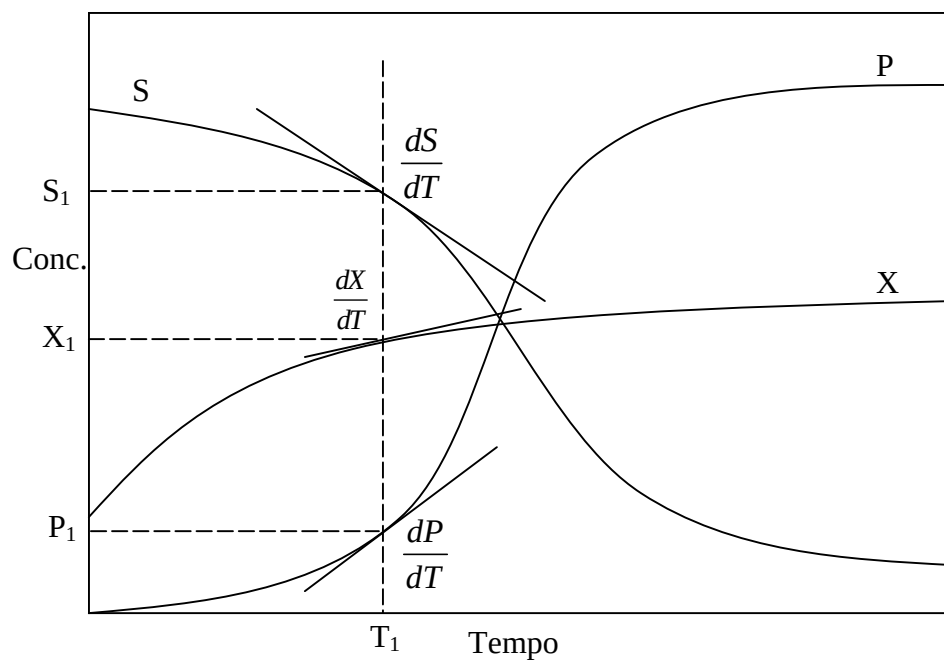


Figura 2.4: Representação esquemática de variações de concentrações em um processo fermentativo. P, concentração de produto; S, concentração de substrato; X, concentração do microrganismo (BORZANI et. al., 1975).

CAPÍTULO 3

MATERIAS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

Os reagentes e equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho são descritos a seguir.

3.1.1 – Soro de queijo em pó

O soro de queijo em pó desnatado foi adquirido junto a Fábrica de Produtos Alimentícios Vigor S/A, localizada na cidade de São Gonçalo do Sapucaí (MG), a sua composição é apresentada na Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Composição do soro de queijo fornecido pela Vigor Alimentos S/A.

Constituinte	Mínimo (%)*	Máximo (%)*
Proteínas	11,0	nd
Lactose	72,0	nd
Cloreto	nd	5,0
Sais minerais	7,0	9,0

*A porcentagem é dada em Peso/Peso
nd – Não disponível

3.1.2 – Enzima β -Galactosidase

A enzima utilizada neste trabalho foi a β -Galactosidase (β -D-Galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23), fornecida pela Sigma-Aldrich, obtida pelo cultivo de *Aspergillus oryzae*, com condições ótimas de estabilidade em pH e temperatura 4,5 e 30°C.

3.1.3 – Microrganismo

Foi utilizado como inóculo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, proveniente do Fermento Biológico Fresco prensado, fornecida pela Fleischmann.

3.1.4 – Unidade Experimental

A unidade experimental apresentada na Figura 3.1 utilizada para conduzir a fermentação é da marca Biostat B-Braun, sendo este um fermentador, com controle de pH, temperatura, agitação. Esse fermentador consistia em duas partes:

- O tanque cilíndrico com volume útil de 1,5 L, onde era colocado o meio de fermentação, esse tanque era fechado com uma tampa de aço inoxidável com aberturas para a entrada do inóculo, ácido/base, retirada de amostras e um exaustor. Na tampa do fermentador havia um motor que promovia a agitação do meio.
- A outra parte era constituída de um sistema de controle com um “display” onde eram apresentadas as variáveis que estavam sendo controladas no processo.



Figura 3.1: Fermentador utilizado na execução dos ensaios

3.1.5 – Centrífuga

Foi utilizada uma centrífuga marca Beckmann Coulter, apresentada na Figura 3.2, modelo Avanti J-25 com controles de velocidade, tempo e temperatura.

Este equipamento era utilizado logo após a retirada das amostras do fermentador, para que fosse possível a separação do sobrenadante e da massa de microrganismos.



Figura 3.2: Centrífuga utilizada na separação das fases da fermentação

3.1.6 – Banho termostatzado

Foi utilizado um banho termostatzado da marca Thermomix, modelo 18BU da B. Braun Biotech International, que está apresentado na Figura 3.3, com controle de temperatura;

Este banho foi utilizado durante as análises da quantidade de álcool presente nas amostras e nos ensaios para determinação de concentração de glicose.



Figura 3.3: Banho Termostizado

3.1.7 – Espectrofotômetro

Também foi utilizado um espectrofotômetro Genesys, modelo 10UV para a leitura da concentração de açúcar redutores e glicose.

3.1.8 – Autoclave

A autoclave era da marca Fanem, utilizada para esterilização do meio de fermentação.

3.1.9 – Micro-destilador

O micro-destilador foi utilizado durante o Método da Oxidação pelo Dicromato de Potássio, para determinação do teor de álcool presentes nas amostras;

3.1.10 – Reagentes

Todos reagentes químicos utilizados nos experimentos apresentaram grau de pureza analítica. A seguir encontra-se a descrição destes reagentes:

- Extrato de Levedura – Vetec Química Fina Ltda;
- Sulfato de Amônio – Labsynth – Produtos para Laboratório Ltda;
- D(+) Lactose P.A – Vetec Química Fina Ltda;
- Glicose Anidra P.A – Proquímios Ltda;
- Galactose P.A – Vetec Química Fina Ltda;
- Dicromato de Potássio P.A – Vetec Química Fina Ltda;
- Sulfato de Amônio Ferroso – Cromoline Química Fina Ltda;
- Ácido Sulfúrico P.A – F. Maia – Indústria e Comércio Ltda;
- Hidróxido de Sódio P.A – Vetec Química Fina Ltda;
- Glicose Enzimática – Laborclin – Produtos para Laboratório Ltda;
- Ácido 3,5 – Dinitrossalicílico P.A – Vetec Química Fina Ltda;
- Tartarato tetra hidratado duplo de Na e K – CAQ – Casa da Química Ltda;
- 1, 10 Fenantrolina P. A (orto) – Vetec Química Fina Ltda.

3.2 – MÉTODOS

Para a execução dos ensaios foram seguidas algumas metodologias:

- Método do Ácido Dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959), para avaliar a quantidade de açúcares redutores presentes no decorrer dos ensaios;
- Método da Oxidação pelo Dicromato de Potássio (JOSLYN, 1950), para determinação do teor de álcool presentes nas amostras;
- Teste Enzimático Colorimétrico, para avaliar a concentração de glicose no decorrer dos ensaios.
- Análise de Massa Seca.

Os métodos supra mencionados encontram-se detalhados no Anexo 1.

3.2.1 – Definição das variáveis

Durante as fermentações foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Concentração de soro de queijo;
- Quantidade de suplemento à fermentação;

- Quantidade de inóculo;
- Concentração de enzima;
- Agitação.

Inicialmente foram feitos alguns testes preliminares, utilizando as variáveis acima citadas em condições adversas, a fim de chegar na faixa desejada de estudo.

As condições experimentais utilizados nos ensaios encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Condições das variáveis avaliadas durante a realização dos experimentos.

Ensaio	Concentração Soro (g/L)	Nutrientes* (g/L)	Enzima (g/L)	Inóculo (g/L)	Agitação (rpm)
1	60	1,0	0,2	30	500
2	60	1,0	0,2	50	300
3	60	1,0	0,4	30	300
4	60	1,0	0,4	50	500
5	60	3,0	0,2	30	300
6	60	3,0	0,4	70	300
7	90	1,0	0,4	70	300
8	90	1,0	0,2	30	500
9	90	3,0	0,2	70	300
10	90	3,0	0,4	30	500
11	90	3,0	0,4	70	500
12	90	3,0	0,2	50	300

*Nutrientes: Extrato de Levedura e Sulfato de amônio

3.2.2 – Preparo do meio de fermentação

Para o preparo do meio de fermentação, pesava-se a quantidade de soro desejada de acordo com o ensaio e com a Tabela 3.2, juntamente com a quantidade de nutrientes que foram: Extrato de Levedura e Sulfato de Amônio. O soro e os nutrientes eram dissolvidos até o volume de 1,5L, sendo este o volume útil do fermentador.

A solução preparada era então inserida no tanque cilíndrico do fermentador. O conjunto era levado até a autoclave nas condições de 120°C e 1 atm, por um período de 20 minutos. Esse procedimento era feito para garantir que o meio de fermentação estivesse livre de contaminação.

3.2.3 – Início da fermentação

Logo após o preparo do meio de fermentação e sua esterilização, o conjunto contendo o soro de queijo e os nutrientes eram montados na unidade experimental de acordo com a Figura 3.1.

Após a montagem, eram ajustadas, no sistema de controle do fermentador, a temperatura e o pH, respectivamente: 30° C e 4,5. E a agitação era ajustada de acordo com a Tabela 3.2.

Ajustadas as variáveis, era adicionado no meio a enzima e simultaneamente o inóculo, nas quantidades pré-determinadas de acordo com cada ensaio e a Tabela 3.2.

No início da fermentação, colhia-se uma amostra após 10 minutos de fermentação para avaliar a concentração de Glicose presente no meio. Durante a fermentação as amostras eram coletadas em intervalos de tempo de 2 em 2 horas para avaliar os seguintes parâmetros:

- Concentração de açúcar redutor presente no meio;
- Concentração de etanol;
- Concentração de glicose;
- Concentração de células “massa seca”.

Para a realização das análises dos parâmetros descritos acima, era coletada uma alíquota de 30mL do meio fermentativo, sendo a mesma centrifugada a 12.000 rpm, durante 5 minutos.

O sobrenadante era utilizado nas análises de etanol, açúcares redutores e glicose, de acordo com os métodos do Item 3.2 e descritos no Anexo 1. A massa seca que ficava no fundo da cubeta da centrífuga era lavada, e em seguida avaliada o conteúdo seco de acordo com Item 3.2 e descrito no Anexo 1.

Para aferição da quantidade de açúcar redutor presente na amostra, era necessário fazer uma curva de calibração com amostras de concentrações conhecidas de lactose de acordo com o Apêndice 1.

3.2.4 – Cálculo do Rendimento e da Produtividade

Para o cálculo da produtividade foi empregada a Equação 1.

$$\text{Produtividade (g/L.h)} = \frac{\text{Etanol produzido}}{\text{tempo}} \quad (1)$$

O rendimento da fermentação foi calculado através da Equação 2.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Etanol produzido}}{\text{Substrato consumido} * 0,5368} \quad (2)$$

O valor de 0,5368 refere-se ao valor teórico para a conversão da lactose a etanol, tal como apresenta a Equação 3.



3.2.5 – Modelo Experimental

Utilizando o Software TABLE CURVE 2D™, foi possível levantar o equacionamento que melhor se ajustou aos dados experimentais. As equações de substrato e produto são respectivamente apresentadas pelas Equações 4 e 5. Essas equações foram utilizadas para todos os ensaios. As mesmas foram derivadas em intervalo de 1 em 1 hora. Para cada intervalo foi levantado a taxa de consumo de substrato – açúcar redutor – (dS/dt) e a taxa de produção de etanol (dP/dt). Esse procedimento foi feito para cada ensaio.

Equação utilizada para todos os ensaio relativas ao substrato:

$$y = a + b*x + c*x^2 + d*\exp(-x) \quad (4)$$

Equação utilizada para todos os ensaio relativas ao produto:

$$y = a + b \cdot x + c \cdot x^2 + d \cdot \exp(x) \quad (5)$$

$$\text{Produção de etanol} = \frac{dP}{dt} = \frac{dy}{dx} \quad (6)$$

$$\text{Consumo de substrato} = \frac{dS}{dt} = \frac{dy}{dx} \quad (7)$$

Os valores dos parâmetros (a,b,c e d) das Equações 4 e 5 e os valores do coeficiente de correlação de cada ensaio encontram-se no Apêndice 2.

3.2.6 – Modelo Teórico

A fim de validar o modelo experimental, recorreu-se na literatura para buscar um modelo teórico, capaz de reproduzir o consumo de substrato.

Utilizou-se o modelo modificado de Monod (BLANCH & CLARK, 1997), que é apresentado pelas duas equações abaixo, que representa a taxa de consumo de substrato e crescimento de microrganismo.

$$\frac{dX}{dT} = \mu X = \frac{\mu_m SX}{K_s + S} \quad (8)$$

$$\frac{dS}{dT} = -\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{\mu_m SX}{K_s + S} \quad (9)$$

Condições iniciais: $X(0)=X_0$; $S(0)=S_0$

$$\frac{d(X + Y_{X/S}S)}{dT} = 0 \quad (10)$$

$$X + Y_{X/S}S = X_0 + Y_{X/S}S_0 \quad (11)$$

Substituindo a Eq. 10 e 11 na Eq. 9, obtemos a Eq. 12, que representa o modelo teórico para o consumo de substrato:

$$\frac{dS}{dT} = -\frac{\mu_m}{Y_{X/S}} * \frac{(X_0 + Y_{X/S} * (S_0 - S)) * S}{(K_s + S)} \quad (12)$$

Integrando analiticamente a Eq. 12 obtemos:

$$[X_0 + Y_{X/S} * (S_0 + K_s)] * \ln\left(\frac{X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)}{X_0}\right) - K_s * Y_{X/S} * \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = \mu_m * (X_0 + Y_{X/S} * S_0) * t \quad (13)$$

2.2.7 – Cinética da fermentação: parâmetro k e ordem da reação

A taxa de consumo de substrato é dada pela Equação 14:

$$-\frac{dS}{dt} = k * [S]^n \quad (14)$$

Onde:

$$\frac{dS}{dt} = \text{Taxa de consumo de substrato;}$$

k = Constante da reação;

[S] = Concentração de substrato;

n = Ordem da reação.

A taxa de produção de etanol é dada pela equação 15:

$$\frac{dP}{dt} = k * [S]^n \quad (15)$$

Onde:

$$\frac{dP}{dt} = \text{Taxa de produção de etanol.}$$

Utilizando o Software STATISTICA[®], Versão 5, edição 97, foi feita uma regressão linear das Equações 14 e 15, e aproveitando os dados das taxas de consumo de substrato e produção de etanol e da concentração de substrato de cada ensaio, foi possível fazer um levantamento da constante da reação k e da ordem da reação.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1- RESULTADOS OBTIDOS

Durante a execução deste trabalho foram realizados um total de doze experimentos variando as quantidades de soro de queijo, quantidade de nutrientes (na forma de extrato de levedura e sulfato de amônio), quantidade de enzima, quantidade de inóculo e agitação. As condições de temperatura e pH para todos os ensaios foram afixadas em 30°C e 4,5.

Os resultados obtidos e as condições estudadas encontram-se apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Condições e resultados obtidos nas fermentações

Ensaio	Conc. de Soro (g/L)	Conc. de Sulfato de Amônio (g/L)	Conc. de Extrato de Levedura (g/L)	Conc. de Enzima (g/L)	Conc. de Inóculo (g/L)	Agitação (rpm)	Conc. de Açúcar ART (g/L)		Conc. de Álcool (g/L)	T _f (h)	η (%)	P (g/L.h)
							Inicial	Final				
1	60	1,0	1,0	0,2	30	500	46	1,06	18,65	13	77,31	1,43
2	60	1,0	1,0	0,2	50	300	44	2,40	19,04	10	85,26	1,90
3	60	1,0	1,0	0,4	30	300	43	2,33	19,15	8	87,72	2,39
4	60	1,0	1,0	0,4	50	500	44,3	1,31	18,72	8	81,12	2,34
5	60	3,0	3,0	0,2	30	300	43,4	5,19	18,48	8	90,10	2,31
6	60	3,0	3,0	0,4	70	300	43,75	9,54	17,09	6	93,06	2,85
7	90	1,0	1,0	0,4	70	300	65	3,67	29,40	8	89,30	3,68
8	90	1,0	1,0	0,2	30	500	64,3	4,77	24,31	12	76,07	2,03
9	90	3,0	3,0	0,2	70	300	65,2	10,13	25,83	10	87,38	2,58
10	90	3,0	3,0	0,4	30	500	66,2	2,54	26,58	12	77,78	2,22
11	90	3,0	3,0	0,4	70	500	63,5	8,66	27,35	8	92,91	3,42
12	90	3,0	3,0	0,2	50	300	66	5,71	30,39	10	93,90	3,04

Conc. – Concentração

T_f – Tempo de Fermentação, onde se pode verificar a maior concentração de etanol;

η - Rendimento da fermentação;

P – Produtividade da fermentação relativa ao produto.

ART – Açúcar Redutor Total

De acordo com a Tabela 4.1, os Ensaios de 1 a 6 foram realizados com uma concentração de soro de 60 g/L e os ensaios 7 a 12 a uma concentração de 90 g/L.

Os resultados dos itens a seguir foram divididos em dois grupos: 60 e 90 g/L de soro, a fim de facilitar a discussão. Os resultados de cada ensaio estão apresentados em um gráfico com as variações das concentrações de açúcar redutor, etanol e de massa seca. Também é apresentado um gráfico com o comportamento da concentração de açúcar redutor e glicose.

4.2 – RESULTADOS: CONCENTRAÇÃO DE SORO = 60G/L

A Figura 4.1 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 1.

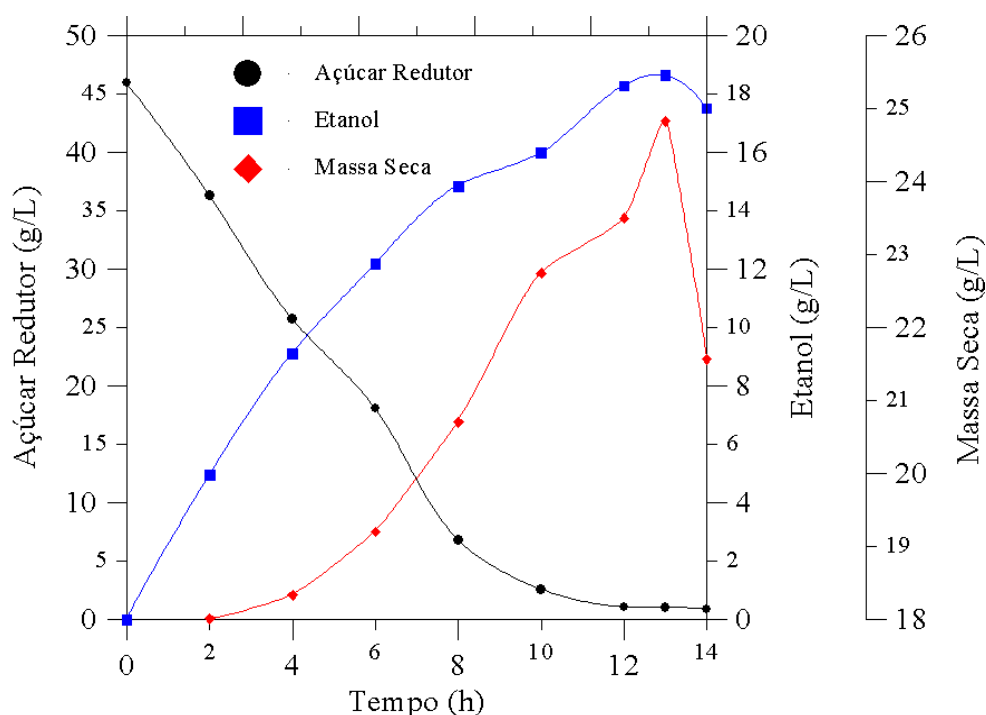


Figura 4.1: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 1. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 30 g/L e agitação de 500 rpm.

No Ensaio 1, o consumo de substrato até a 10ª hora de fermentação atingiu o valor de 2,61 g/L, sendo praticamente esgotada em 12 horas de fermentação. A produção de etanol mostrou-se acentuada até a 8ª hora, atingindo um valor de 14,85 g/L, a partir desse instante a produção torna-se moderada, atingindo a produção máxima em

13 horas de fermentação, com um valor de 18,65 g/L. A partir desse momento nota-se uma queda na produção de etanol.

Com relação à concentração de células, expressa como massa seca, o crescimento foi moderado, a partir de um valor medido na 2ª hora de 18,02 g/L e atingi na 13ª hora, 24,83 g/L.

A Figura 4.2 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 1, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

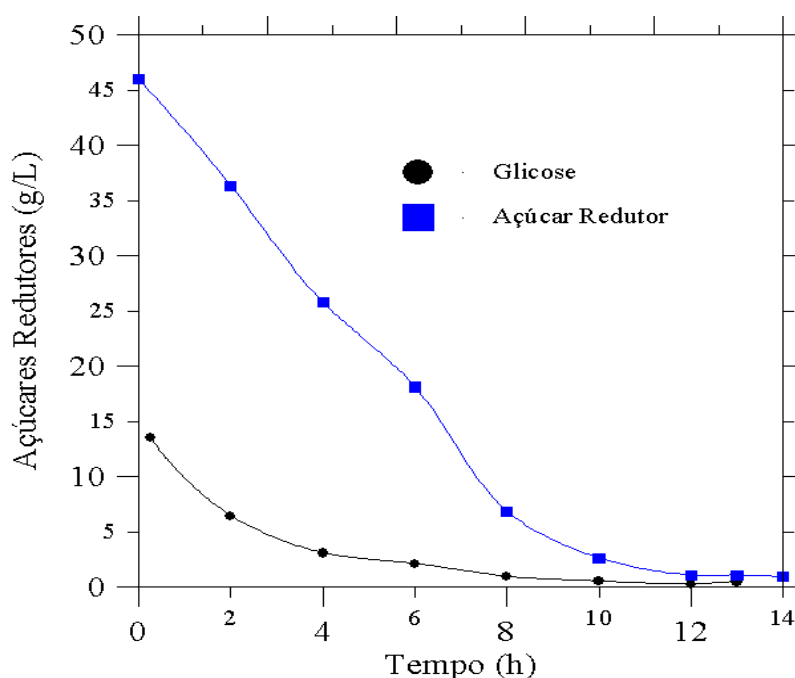


Figura 4.2: Açúcar redutor e Glicose para o Ensaio 1

Nota-se que desde o início até a 4ª hora de fermentação que a glicose é consumida rapidamente devida à atuação da enzima no processo de conversão da lactose nos seus respectivos monossacarídeos, açúcares mais facilmente fermentáveis. Da 6ª a 10ª hora o consumo da glicose apresenta-se moderada, até seu esgotamento em 13 horas de fermentação. A diferença entre as curvas, de açúcar redutor e glicose, representa o teor remanescente de açúcar redutor representada por lactose mais galactose que não passaram, respectivamente, pela hidrólise da enzima e pela fermentação das leveduras. Essa diferença é maior nas 6 primeiras horas de fermentação.

Na Tabela 4.2 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

Tabela 4.2: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 1

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-4,828	2,300
2	-5,849	2,141
3	-5,835	1,981
4	-5,439	1,821
5	-4,903	1,661
6	-4,316	1,501
7	-3,710	1,340
8	-3,097	1,178
9	-2,482	1,012
10	-1,865	0,837
11	-1,248	0,636
12	-0,631	0,363
13	-0,014	-0,104
14	0,603	-1,099

De acordo com Tabela 4.2 observa-se que a maior velocidade de consumo de substrato ocorreu no tempo compreendido entre 1 e 9 horas, com taxas de 4,83 a 2,48 g/L.h, a partir desse instante o consumo de substrato foi praticamente constante. A produção de etanol teve uma maior velocidade de produção até 8^a hora, a partir da 12^a hora a taxa passa pelo seu máximo.

A Figura 4.3 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para Ensaio 2.

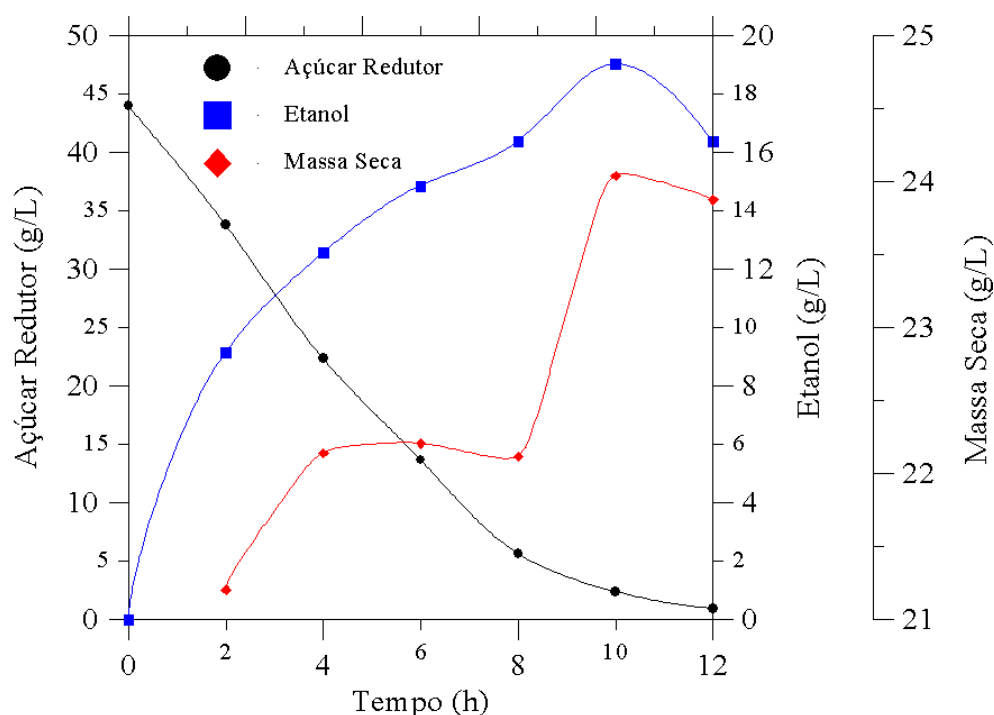


Figura 4.3: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 2. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 50 g/L e agitação de 300 rpm.

No Ensaio 2 observa-se que até a 8ª hora de fermentação há um consumo acentuado do substrato, pois a fermentação foi iniciada com 44 g/L e chegando a 5,68 g/L. A partir da 8ª hora o substrato é praticamente esgotado. A produção de etanol apresentou uma maior crescimento até a 6ª hora, 14,85 g/L. No intervalo da 6ª e 10ª hora a produção de etanol teve um pequeno pico, e por volta da 10ª hora houve uma produção máxima, 19,04 g/L. Já partir da 10ª hora, houve uma ligeira queda da produção de etanol.

Em relação ao Ensaio 1, um aumento na quantidade de inóculo do Ensaio 2 contribuiu para uma conversão máxima de etanol em 10 horas de fermentação.

A concentração de massa seca teve um crescimento pouco significativo, iniciando com 21,21 g/L e chegando na 10ª hora com 24,04 g/L. Em comparação com o Ensaio 1 um aumento da quantidade inóculo reduziu a produção de massa seca em 30%.

A Figura 4.4 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 2, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

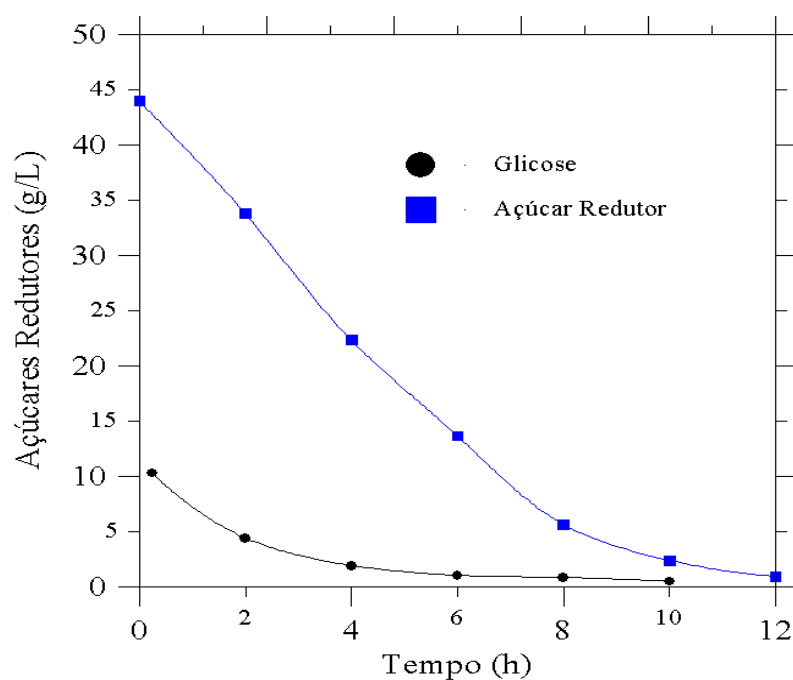


Figura 4.4: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 2

O consumo da glicose foi bem gradativo durante toda a fermentação e a partir da 10^a hora a glicose é praticamente esgotada. A diferença entre as duas curvas é maior até a 6^a hora de fermentação.

Na Tabela 4.3 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

Tabela 4.3: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 2

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-5,389	3,174
2	-5,995	2,804
3	-5,793	2,434
4	-5,294	2,064
5	-4,684	1,694
6	-4,035	1,323
7	-3,371	0,952
8	-2,701	0,576
9	-2,029	0,193
10	-1,357	-0,215
11	-0,684	-0,688
12	-0,011	-1,338

A velocidade de consumo de substrato foi iniciada com uma taxa de 5,39 g/L.h e chegando a 1,36 g/L.h em 10 horas de fermentação. A partir desse instante foi praticamente constante. A taxa de produção etanol apresentou moderada até a 6ª hora, 1,32 g/L.h.. A partir da 10ª hora a taxa de produção passou pelo seu máximo.

A Figura 4.5 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 3.

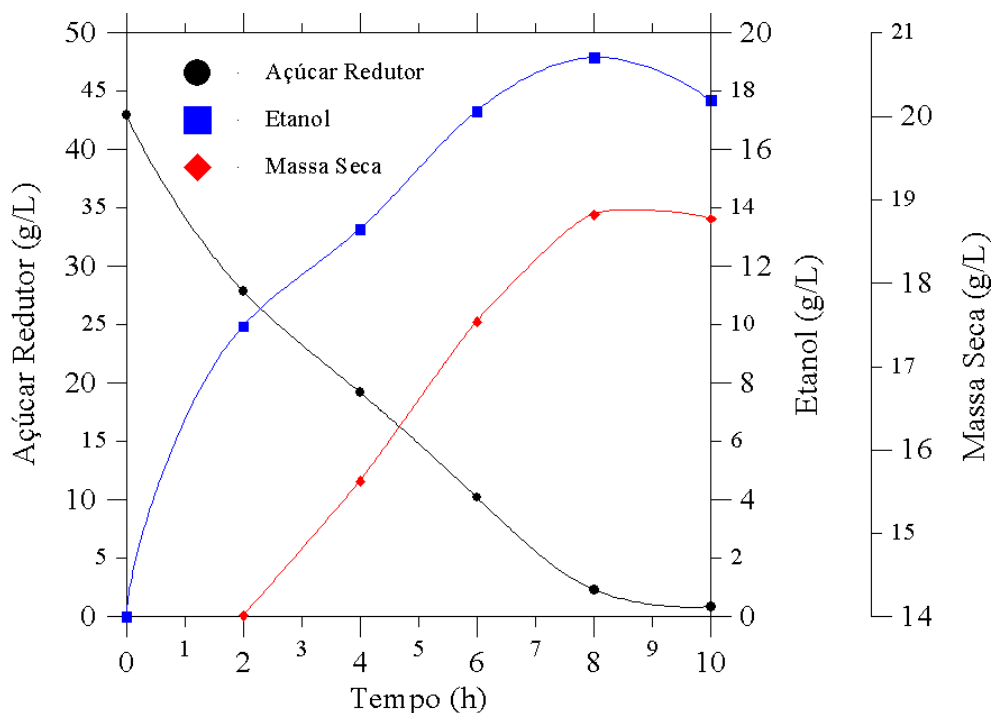


Figura 4.5: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 3. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 30 g/L e agitação de 300 rpm.

O Ensaio 3 mostra que a quantidade de substrato é consumida de forma gradativa até a 8ª hora, tendo como concentração inicial de substrato, 43 g/L, chegando a 2,33 g/L. A partir deste instante ela é praticamente esgotada. A produção de etanol atingiu o máximo em 8 horas de fermentação, 19,15 g/L. A partir da 8ª hora o etanol teve uma pequena queda.

Em comparação com ensaios anteriores, um aumento da quantidade de enzima contribuiu para o esgotamento do substrato e uma produção máxima de álcool em 8 horas de fermentação.

A concentração de massa seca teve um crescimento em relação à quantidade de microrganismo de 63 % até a 8ª hora, 18,82 g/L.

A Figura 4.6 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 3, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

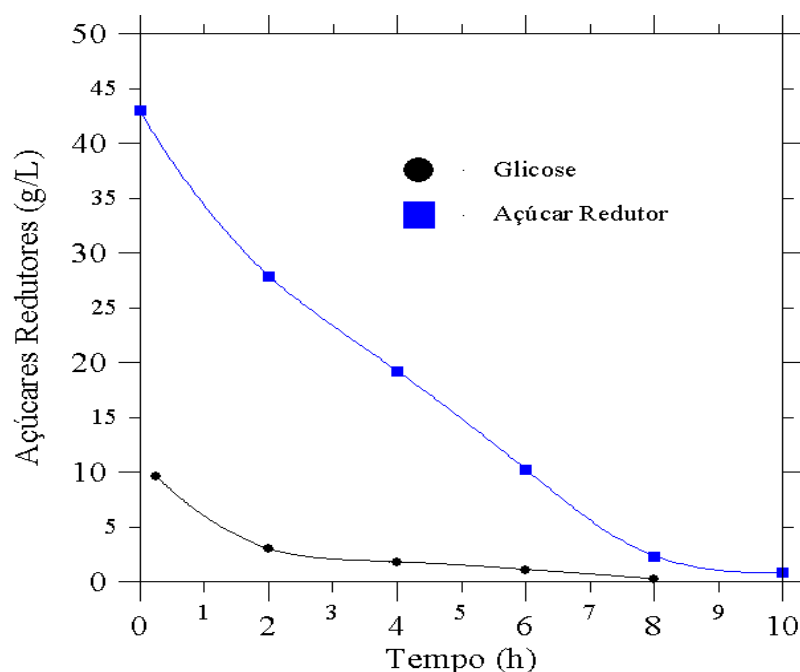


Figura 4.6: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 3

A glicose foi praticamente consumida em 8 horas de fermentação. A maior diferença entre as curvas pode ser notado nas 4 primeiras horas de fermentação, a partir deste instante a diferença é bem menor.

Na Tabela 4.4 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

Tabela 4.4: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 3

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-7,004	3,967
2	-6,012	3,404
3	-5,296	2,840
4	-4,680	2,277
5	-4,102	1,713
6	-3,538	1,150
7	-2,978	0,588
8	-2,421	0,027
9	-1,864	-0,530
10	-1,308	-1,074

De acordo com a Tabela 4.4, a taxa de consumo de substrato iniciou-se com 7 g/L.h e mostrou-se bastante moderada durante toda a fermentação. A taxa de produção de etanol iniciou-se com 3,98 g/l.h e atingindo o máximo em 8 horas de fermentação.

A Figura 4.7 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 4.

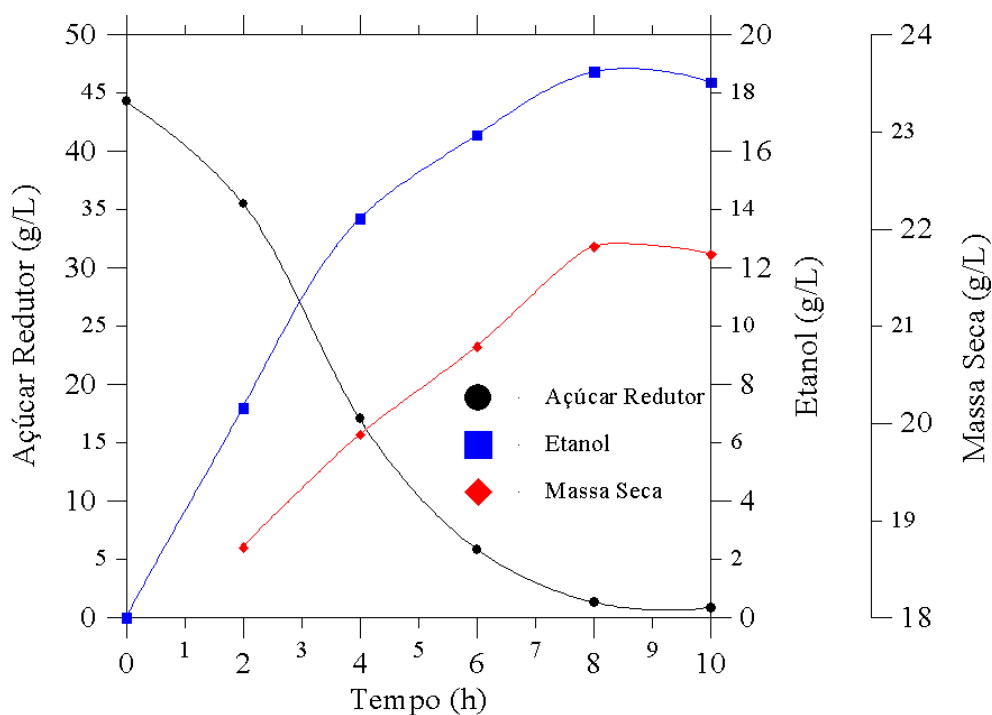


Figura 4.7: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 4. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 50 g/L e agitação de 300 rpm.

No Ensaio 4, o substrato foi iniciado com uma concentração de 44,3 g/L, observa-se que ele foi praticamente consumido em 8 horas de fermentação, 1,31 g/L. No intervalo de 0 a 4 horas a produção de etanol teve um crescimento acentuado, atingindo uma concentração de 13,68 g/L. A partir de 4ª hora a produção foi bem moderada e a atingindo o máximo e 8 horas de fermentação, 18,72 g/L. A partir da 8ª hora houve uma pequena queda na produção de etanol.

A concentração de massa seca teve um pequeno crescimento, em comparação com o Ensaio 2 para uma mesma quantidade de inóculo, a produção de massa seca no final 8ª hora foi de 21,82 g/L, girou em torno de 45% da quantidade de microrganismo.

A Figura 4.8 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 4, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

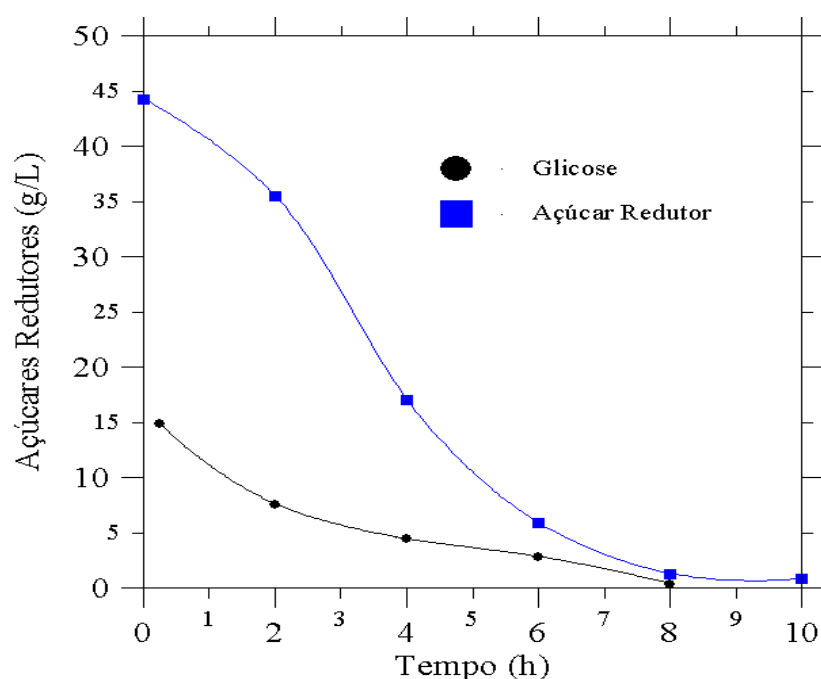


Figura 4.8: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 4

Neste Ensaio o consumo de glicose é pronunciado até a 4ª hora de fermentação, sendo que a partir da 8ª hora é totalmente esgotada. Há uma diferença entre as curvas nas 4 primeiras horas, a partir deste instante já não houve diferença e na 6ª hora praticamente todo açúcar foi hidrolisado.

Na Tabela 4.5 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

Tabela 4.5: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 4

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-8,944	3,810
2	-8,649	3,320
3	-8,588	2,830
4	-7,511	2,339
5	-6,059	1,849
6	-4,470	1,358
7	-2,830	0,867
8	-1,171	0,373
9	0,495	-0,125
10	2,163	-0,637

Nota-se que a velocidade de consumo de substrato inicialmente foi moderada até a 5ª hora, iniciando a uma taxa de 8,94 g/L.h e chegando até a 6,06 g/L.h. A partir desse instante até a 8ª hora, a velocidade chegou a uma taxa de 1,17 g/L.h. Já a velocidade de produção de etanol mostrou-se moderada durante quase toda fermentação, iniciou-se com uma taxa de 3,81 g/L.h e passando pelo máximo em 9 horas.

A Figura 4.9 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 5.

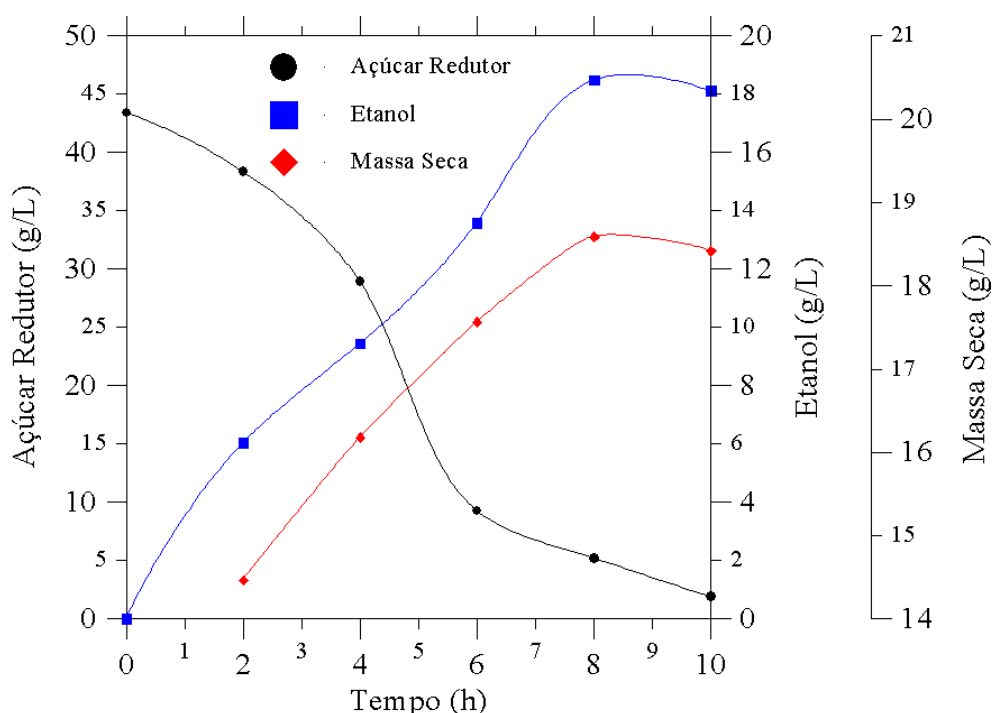


Figura 4.9: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 5. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 30 g/L e agitação de 300 rpm.

No Ensaio 5 o consumo de substrato até a 6ª hora de fermentação, chegou a uma concentração de 9,28 g/L. No intervalo da 6ª a 10ª hora o consumo de substrato foi relativamente pequeno, sendo todo consumido em 10 horas de fermentação. A produção de etanol foi aumentada gradativamente até a 6ª hora, 13,58 g/L. No intervalo de 6ª e 8ª a produção teve um crescimento acentuado, atingindo a produção máxima em 8 horas de fermentação, 18,48 g/L.

Um aumento na quantidade de nutrientes (extrato de levedura e sulfato de amônio), contribuiu para um consumo bem pronunciado de substrato nas 6 primeiras horas de fermentação.

A concentração de massa seca foi ligeiramente crescente, iniciando com uma concentração de 14,46 g/L e atingindo uma produção de 62 % em relação à quantidade de microrganismo em 8 horas de fermentação, 18.59 g/L.

A Figura 4.10 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 5, durante toda a fermentação em comparação com as concentrações de glicose.

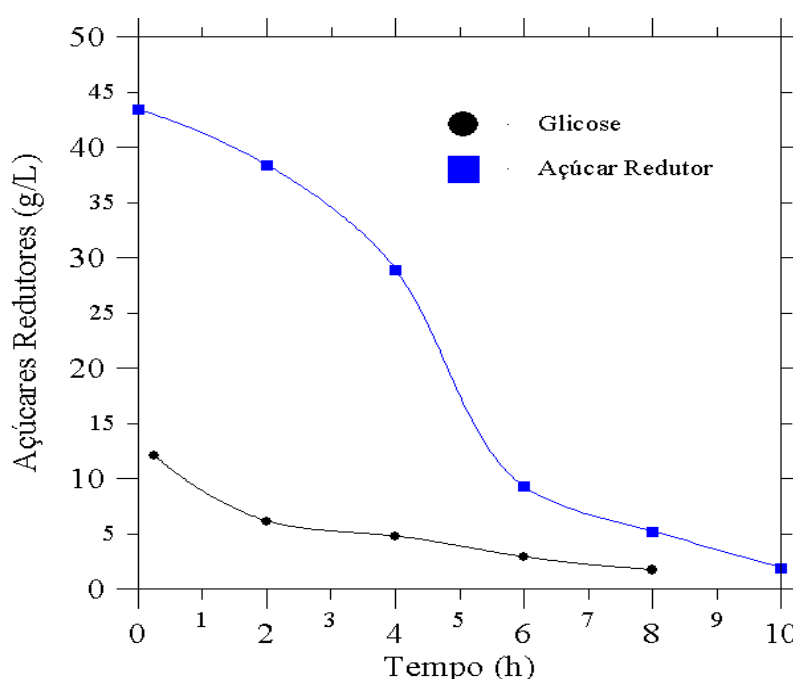


Figura 4.10: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 5

O Consumo de glicose foi pronunciado nas duas primeiras horas de fermentação, a partir desse instante o consumo foi discreto sendo praticamente esgotado em 10 horas de fermentação. Nas 4 primeiras horas de fermentação nota-se uma grande diferença entre as curvas, sendo que a partir desse instante a diferença apresenta-se bem reduzida.

Na Tabela 4.6 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

De acordo com a Tabela 4.6, nas 4 primeiras horas de fermentação, a velocidade de consumo de substrato não sofreu muita alteração. Já a partir da 5ª hora a taxa de consumo foi acentuada até a 10ª hora de fermentação.

Tabela 4.6: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 5

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-7,919	2,355
2	-7,774	2,332
3	-7,480	2,307
4	-7,255	2,277
5	-6,276	2,234
6	-5,130	2,155
7	-3,923	1,978
8	-2,694	1,534
9	-1,456	0,365
10	-0,215	-2,776

A taxa de produção de etanol iniciou-se a 2,35 g/L.h e até a 9ª hora ela apresentou-se moderada. A partir desse instante ela passou pelo máximo.

A Figura 4.11 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 6.

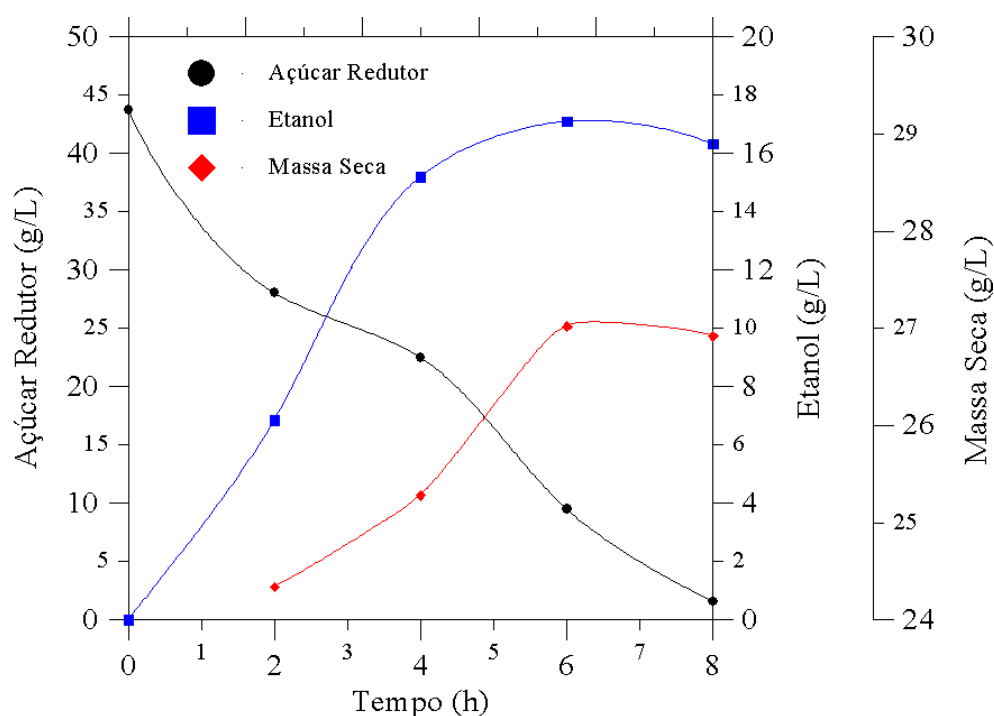


Figura 4.11: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 6. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 70 g/L e agitação de 300 rpm.

A concentração inicial de substrato foi de 43,75 g/L e ela foi praticamente todo consumindo em 8 horas de fermentação, ocorrendo uma pequena oscilação na 4ª hora de fermentação. A Produção de etanol mostrou-se bem acentuada até a 4ª hora, 15,19 g/L e a partir desse instante teve um ligeiro crescimento culminando com a produção máxima em 6 horas de fermentação, 17,09 g/L.

Em relação aos ensaios anteriores, a quantidade de inóculo teve influência significativa para uma fermentação com produção máxima de etanol em 6 horas.

A concentração de massa seca teve um aumento pouco significativo durante o período de fermentação, sendo uma produção de 40 % da quantidade de microrganismo em 6 horas de fermentação, 27,02 g/L.

A Figura 4.12 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 6, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

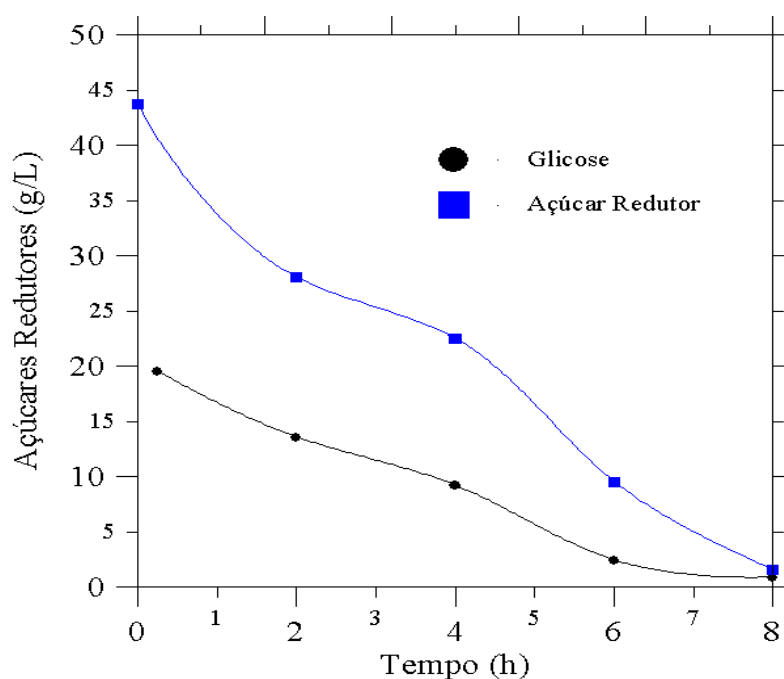


Figura 4.12: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 6

Neste ensaio o consumo de glicose foi moderado até a 6ª hora de fermentação, a partir desse instante foi praticamente esgotada. Nota-se que a diferença entre as curvas é pequena durante toda a fermentação, sugerindo que praticamente todo açúcar redutor foi hidrolisado.

Na Tabela 4.7 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

Tabela 4.7: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 6

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-6,702	4,138
2	-4,844	3,596
3	-4,640	3,045
4	-4,408	2,467
5	-4,286	1,816
6	-4,042	0,969
7	-3,226	-0,413
8	-2,620	-3,249

A taxa de consumo de substrato neste ensaio foi iniciado a 6,7 g/L.h e chegando até 6ª hora a 4,04 g/L.h . A taxa de produção de etanol iniciou-se a 4,14 g/l.h e mostrou-se acentuada até a 6ª hora e a partir desse instante passou pelo máximo.

Na Figura 4.13 são apresentadas as curvas que representam os teores obtidos de álcool ao longo do tempo de fermentação para os Ensaios de 1 a 6.

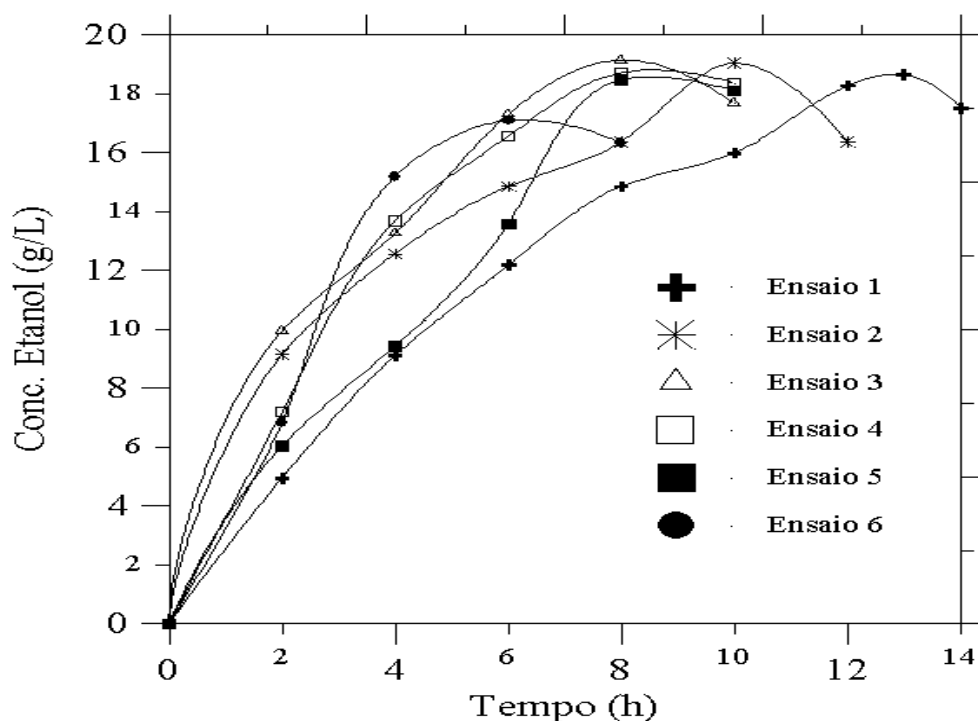


Figura 4.13: Concentração de etanol em função dos tempos de fermentação

Pode-se constatar de acordo com a Figura 4.13 que na maioria dos ensaios estudados, com concentração inicial de soro, 60g por litro de meio, a produção máxima de etanol foi por volta de 8 horas de fermentação.

O Ensaio 1 foi aquele que demandou maior tempo de fermentação, cerca de 13 horas, isto pode ser inicialmente explicado pelas condições de processo, ou seja, utilizou-se a um só tempo os valores mais baixos de substratos, enzima, inóculo e nutrientes.

Observa-se ainda que a quantidade de enzima é determinante na redução do tempo de fermentação, como indicam os resultados obtidos para os Ensaios 3 e 4 com tempo de fermentação de 8 horas e para o Ensaio 6 com tempo de fermentação de 6 horas. Para uma quantidade de 0,4g de enzima por litro de meio.

O Ensaio 6 foi o que apresentou o menor tempo de fermentação, cerca de 6 horas, devido o acréscimo de uma elevada quantidade de inóculo, cerca de 70g por litro de meio.

A Figura 4.14 apresenta as curvas que representam os valores de consumo de substrato durante o tempo de fermentação para os Ensaios de 1 a 6.

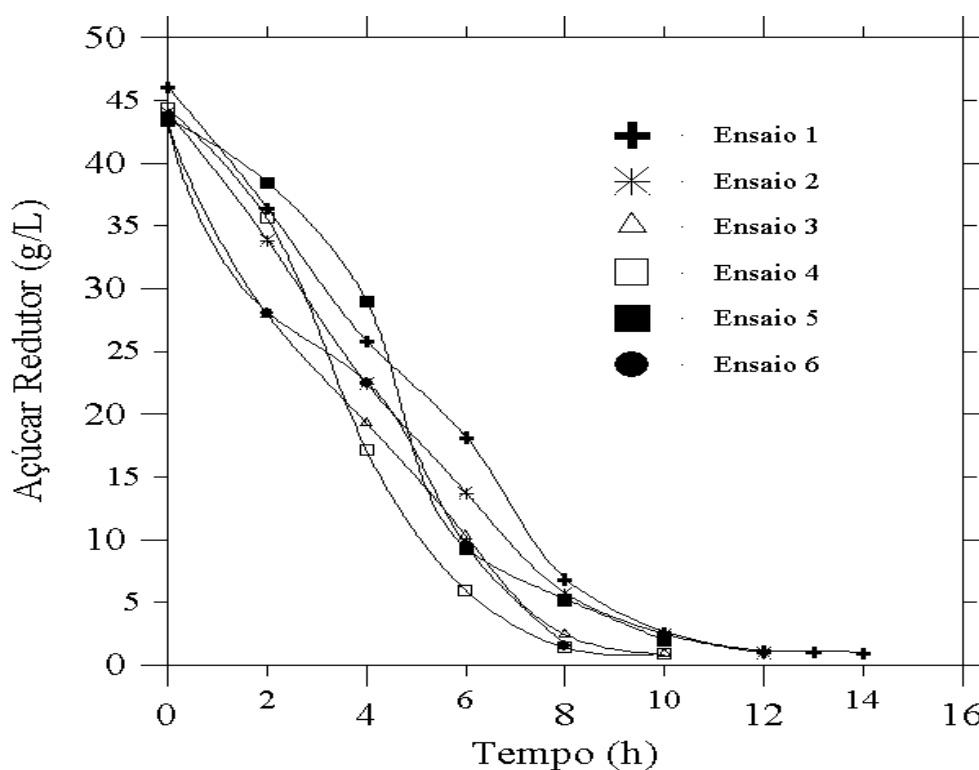


Figura 4.14: Açúcares redutores em função dos tempos de fermentação

Na Figura 4.14 são apresentados de forma global os valores restantes de Açúcares Redutores ao longo dos tempos de fermentação para os vários ensaios. Pode-se notar que na maioria dos ensaios, o teor de substrato era praticamente esgotado em torno de 8 a 10 horas de fermentação.

Para a maioria dos ensaios a limitação da velocidade de reação, pelo substrato, se dá a partir da 6ª hora de fermentação, isto pode ser observado na Figura 4.13 quando a partir da 6ª hora se dá uma redução no acréscimo dos teores de etanol.

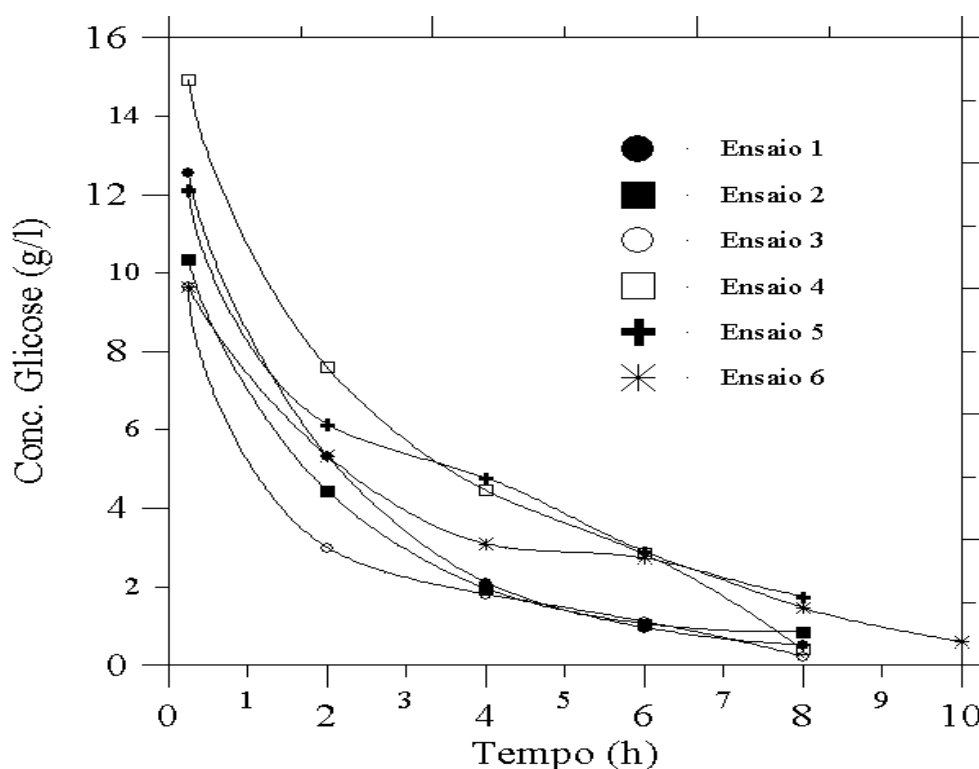


Figura 4.15: Concentração de glicose ao longo das fermentações

A Figura 4.13 indica claramente, que após 4 horas de ensaio, ocorre uma ligeira diminuição na velocidade de produção de etanol, que coincide com o esgotamento do teor de glicose (Figura 4.15), sugerindo um consumo à posteriori do monossacarídeo galactose, que indicaria um espécie de “diauxia”.

4.3 – RESULTADOS: CONCENTRAÇÃO DE SORO = 90G/L

A Figura 4.16 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 7.

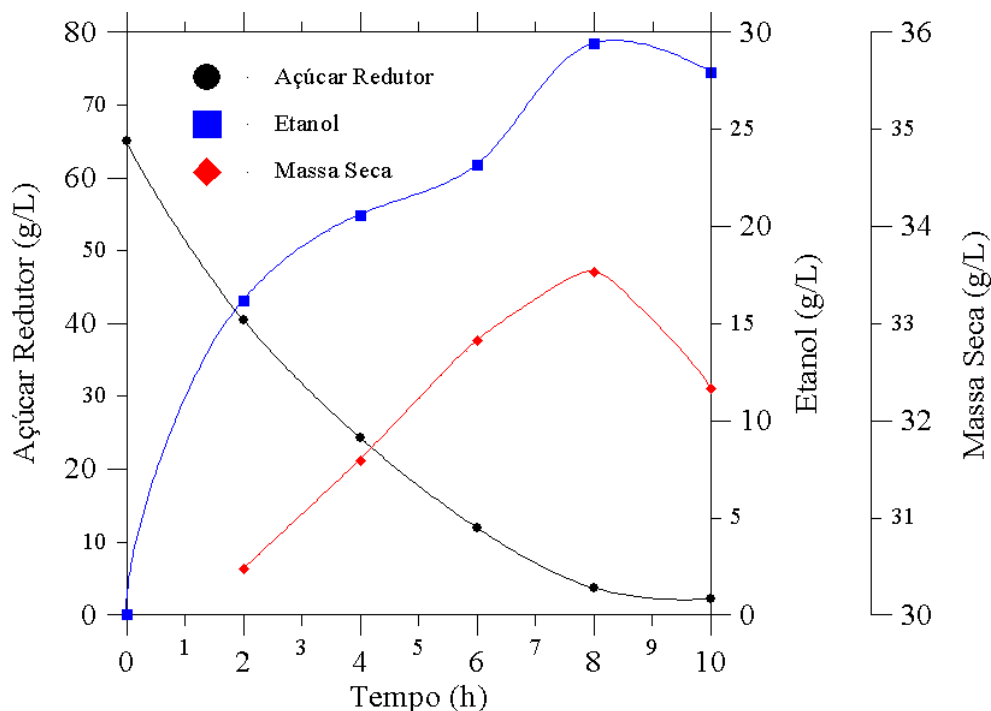


Figura 4.16: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 7. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 70 g/L e agitação de 300 rpm.

No Ensaio 7, a concentração inicial de substrato foi de 65 g/L e durante toda a fermentação, o consumo de substrato apresentou-se de forma pronunciada até 8ª hora, 3,67 g/L, a partir deste instante foi praticamente esgotada. A produção de etanol apresentou-se de forma gradativa até a 6ª hora, 23,15 g/L. A partir deste instante, a produção de etanol atinge o máximo em 8 horas de fermentação, 29,40 g/L. A partir desse instante o etanol passa a ser consumido.

A produção de massa seca em 8 horas de fermentação atinge a uma concentração de 33,53 g/L e equivale a 50 % da quantidade de microrganismo.

A Figura 4.17 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 7, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

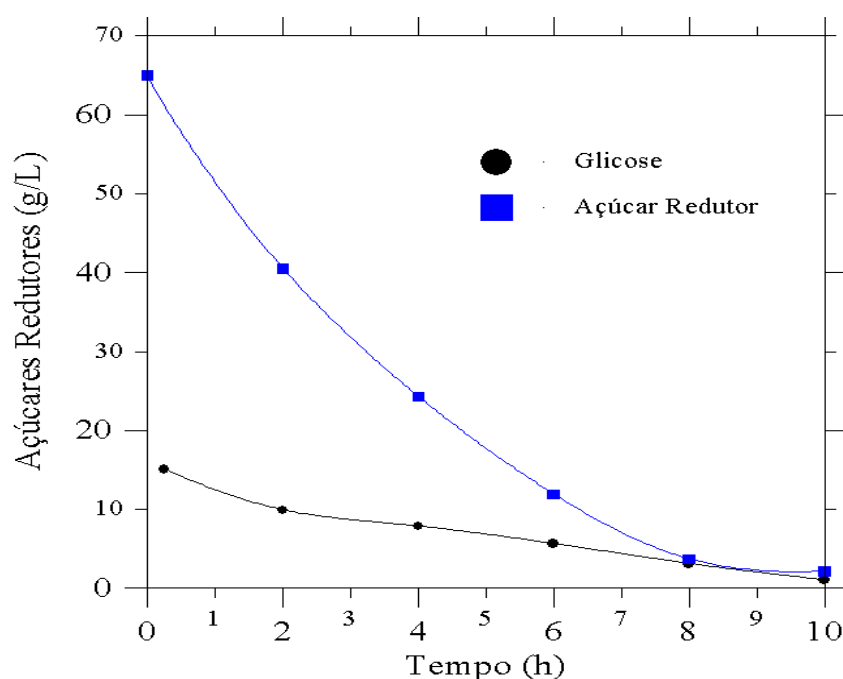


Figura 4.17: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 7

A glicose apresentou-se um consumo acentuado nas 6 primeiras horas de fermentação, sendo que após foi esgotada. Uma pequena diferença existe entre as curvas até 4ª hora de fermentação. A partir da 8ª hora praticamente todo açúcar redutor foi hidrolisado.

Na Tabela 4.8 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

Tabela 4.8: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 7

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto DP/dt
1	-11,852	6,611
2	-9,962	5,763
3	-8,521	4,915
4	-7,244	4,069
5	-6,029	3,225
6	-4,836	2,389
7	-3,651	1,575
8	-2,469	0,820
9	-1,288	0,225
10	-0,108	0,067

Nota-se que neste ensaio, a taxa de consumo de substrato iniciou-se que uma taxa de 11,85 g/L.h e até 10^a hora de fermentação atingiu 0,12 g/L.h. Já a velocidade de produção de etanol apresentou-se uma taxa bastante significativa até 8^a hora de fermentação, 0,82 g/L.h. Na 10^a hora ela passa pelo máximo.

A Figura 4.18 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 8.

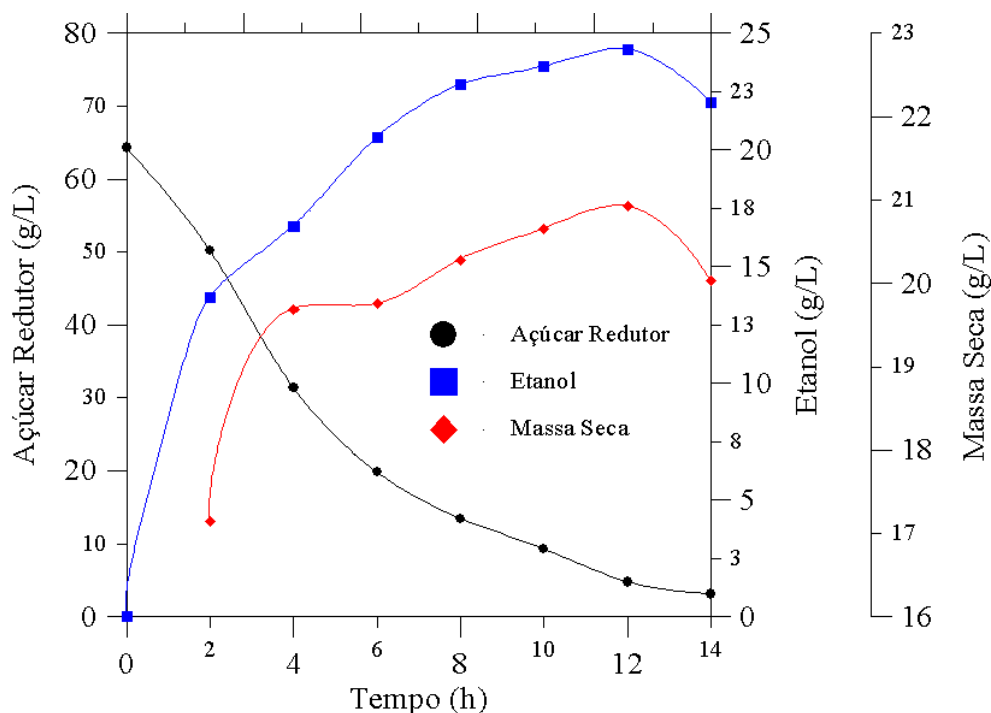


Figura 4.18: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 8. Concentração de nutrientes de 1,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 30 g/L e agitação de 500 rpm.

O substrato foi iniciado a uma concentração de 64,3 g/L e em 12^a hora de fermentação o consumo chegou a 4,77 g/L, a partir deste instante foi praticamente esgotado. A produção de etanol apresentou-se até 6^a hora de fermentação uma concentração de 20,51 g/L, a partir deste instante teve um ligeiro crescimento até a 12^a hora, 24,31 g/L. E partir da 12^a hora a produção teve uma pequena baixa.

Em comparação com ensaio anterior, este foi realizado com as mais baixas quantidades de enzima e inóculo, o que propiciou uma fermentação lenta com duração máxima de 12 horas.

Nas 4 primeiras horas de fermentação a concentração de massa seca atingiu a 19,69 g/L, após este instante o crescimento teve pouca alteração até a 12^a hora, 20,92 g/L, atingindo a 70% da quantidade de microrganismo.

A Figura 4.19 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 8, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

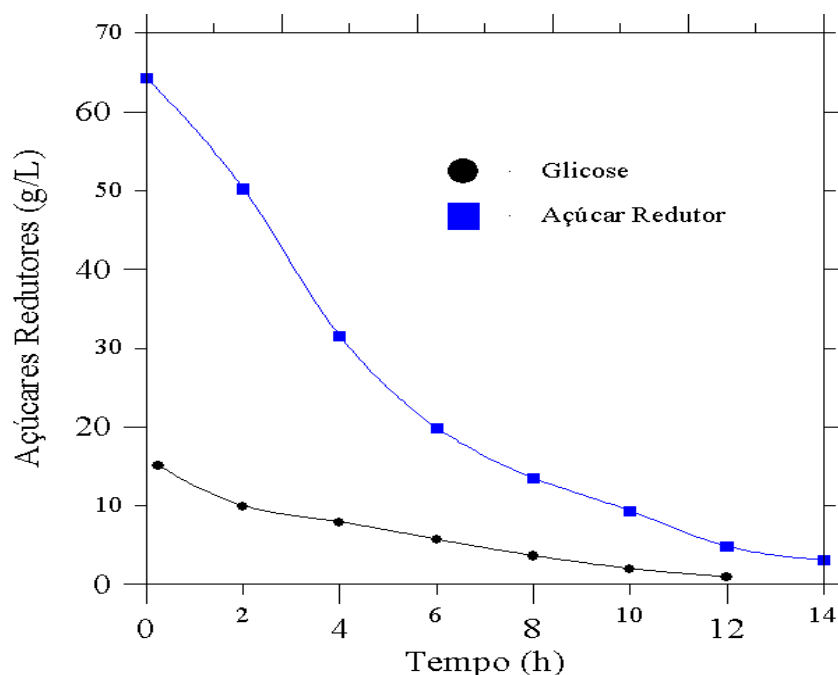


Figura 4.19: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 8

O consumo de glicose apresentou-se de forma gradativa até o seu esgotamento em 12 horas de fermentação. Nota-se que há na 4 primeiras horas de fermentação uma ligeira diferença entre as curvas, a partir deste instante diferença é bastante reduzida.

Na Tabela 4.9 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

A taxa de consumo de substrato iniciou-se a 8,37 g/L.h e chegou na 12^a hora a 0,72 g/L.h.. A taxa de produção de etanol iniciou-se a 4,19 g/L.h e chegando na 8^a hora de fermentação a uma taxa de 0,754 g/L.h, a partir deste instante ela passa pelo máximo.

Tabela 4.9: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 8

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-8,377	4,190
2	-7,902	3,698
3	-7,264	3,206
4	-6,566	2,715
5	-5,845	2,223
6	-5,117	1,732
7	-4,385	1,242
8	-3,653	0,754
9	-2,920	0,275
10	-2,187	-0,184
11	-1,453	-0,586
12	-0,720	-0,834
13	0,013	-0,662
14	0,746	0,649

A Figura 4.20 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 9.

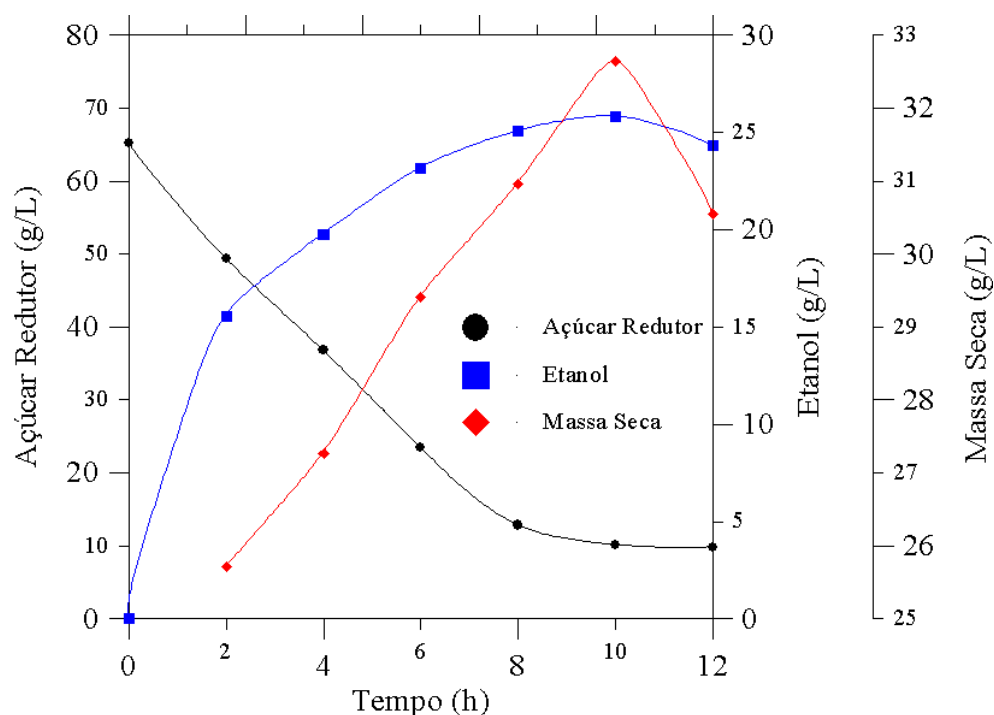


Figura 4.20: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 9. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 70 g/L e agitação de 300 rpm.

No Ensaio 9, a concentração inicial de substrato foi de 65,2 g/L, chegando na 8ª hora de fermentação a 12,85 g/L, a partir deste instante praticamente manteve-se constante. Notou-se que a produção de etanol nas quatro primeiras horas atingiu a 19,75 g/L, a partir deste instante a produção foi moderada culminando com o máximo em 10 horas de fermentação, 25,83 g/L. A partir da 10ª hora houve um decréscimo.

Com relação aos ensaios anteriores, um aumento na quantidade de nutrientes contribuiu para uma fermentação mais rápida nas primeiras horas de fermentação.

A concentração de massa seca chegou até a 10ª hora com 32,64 g/L. Atingido a praticamente 50 % da quantidade de microrganismo.

A Figura 4.21 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 9, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

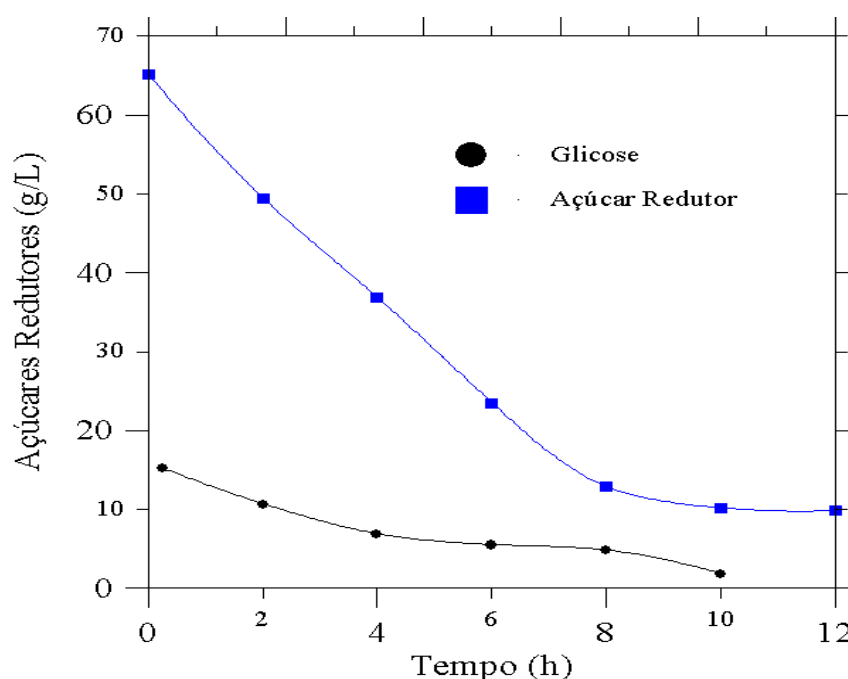


Figura 4.21: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 9

Com relação ao consumo de glicose, ela foi praticamente esgotada em 10 horas de fermentação. Nas 6 primeiras horas de fermentação a diferença entre as curvas foi relativamente grande.

Na Tabela 4.10 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

Tabela 4.10: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 9

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-8,655	5,396
2	-8,220	4,605
3	-7,807	3,813
4	-7,033	3,023
5	-6,127	2,234
6	-5,172	1,451
7	-4,199	0,683
8	-3,219	-0,044
9	-2,237	-0,661
10	-1,254	-0,977
11	-0,271	-0,477

De acordo com a Tabela 4.10, a taxa de consumo de substrato iniciou-se a 8,66 g/L.h e chegando na 11^a hora, 0,27 g/L.h. A taxa de produção de etanol iniciou-se a 5,39 g/L.h e na 7^a hora estava a 0,68 g/L.h, sendo após este instante passa pelo máximo.

A Figura 4.22 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 10.

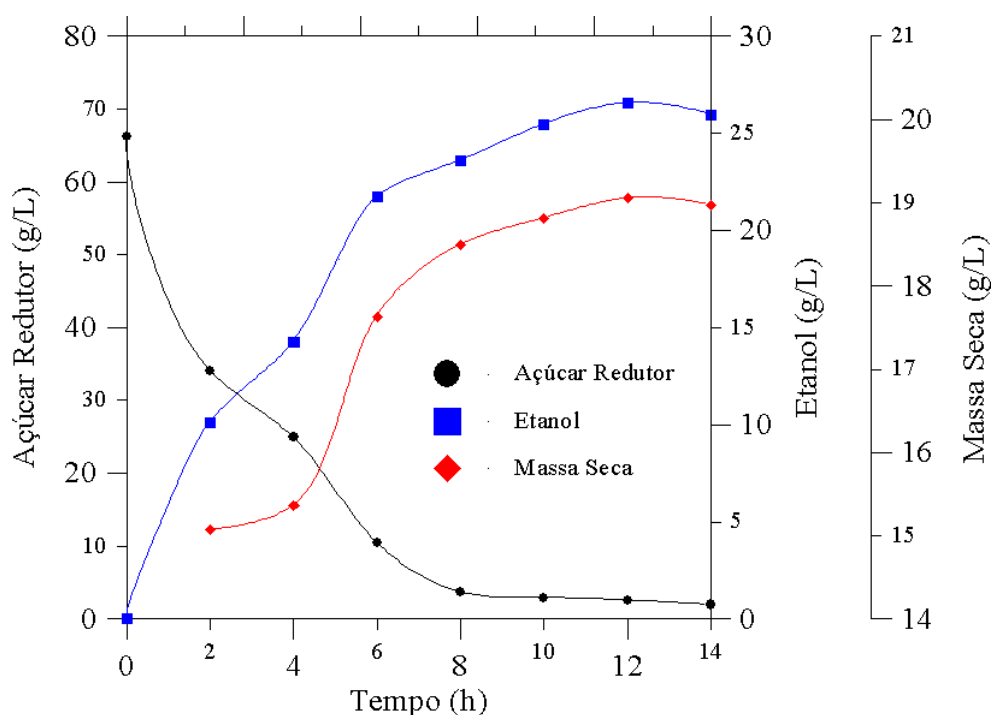


Figura 4.22: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 10. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 30 g/L e agitação de 500 rpm.

A concentração inicial de substrato foi de 66,2 g/L no Ensaio 10, na 8ª hora de fermentação chegou a 3,66 g/L, a partir da 8ª hora nota-se que o consumo de substrato foi praticamente esgotado. Com relação à produção de etanol, até a 6ª hora de fermentação ela chegou a 21,72 g/L, a partir deste instante a produção teve um ligeiro crescimento, culminando com a produção máxima em 12 horas de fermentação, 26,58 g/L.

A concentração de massa atingiu em 12 horas de fermentação a 19,05 g/L, atingindo a 63 % da quantidade de microrganismo.

A Figura 4.23 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 10, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

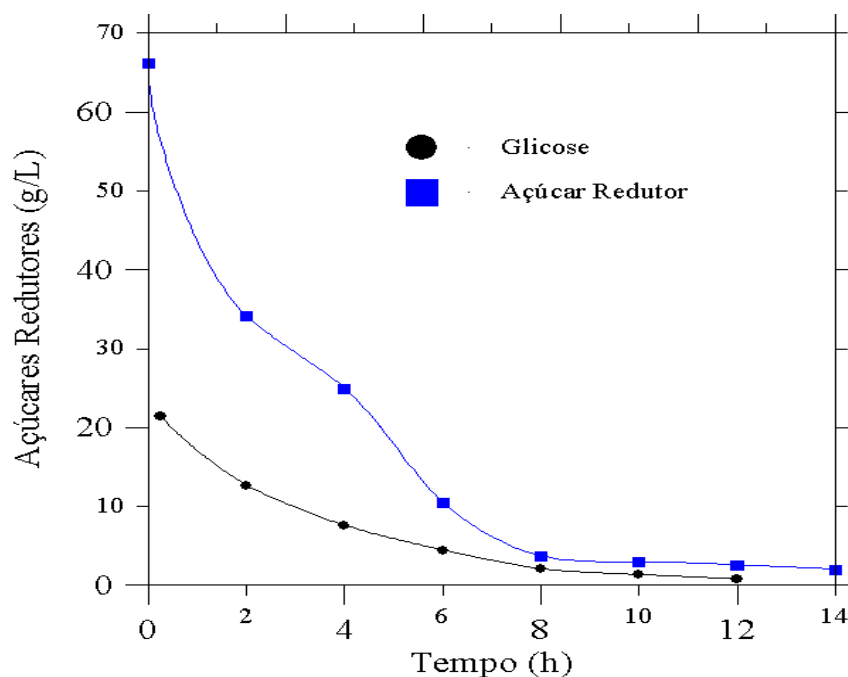


Figura 4.23: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 10

O consumo de glicose apresentou-se bem definida durante toda a fermentação, sendo que a partir da 8ª hora foi praticamente esgotada. Nota-se que até a 4ª hora existe uma pequena diferença entre as curvas, a partir deste instante não há mais diferenças, com isso sugere que toda lactose foi hidrolisada.

Na Tabela 4.11 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

Tabela 4.11: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 10

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-14,064	4,177
2	-9,108	3,767
3	-6,853	3,356
4	-5,591	2,945
5	-4,695	2,535
6	-3,933	2,125
7	-3,221	1,715
8	-2,527	1,306
9	-1,839	0,902
10	-1,154	0,509
11	-0,470	0,146
12	0,213	-0,135

A taxa de consumo de substrato iniciou-se a 14,06 g/L.h e chegou na 10^a hora a 1,15 g/L.h. A taxa de produção de etanol na 11^a hora foi de 0,14 g/L.h, a partir desse instante passou pelo máximo.

A Figura 4.24 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 11.

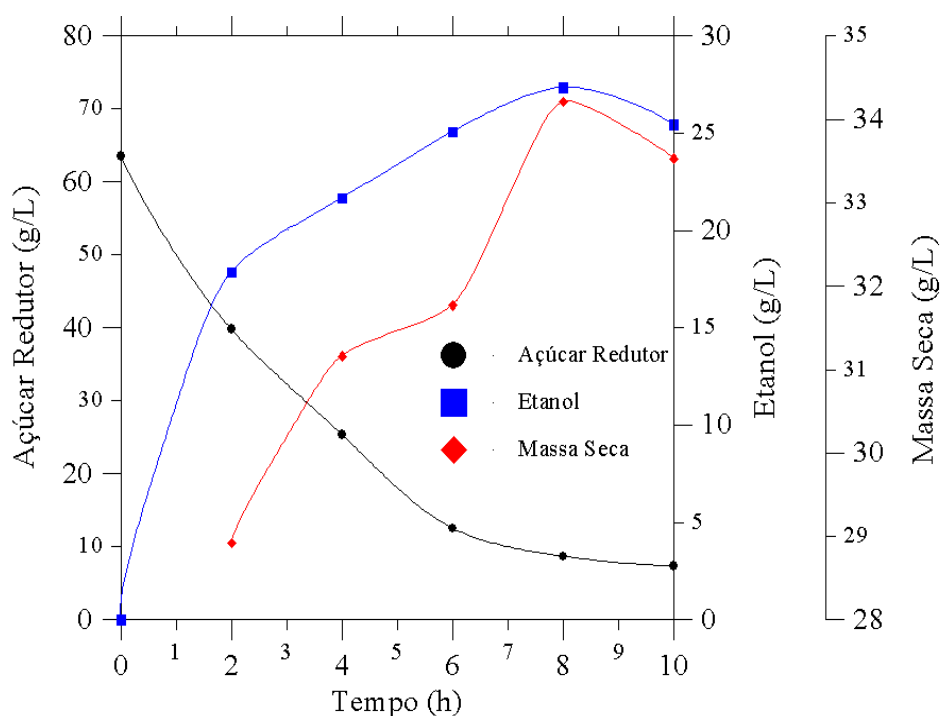


Figura 4.24: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 11. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,4 g/L; concentração de inóculo de 70 g/L e agitação de 500 rpm.

No Ensaio 11, o consumo de substrato até a 6^a hora de fermentação foi de 12,52 g/L. Na 10^a hora chegou a 7,40 g/L. A produção etanol mostrou-se elevada nas quatro primeiras horas de fermentação chegou a 21,65 g/L e atingindo o máximo em 8 horas de fermentação, 27,35 g/L.

A concentração de massa seca apresentou-se na 10^a hora de fermentação um valor de 34,21 g/L, atingindo a 50 % da quantidade de microrganismo.

A Figura 4.25 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 11, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

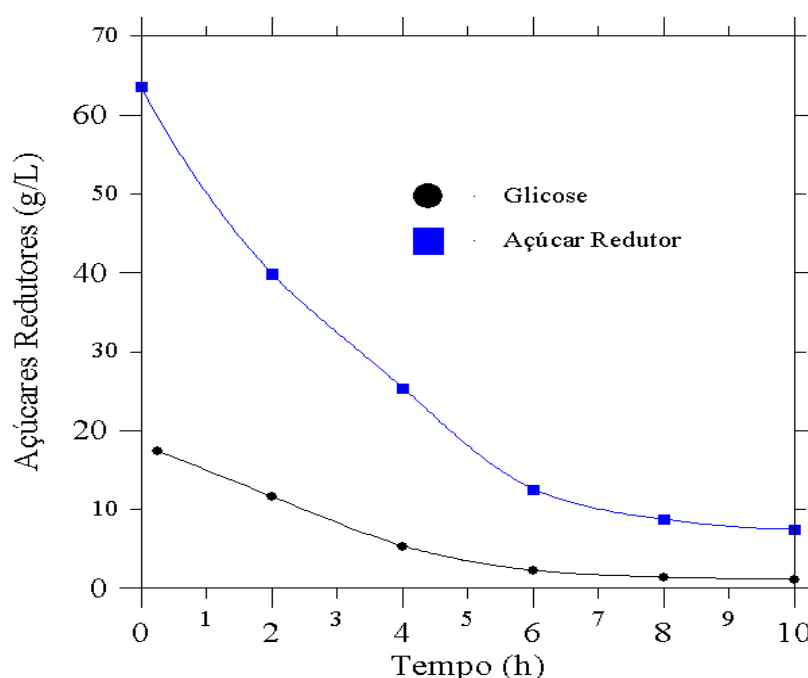


Figura 4.25: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 11

Neste ensaio, a taxa de consumo de glicose foi acentuada nas 6 primeiras horas de fermentação, sendo que logo em seguida praticamente esgotado. A diferença entre as curvas durante toda a fermentação praticamente permaneceu a mesma.

Na Tabela 4.12 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

A taxa inicial de consumo de substrato foi de 11,43 g/L.h, chegando na 6^a hora de fermentação a 4,04 g/L.h.. Com relação à taxa de produção etanol, na 6^a hora estava em 0,66 g/L.L e a partir daí passou pelo máximo em 7 horas de fermentação.

Tabela 4.12: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 11

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-11,426	6,637
2	-9,440	5,420
3	-7,923	4,205
4	-6,579	2,996
5	-5,299	1,805
6	-4,042	0,663
7	-2,794	-0,348
8	-1,549	-0,999
9	-0,305	-0,677
10	0,938	2,295

A Figura 4.26 mostra as variações das concentrações do açúcar redutor, do etanol e da massa seca ao longo do tempo para o Ensaio 12.

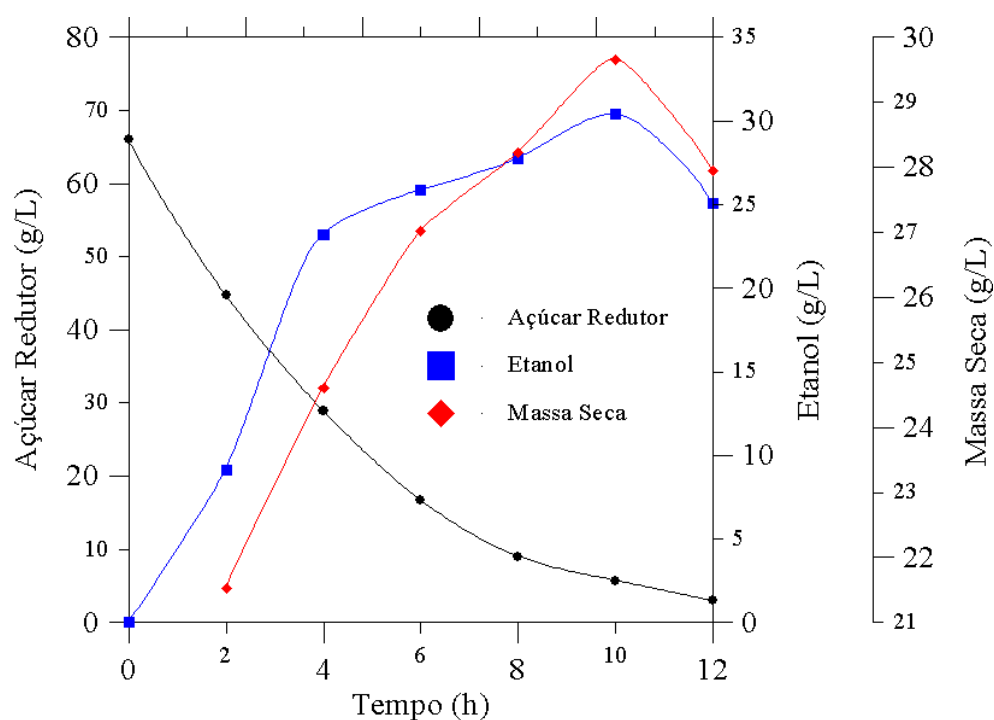


Figura 4.26: Variações das concentrações de etanol, açúcar redutor e da massa seca para Ensaio 12. Concentração de nutrientes de 3,0 g/L, concentração de enzima de 0,2 g/L; concentração de inóculo de 50 g/L e agitação de 300 rpm.

Neste ensaio o consumo de substrato apresentou-se até a 8ª hora de fermentação, um valor de 9,01 g/L, sendo que após este instante foi todo consumido. A produção de etanol apresentou-se elevada até a 4ª hora de fermentação, 23,17 g/L. A partir desse instante até a 10ª hora, ela chegou a 30,39 g/L, que foi a produção máxima.

A Figura 4.27 apresenta o comportamento da concentração de açúcar redutor para o Ensaio 12, durante toda a fermentação em comparação com a concentração de glicose.

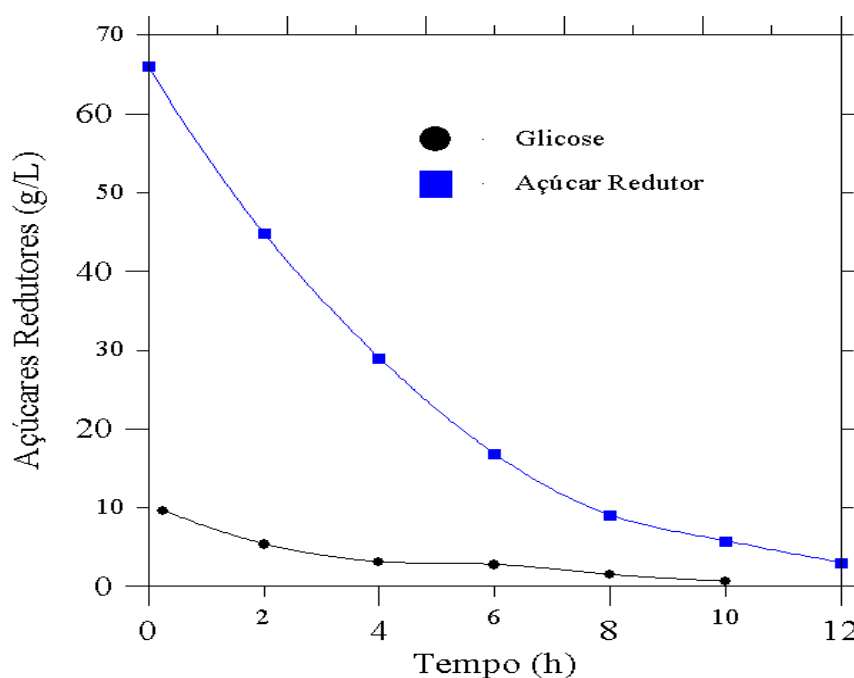


Figura 4.27: Açúcar redutor e glicose para o Ensaio 12

No Ensaio 12, o consumo de glicose foi praticamente esgotado em 10 horas de fermentação. Nas primeiras 6 horas de fermentação há uma grande diferença entre as curvas, sendo que a partir da 8ª a 12ª hora essa diferença foi reduzida.

Na Tabela 4.13 são apresentados os valores da taxa de consumo de substrato e a taxa de produção de etanol.

De acordo com a Tabela 4.13, a taxa de consumo de substrato inicialmente apresentou-se elevada, 10,55 g/L.h e chegou na 9ª hora a 2,29 g/L.h. A taxa de produção de etanol apresentou-se na 9ª hora de fermentação um valor de 0,03 g/L.h e a partir daí ela passa pelo máximo.

Tabela 4.13: Taxas para o substrato e produto para o Ensaio 12

T(h)	Taxa (g/L.h)	
	Substrato dS/dt	Produto dP/dt
1	-10,553	5,914
2	-8,895	5,189
3	-7,730	4,464
4	-6,747	3,739
5	-5,830	3,013
6	-4,938	2,286
7	-4,054	1,553
8	-3,174	0,807
9	-2,296	0,026
10	-1,418	-0,853
11	-0,539	-1,998
12	0,339	-3,863

Na Figura 4.28 são apresentadas as curvas que representam os teores obtidos de álcool ao longo do tempo de fermentação para os Ensaios de 7 a 12.

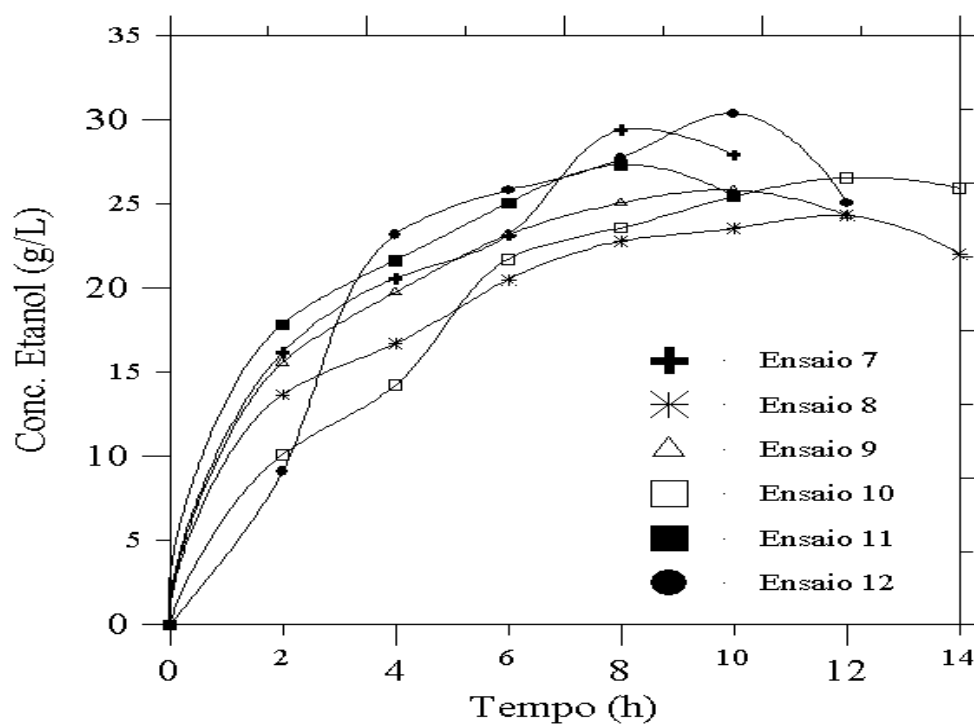


Figura 4.28: Concentração de etanol em função dos tempos de fermentação

Com a concentração inicial de soro, 90g por litro de meio e de acordo com a Figura 4.28, a produção máxima de etanol oscilou entre 8 a 12 horas de fermentação.

O Ensaio 8 e 10 foram os que demandaram um maior tempo de fermentação, por volta de 12 horas, isto pode ser explicado, já que pelas condições do processo, estes ensaios foram os que utilizaram os níveis mais baixos de inóculo.

Observa-se ainda que a quantidade de enzima é determinante na redução do tempo de fermentação, como indicam os resultados obtidos para os Ensaios 7 e 11 com tempo de fermentação de 8 horas, para uma quantidade de 0,4g de enzima por litro de meio.

Os Ensaios 9 e 12 apresentaram um tempo intermediário de produção máxima de etanol por volta de 10 horas. Sendo que o Ensaio 9 foi adicionado uma quantidade de inóculo de 70g por litro de meio e já o Ensaio 12 foi de 50g por litro de meio. E os dois ensaios foram utilizados as mesmas quantidades de enzima, 0,2g por litro de meio.

A Figura 4.29 apresenta as curvas que representam os valores de consumo de substrato durante o tempo de fermentação para os Ensaios de 7 a 12.

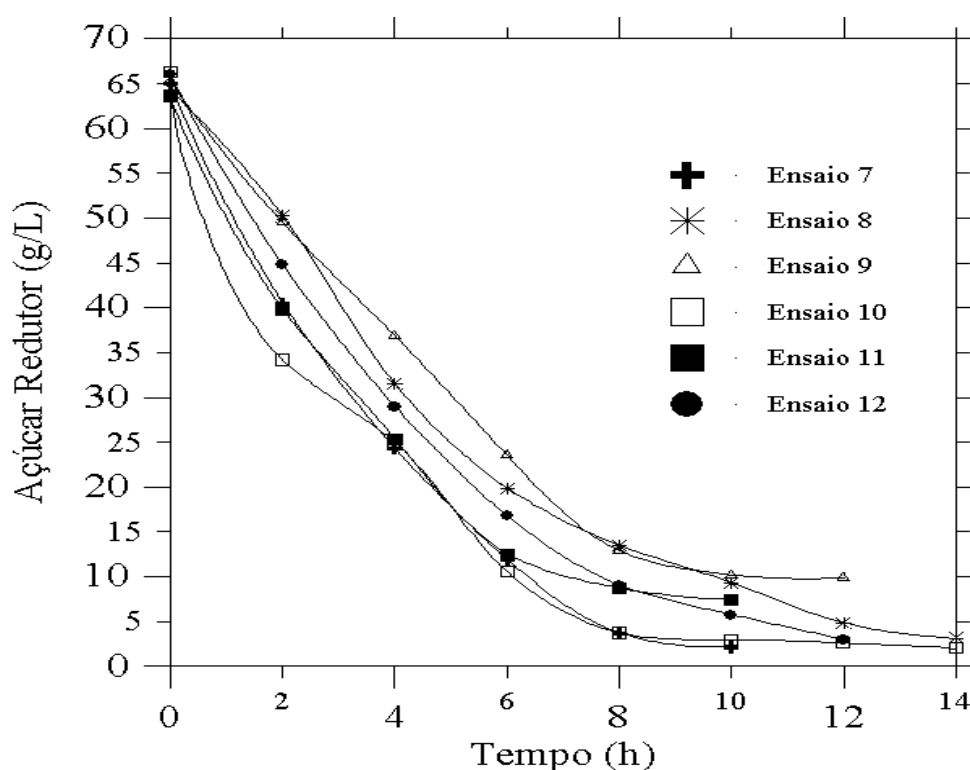


Figura 4.29: Açúcares redutores em função dos tempos de fermentação

A Figura 4.29 apresenta os valores restantes de Açúcares Redutores ao longo dos tempos de fermentação para os vários ensaios. Nota-se que o esgotamento do teor de substrato se dá na faixa de 8 a 12 horas de fermentação.

A limitação da velocidade de reação, pelo substrato, se dá a partir da 6^a hora e prolongando até 10^a de fermentação, isto pode ser observado na Figura 4.28 quando a partir da 6^a hora se dá uma redução no acréscimo dos teores de etanol.

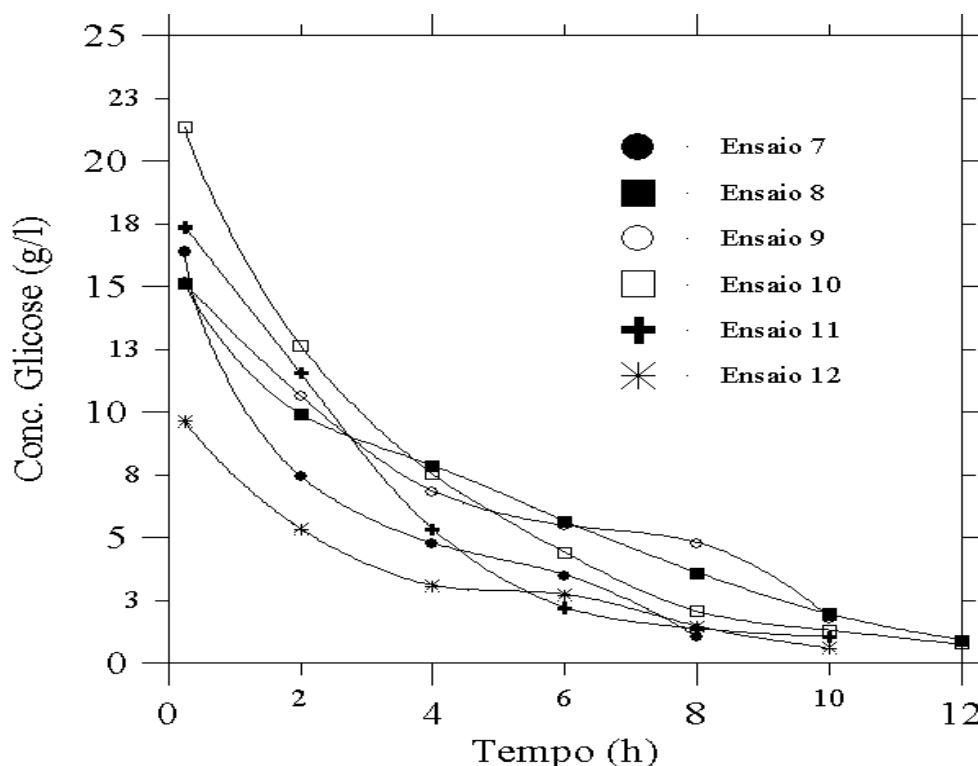


Figura 4.30: Concentração de glicose ao longo das fermentações

De acordo com a Figura 4.30, a partir da 4^a e 6^a hora de fermentação ocorre o esgotamento da glicose na maioria dos ensaios. Observa-se também que na Figura 4.28, após a 4^a e 6^a hora de fermentação, ocorre uma ligeira diminuição na velocidade de produção de etanol. Esse fato sugere que posterior esses tempos de fermentação ocorre o consumo do monossacarídeo galactose, que indicaria uma espécie de “diauxia”.

4.4 – PRODUTIVIDADE E RENDIMENTO DOS ENSAIOS

4.4.1 – Concentração de soro = 60g/L

A Tabela 4.14 apresenta os valores de produtividade e rendimento para os ensaios de 1 a 6, realizados com concentração de 60g de soro por litro de meio.

Tabela 4.14: Produtividade e Rendimento obtidos nos Ensaios 1 a 6

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6
Produtividade (g/L.h)	1,43	1,90	2,39	2,34	2,31	2,85
Rendimento (%)	77,31	85,26	87,72	81,12	90,10	93,06

Conforme já comentado, o Ensaio 1 foi o mais longo, e para este obteve-se os menores valores de produtividade e rendimento.

Verificou-se que para os Ensaios 3 e 4, uma quantidade de enzima da ordem de 0,4 g/L, foi capaz de aumentar as produtividades em torno de 20% em relação ao Ensaio 2. Já o Ensaio 5 pode ser destacado, pois apesar de ter sido conduzido com os teores menores de enzima e inóculo, utilizou-se uma maior concentração de nutrientes, 3 g/L e, com isto obteve-se um maior rendimento em relação aos Ensaios 3 e 4 e um valor de produtividade próximo daqueles. O Ensaio 6 foi o que apresentou os maiores valores de produtividade e rendimento, pois neste foram utilizados os maiores teores de nutrientes, enzima e inóculo.

4.4.2 – Concentração de soro = 90g/L

A Tabela 4.15 apresenta os valores de produtividade e rendimento para os ensaios de 7 a 12, realizados com concentração de 90g de soro por litro de meio.

Tabela 4.15: Produtividade e Rendimento obtidos nos Ensaios 7 a 12

	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12
Produtividade (g/L.h)	3,68	2,03	2,58	2,22	3,42	3,04
Rendimento (%)	89,30	76,07	87,38	77,78	92,91	93,9

De acordo com a Tabela 4.15, nota-se que o Ensaio 8 foi o que apresentou os menores valores de produtividade e rendimento, devido no mesmo foram utilizados os menores teores de enzima e inóculo.

Os Ensaios 7 e 11 apresentaram os maiores valores de produtividade para uma quantidade de enzima na ordem de 0,4 g/L. Já no Ensaio 10, com a mesma quantidade de enzima, obteve uma produtividade inferior devido utilização do menor teor de inóculo. O Ensaio 12 apresentou o maior rendimento, sendo este valor próximo ao Ensaio 11, para uma quantidade de inóculo de 50 g/L e um teor de enzima na faixa de 0,2 g/L.

4.5 – EFEITO DA AGITAÇÃO NO RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO

A Tabela 4.16 apresenta os valores de agitação e rendimento para os ensaios 1 a 6, realizados com concentração de 60g de soro por litro de meio.

Tabela 4.16: Agitação e Rendimento obtidos nos Ensaios 1 a 6

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6
Agitação (rpm)	500	300	300	500	300	300
Rendimento (%)	77,31	85,26	87,72	81,12	90,10	93,06

Os Ensaios 2 e 3 apresentaram um valor de rendimento próximo para uma agitação de 300 rpm. Já o Ensaio 6 foi o que apresentou uma melhoria conjuntamente com o rendimento para uma agitação de 300 rpm. Os Ensaios 1 e 4 foram os que apresentaram os menores valores de rendimento para uma agitação de 500 rpm.

A Tabela 4.17 apresenta os valores de agitação e rendimento para os ensaios 7 a 12, realizados com concentração de 90g de soro por litro de meio.

Tabela 4.17: Agitação e Rendimento obtidos nos Ensaios 7 a 12

	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12
Agitação (rpm)	300	500	300	500	500	300
Rendimento (%)	89,30	76,07	87,38	77,78	92,91	93,90

De acordo com a Tabela 4.17 os Ensaios 8 e 10 foram os que apresentaram os menores valores de rendimento para uma agitação de 500 rpm. Os Ensaios 7 e 9 apresentaram um rendimento intermediário, para uma agitação 300 rpm. O Ensaio 12 foi o que apresentou o melhor rendimento para uma agitação de 300 rpm.

4.6 – COMPARAÇÃO DO MODELO TEÓRICO COM O MODELO EXPERIMENTAL

A seguir são apresentados os gráficos comparativos entre o modelo teórico e o experimental para o consumo de substrato.

O modelo experimental:

$$\frac{dy}{dx} = a + b*x + c*x^2 + d*\exp(-x) ; \quad \text{Onde: } \frac{dS}{dt} = \frac{dy}{dx}$$

O modelo teórico:

$$\frac{dS}{dT} = -\frac{\mu_m}{Y_{X/S}} * \frac{(X_0 + Y_{X/S} * (S_0 - S)) * S}{(K_s + S)}$$

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 1.

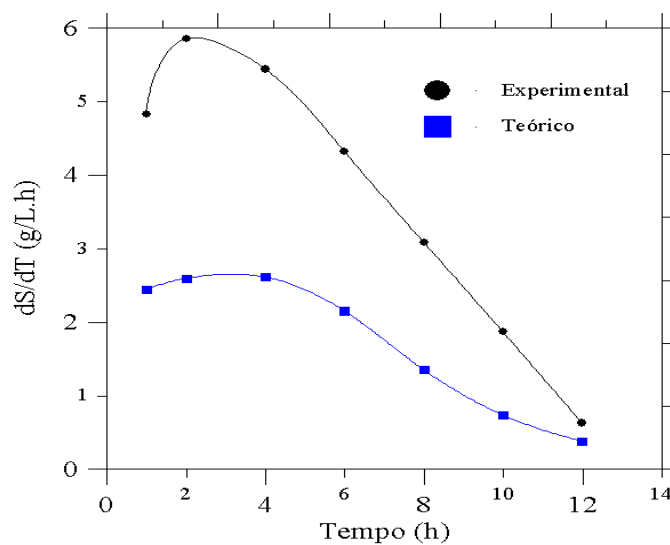


Figura 4.31: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 1

Para este ensaio, a curva do modelo experimental apresentou-se maior que teórico. Nota-se que o modelo experimental obedece ao teórico, sendo que a partir da 10^a hora as curvas tendem a se encontrar, para este sugere um fator de proporcionalidade para equiparar as curvas.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 2.

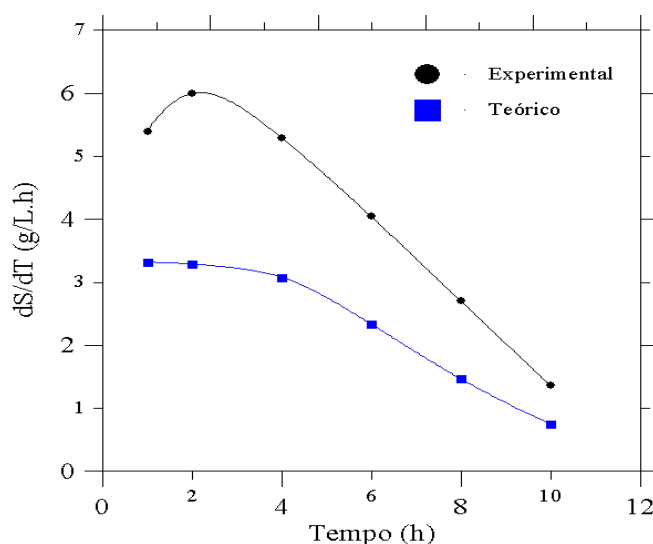


Figura 4.32: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 2

Neste ensaio, nota-se uma pequena diferença inicial no comportamento das curvas, e no decorrer da fermentação as curvas tende a equiparar-se.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 3.

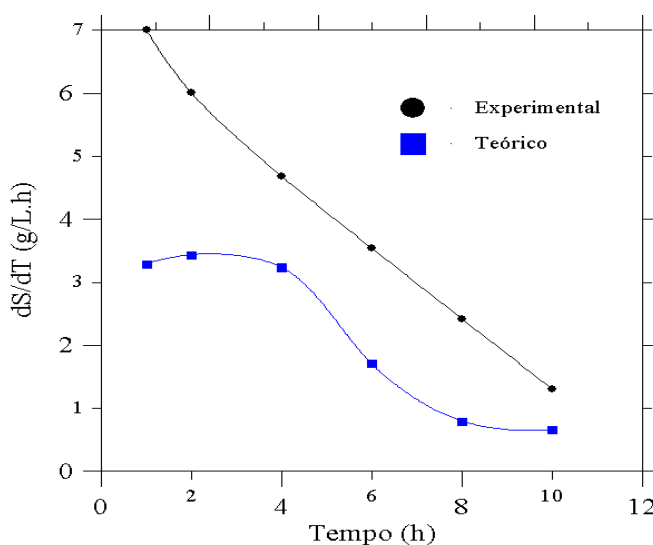


Figura 4.33: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 3

No Ensaio 3, o modelo experimental apresentou-se de forma linear e não seguiu ao comportamento do modelo teórico.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 4.

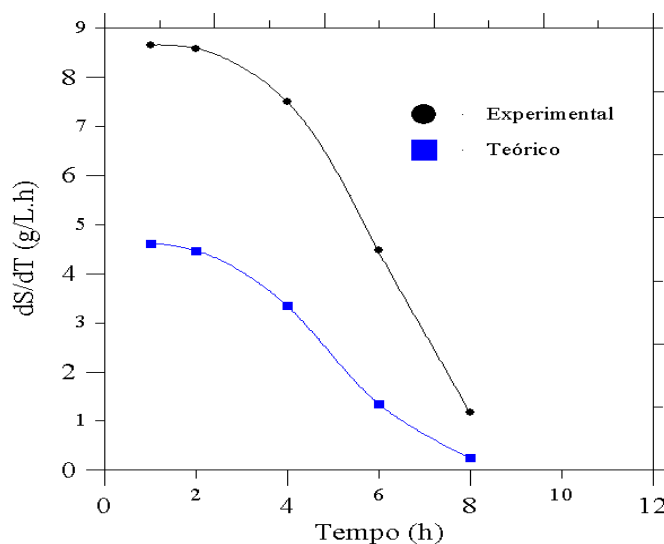


Figura 4.34: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 4

Para este ensaio, a curva do modelo experimental apresentou-se maior que teórico. Nota-se que o modelo experimental obedece ao teórico, para este sugere um fator de proporcionalidade para equiparar as curvas.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 5.

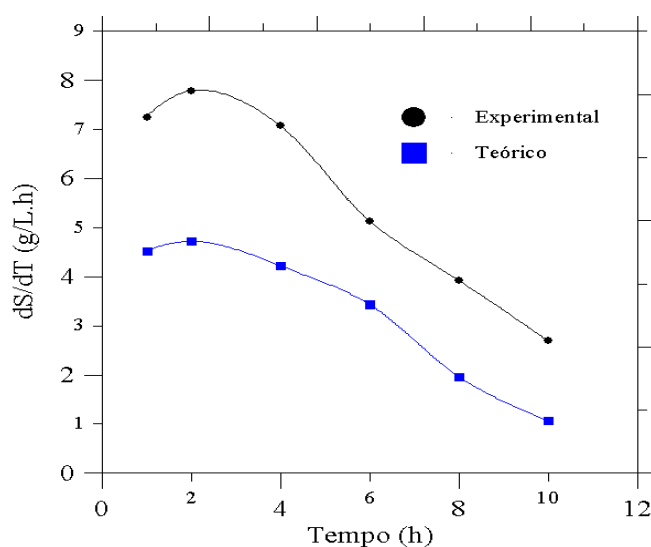


Figura 4.35: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 5

No Ensaio 5, o modelo experimental segue ao modelo teórico, sugerindo um ajuste necessário para equiparar as curvas.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 6.

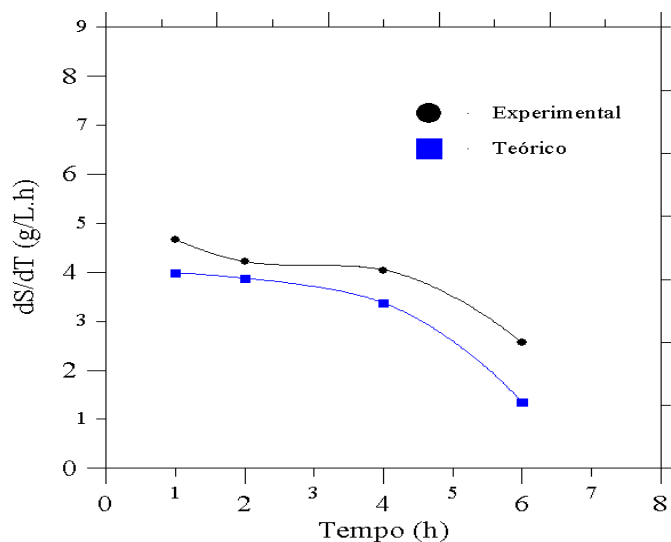


Figura 4.36: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 6

Neste ensaio, nota-se o comportamento muito próximo das curvas. Para este ensaio, sugere que o modelo experimental representou muito bem os dados experimentais.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 7.

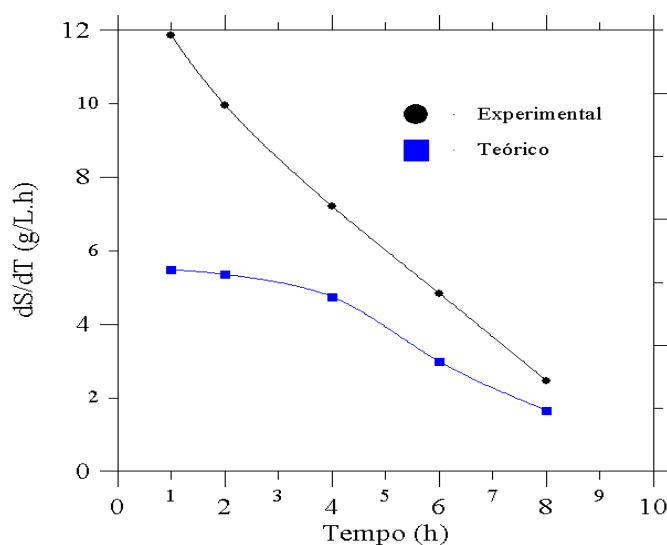


Figura 4.37: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 7

Para este ensaio, a curva do modelo experimental apresentou-se maior que teórico. Nota-se que o modelo experimental obedece ao teórico, para este sugere um fator de proporcionalidade para equiparar as curvas.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 8.

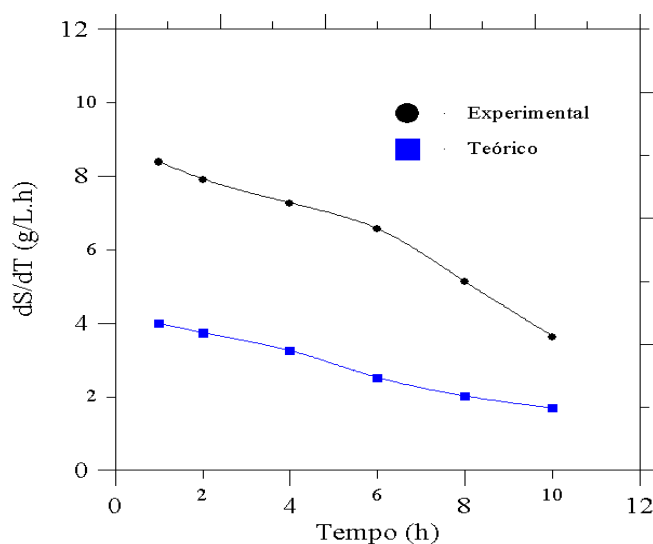


Figura 4.38: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 8

Neste ensaio os modelos teórico e experimental apresentaram um comportamento semelhante, sendo que o modelo experimental é maior que o teórico.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 9.

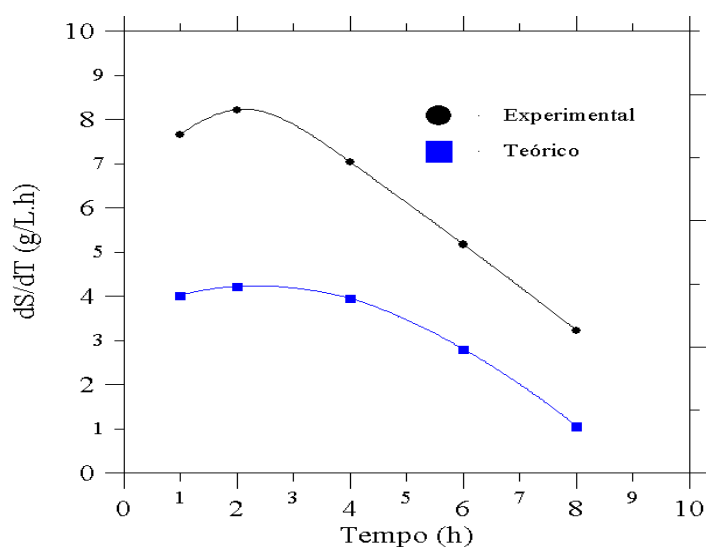


Figura 4.39: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 9

Para este ensaio, a curva do modelo experimental apresentou-se maior que teórico. Nota-se que o modelo experimental obedece ao teórico, para este sugere um fator de proporcionalidade para equiparar as curvas.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 10.

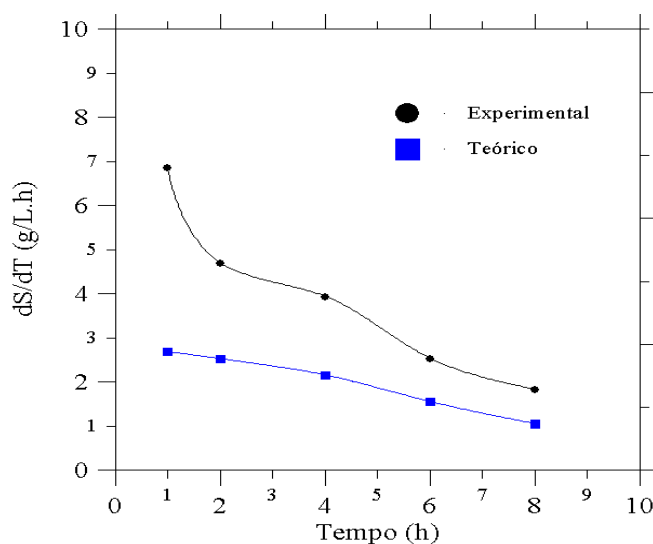


Figura 4.40: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 10

Para este ensaio, o modelo experimental não se apresentou adequado ao modelo teórico. Nota-se a diferença nas duas primeiras horas de fermentação.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 11.

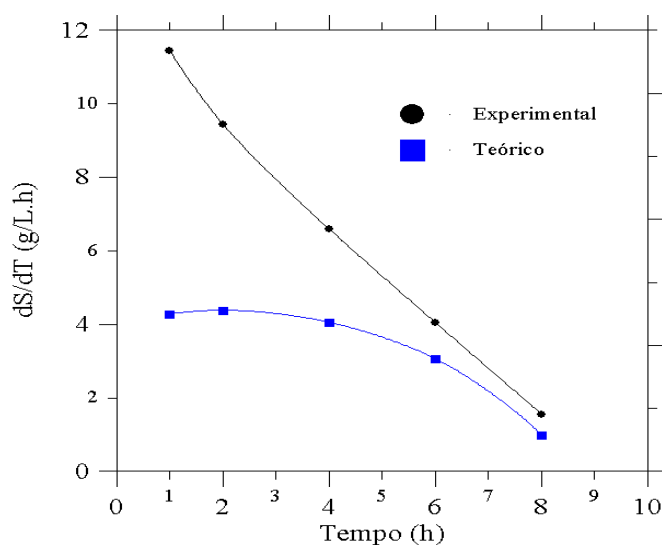


Figura 4.41: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 11

Neste ensaio nota-se que nas 4 primeiras horas de fermentação os modelos apresentam-se comportamentos diferentes.

O gráfico a seguir representa as curvas do modelo teórico e experimental para o Ensaio 12.

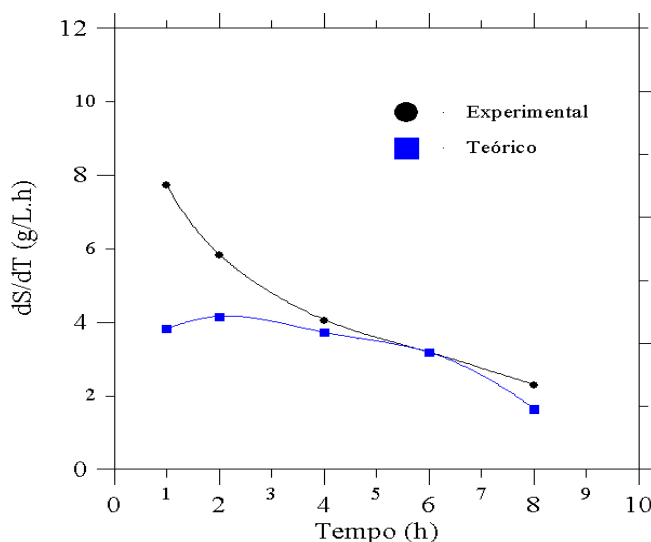


Figura 4.42: Comparação dos modelos teórico e experimental para o Ensaio 12

No Ensaio 12, o modelo experimental apresenta-se um comportamento diferente do modelo teórico.

4.7 – CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO: PARÂMETRO K E ORDEM DA REAÇÃO

Os valores da constante da reação k e da ordem da reação são apresentados na Tabela 4.18.

De acordo com a Tabela 4.18, os Ensaios de 1 a 6, que foram realizados com concentração de soro de 60 g/L, apresentaram uma ordem de reação para o substrato na faixa de 0,5, principalmente nos ensaios 1, 2, 4 e 5. Já para o produto o modelo cinético não foi adequado, uma vez que os modelos propostos foram os mais simples e o modelo para o produto não depende só do consumo do substrato, depende também da concentração de enzima e do crescimento de microrganismo. Para os Ensaios de 7 a 12, que foram realizados com concentração de soro de 90 g/L, apresentaram uma ordem de

reação para substrato na faixa de 0,7, principalmente nos ensaios 8, 9, 11 e 12. Já para o produto o modelo cinético não foi adequado.

Tabela 4.18: Valores de k , n e R^2 para todos os ensaios

		K^*	$n [\]$	R^2
Ensaio 1	Substrato	0,806	0,59	0,967
	Produto	0,432	0,45	0,971
Ensaio 2	Substrato	0,915	0,55	0,989
	Produto	0,099	0,97	0,997
Ensaio 3	Substrato	1,719	0,35	0,987
	Produto	0,006	1,99	0,983
Ensaio 4	Substrato	1,163	0,62	0,971
	Produto	0,348	0,66	0,989
Ensaio 5	Substrato	1,499	0,45	0,929
	Produto	1,261	0,17	0,858
Ensaio 6	Substrato	1,161	0,15	0,938
	Produto	0,067	1,18	0,996
Ensaio 7	Substrato	0,134	1,27	0,865
	Produto	0,058	1,33	0,923
Ensaio 8	Substrato	0,496	0,74	0,968
	Produto	0,007	1,68	0,939
Ensaio 9	Substrato	0,547	0,7	0,997
	Produto	$1,18 \cdot 10^{-5}$	3,42	0,948
Ensaio 10	Substrato	0,276	1,01	0,851
	Produto	0,157	0,95	0,859
Ensaio 11	Substrato	0,641	0,72	0,999
	Produto	0,007	1,83	0,993
Ensaio 12	Substrato	0,795	0,63	0,989
	Produto	0,074	1,14	0,981

* Unidade da constante k depende da ordem da reação:

Reação de ordem zero: $[k] = \text{g/L.h}$;

Reação de ordem 1: $[k] = \text{h}^{-1}$;

Reação de ordem 2: $[k] = \text{L/g.h}$;

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Com base nos resultados obtidos e nas discussões, foi possível chegar às seguintes conclusões:

5.1 – CONCLUSÕES

- A quantidade de enzima é determinante na redução do tempo de fermentação e no aumento da produtividade, a quantidade de enzima mais eficaz foi de 0,4 g/L;
- O menor tempo de fermentação foi de 6 horas para uma concentração de soro de 60 g por litro de meio, enzima de 0,4 g/l, inóculo de 70 g/L, nutrientes 3 g/L e agitação de 300 rpm;
- A maior produtividade foi de 3,68 g/L.h para uma concentração de soro de 90 g por litro de meio, enzima de 0,4 g/L, inóculo de 70 g/L, nutrientes 1 g/L e agitação de 300 rpm;
- O maior rendimento foi de 93,90 % para uma concentração de soro de 90 g por litro de meio, enzima de 0,2 g/l, inóculo de 50 g/L, nutrientes 3 g/L e agitação de 300 rpm;
- O modelo experimental da taxa de consumo de substrato obedece ao modelo teórico na maioria dos ensaios realizados, sendo necessário utilizar um fator de proporcionalidade;
- A ordem da reação do substrato para os ensaios realizados a concentração de soro de 60 g por litro de meio foi de 0,5 e para concentração de soro de 90 g por litro de meio foi de 0,7;
- A concentração de soro para obtenção de um melhor rendimento e produtividade foi de 90 g por litro de meio;
- A agitação que promoveu o melhor rendimento para todos ensaios (realizados com concentração de soro de 60 g/L e 90 g/L) foi de 300 rpm;
- Na maioria dos ensaios não houve influência da concentração de nutrientes. Quantidade de nutrientes (1 e 3 g/L): Extrato de levedura e Sulfato de amônio;
- O tempo de fermentação é influenciado pela concentração de inóculo.

5.2 – SUGESTÕES

- Estudo comparativo da hidrólise do soro de queijo, utilizando diversas lactases;
- Verificar a possibilidade de trabalhar com temperatura e pH diferentes na fermentação simultânea à hidrólise do soro de queijo;
- Trabalhar com linhagens diferentes de microrganismos na fermentação simultânea à hidrólise do soro de queijo;
- Fazer um estudo do modelo cinético com melhor adaptação aos resultados experimentais na fermentação simultânea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, E. H., (2001), Redução na poluição dos laticínios, pela transformação da lactose do soro de queijo em etanol. XXXIX Cong. Brasileiro de Ensino de Engenharia, Porto Alegre.
- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F., (1986). Biochemical engineering fundamentals. 2ª Ed. New York.
- BERNSTEIN, S., TZENG, C. H & SISSON, D. (1977). The commercial fermentation of cheese whey for the production of protein and alcohol. Biotechnology and bioengineering symposium, n. 7, p. 1-9.
- BERTOL, T. M. & SANTOS FILHO, J. I., (1996), Soro de leite integral na alimentação de suínos. Suinocultura dinâmica. Periódico Técnico- Informativo elaborado pelo Departamento técnico Rhodia – Merieux.
- BIO-DIAGNÓSTICA – Laborclin – Produtos para Laboratório Ltda, Kit (Teste Enzimático colorimétrico para determinação de Glicose em soro, plasma e fluido cerebrospinal).
- BLANCH, H. W. & CLARK, D. S., (1997), Biochemical Engineering. Ed. Marcel Dekker, New York.
- BLOWEY, R. W., (1992), Factors affecting milk quality. In: ANDREWS, A. H. et al. Ed. Bovine Medicine. Diseases and husbandry of cattle. Blackwell, Oxford, p.329-334.
- BORZANI, V., LIMA, U. A. & AQUARONE, E., (1975). (Biotecnologia) – Eng. Bioquímica. Edgard Blucher. Ed. Universidade de São Paulo, p. 168-178.
- CASTILLO, F. J., (1990). Lactose metabolism by yeasts. In Yeast Biotechnology and Biocatalysis, ed. H. Verachtert & R. De Mot. Marcel Dekker, New York, p. 297-320.
- CHAMPAGNE, C. P. & GOULET, J., (1988). Growth of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in lactose-hydrolyzed cheese-whey ultrafiltrate. Can. Inst. Food. ScL Technol., 21, 545-548.
- COELHO, M. G., MARAGNO, A.L., LEMOS, J. C., LIMA, S. C., ALBURQUERQUE, Y. T., (2002). Avaliação Ambiental do Aterro Sanitário de Uberlândia. Uberlândia – MG.
- COTON, S. G., (1985), Whey resources and utilization. Journal of the Society of Dairy Technology, Vol. 38, n.4, p.97-100.
- COUGHLIN, R. W. & CHARLES, M., (1980). Applications of lactase and immobilized lactase. In Immobilized Enzymes for Food Processing, ed. W. H. Pitcher Jr. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 153-173.

- CHEN, H. C.; ZALL, R. R., (1982), Continuous fermentation of whey into alcohol using an attached film expanded bed reactor. *Process Biochemistry*, Vol. 17, n.1, p.20-25.
- DEMOTT, B. J.; DRAUGHON, F. A & HERALD, P. J., (1981), Fermentation of lactose in direct-acid-set cottage cheese whey. *Journal of Food protection*, Vol. 44, n.8, p. 588-590.
- FERREIRA, C. L., (1978). Intolerância à lactose. O problema e as soluções. *Revista de laticínios Cândido Tostes*, Vol. 33, p. 10-14.
- FERREIRA, R. M., (2003), Produção de etanol a partir do soro de queijo utilizando a levedura *kluveromyces marxianus*. Tese de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, M.G.
- FREYER, J., (1972). Elaboration de Dulce de leche. Primer curso de capacitacion em industria lechera. FAO, Uruguai, p. 27.
- GEKAS, V. & LOPEZ-LEIVA, M., (1985). Hydrolysis of lactose: a literature review. *Proc. Biochem.*, 20, 2-12.
- GHALY, A. E. & EL-TAWEEL A. A., (1997). Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. *Biomass and Bioenergy* Vol. 12, n. 6, p. 461-72.
- HOLSINGER, V. H.; POSATI, L. P. & DE VILDISS, E.D. (1974), Whey beverages: a review. *J. Dairy Sci.* v. 57, p. 849-859.
- JONES, R. P; PAMMENT, N. & GREENFIELD, P. F., (1981), Alcohol fermentation by yeasts – the effect of environmental and other variables. *Process biochemistry*, v. 16, n.3, p. 42-49.
- JOSLYN, M. A. (1950), *Methods in Food Analysis*. New York, Academic Press, 2º ed., p.525.
- KOSARIC, N. & ASHER, Y., (1982). Cheese whey and its utilization. Conservation and recycling, Vol. 5, n.1, p. 23-32.
- KOSARIC, N.; WIECZOREK, A. & COSENTINO, G. P., (1983), Etanol fermentation. Ed. *Biotechnology*, Wheinheim: Verlag Chimie, p.257-385.
- KOSIKOWSKI, F.V., (1979), Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.*, 62(7): 1149-1160.
- LADERO, M., SANTOS, A. & GARCIA-OCHA, F., (2000). Kinectic modeling of lactose hydrolysis with na imobilize β -galactosidase from *Kluveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbiology Technology*, Vol. 27.
- LOURSEMA, J., (1978). Aplicaciones de lactasa para el dulce de leche. *Ind. Lacteas*. 27(5): 25-26.

- LOPEZ-LEIVA, M.H. & GUZMAN, M., (1985), Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. *Process Biochem.*, 30, 757-62.
- MACHADO, M. G. & LINARDI, V. R., (1990). Production of amylase and β -galactosidase by yeasts. *Arq. Biol. Technol.*, 33, 247-253.
- MAHONEY, R. R., (1997). *Lactose: Enzymatic Modification*. London, Chapman & Hall.
- MARIOTTI, M. P.; TREVISAN, H. C. & HYAMANAKA, H., (2000). Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de β -galactosidase imobilizada. Tese de mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, S.P.
- MARWAHA, S. S. & KENNEDY, J. F, (1988), Review: Whey-polution problem and potencial. *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 23, p.323-336.
- MAWSON, A. J., (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Biores. Technol.*, 47, 195-203.
- MENEZES, T. J. B., (1980), Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 223
- MILLER, G.L., (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* Vol. 31 p.426-428.
- MINAS AMBIENTE / CETEC (1998), Pesquisa tecnológica para controle ambiental em pequenos e médios laticínios de Minas Gerais. Belo Horizonte: Minas Ambiente / Cetec, v.2.
- PAIGE, D. M., (1971). Lactose Malabsortion and milk rejection in Nigro children. *John Hopkin Méd. J.*, Vol. 129, p. 163-168.
- PAOLUCCI, A. A .P., (1991), Formulação de um meio de cultura a base de soro de queijo para produção de *Lactococcus lactis* sp *Lactis*. Tese de Mestrado, p.6, UFV, Viçosa, MG.
- PARK, Y. K., (1979). *J. Food Sci.*, Vol. 44, p. 100.
- PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. & CASTRO GOMES, R. J. H., (1992), Soro de leite – Obtenção, características e aproveitamento: revisão. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, Vol. 13, n.1, p.92-96.
- PONSANO, E. H. G., (1992), Produção de etanol por *Kluyveromyces fragilis*: Estudo em soro de leite visando seu aproveitamento e a diminuição de sua capacidade poluente. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- RAMOS, D. C., (1985), Utilização do soro de queijo. Instituto de Laticínios Candido Tostes.
- REED, G., NAGODAWITHANA, T., (1993). *Enzymes in Food Processing*. 3ª Ed. New York, Academic Press.

- RENNER, E., (1983), Milk and Dairy Products in Human Nutrition. V-*GmbH., Volkswirtschaftlicher Verlag. Munich, p.1-450.
- RICHARDS, N. S. P. S., (1997), Emprego Racional do soro láctico. Indústria de laticínios. P.67-69.
- ROGOSA, M., BROWNW, H. H. & WHITTIER, E. O., (1947). Ethyl alcohol from whey. Journal of Dairy Science, Vol. 30, n.4, p. 263-269.
- RUSSEL, I., (1986). Will a recombinant DNA yeast be able to solve whey disposal problems? Trends Biotechnol., 4, 107-108.
- SANTIAGO, P. A., (2002). Contribuição o estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluveromyces marxianus*. Tese de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, M.G.
- SEGEL, I. H., (1993). Enzyme Kinetcs. New York, John Wiley.
- SILVA, C. A & CASTRO-GOMEZ, R. J. H. (1995). Estudo de um processo fermentativo utilizando soro de leite e a levedura *Kluyveromyces fragilis*. Semina. Vol. 16, n. 1:17-21.
- SISO, M. I. G., (1996). The Biotechnological utilization of cheese whey: A review. Bioresource Technology, 57, 1-11.
- TORRES, C. C., (1988), Bebidas à base de soro de queijo: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial. Tese de mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, M.G.
- VINHAL, E. F., (2001), Hidrólise da lactose no leite por β -galactosidase de *kluyveromcyces fragilis*. Tese de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, M.G.
- ZADOW, J.G., (1997), Utilization of milk components: whey. In: ROBINSON, R.K., Modern Dairy Technology, vol. 2, Advances in Milk products.
- WAKSTRA, P. & JENNESS, R., (1984), Química e Física Lactologia. Editora Acribia, S.A., Zaragoza.
- WOYCHICK, J. H. & HOLSINGER, V. H., (1977). Use of lactase in the manufacture of dairy products. In: ORY, R. L. & ANGELO, A. J., (ed). Enzymes in food and beverage processing. Washington: American chemical society, p. 67-79.

ANEXO

ANEXO 1

TÉCNICAS UTILIZADAS DURANTE A EXECUÇÃO DOS ENSAIOS

1.1 – Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores

Durante a determinação do teor de lactose presente no soro utilizou-se uma variante do método do ácido 3,5 – dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

Esse método consistia em:

1. Tomar uma alíquota de 1mL da amostra pura ou diluída de acordo com as condições e colocar em um tubo Folin-Wu de 25mL, juntamente com 2mL de DNS preparado como descrito no anexo 1.4;
2. O conjunto era então colocado em banho-maria por um período de 5 minutos;
3. Decorrido o tempo completava o volume do tubo com água destilada;
4. Fazia a leitura da amostra em absorbância (ABS) no espectrofotômetro a 540nm, tendo com padrão uma amostra em branco; (O branco era preparado, substituindo 1mL da amostra por 1mL de água destilada);
5. Para a aferição da quantidade de açúcar presente era necessário fazer uma curva de calibração (Ver apêndice) com amostras de concentrações conhecidas de lactose seguindo o método acima.

1.2 – Determinação da Concentração de Etanol: Método do Dicromato

Os passos para a determinação do teor etanol presentes na amostra eram (JOSLYN, 1950):

1. Centrifugar a amostra;
2. Pipetar 10mL do sobrenadante;
3. Destilar no micro-destilador por 5 minutos;

4. Recolher o destilado em um balão de 200mL e completar o volume com água destilada;
5. Pipetar 20mL do balão de 200mL em um erlenmeyer com tampa de vidro esmerilhado;
6. Adicionar 20mL do Dicromato de Potássio ao erlenmeyer;
7. Levar o erlenmeyer a um banho 60°C por 25 minutos;
8. Titular com a solução de Sal de Mohr utilizando o indicador Fenantrolina;
PONTO DE VIRAGEM: VERDE PARA VERMELHO.
9. Paralelamente fazer um branco: adicionara 20mL de água destilada com 20mL de Dicromato. Titular sem levar ao banho de 60°C.

Repetir o branco quando houver substituição das soluções de Dicromato de Potássio ou de Sal de Mohr por solução nova.

1.2.1 – Teor de Etanol

O teor de etanol presente na amostra era calculado segundo a expressão:

$$C = E.V.N.\left(1 - \frac{V_t}{V_{tb}}\right) \cdot \frac{\text{diluição}}{V_{amostra}}$$

Onde :

C = Concentração de Etanol (g/L);

E = Equivalente químico do etanol (11,5);

C = Concentração de etanol (g/L);

V = Volume de dicromato (20mL);

N = Normalidade do dicromato = $33,678/49,035 = 0,687$

D = diluição=200/10=20vezes;

V amostra = 20mL;

V_t = Volume da solução de Sal de Mohr utilizado na titulação amostra;

V_{tb} = Volume da solução de Sal de Mohr utilizado na titulação do branco.

Fazendo as substituições acima a expressão a que se chega é:

$$C = 158,01 \left(1 - \frac{V_t}{V_{tb}} \right)$$

1.3 – Determinação do Teor de Massa Seca

A massa seca que ficava no fundo da cubeta da centrífuga era lavada e então transferido para um vidro de relógio de massa conhecida. Após esta etapa o mesmo era levado à estufa até a massa ficar constante. Pesava-se o conjunto e a massa seca era obtida por diferença.

O conteúdo seco presente na amostra foi efetuado utilizando a seguinte equação:

$$\text{MASSA SECA} = (\text{Massa}_{\text{vidro relógio} + \text{amostra}} - \text{Massa}_{\text{vidro relógio}}). 33,33$$

Onde:

MASSA SECA = Conteúdo seco presente na amostra;

Massa_{vidro relógio + amostra} = Massa do conjunto Vidro de relógio – Massa Coletada;

Massa_{vidro relógio} = Massa do vidro de relógio;

1.4 – Determinação da Concentração de Glicose

O Kit de Glicose Enzimática era composto pelo Reagente Glicose Enz-Color e pela solução Padrão.

Para determinação da concentração de glicose presente nos ensaios foi utilizado procedimento descrito abaixo:

- 1) Rotular 3 tubos como B (branco), P (padrão) e T (teste) e proceder como indicado abaixo:

	B (branco)	P (padrão)	T (teste)
Reagente Glicose Enz-Color	1,0mL	1,0mL	1,0mL
Padrão de Glicose	-	0,01mL	-
Amostra	-	-	0,01mL

- 2) Misturar suavemente os tubos;
- 3) Incubar em banho-maria a 37°C durante 10 minutos;
- 4) Ajustar o espectrofotômetro à 500nm;
- 5) Fazer a leitura de absorbância (ABS) da solução padrão e da amostra;
- 6) Proceder aos cálculos de acordo com a equação abaixo, para a concentração de Glicose:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{ABS do Teste}}{\text{ABS do Padrão}} * 100$$

ANEXO 2

MÉTODO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES

2.1 – Sal de Mohr (Sulfato de Amônio Ferroso)

1. Pesar 135,1g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
2. Transferir o material pesado para um erlenmeyer de 2L, adicionando 500mL de água destilada; (O erlenmeyer deve apresentar uma marca correspondente a 1 L);
3. Colocar em um banho de água e juntar lentamente 20mL de H_2SO_4 concentrado;
4. Transferir a solução para um balão de 1L não completando o volume;
5. Embrulhar o balão em papel para protegê-lo da luz;
6. Completar o volume posteriormente com água destilada quando a solução estiver fria;
7. Transferir esta solução para um vidro de tonalidade escura etiquetando com a data de preparo da solução.

2.2– Dicromato de Potássio

1. Pesar 33,678g de dicromato de potássio;
2. Transferir o material pesado para um erlenmeyer de 2L, adicionando 500mL de água destilada; (O erlenmeyer deve apresentar uma marca correspondente a 1 L);
3. Colocar em um banho de água e juntar lentamente 325mL de H_2SO_4 concentrado;
4. Transferir a solução para um balão de 1L não completando o volume;
5. Embrulhar o balão em papel para protegê-lo da luz;
6. Completar o volume posteriormente com água destilada quando a solução estiver fria;
7. Transferir esta solução para um vidro de tonalidade escura etiquetando com a data de preparo da solução e massa exata de dicromato de potássio pesada.

2.3 – Indicador fenantrolina

1. Pesar 0,695g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
2. Pesar 1,485g de 1,10 Fenantrolina;
3. Adicionar 100mL de água destilada.

2.4 – Ácido Dinitrossalicílico (DNS)

1. Dissolver à temperatura ambiente, 1g de ácido 3,5 – dinitrossalicílico em 20mL de NaOH e 50mL de água destilada;
2. Adicionar 30g de Sal de Rochele (tartarato duplo de Na e K – $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$);
3. Completar o volume com água destilada até atingir 100mL;
4. Este reagente era mantido em frasco escuro e vedado.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

CURVA DE CALIBRAÇÃO: AÇÚCAR REDUTOR

Preparava-se concentrações de lactose conhecidas variando de 0,1g/l a 1,0g/L. Misturava-se 1mL de cada solução a 2mL de DNS e aquecia-se por 5 minutos em banho de água em ebulição. A seguir esfriava-se a mistura em água corrente e completava-se o volume do tubo de Folin-Wu até 25mL. Feito isto, procedia à leitura de absorbância (ABS) no espectrofotômetro à 540nm;

Utilizando o Software STATISTICA®, Versão 5, edição 97, e os dados de concentração de lactose e da leitura de absorbância, foi feita uma regressão linear (Figura AP-1).

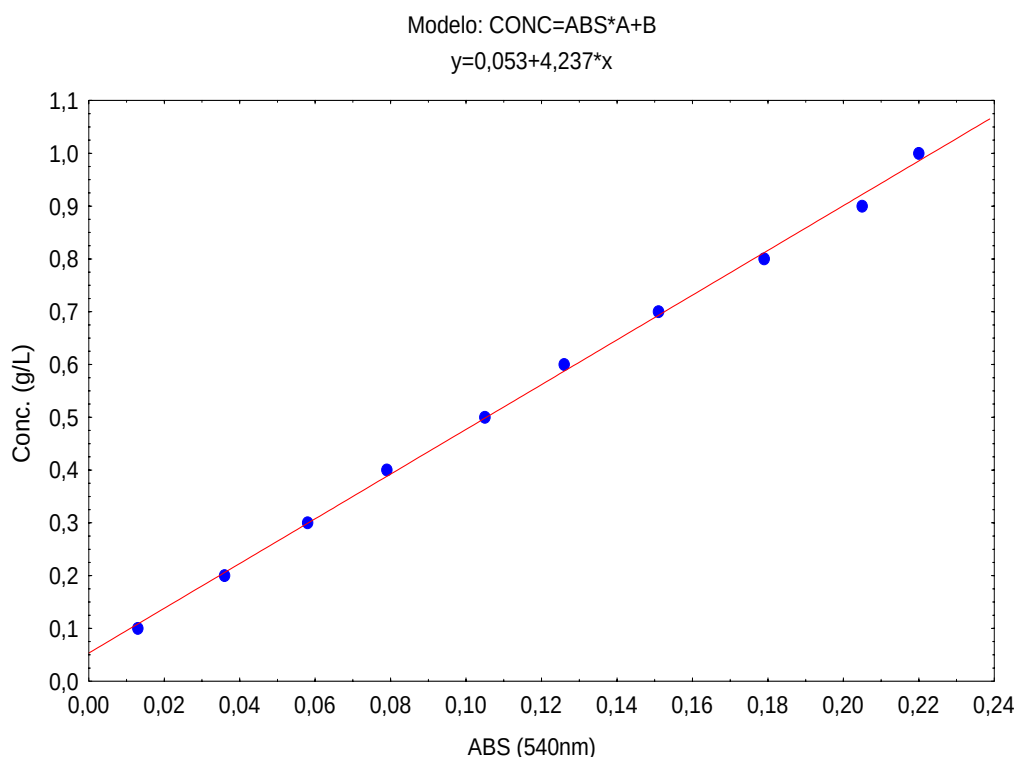


Figura AP-1: Curva de calibração para avaliar concentração de lactose

Do gráfico acima, tem-se a seguinte equação:

$$\text{CONC} = 4,2372 * \text{ABS} + 0,0534$$

Onde:

CONC: Concentração de lactose (g/L);

ABS: Leitura de absorvância no espectrofotômetro à 540nm.

A curva apresenta um coeficiente de correlação de ($R^2 = 0,9984$), que representa bem os dados observados.

APÊNDICE 2

PARÂMETROS E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO

Os valores dos parâmetros (a,b,c e d) referentes às Equações 4 e 5 e os valores dos coeficientes de correlação de cada ensaio são apresentados a seguir.

Ensaio 1:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	0,2286	52,9428
b	2,4604	-8,0365
c	-0,0799	0,3085
d	$-1,098 \cdot 10^{-6}$	-7,0431
R ²	0,9967	0,9960

Ensaio 2:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	1,0445	49,4884
b	3,5444	-8,0858
c	-0,1849	0,3364
d	$-2,7176 \cdot 10^{-6}$	-5,5027
R ²	0,9894	0,9994

Ensaio 3:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	0,5619	41,0437
b	4,5307	-6,8718
c	-0,2817	0,2782
d	$1,3794 \cdot 10^{-6}$	1,8715
R ²	0,9864	0,9962

Ensaio 4:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	-0,0869	63,1737
b	4,3005	-14,5331
c	-0,2451	0,8347
d	$-1,5427 \cdot 10^{-6}$	-18,8091
R ²	0,9982	0,9985

Ensaio 5:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	0,0402	66,0122
b	2,3776	-12,6424
c	-0,0109	0,6213
d	$-2,2352 \cdot 10^{-4}$	-22,7825
R ²	0,9937	0,9818

Ensaio 6:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	-0,3456	33,0966
b	4,6770	-2,4122
c	-0,2679	-0,2002
d	$-1,2215 \cdot 10^{-3}$	10,5713
R ²	0,9867	0,9916

Ensaio 7:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	1,4654	61,9095
b	6,6110	-11,9091
c	-0,4241	0,5900
d	$1,3412 \cdot 10^{-4}$	3,0521
R ²	0,9592	0,9996

Ensaio 8:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	1,9756	65,6743
b	4,6816	-9,5186
c	-0,2459	0,36665
d	$-2,3724 \cdot 10^{-6}$	-1,1114
R ²	0,9606	0,9945

Ensaio 9:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	1,6399	71,7264
b	6,1879	-11,0882
c	-0,3958	0,4916
d	$3,4142 \cdot 10^{-5}$	-6,6592
R ²	0,9671	0,9973

Ensaio 10:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	0,4931	47,6860
b	4,5879	-7,9887
c	-0,2053	0,3417
d	$-1,2590 \cdot 10^{-6}$	18,3730
R ²	0,9804	0,9933

Ensaio 11:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	1,3546	60,2676
b	7,8557	-11,4939
c	-0,6095	0,6216
d	$3,0115 \cdot 10^{-4}$	3,1951
R ²	0,9645	0,9987

Ensaio 12:

Parâmetros	Etanol	Substrato
a	-0,5032	62,6783
b	6,6389	-10,1971
c	-0,3624	0,4389
d	$-1,1080 \cdot 10^{-5}$	3,3542
R ²	0,9767	0,9994

APÊNDICE 3

RESULTADOS DOS ENSAIOS REALIZADOS

Ensaio 1

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	46	0	-	(15min)12,56
2	36,35	4,95	18,015	5,33
4	25,76	9,12	18,338	2,1
6	18,13	12,18	19,208	0,95
8	6,84	14,85	20,708	0,52
10	2,61	15,99	22,748	
12	1,09	18,28	23,504	
13	1,06	18,65	24,831	
14	0,92	17,51	21,571	

Ensaio 2

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	44	0	-	(15min)10,34
2	33,81	9,14	21,205	4,43
4	22,37	12,56	22,141	1,94
6	13,69	14,85	22,208	1,05
8	5,68	16,37	22,118	0,85
10	2,40	19,04	24,041	
12	0,96	16,37	23,878	

Ensaio 3

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	43	0	-	(15min)9,64
2	27,88	9,94	14,015	2,99
4	19,20	13,26	15,625	1,80
6	10,23	17,31	17,535	1,10
8	2,33	19,15	18,821	0,22
10	0,84	17,68	18,771	

Ensaio 4

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	44,3	0	0	(15min)14,91
2	35,51	7,20	18,725	7,58
4	17,08	13,68	19,885	4,44
6	5,89	16,56	20,788	2,82
8	1,31	18,72	21,818	0,38
10	0,85	18,36	21,738	

Ensaio 5

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	43,4	0	0	(15min)12,10
2	38,39	6,03	14,462	6,13
4	28,94	9,43	16,178	4,76
6	9,28	13,58	17,562	2,88
8	5,19	18,48	18,588	1,74
10	1,94	18,10	18,418	

Ensaio 6

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	43,75	0	0	(15min) 19,64
2	28,05	6,84	24,34	13,56
4	22,50	15,19	25,28	9,19
6	9,54	17,09	27,02	2,42
8	1,59	16,33	26,92	

Ensaio 7

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	65	0	0	(15min)16,38
1	44,32	11,76	29,750	14,33
2	40,51	16,17	30,470	7,43
4	24,28	20,58	31,597	4,76
6	11,92	23,15	32,827	3,49
8	3,67	29,40	33,530	1,03
10	2,15	27,93	32,330	

Ensaio 8

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	64,3	0	0,000	(15min)15,10
2	50,2	13,67	17,145	9,90
4	31,45	16,71	19,698	7,85
6	19,8	20,51	19,755	5,64
8	13,45	22,79	20,288	3,59
10	9,27	23,55	20,655	1,95
12	4,77	24,31	20,918	0,92
14	3,12	22,03	20,025	

Ensaio 9

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	65,2	0	0	(15min) 15,16
2	49,4	15,57	25,717	10,63
4	36,8	19,75	27,264	6,83
6	23,45	23,17	29,407	5,47
8	12,85	25,07	30,964	4,78
10	10,13	25,83	32,640	1,80
12	9,82	24,31	30,556	

Ensaio 10

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	66,2	0	0	(15min)21,34
2	34,1	10,11	15,075	12,63
4	24,9	14,23	15,165	7,51
6	10,5	21,72	17,628	4,39
8	3,66	23,59	18,491	2,05
10	2,90	25,46	18,811	1,29
12	2,54	26,58	19,053	0,75
14	1,95	25,95	18,975	

Ensaio 11

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	63,5	0	0	(15min) 17,36
2	39,8	17,85	28,924	11,54
4	25,36	21,65	31,164	5,31
6	12,52	25,07	31,773	2,21
8	8,66	27,35	34,213	1,36
10	7,40	25,45	33,530	1,06

Ensaio 12

Tempo (h)	Açúcar Redutor (g/L)	Conc. Etanol (g/L)	Massa seca (g/L)	Conc. Glicose (g/L)
0	66	0	0	(15 min) 9,63
2	44,75	9,12	21,521	5,33
4	28,94	23,17	24,614	3,08
6	16,75	25,83	27,017	2,72
8	9,01	27,73	28,227	1,45
10	5,71	30,39	29,660	0,59
12	2,98	25,07	27,941	