



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS-PPGSA**

MAGNO DE SOUZA ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE ETANOL NEUTRO A PARTIR DO SORO DE QUEIJO
COALHO POR DESTILAÇÃO CONVENCIONAL**

**POMBAL - PB
DEZEMBRO 2013**

MAGNO DE SOUZA ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE ETANOL NEUTRO A PARTIR DO SORO DE QUEIJO COALHO
POR DESTILAÇÃO CONVENCIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande/Campus Pombal, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Sistemas Agroindustriais.

ORIENTADORA: Dra Mércia Melo de Almeida

**POMBAL - PB
DEZEMBRO 2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL
CAMPUS POMBAL/CCTA/UFCG

DIS

A663p

Araújo, Magno de Souza.

Produção de etanol neutro a partir do soro de queijo coalho por destilação convencional / Magno de Souza Araújo. - Pombal, 2013.
68fls.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2013.

"Orientação: Prof.^a Dr.^a. Mércia Melo de Almeida".

"Co-orientação: Prof.^a Dr.^a. Ângela Maria Santiago".

"Co-orientação: Prof.^a Dr.^a. Josilene de Assis Cavalcante".

Referências.

1. Soro de queijo coalho. 2. Etanol Neutro. 3. Fermentação Alcoólica. I. Almeida, Mércia Melo de. II. Santiago, . Ângela Maria. III. Cavalcante, Josilene de Assis. IV. Título.

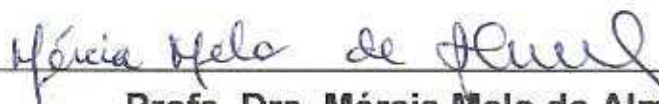
UFCG/CCTA

CDU 637.146

**PRODUÇÃO DE ETANOL NEUTRO A PARTIR DO SORO DE QUEIJO COALHO
POR DESTILAÇÃO CONVENCIONAL**

Dissertação aprovada em 16 / 12 / 2013.

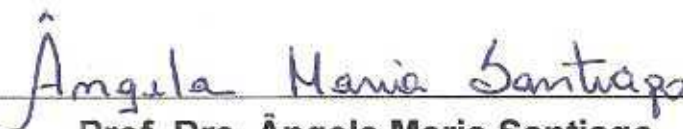
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Mércia Melo de Almeida

DEQ/CT/UFPB

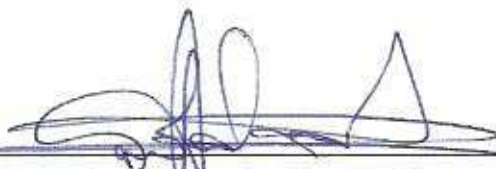
Orientadora



Prof. Dra. Ângela Maria Santiago

DQ/CCT/UEPB

Examinadora externa



Prof. Dra. Josilene de Assis Cavalcante

DEQ/CT/UFPB

Examinadora interna

**POMBAL - PB
DEZEMBRO 2013**

DEDICO esta dissertação com muito carinho ao meu pai Marcos Farias e minha mãe Rozália de Souza, pelo intenso apoio e investimento, por acreditar no meu potencial, por ambos serem tão pai em minha vida, pelos pés no chão e pelo carinho sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me fazer reconhecer a sua importância como força que nos move em busca da realização dos nossos projetos de vida.

A toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, em especial minhas irmãs Mairly e Camila, minhas tias Socorrinha e Paulina e minha namorada Janaína Kássia.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande/Câmpus Pombal que contribuíram com profissionalismo e atenção na elaboração deste trabalho.

A minha Orientadora Dra Mércia Melo de Almeida, por todo o conhecimento passado, pelo inestimável apoio, esclarecimentos e intensos momentos de paciência e orientação prestados atenciosamente com a minha pessoa.

Ao professor Vital Queiróz e Sófacles do Laboratório de Produtos Fermento-destilados da UFPB, pela ajuda na execução deste trabalho.

A Prof. Dr^a Alfredina dos Santos Araújo, diretora do Centro Vocacional Tecnológico (CVT) da UFCG/Pombal por disponibilizar os laboratórios para a realização dos ensaios.

Aos membros da banca Profa Dra. Josilene de Assis Cavalcante e a Profa. Dra. Ângela Maria Santiago pelas contribuições prestadas para o enriquecimento deste trabalho.

Ao amigo Anderson pelo ajuda e apoio nas diversas análises químicas realizadas neste trabalho e aos colaboradores do CVT pelo auxílio nas intensas horas de fermentação, em especial a Katiane, Wiliane, Fernanda, Simone e Daniele.

Aos colegas Pós-Graduandos, pelo incentivo, amizade e colaboração nas diversas etapas deste trabalho.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Devido às questões econômicas e ambientais, as perspectivas de aumento do consumo de etanol conduzem a busca por novas matérias-primas, destacando-se o soro de queijo, que é um resíduo de elevada carga orgânica e de difícil biodegradabilidade, proveniente das fábricas artesanais de queijo. Como a cana-de-açúcar é uma cultura sazonal, uma alternativa recomendável é conferir às usinas produtoras de etanol um caráter polivalente capazes de operar com variedades de matérias-primas potencialmente disponíveis na região, já que uma das preocupações do mundo atual é o suprimento de energia nas próximas décadas. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo a produção do etanol neutro utilizando o soro de queijo “coalho” procedente de queijeira da cidade de Pombal/PB. A primeira etapa deste trabalho consistiu na caracterização da matéria-prima e no estudo da fermentação alcoólica utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* através de um planejamento experimental fatorial 2^2 com três repetições no ponto central para verificar as influências das variáveis de entrada (concentração inicial de sacarose e concentração inicial de inóculo) sobre a resposta produtividade. Na segunda etapa foi realizada a destilação do fermentado e a caracterização do etanol neutro. De acordo com os resultados obtidos, o experimento 4 foi o que apresentou maior produção de etanol, com graduação alcoólica de 9,8°GL. Os efeitos da concentração de levedura, sacarose e da interação entre essas se apresentaram estatisticamente significativos em nível de 95% de confiança, sendo que a concentração de levedura foi à variável de maior influência. O etanol neutro obtido foi analisado quanto ao pH, acidez total, massa específica, condutividade elétrica e teor alcoólico, e atendeu a maioria das especificações técnicas da legislação vigente, com exceção do pH. Os resultados obtidos mostraram que o uso do soro de queijo é visivelmente promissor para a produção de etanol neutro.

PALAVRAS-CHAVE: queijeiras, fermentação alcoólica, características físico-químicas, microdestilador de álcool.

ABSTRACT

Due to economic and environmental issues, the prospects for increased consumption of ethanol leads to search for new raw materials , especially the whey , which is a residue of high organic load and hard biodegradability , from craft factories cheese. As cane sugar is a seasonal crop, a recommendable alternative is to confer on plants producing ethanol polyvalent character capable of operating with varieties of raw materials potentially available in the region, since one of the concerns of the world today is the supply energy in the coming decades. Given the above, this study aimed to the production of neutral ethanol using the whey from cheesemaking founded the city of Pombal / PB "curd". The first step of this work was the characterization of the raw material and the study of alcoholic fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* through a 2^2 factorial experimental design with three replications at the center point to verify the influences of input variables (initial sucrose concentration and concentration initial inoculum) on the response productivity. In the second stage fermentation and distillation of ethanol neutral characterization was performed. According to the results, the experiment 4 showed the highest ethanol production, with an alcohol content of 9.8 °GL. The effects of concentration of yeast, sucrose and the interaction between these is statistically significant at the 95% level of confidence, whereas the concentration of yeast was the most influential variable. The neutral ethanol obtained was analyzed for pH, total acidity, density, electrical conductivity and alcohol content , and attended most of the technical specifications of the current legislation, except for pH. The results showed that the use of whey is strikingly promising to produce neutral ethanol.

KEYWORDS: cheese factories, alcoholic fermentation, physico-chemical characteristics, microdestilador alcohol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução da produção de soro de queijo no Brasil em mil ton.....	15
Figura 2 - <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> (ampliado 10.000X em microscópio eletrônico de transmissão)	22
Figura 3 - Curvas de ajuste dos resultados de uma experiência idealizada de fermentação.....	26
Figura 4 - Etapas da produção do álcool	34
Figura 5 - Aglomerado protéico do soro de queijo coalho.....	37
Figura 6 - Reatores de polietileno.....	40
Figura 7 - Microdestilador de etanol convencional.....	43
Figura 8 - Cinética fermentativa do Experimento 1	50
Figura 9 - Cinética fermentativa do Experimento 2	50
Figura 10 - Cinética fermentativa do Experimento 3	51
Figura 11 - Cinética fermentativa do Experimento 4.....	51
Figura 12 - Cinética fermentativa do ponto central - experimentos 5, 6 e 7	52
Figura 13 - Perfil do pH e acidez durante a fermentação.....	54
Figura 14 - Gráfico de Pareto para produtividade.....	57
Figura 15 - Superfície de resposta para a produtividade	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do soro de queijo “Tipo coalho”	17
Tabela 2 - Especificações técnicas do etanol neutro	31
Tabela 3 - Valores codificados e reais das variáveis de entrada	38
Tabela 4 - Matriz de planejamento fatorial completo $2^2 + 3$ PC.....	38
Tabela 5 – Média dos resultados das análises físico-químicas do soro de queijo coalho in natura	46
Tabela 6 – Média dos resultados das análises físico-químicas do soro desproteinizado	48
Tabela 7 – Valores da produtividade para cada experimento e por tempo de fermentação	55
Tabela 8 – Modelo empírico decodificado para a produtividade analisados ao nível de 95% de confiança	55
Tabela 9 – Análise de variância para a produtividade ao nível de 95% de confiança	56
Tabela 10 – Média dos resultados das análises físico-químicas do etanol neutro ...	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Geral	13
2.2 Específicos.....	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Soro de Queijo	14
3.1.1 Composição do Soro de Queijo	17
3.2 Separação das proteínas do soro de queijo	18
3.3 Aproveitamento do soro de queijo por fermentação	19
3.4 Fermentação	19
3.4.1 Fermentação alcoólica	20
<i>3.4.1.1 Agentes da fermentação alcoólica</i>	22
3.4.2 Fatores que afetam a fermentação	23
3.5 Cinética dos Processos Bioquímicos.....	25
3.6 Destilação	26
3.6.1 Destilação descontínua simples	27
3.7 Produção de Álcool	28
3.8 Planejamento experimental	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Matéria-prima	33
4.2 Microrganismo	33
4.3 Etapas da Produção de etanol neutro a partir do soro de queijo coalho	33
4.3.1 Caracterização do soro de queijo	34
<i>4.3.1.1 Acidez</i>	34
<i>4.3.1.2 pH</i>	35
<i>4.3.1.3 Extrato Seco Total</i>	35
<i>4.3.1.4 Cinzas</i>	35
<i>4.3.1.5 Gordura</i>	36

4.3.1.6 Lactose	36
4.3.1.7 Proteína	36
4.3.1.8 Densidade	36
4.3.2 Desproteínização e correção do pH do soro de queijo	37
4.3.3 Planejamento experimental	37
4.3.4 Chaptalização	39
4.3.5 Adição do inóculo	39
4.3.6 Processo fermentativo	40
4.3.7 Acompanhamento cinético da fermentação alcoólica	41
4.3.7.1 Concentração de etanol	41
4.3.7.2 Concentração de biomassa	41
4.3.7.3 Sólidos solúveis	42
4.3.7.4 Determinação do pH	42
4.3.7.5 Acidez total.....	42
4.3.8 Centrifugação	42
4.3.9 Destilação convencional.....	43
4.3.10 Análises físico-químicas do etanol neutro	44
4.3.10.1 pH	44
4.3.10.2 Condutividade Elétrica	44
4.3.10.3 Acidez total.....	44
4.3.10.4 Teor alcoólico.....	45
4.3.10.5 Massa específica.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Caracterização do soro <i>in natura</i>	46
5.2 Caracterização do soro desproteínizado	48
5.3 Acompanhamento cinético da fermentação alcoólica	49
5.3.1 Monitoramento do pH e acidez.....	53
5.4 Análise estatística do processo fermentativo utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	55
5.4.1 Diagrama de Pareto.....	56
5.4.2 Superfície de resposta.....	57
5.5 Caracterização físico-química do etanol neutro.....	58

6 CONCLUSÕES.....60

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS62

1 INTRODUÇÃO

Uma das preocupações do mundo atualmente é com o suprimento de energia nas próximas décadas, uma vez que a principal fonte de energia utilizada hoje é o petróleo, por se tratar de combustível fóssil não renovável. O recente retorno aos aumentos no preço do petróleo, as perspectivas de esgotamento das reservas, os riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo de países politicamente instáveis e os compromissos mais sólidos com a questão ambiental desde a assinatura do Protocolo de Quioto fizeram renascer a atenção nas fontes alternativas de energia (BASTOS, 2007).

Devido às questões econômicas e ambientais, as perspectivas de aumento no consumo de álcool etílico, conduzem a busca por novas matérias-primas, destacando-se o soro de queijo, com o objetivo de atender a demanda por esse insumo. A utilização do soro de leite como substrato em processos fermentativos pode atenuar os problemas ambientais causados pelos mesmos, bem como obter produtos de maior valor agregado, como por exemplo, o etanol (ARAÚJO, 2008).

O etanol vem despertando, desde a crise de petróleo, um crescente interesse do governo Federal do Brasil e dos pesquisadores do mundo. O Programa Nacional do álcool (Proálcool) foi criado na década de 70 com o objetivo de estimular a produção do álcool, a partir da cana-de-açúcar, visando o atendimento das necessidades do mercado interno e externo e da política de combustíveis automotivos (OLIVERIA, 2009). De acordo com Macedo e Nogueira (2004), o Brasil detém o maior parque industrial de produção de etanol oriundo da cana-de-açúcar do mundo, com a mais alta tecnologia.

No entanto, a cana-de-açúcar é uma cultura sazonal (6 meses de safra), aumentando o custo final do litro de álcool produzido, onerando os custos de produção por uma ociosidade no investimento da ordem de seis meses. Uma alternativa recomendável é conferir às usinas produtoras de Álcool etílico um caráter polivalente, ou seja, torná-las capazes de operar com diferentes matérias-primas potencialmente disponíveis na região, aumentando desta forma a eficiência da estrutura produtiva, a capacidade de inovação e da expansão das exportações do

país, segundo as diretrizes do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, no plano de Estratégia Nacional de Biotecnologia (TORRES NETO, 2010).

Segundo ALMEIDA (2010), no estado da Paraíba, mais de 70 municípios são produtores de queijo, um empreendimento que gera renda para quem atua nesse ramo, sendo a grande maioria artesanal e instalada nas microrregiões de Catolé do Rocha, Cajazeiras, Sousa, Itaporanga, Pombal, Patos, Piancó, Serra de Teixeira e Seridó Ocidental.

A microrregião de Pombal é considerada a maior bacia leiteira da Paraíba, e a fabricação artesanal de queijo é uma das principais atividades dessa região, representado por cerca de 36 micro empreendimentos (queijeiras) de médio e pequeno porte, distribuídos em sua maior parte na zona rural desse município. Esses micro empreendimentos contribui significativamente na formação de renda dos produtores de leite e na economia da região. Diariamente essas queijeiras processam mais de 200.000 L de leite de vaca para a produção de queijo de coalho, queijo de manteiga, manteiga da terra e subprodutos como nata e creme (ALMEIDA, 2010).

Em média, para fabricação de 1 Kg de queijo necessita-se de 10 L de leite, gerando-se 9 L de soro. Considerando que a produção de queijos na microrregião de Pombal está em torno de 48,5 ton/mês, isso corresponde a aproximadamente 437.000 litros de soro de queijo gerado (ALMEIDA, 2010), que se despejados na rede pública, rios ou lagos sem nenhum tratamento prévio, podem causar sérios riscos ao meio ambiente, pois certamente o mesmo não possui condições de absorver uma carga poluidora extremamente rica em elementos orgânicos.

Desta forma, o aproveitamento do soro de queijo na produção de etanol neutro terá como benefício à redução do potencial poluidor desse resíduo e obtenção de um produto de maior valor agregado. As aplicações do etanol neutro são inúmeras, englobando indústrias de bebidas, farmacêuticas, cosméticos, produtos de limpeza, uso doméstico, entre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- ✓ Estudar a produção do etanol neutro utilizando o soro de queijo coalho procedente de queijeira da cidade de Pombal/PB.

2.2 Específicos

- ✓ Caracterizar o soro de queijo coalho *in natura* e desproteínizado;
- ✓ Acompanhar a cinética da fermentação alcoólica da produção de etanol utilizando a metodologia de planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central, avaliando a influência das variáveis de entrada (concentração de sólidos solúveis e concentração de levedura) sobre a variável resposta produtividade;
- ✓ Realizar a destilação do fermentado em microdestilador convencional, mediante aquecimento através de resistências elétricas para a produção do etanol neutro;
- ✓ Fazer a caracterização físico-química (pH, acidez total, massa específica, condutividade elétrica e teor alcoólico) do destilado (álcool neutro) e comparar com as especificações técnicas da legislação vigente para etanol neutro.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Soro de Queijo

O soro de queijo constitui-se em um subproduto, de cor amarelo-esverdeado, resultante da coagulação do leite por ácido ou por enzimas proteolíticas durante a produção de queijo ou de caseína. (DALLAS, 1999).

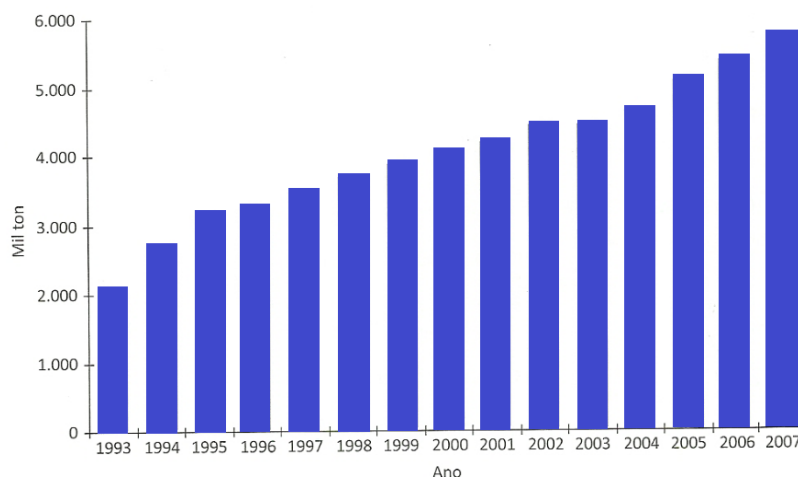
O queijo obtido por coagulação enzimática utilizando-se, na maioria das vezes, leite cru, de massa crua prensada ou não, salgado e não maturado, produz soro tipo doce como resíduo (BENEVIDES, 2002).

Segundo Oliveira (2009) o soro pode ser convenientemente dividido em grupos:

- Soro doce com acidez titulável entre 0,10% e 0,20% de ácido láctico, pH tipicamente de 5,0 a 6,6;
- Soro meio ácido com acidez titulável entre 0,20% e 0,40% de ácido láctico, pH tipicamente de 5,0 a 5,8;
- Soro ácido com acidez titulável acima de 0,40%, pH inferior a 5,0.

Vários são os fatores que levam a indústria queijeira a considerar as possibilidades de aproveitamento do soro de queijo. O aumento da produção de queijos traz como consequência um incremento na produção de soro de queijo. O valor nutricional do soro de queijo e a despesa necessária para seu tratamento faz com que as técnicas que permitem sua transformação em um produto com valor comercial se tornem cada vez mais atraentes (OLIVEIRA, 2009). A evolução da produção de soro no Brasil pode ser observada na Figura 1. Os dados foram estimados em relação à produção de queijos registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF).

Figura 1 - Evolução da produção de soro de queijo no Brasil em mil ton.



Fonte: OLIVEIRA, 2009

O soro é um produto capaz de promover poluição ambiental quando descartado. Sua descarga em cursos d'água pode provocar a destruição da flora e fauna devido à sua alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Sua eliminação é um dos maiores problemas enfrentados por boa parte das indústrias de laticínios, as quais consideraram o soro por muitos anos como um subproduto de baixo custo, despejando-o na rede pública, rios ou lagos, causando sérios riscos ao meio ambiente, pois, certamente, os mesmos não possuem condições de absorver uma carga poluidora extremamente rica em elementos orgânicos (VÉRAS, 1997).

Em paralelo, a legislação vem forçando os fabricantes de queijos e de caseína a tratar o soro de forma diferente (CONAMA, 2011). Ao mesmo tempo, é fato reconhecido que no Brasil se continua desperdiçando proteínas dos soros que ainda são lançados no meio ambiente.

O tratamento de efluentes que recebe este descarte demandam altos custos devido elevado teor de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) resultante da degradação biológica das proteínas e lactose do soro. Com isso, se faz necessária a construção de um sistema de tratamento isolado dos outros efluentes uma vez que causam desequilíbrio nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETE'S) (VIEIRA, 1999).

Um litro de soro possui uma DBO entre 30 a 50 g de oxigênio, este valor é aproximadamente 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico. Uma fábrica com produção média de 10.000 L de soro/dia polui o equivalente a uma população de 5.000 habitantes (SIQUEIRA, 2002).

Cada litro de soro lançado em um corpo receptor ocasiona uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) em torno de 60 g/L, sua descarga em cursos d'água provoca a destruição da fauna e da flora, devido a sua alta concentração de matéria orgânica, sujeita à rápida alteração pelos microrganismos. O alto consumo de oxigênio pelos microrganismos no processo de utilização dos componentes do soro, principalmente da lactose, juntamente com a fermentação deste carboidrato a ácido láctico, faz com que o soro, ao ser lançado em cursos d'água, reduza o teor de oxigênio dissolvido e aumente a acidez da água, prejudicando a vida aquática e provocando assim o processo conhecido como eutrofização (RICHARDS, 2002).

As aplicações do soro são inúmeras, englobando as indústrias de lácteos, carnes, misturas secas (para condimentar), panificação (melhorar o valor nutricional, sabor e cor), chocolate, cereais, aperitivos, bebidas, material combustível, fertilizante e alimentação animal, entre outros. Em virtude do seu alto valor nutricional o soro de queijo se torna um substrato atraente para sua utilização em processos fermentativos para obtenção de vários produtos, como ácido láctico, butanol e etanol, entre outros. Segundo Alegre (1988) o aproveitamento do soro para produção de etanol vem sendo estudado desde a década de 40.

O soro é usado na alimentação humana nos países Europeus e nos Estados Unidos. No Brasil o soro é ainda sub-utilizado, sendo muitas vezes destinado para alimentação animal. O pior destino que se dá a esse produto é o descarte no meio ambiente (SANTOS, 2001).

3.1.1 Composição do Soro de Queijo

A composição do soro varia de maneira substancial, dependendo da variedade de queijo produzido, dos processos tecnológicos empregados e do tipo de leite utilizado na produção de queijo. O soro mantém quase 50% dos nutrientes originais do leite. A maior parte da água contida no leite faz parte do soro onde também se encontram compostos como lactose, proteínas solúveis, sais minerais e pouca gordura (OLIVEIRA, 2009).

A composição média padrão do soro de queijo de coagulação enzimática compreende 5% a 6,9% de sólidos totais, 0,6% a 1,9% de proteínas, 3,9% a 5% de lactose, 0,3% a 0,7% de cinzas, 0,1% a 1,0% de gordura, 0,1% a 0,8% de ácido láctico resultante da fermentação da lactose e apresenta valor de pH entre 6,1 e 6,5. A fração proteica contém cerca de 50% de β -lactoglobulina (0,2% a 0,4%), 25% de α -lactoalbumina (0,1% a 0,15%) e 25% de outras frações proteicas incluindo imunoglobulinas (0,06% a 0,1%), albumina sérica (0,01% a 0,04%) e outras proteínas denominadas coletivamente proteose-peptona (0,06% a 0,18%), muitas resultantes da proteólise da caseína (OLIVEIRA, 2009).

A Tabela 1 mostra a composição química do soro de queijo “Tipo coalho”.

Tabela 1 – Composição química do soro de queijo “Tipo coalho”

Componente	Concentração (%)
Água	92,36
Lactose	4,20
Proteínas	1,78
Sais Minerais	0,60
Gordura	1,05

Fonte: Florentino (2006)

Dos sais minerais presentes no soro de queijo, os de cálcio, fósforo, sódio e potássio estão presentes em maiores concentrações, sendo os de cálcio e fósforo de grande interesse devido ao seu valor nutricional.

3.2 Separação das proteínas do soro de queijo

Existem vários métodos de separação das proteínas do soro e a sua extração/recuperação é uma alternativa tanto para minimizar os problemas ambientais causados pela inadequada disposição do soro, como para obter um concentrado protéico que sirva de matéria-prima para processamento de um alimento. Desta forma, o aproveitamento de proteínas tem significativa aplicabilidade, sobretudo nas fazendas e queijarias brasileiras (TOLKACH E KULOZIK, 2005).

A obtenção do concentrado protéico pode se dá basicamente pelos seguintes métodos: tratamento térmico, separação por membranas e por precipitação. A ultrafiltração, a osmose inversa e a eletrólise têm sido cada vez mais utilizadas na indústria alimentícia de todo o mundo para a obtenção de proteínas in natura. Entretanto, esses processos são caros devido à alta tecnologia de suas membranas e as pressões altíssimas utilizadas em suas operações (RICHARDS, 2002).

Se tratando da separação da proteína por precipitação, há agentes floculantes, como polifosfato sódico, hexametáfosfosódico, diversos sais férricos e diversos polieletrólitos são eficientes em termos de precipitação, porém impróprio para indústria alimentícia. Já quando a proteína é obtida por tratamento térmico consiste na acidificação direta com adição de um ácido orgânico ao soro aquecido, é um procedimento simples e bastante utilizado combinando calor e ajuste de pH até o ponto isoelétrico das proteínas. O processo térmico depende das forças ativas de coesão, adesão e hidratação aplicadas às partículas proteicas, o que é bastante influenciado pela quantidade de ácido adicionado. Com elevação da temperatura a carga elétrica líquida das proteínas é reduzida ocorrendo precipitação em forma de coágulo, quando o sistema atinge o seu equilíbrio. Porém pela ação do calor, são rompidas algumas das ligações da molécula e que com o rearranjo das moléculas desnaturadas provoca a insolubilidade das proteínas. Assim, o lactosoro diminui o teor protéico na razão direta do grau de desnaturação térmica (SINGH e WAUNGANNA, 2001).

3.3 Aproveitamento do soro de queijo por fermentação

A utilização do soro em processos fermentativos tem sido cada vez mais estudada (SILVA e CASTRO-GOMES, 1995; RUBIO E TEIXEIRA, 2000; FLORENTINO, 2006; FLORÊNCIO, 2008). Destaca-se que alguns problemas são encontrados quando se utiliza o soro como substrato para a fermentação alcoólica como, por exemplo, o número limitado de microrganismos capazes de metabolizar diretamente a lactose para produção de etanol, bem como o fato desses microrganismos serem inibidos por concentrações moderadas do substrato (glicose) e do produto (etanol).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada para produção de vinhos, cervejas, aguardente, etc, por ser alta produtora de álcool e suportar altas concentrações do mesmo. Entretanto por não possuir o sistema lactase permease, bem como a enzima β -galactosidase para hidrólise da lactose, a mesma não é capaz de fermentar a lactose diretamente para o etanol (CASTILLO, 1990; PORRO, *et AL.*, 1992; OSTERGAARD *et al.*, 2000).

3.4 Fermentação

A fermentação é um processo que consiste na modificação intencional dos alimentos pela atividade de certos microrganismos, tais como bactérias e fungos, chamados nestes casos de fermentos, para a obtenção de produtos de sabor agradável, saudáveis e estáveis (ORDOÑES, 2005).

No passado, o principal objetivo da fermentação era conservar alguns alimentos sazonais ou perecíveis graças aos produtos finais da fermentação, que impedem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Porém, atualmente, é muito mais importante do ponto de vista da transformação das matérias-primas, que permitem diversificar os alimentos. Pela fermentação obtêm-se novos alimentos com textura, sabor e aroma completamente diferentes da matéria-prima inicial, modificações difíceis de conseguir por outros meios (ORDOÑES, 2005).

Os microrganismos envolvidos são bactérias, destacando, sobretudo, as bactérias lácticas, alguns mofos e leveduras, individualmente ou combinados. Segundo Abreu (2005) as fermentações classificam-se em:

- Fermentação aeróbica (respiração celular) - ocorre na presença de oxigênio do ar, como exemplo: vinagre e ácido cítrico.
- Fermentação Anaeróbica - ocorre na ausência de oxigênio, como por exemplo: iogurte; cerveja; vinho e penicilina.

A fermentação é um processo de obtenção de energia utilizado por algumas bactérias e outros organismos. Ele ocorre com a quebra da glicose (ou outros substratos como o amido) em piruvato, que depois é transformado em algum outro produto, como o álcool etílico e lactato, definindo fermentação alcoólica e láctica, respectivamente.

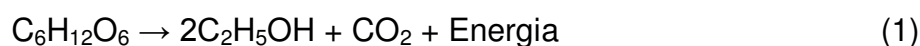
3.4.1 Fermentação alcoólica

O homem vem se utilizando da fermentação alcoólica desde a mais remota antiguidade; há mais de 4.000 anos os egípcios fabricavam o pão e produziam bebidas alcoólicas a partir de cereais e frutas. Entretanto, apenas no final do século XX é que se pôde relacionar a fermentação com a levedura, fungo amplamente distribuído na natureza e com capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias como anaeróbias (LIMA, 2001).

A possibilidade de oxidação do etanol é a base da utilização da fermentação alcoólica como combustível no Brasil. Na produção industrial do álcool neutro é utilizada a fermentação de melaço de cana-de-açúcar por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). A fermentação alcoólica de extratos de malte e de macerados de uvas e de vários outros frutos tem sido utilizada há muitos séculos para o preparo de diferentes bebidas alcoólicas (BARBOSA & TORRES, 1998).

Depois da formulação da estequiometria da fermentação por Gay-Lussac (1815), Pasteur (1863) demonstrou a natureza microbiológica da fermentação alcoólica como um processo anaeróbio, ou seja, a vida se manifestando na ausência de ar (oxigênio). A partir daí, e principalmente durante as primeiras décadas de 1900, as pesquisas culminaram com a elucidação das reações enzimáticas responsáveis pela transformação química do açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura (LIMA, 2001).

A fermentação alcoólica ocorre devido ao fato de que as células de levedo produzem energia de que é necessária para sobreviver, através de dois fenômenos de degradação da matéria orgânica: a respiração, que necessita do oxigênio do ar ou a fermentação, que ocorre na ausência de oxigênio do ar. Os microrganismos vão degradar todo o açúcar presente na amostra, transformando-o em etanol e que segundo o princípio de Gay-Lussac a concentração de açúcar pode ser medida usando-se a Equação 1 que descreve a fermentação alcoólica:



Por fermentação alcoólica se entende um conjunto de reações bioquímicas provocadas por microrganismos chamados de leveduras, normalmente em cultura pura com levedo selecionado, que atacam fundamentalmente os açúcares (amido, glicose, frutose, sacarose e outros) transformando-os em álcool etílico e gás carbônico, além de outros produtos secundários, como glicerol, ácido succínico e outros ácidos orgânicos, com liberação de energia (AQUARONE, 2001).

A importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional. Atualmente, os produtos da biotecnologia a partir de leveduras se estenderam em muitos setores comerciais importantes, como as indústrias de alimentos, bebidas, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas industriais, produtos farmacêuticos, produtos agrícolas e o ambiente (GUIMARÃES, 2005).

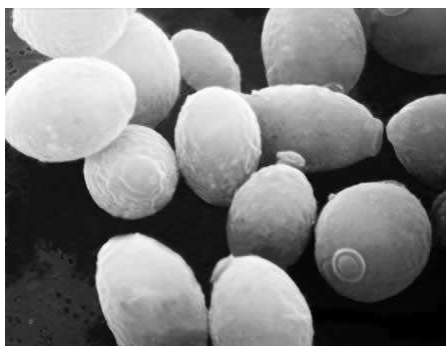
3.4.1.1 Agentes da fermentação alcoólica

As leveduras são fungos pertencentes às classes dos Ascomicetos, Basidiomicetos ou Deuteromicetos. Ao contrário dos bolores, as leveduras são, normalmente, unicelulares, apresentando células de forma oval, elíptica ou arredondada. Possuem parede celular rígida, membrana citoplasmática e organelas encontradas, em geral, nas células superiores, tais como núcleo, mitocôndria retículo endoplasmático etc (NOGUEIRA, 2005).

As leveduras mais utilizadas no processo de fermentação alcoólica são as espécies originárias do gênero *Saccharomyces* sendo uma das principais a *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que é fácil manipulá-la geneticamente e o seu cultivo em laboratório acarreta baixos custos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo atrativo de se trabalhar por ser não-patogênico, e devido a sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis como o etanol e o pão, ela foi classificada como microrganismo geralmente considerado seguro (OSTERGAARD et al., 2000).

A Figura 2 mostra a foto ampliada da levedura *Saccharomyces Cerevisiae*.

Figura 2 - *Saccharomyces Cerevisiae* (ampliado 10.000X em microscópio eletrônico de transmissão)



Fonte: http://www.musee-afrappier.qc.ca/index.php?pageid=3114a&image=3114a_cerevisiae, 2013

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo aeróbio facultativo, isto é, que tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose. Os produtos finais do metabolismo

do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, em aerobiose, o açúcar é transformado em biomassa, CO₂ e água, e, em anaerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂, processo denominado de fermentação alcoólica (SANTOS et al., 2010). Os carboidratos considerados substratos para a fermentação tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros) (OSTERGAARD, 2000).

3.4.2 Fatores que afetam a fermentação

De acordo com Lima et al., (2001), diversos fatores afetam a fermentação (o rendimento e a eficiência da conversão de açúcar em etanol), como físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração de inóculo, contaminação bacteriana), afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol. Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à maior formação de produtos secundários (especialmente glicerol e ácidos orgânicos) e biomassa. Lima et al., (2001) descreve alguns desses parâmetros:

Nutrição mineral e orgânica

As leveduras exigem uma fonte de carbono – glicose ou outro açúcar – que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio.

Algumas vitaminas, como tiamina e ácido pantotênico, também são exigidas. O meio deve, igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas.

Temperatura e pH

As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo adequada a entre 4,0 e 5,0.

As leveduras são mesófilas. As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35°C. À medida que a temperatura aumenta, aumenta a velocidade da fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo em que a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol.

Inibidores da Fermentação

O processo fermentativo pode ser inibido não só pelos seus próprios produtos, como o etanol, como por diferentes substâncias que podem estar presentes nos mostos. Alguns minerais como potássio e cálcio em quantidades excessivas acarretam efeitos negativos à fermentação.

A sulfitação do caldo de cana para sua clarificação pode resultar em melaços com elevados teores de sulfito, que podem acarretar efeitos tóxicos à levedura, comprometendo a fermentação, bem como aumentar a acidez do álcool obtido.

Concentração de açúcares

Aumentando-se a concentração de açúcares, aumenta-se a velocidade de fermentação, a produtividade e, dentro de certos limites acarreta-se menor crescimento do fermento e menor formação de glicerol por unidade de substrato processado.

Concentração de Inoculo

Maiores concentrações de levedura na dorna permitem fermentações mais rápidas, com maior produtividade e com maior controle sobre as bactérias contaminantes, além de restringir o crescimento da própria levedura. Por outro lado, elevado teor de levedura exige energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas. Como consequência, resulta em maior

competição pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade do fermento.

3.5 Cinética dos Processos Bioquímicos

A cinética química ou cinética de reação é a parte da química que estuda a velocidade das reações químicas de um processo e os fatores que as influenciam.

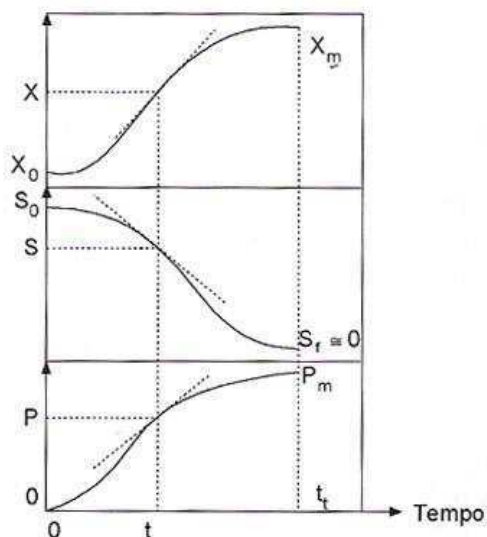
O conhecimento da cinética de um processo ou da cinética de crescimento microbiano é importante industrialmente, pois permite a análise de perigos e pontos críticos do processo; previsão de eventos fora do processo; determinação de vida-de-prateleira; análise de risco (RODRIGUES E SANTOS, 2011).

A cinética da fermentação é um dos estudos mais complexos da Engenharia Bioquímica. A complexibilidade neste estudo consiste no fato de que o agente responsável pela transformação é uma célula viva que assimila diversas substâncias, se reproduz e produz outras substâncias alterando intensivamente a composição do meio em que vive (DORAN,1998). Com isso, o estudo da cinética dos processos fermentativos defronta-se com grandes obstáculos. Segundo Alves (1998) um deles está no que diz respeito à concentração dos microrganismos, catalisadores das reações que se processam, estes não se mantêm constantes com o tempo, o que faz necessário medir a concentração de células ativas existentes em diferentes estágios da fermentação.

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entende-se como componentes, os microrganismos (ou a biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura (SCHMIDELL et al., 2001). Tais valores experimentais de concentração (X , P e S respectivamente), quando representados em função do tempo, permitirão os traçados das curvas de ajuste, conforme Figura 3 e indicados por $X=X(t)$, $P=P(t)$ e $S=S(t)$.

Os valores de X , P e S são as concentrações do microrganismo, do produto e do substrato residual no meio, respectivamente.

Figura 3 - Curvas de ajuste dos resultados de uma experiência idealizada de fermentação.



Fonte: SCHMIDELL et al., 2001

3.6 Destilação

A separação de misturas por destilação é uma das operações unitárias mais antigas que se conhece. É uma operação pela qual um líquido, por efeito de aquecimento, passa para a fase gasosa e, em seguida, volta ao estado líquido por meio de resfriamento. Quando se trata de uma única substância, o líquido destilado tem a mesma composição do líquido original. Quando se trata da concorrência conjunta de líquidos imiscíveis, o destilado encerra o líquido que tem ponto de ebulição mais baixo. No caso de líquidos perfeitamente miscíveis, os vapores destilados se compõem de uma mistura de vapores dos dois, com predominância daquele de menor volatilidade. Com uma série de destilações é possível separar os dois líquidos em estado de pureza, desde que não se forme mistura azeotrópica, que é o fenômeno que ocorre numa mistura de líquidos na qual se formam vapores com todos os componentes, em um ponto de ebulição inferior ao de qualquer um dos integrantes da mistura (LIMA et al., 2001).

Os líquidos mais importantes são a água e o etanol, em porcentagens que variam de 88 a 93% e 12 a 7%, respectivamente, nos vinhos comuns. Desse material impuro e heterogêneo separa-se o etanol por destilação, em grau de pureza e concentrações variáveis. Nessa operação geram-se vapores de álcool e água, que depois de resfriados formam um líquido de concentração superior a do vinho, e isento de substâncias sólidas (LIMA, 2001).

Quando uma mistura líquida de dois componentes voláteis é aquecida, o vapor produzido terá uma maior concentração no componente mais volátil (de menor ponto de bolha) do que o líquido em que estava presente. De outra forma, se o vapor é resfriado, o componente menos volátil (de maior ponto de bolha) tem a tendência em condensar em uma proporção maior do que o componente mais volátil (MAYER, 2010).

O equipamento de destilação (destilador, torre de destilação ou coluna de destilação) permite a separação de misturas de líquidos em componentes puros próximos de pureza e que se realiza a vaporização e condensação sucessivas à operação em questão é exequível quando se verifica uma diferença de volatilidade entre os componentes do líquido (RASOVSKY, 2009).

3.6.1 Destilação descontínua simples

Lima (2001) descreve a destilação descontínua ou intermitente da seguinte forma: faz-se uma carga no aparelho, esgota-se o vinho de seu componente álcool por aquecimento, evaporação, condensação e refrigeração, descarregando-se o resíduo ou vinhaça, fazendo-se nova carga, e assim por diante.

A operação de uma coluna de destilação em processo de batelada divide-se em duas etapas distintas. A primeira (partida ou “start-up”) consiste na carga da mistura no depósito, ou cuba, e no aquecimento da mesma em refluxo total até que um estado estacionário seja atingido no qual os perfis de temperatura e composição estejam estabelecidos (PEDROSA, 2008).

Os vapores que se desprendem do fermentado contido na cuba ou caldeira do destilador, não são os mesmos durante todo o processo, começando a evaporar os mais voláteis, chamados alcoóis de cabeça ou aldeídos, seguidos pelo álcool etílico, produto desejado e também chamado de coração, terminando com os produtos pesados, como alcoóis de mau gosto, cauda, e óleo fúsel (MICHEL, 2010).

A primeira porção do destilado será a mais rica em componentes mais voláteis. À medida que prossegue a vaporização, o produto vaporizado torna-se mais volátil e o líquido residual torna-se menos volátil, pois o percentual de componentes leves no líquido residual vai sendo esgotado. O destilado, que é o vapor condensado, poderá ser coletado em frações separadas, denominadas de cortes (RASOVSKY, 2009).

3.7 Produção de Álcool

No Brasil, as indústrias de açúcar e de álcool sempre estiveram intimamente ligadas, desde o tempo do descobrimento, onde se transformava o melaço residual da fabricação do açúcar em cachaça e, diretamente da garapa fermentada produzia-se aguardente (LIMA et al., 2001).

O álcool etílico é um dos mais antigos produtos de síntese orgânica utilizado pelo homem. É um composto ternário constituído de carbono, oxigênio e hidrogênio de fórmula bruta C_2H_5OH , derivado dos hidrocarbonetos por substituição de um átomo de hidrogênio por uma hidroxila. O álcool se apresenta como líquido incolor, límpido, de cheiro agradável e fortemente penetrante, seu sabor é cáustico e ardente (BAROUD, 2006).

O álcool etílico vem despertando, desde a crise de petróleo que se deflagrou em 1974, um crescente interesse do governo Federal do Brasil e dos pesquisadores do mundo. O Programa Nacional do álcool (Proálcool) foi criado na década de 70 com o objetivo de estimular a produção do álcool, a partir da cana-de-açúcar, visando o atendimento das necessidades do mercado interno e externo e da política de combustíveis automotivos (TORRES NETO, 2010).

Diversos são os tipos e qualidades do álcool como, por exemplo: álcool etílico, álcool metílico, álcool isobutílico, álcool propílico, etc. Porém genericamente recebe o nome de álcool a espécie química denominada de álcool etílico ou etanol.

O Brasil vem se destacando, há algum tempo, como o maior produtor mundial de álcool. Para a safra 2008/09 a produção foi de 16,5 bilhões de litros, seguida pela produção americana, com um total de mais de 11 bilhões de litros, juntos os dois países são responsáveis por quase 70 % da produção mundial, que no ano de 2003 atingiu a marca de mais de 32 bilhões de litros (CARVALHO, 2008).

Todos os produtos que se baseiam no álcool etílico, tais como Álcool Etílico Anidro Combustível (AEAC), Álcool Etílico Hidratado Combustível (AEHC), alcoóis especiais para aplicações nas indústrias de bebidas, farmacêuticas e afins, e a própria aguardente de cana, são obtidos a partir do vinho, denominação industrial do mosto açucarado da cana de açúcar após o processo fermentativo. A fermentação do mosto gera uma solução hidro-alcoólica, contendo teores de etanol normalmente situados em uma faixa compreendida entre 7,0 e 10,0°GL, além de outros componentes em quantidade diminutas originadas como componentes secundários da fermentação ou como resíduos do substrato do processo (JÚNIOR, 2010).

O etanol brasileiro é produzido em destilarias de álcool anexas as usinas de açúcar e em destilarias autônomas a partir da cana-de-açúcar e é obtido por via bioquímica. O álcool produzido em destilarias apresenta percentuais de componentes secundários diferentes em função do seu uso. Segundo Macedo e Nogueira (2004), o Brasil detém o maior parque industrial de produção de etanol oriundo de cana-de-açúcar do mundo, com a mais alta tecnologia.

Para o ano de 2015, a meta é produzir 50 bilhões de litros de álcool derivado da produção agrícola de 1 bilhão de toneladas de cana-de-açúcar. As capacidades produtivas das unidades industriais de fabricação de etanol variam de nível micro à macro e na Paraíba, segundo informações dos gerentes industriais das destilarias GIASA e JAPUNGU, com capacidade nominal de produção de 550.000 litros/ dia e 400.000 litros/ dia de etanol respectivamente, as destilarias no nosso Estado apresentam porte de médio a grandes unidades industriais (QUEIRÓZ, 2013).

De acordo com a Resolução ANP N° 7, de 9.2.2011 – DOU 10.2.2011, a graduação alcoólica do etanol combustível hidratado e do etanol anidro produzido em destilarias varia de 92,3°INPM a 93,6°INPM e de 99,5°INPM a 99,8°INPM, respectivamente. Segundo QUEIRÓZ (2013), dependendo da graduação alcoólica o etanol pode ser classificado em:

- Etanol absoluto – etanol produzido com alto grau de pureza (99,99%) geralmente obtido por síntese química e comumente usado em ensaios laboratoriais;
- Etanol hidratado – usado comumente como combustível automotivo com grau de pureza variando entre 92,3 a 93,6°INPM;
- Etanol anidro – destinado à mistura com a gasolina na produção de até 25% com pureza da ordem de 99,5°INPM mín.;
- Etanol desnaturado – álcool hidratado acrescido de uma ou mais substâncias que confere sabor ou odor repugnante, a fim de impedir o uso em bebidas, alimentos e produtos farmacêuticos, mas sem efeito toxicológico e grau de pureza variado e pode ser aplicado para a limpeza de muitos itens domésticos;
- Etanol neutro – álcool hidratado com baixo grau de impurezas voláteis destinado às indústrias de bebidas, farmacêuticas e uso doméstico com grau de pureza da ordem entre 70°GL a 96°GL;
- Etanol industrial – álcool hidratado produzido exclusivamente para a indústria química de tinta, corante, borracha, vernizes e outras com pureza da ordem de 96°GL;
- Etanol de cereais – álcool obtido a partir de cereais (milho, soja, arroz, outros) geralmente usado na preparação de perfumes, colônias e produtos aromatizantes com grau de pureza da ordem de 96°GL;
- Etanol gel anti-séptico (álcool gel) – álcool com característica viscosa e graduação alcoólica de no mínimo 70°INPM e no máximo 77°INPM, produzido por indústria química de saneantes e/ou farmacêutica a partir de etanol neutro de destilaria.

Segundo Queiróz (2013), o álcool neutro possui padrões de qualidade estabelecidos. A Tabela 2 apresenta as especificações técnicas do etanol neutro

produzido a partir da cana-de-açúcar nas destilarias de álcool anexas às usinas e em destilarias autônomas, como por exemplo, a Destilaria MIRIRI, Destilaria Japungu e Destilaria GIASA localizadas nos municípios de Santa Rita e Pedras de Fogo no Estado da Paraíba.

Tabela 2 - Especificações técnicas do etanol neutro

Característica	Unidade	Limite	Método
Teor alcoólico	°GL	96,1	Densimetria
Aspecto	Límpido	Visual
Cor	incolor	Visual
Odor	característico	Sensorial
Acidez (ácido acético)	mg/L	10 max.	Titulometria
Condutividade elétrica	µS/m	50 max.	Condutimetria
Massa específica a 20°C	Kg/m ³	889	Densimetria
* Temperatura de ignição	°C	363°C
pH	6,5 a 7,5	Potenciometria
* Ponto de ebulição	°C	78,4
Resíduo por evaporação	mg/100mL	5 max.	estufa
Íon sulfato	mg/100mL	2 max.	Cromatografia de íons
Sódio, max.	mg/Kg	2 max.	Espectrofotometria
Cobre, max.	mg/Kg	0,03	Espectrofotometria
Aldeídos, max.	mg/L	5 max.	Cromatografia gasosa
Ésteres, max.	mg/L	5 max.	Cromatografia gasosa
Alcoóis superiores, max.	mg/L	5 max.	Cromatografia gasosa
Metanol, max.	mg/L	10 max.	Cromatografia gasosa

Fonte: GIASA (2012)

(*) – Ensaios não realizados na destilaria GIASA

3.8 Planejamento experimental

O planejamento experimental, também denominado delineamento experimental, representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo.

É uma ferramenta essencial no desenvolvimento de novos processos e no aprimoramento de processos em utilização. Um planejamento adequado permite, além de aprimoramento de processos, a redução da variabilidade de resultados, a redução de tempo de análise e dos custos envolvidos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

O primeiro procedimento a ser feito no planejamento de um experimento é determinar quais são os fatores de interesse para o sistema que se deseja estudar. Os fatores, isto é, as variáveis controladas pelo experimentador, tanto podem ser qualitativas como quantitativas. Dependendo do problema, pode haver mais de uma resposta de interesse. Eventualmente essas respostas também podem ser qualitativas.

No planejamento experimental é preciso definir claramente que objetivo se pretende alcançar com os experimentos, porque isso determinará que tipo de planejamento experimental deve ser utilizado. O planejamento dos experimentos, isto é, a especificação detalhada das operações experimentais que devem ser realizadas, dependerá do objetivo particular que se queira atingir. Cada objetivo irá requerer um planejamento diferente, para que possa ser alcançado de forma eficaz (BARROS NETO et al., 1996).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira etapa foi realizada a caracterização da matéria-prima e estudo cinético da fermentação alcoólica do soro e foi desenvolvido no Centro Vocacional Tecnológico (CVT) da Universidade Federal de Campina Grande/Campus Pombal. A segunda etapa consistiu na destilação do fermentado para a produção do etanol neutro, o qual foi realizado no Laboratório de Produtos Fermento Destilados (LPFD) do Departamento de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba/ Campus de João Pessoa.

4.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi o soro de queijo resultante da produção de queijo “Tipo coalho” proveniente de 1 (uma) queijeira localizada na zona urbana da cidade de Pombal - PB. O soro foi coletado em recipientes plásticos, com capacidade de 2 litros, acondicionado em caixas de isopor contendo gelo e transportado para o Centro Vocacional Tecnológico (CVT) do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande/ Campus Pombal.

4.2 Microrganismo

Foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fermento biológico úmido (fermento de panificação) da marca comercial Fleischmann Royal adquirido em panificadoras da cidade de Pombal (PB).

4.3 Etapas da Produção de etanol neutro a partir do soro de queijo coalho

As etapas realizadas na produção do etanol neutro estão apresentadas na Figura 4.

Figura 4 - Etapas da produção do álcool

4.3.1 Caracterização do soro de queijo

Com o objetivo de conhecer os componentes do soro, foi realizada a caracterização físico-química na sua forma *in natura* e desproteínizado. Todas as determinações seguiram a metodologia de BRASIL (2005) e foram realizadas em triplicata.

4.3.1.1 Acidez

Foi determinada utilizando o método Dornic, baseado na titulação do soro com uma solução de hidróxido de sódio N/9, empregando a fenolftaleína como

indicador do ponto final da titulação. O resultado foi expresso em Dornic (°D), ao qual 1 mL da solução de NaOH consumido na titulação equivale a 0,009g de ácido láctico.

4.3.1.2 pH

Utilizou-se o método eletrométrico baseado na determinação da concentração hidrogeniônica através de potenciômetro previamente calibrado com as soluções tampões de pH 4,0 e pH 7,0.

4.3.1.3 Extrato Seco Total

O extrato seco total foi determinado através da secagem direta do soro em estufa a 105°C até peso constante. Esta análise fundamenta-se na perda em peso sofrida pela amostra quando aquecida, devido à evaporação da água e substâncias voláteis, e pesagem do resíduo não volatilizado, fornecendo assim o extrato seco total do soro.

4.3.1.4 Cinzas

O teor de cinzas foi quantificado por gravimetria. A primeira fase da determinação consistiu na carbonização da matéria orgânica, realizada em Bico de Bunsen, e a segunda fase na incineração em forno mufla à temperatura de 550°C por 5 horas até obter uma cinza de cor clara. Em seguida, a amostra incinerada foi resfriada em dessecador e pesada. Esta análise fundamenta-se na perda de peso que ocorre quando a amostra é incinerada com destruição da matéria orgânica, sem apreciável decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização.

4.3.1.5 Gordura

Determinou-se o teor de gordura através do método de Gerber, que consiste na quebra da emulsão do leite através da centrifugação após digestão do material protéico com ácido sulfúrico (P.A.) e álcool isoamílico concentrado. A leitura do percentual de gordura é realizada de forma direta na escala do butirômetro de Gerber.

4.3.1.6 Lactose

O teor de lactose foi determinado através do método volumétrico com Licor de Fehling, baseado na determinação do teor de lactose no soro através da redução do ácido cúprico a ácido cuproso.

4.3.1.7 Proteína

Foi determinado através do método de Kjeldahl, que se baseia no aquecimento da amostra com ácido sulfúrico para digestão até que o carbono e hidrogênio sejam oxidados. O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônio. Adiciona-se NaOH concentrado e aquece-se para liberação da amônia dentro do volume conhecido de uma solução de ácido bórico, formando borato de amônio. O borato de amônio formado é dosado com uma solução ácida (HCl) padronizada.

4.3.1.8 Densidade

Determinou-se a densidade através do termolactodensímetro, cuja graduação toma como base à água a 15°C. O valor lido, após o ponto de afloramento indicado na escala do aparelho, foi corrigido na tabela de Quevenne. A densidade indica a relação entre seu peso por unidade de volume e fornece a quantidade de substâncias contidas no soro.

4.3.2 Desproteínização e correção do pH do soro de queijo

A desproteínização utilizando o método ácido-térmico e ajuste do pH consistiu da seguinte forma: inicialmente o pH do soro foi abaixado para 4,6 (ponto isoelétrico das proteínas) mediante a adição de 150mL de ácido cítrico em 8 litros de soro. Em seguida, este soro foi submetido a aquecimento até 90°C por 3 minutos, ocorrendo assim à formação do aglomerado protéico (Figura 5). Este tempo e temperatura a que o soro foi submetido, baseou-se em estudos realizados por Florentino (2006). O soro manteve-se em repouso até atingir a temperatura ambiente para a separação da proteína por filtração. Em seguida o soro foi novamente caracterizado seguindo as análises descritas nos itens 4.3.1.1 ao 4.3.1.8.

Figura 5 - Aglomerado protéico do soro de queijo coalho



A desproteínização do soro de queijo coalho teve por finalidade a remoção das proteínas, principalmente a alta concentração de nitrogênio presente, que compromete o desenvolvimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3.3 Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central conforme a Tabela 3. Os ensaios foram realizados aleatoriamente. As variáveis chamadas independentes foram a concentração de sacarose e a concentração de inóculo adicionados ao meio, cujos níveis (-1 e +1) corresponderam a 120 e 180 g/L e 10 e 16 g/L. E como variável dependente foi avaliado a produtividade expressa em

(g/L.h). Os níveis foram definidos baseados em estudos realizados FLORENTINO (2006) quando trabalhou com soro de queijo coalho também em processos fermentativos.

Na Tabela 3 estão expostos os níveis reais e codificados das variáveis independentes de entrada. A matriz de planejamento fatorial 2^2 é mostrada na Tabela 4, totalizando 7 experimentos, sendo 4 distintos e mais 3 no ponto central.

Tabela 3 - Valores codificados e reais das variáveis de entrada

Variáveis	Nível -1	Nível 0	Nível +1
CS (g/L)	120 g/L	150 g/L	180 g/L
CL (g/L)	10 g/L	13 g/L	16 g/L

Variáveis de entrada:

Variável 1 - (CS) Concentração de sacarose (g/L)

Variável 2 - (CL) Concentração de levedura (g/L) (b.u.)

Tabela 4 - Matriz de planejamento fatorial completo $2^2 + 3$ PC

Experimentos	CS	CL
1	-1 (120 g/L)	-1 (10 g/L)
2	+1 (180 g/L)	-1 (10 g/L)
3	-1 (120 g/L)	+1 (16 g/L)
4	+1 (180 g/L)	+1 (16 g/L)
5	0 (150 g/L)	0 (13 g/L)
6	0 (150 g/L)	0 (13 g/L)
7	0 (150 g/L)	0 (13 g/L)

O planejamento fatorial teve por objetivo a otimização dos procedimentos operacionais no processo fermentativo a partir do soro de queijo coalho e permitir avaliar qual experimento apresentava maior produção de álcool. Além disso, o planejamento experimental visa avaliar quantitativamente a influência das variáveis de entrada: concentração de sacarose e concentração de levedura sobre a variável

resposta produtividade. Utilizou-se como ferramenta o software STATISTICA 7.0 para a interpretação dos dados.

Cálculo da produtividade

O cálculo da produtividade, em relação ao etanol produzido, é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção. Ao final do tempo de fermentação de cada experimento, ou seja, após a estabilização da sacarose expressos em °GL e °Brix, a produtividade foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$P \text{ (g/L.h)} = \frac{C_{\text{etanol}}}{t} \quad (2)$$

Em que:

P = produtividade do etanol (g/L.h)

C_{etanol} = concentração de etanol (g/L)

t = tempo de fermentação (h)

4.3.4 Chaptalização

Para o estudo da fermentação alcoólica utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* foi adicionado sacarose ao meio, conforme o planejamento experimental da Tabela 3, por saber que a mesma não sintetiza a β -galactosidase, enzima capaz de hidrolisar a lactose presente no soro de queijo em seus monossacarídeos (glicose e galactose), o que significa que nesta estratégia o soro representa essencialmente a fonte de sais minerais necessários ao processo fermentativo (FLORÊNCIO, 2008).

4.3.5 Adição do inoculo

Consistiu em pesar o fermento biológico úmido (fermento de panificação) da marca comercial Fleischmann Royal de acordo com a concentração predeterminada

como variável de entrada (Tabela 3) para cada experimento da matriz de planejamento experimental. Inicialmente realizou-se a dissolução do fermento previamente pesado, em um litro de soro, sob agitação manual em becker e com auxílio de uma espátula metálica de aço inox. Em seguida, foi realizada a inoculação deste fermento no reator juntamente com o volume total do soro a ser fermentado. Uma vez preparado o sistema (biorreator + meio inoculado) iniciou-se a fermentação.

4.3.6 Processo fermentativo

Os experimentos foram conduzidos em sistema de batelada simples constituído de biorreatores (recipientes de polietileno adaptados com torneiras) com volume útil de 18 litros, de acordo com o planejamento experimental (Tabela 3). O volume de mosto a fermentar em cada reator foi de 8 litros. Os experimentos foram conduzidos à temperatura de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por um período de tempo que dependeu da estabilização dos sólidos solúveis, expressos em ($^{\circ}\text{Brix}$), em cada experimento.

A Figura 6 representa os reatores de polietileno utilizado nos experimentos

Figura 6 - Reatores de polietileno



4.3.7 Acompanhamento cinético da fermentação alcoólica

Para estudo cinético das fermentações do soro de queijo coalho foram coletadas amostras a cada 3 horas de fermentação para o acompanhamento dos seguintes parâmetros: teor alcoólico, concentração de biomassa, sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), pH e acidez total.

4.3.7.1 Concentração de etanol

O teor alcoólico foi determinado através da leitura direta em ebuliômetro e foi expresso $^{\circ}$ GL - Graus Gay Lussac. A calibração do ebuliômetro foi realizada com água, até a temperatura de ebulição, visto que a temperatura de ebulição do etanol ser menor que a da água, a qual serve de referência para o etanol. Definidas as temperaturas de ebulição da água e do soro, determinou-se a concentração alcoólica do soro, utilizando a régua de conversão do ebuliômetro.

4.3.7.2 Concentração de biomassa

A biomassa celular foi determinada seguindo o método de massa seca descrito por Florentino (2006), que consiste em separar as células do meio, secá-las e pesá-las. Aliquotas de 2 mL da amostra foram transferidas com o auxílio de uma pipeta para tubos de eppendorff previamente secos e pesados.

Para esta determinação foi utilizado centrífuga da marca FANEM modelo 3400, ao qual os tubos foram centrifugados a uma rotação de 10.000 rpm por 10 minutos e a solução sobrenadante desprezada.

Em seguida foi adicionada água destilada aos tubos contendo a levedura, e esta operação de lavagem foi repetida duas vezes.

Após a segunda lavagem as amostras foram colocadas em estufa a 105°C por 24 horas e pesadas.

A massa seca foi determinada conforme a Equação 3:

$$\text{Conc. biomassa (g / L)} = \frac{M_f - M_i * 1000}{V} \quad (3)$$

Onde:

M_f = massa final (g/L)

M_i = massa inicial (g/L)

V = volume da amostra (mL)

1000 = fator de conversão

4.3.7.3 Sólidos solúveis

Os sólidos solúveis, expressos em °Brix, foram medidos diretamente no refratômetro portátil digital de marca Tecnal, modelo: ar-200.

4.3.7.4 Determinação do pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, com o pHmetro previamente calibrado com as soluções tampões de pH 4,0 e pH 7,0.

4.3.7.5 Acidez total

A acidez total foi determinada pelo método da AOAC (1997).

4.3.8 Centrifugação

O fermentado foi separado por centrifugação em centrífuga FANEM, modelo Excelsa II 206 BL, onde foram utilizadas 4 cubetas de 50ml cada, totalizando 200mL por batelada, velocidade de 5000 rpm por 2 minutos, com o objetivo de separar a biomassa celular do meio líquido fermentado.

4.3.9 Destilação convencional

Para a destilação do fermentado do soro de queijo, utilizou-se um Micro-Destilador de álcool modelo TE-012 da TECNAL (Figura 7) com aquecimento através de resistências elétricas, para a produção do etanol neutro. A descrição deste equipamento segue conforme QUEIRÓZ (2013).

Figura 7 - Microdestilador de etanol convencional



Fonte: internet

(http://www.tecnallab.com.br/padrao.aspx?por_tipo_content_lst_2073__.aspx)

Inicialmente estimou-se o volume de fermentado a ser destilado após análise do percentual alcoólico do líquido fermentado para saber a quantidade teórica total de destilado a ser coletado. Através de regra de três, foi estimado que a cada 50mL de destilado a ser coletado, seria obtido 4,9mL de álcool, já que o fermentado apresentava 9,8% de álcool, ou seja, 9,8 mL de álcool a cada de 100 mL de fermentado.

A condução operacional da destilação foi de forma intermitente, ao qual a cuba da caldeira era alimentada com volume total de 50mL em tempos regulares de 5 minutos. Ao se atingir a temperatura de 99°C, os vapores hidroalcoólicos do fermentado ascendiam através do condensador tipo bola e em seguida sofria resfriamento e o álcool era liquefeito ao atingir a temperatura média de 26°C.

4.3.10 Análises físico-químicas do etanol neutro

Foram realizadas análises físico-químicas do etanol obtido quanto ao pH, condutividade elétrica, acidez total, teor alcoólico (%v/v) e massa específica. Os valores obtidos foram confrontados com as especificações descritas pela destilaria GIASA (2012).

4.3.10.1 pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, através de leitura direta em pHmetro Modelo: PH-2000 - Marca: Instrutherm, previamente calibrado com as soluções tampões de pH 4,0 e pH 7,0.

4.3.10.2 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica foi realizada através de leitura direta em aparelho condutímetro modelo: CD-820 - Marca: Instrutherm, previamente calibrado.

4.3.10.3 Acidez total

A acidez total titulável foi determinada pelo método da AOAC (1997).

4.3.10.4 Teor alcoólico

O teor alcoólico foi determinado utilizando-se o método da alcoometria, que consiste na determinação da graduação alcoólica das misturas de álcool etílico e água. A amostra foi analisada com o auxílio de uma proveta de 250 mL e de um alcoômetro Gay-Lussac, a temperatura de 20º Celsius. A amostra de etanol obtida após destilação foi vertida na proveta e foi esperado o tempo para a estabilização do produto e desaparecimento de bolhas de ar formadas. Na seqüência, cuidadosamente foi colocado o alcoômetro e aferida a graduação alcoólica da amostra através de leitura direta na escala deste equipamento.

4.3.10.5 Massa específica

A massa específica do etanol foi determinada seguindo o método da picnometria (AOAC, 1997). A operação foi realizada a temperatura de 25ºC e a partir dos valores obtidos, calculou-se massa específica do álcool através da Equação 4:

$$\rho_{ETANOL,H_2O} = \frac{m_{ETANOL}}{m_{H_2O}} \quad (4)$$

onde:

m_1 é a massa do picnômetro vazio

m_2 é a massa do picnômetro cheio com o líquido (etanol) cuja densidade relativa se deseja determinar

m_3 é a massa do picnômetro cheio de água pura.

$m_{ETANOL} = m_2 - m_1$ é a massa do líquido em questão (etanol) que ocupa o volume V do picnômetro

$m_{H_2O} = m_3 - m_1$, é a massa da água pura que ocupa o mesmo volume V

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do soro *in natura*

A caracterização do soro de queijo “coalho” foi realizada a fim de conhecer os componentes presentes no soro, assim como também avaliar sua viabilidade fermentativa.

A composição do soro varia de acordo com a qualidade do leite utilizado, com o tipo de leite utilizado, tipo de queijo produzido, e com o processo de coagulação empregado, por acidificação ou pela adição de coalho.

As médias dos resultados das análises físico-químicas realizadas em triplicata no soro resultante do queijo “coalho” são apresentadas na Tabela 5

Tabela 5 – Média dos resultados das análises físico-químicas do soro de queijo coalho *in natura*

Componentes	Média ± desvio padrão
pH	6,59 ± 0,05
Umidade (%)	93,10 ± 0,05
E.S.T (%)	6,90 ± 0,06
Acidez (°D)	10,70 ± 0,57
Sais Minerais (%)	0,41 ± 0,06
Densidade (g/L)	1.024,90 ± 0,03
Lactose (%)	3,73 ± 0,02
Gordura (%)	0,46 ± 0,05
Proteína (%)	2,52 ± 0,06

Observando-se os resultados da Tabela 5, verifica-se que os teores encontrados no soro *in natura* estão próximos aos resultados obtidos por FLORENTINO (2006) que também trabalhou com soro de queijo coalho em

processos de fermentação alcoólica testando as leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de vinagre.

O pH do soro de queijo foi de 6,59. Segundo OLIVEIRA (2009), o soro doce de coagulação enzimática possui valores de pH entre 6,10 e 6,60. Com isso, se fez necessário a correção do pH para a faixa ideal da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é de 4 a 4,5, viabilizando o uso deste soro no processo de fermentação alcoólica.

Os valores da umidade (93,1%) e extrato seco total (6,9%) estão bem próximos aos de FURTADO (1991) que foi 93,6% e 6,34% respectivamente, quando estudou a composição de vários tipos de queijos e o soro gerado na produção desses queijos.

A acidez (10,7^oD) encontrada na amostra de soro analisada está próxima à da média dos valores observados por FLORENCIO et al. (2007a), quando caracterizou soro de queijo de coagulação enzimática de queijeiras artesanais (9 ^oD) da zona rural da cidade de Montadas-PB.

Observa-se na Tabela 5 que o percentual de sais minerais encontrado (0,41%), está próximo ao encontrado por Florentino et al. (2007) que foi de 0,55%, ressaltando que para o processo fermentativo, esses compostos servirão de nutrientes para o desenvolvimento da *Saccharomyces cerevisiae*.

Verifica-se que quanto a média da densidade encontrada no soro de queijo (1.024,9 g/L), este valor não favorece comparações precisas pelo fato de que a média da densidade e de todos os outros componentes presentes no soro dependem do tipo de queijo produzido, bem como de fatores ligados ao leite como: raça e alimentação do animal, sazonalidade, período de lactação, tipo de queijo produzido e processo de coagulação empregado (por acidificação ou pela adição de coalho).

Segundo FURTADO (1991), o teor de gordura no soro de queijo varia de 0,2 a 0,5%. Com isso o valor encontrado (0,46%) apresenta-se dentro da média dos soros de queijos procedentes de coagulação enzimática.

A concentração de lactose no leite bovino e no soro de queijo varia amplamente entre as espécies devido à raça, fator de individualidade e principalmente à fase de lactação do animal (BALDASSO, 2008). Considerando a média da lactose no leite (4.6%), levando-se em conta a quantidade retida na coagulação enzimática, a quantidade encontrada 3,73% pode ser resultante da hidrólise dos microrganismos lácticos e da retenção da lactose na caseína do queijo coalho produzido (FLORENTINO, 2006).

De acordo com a Tabela 5, o valor protéico (2,52%) do soro de queijo coalho *in natura* está próximo ao encontrado por Florentino (2006) que foi 1,78%, valor médio obtido normalmente na produção de queijo de coagulação similar produzido com técnicas apropriadas.

5.2 Caracterização do soro desproteínizado

A Tabela 6 apresenta a média da caracterização do soro de queijo realizado em triplicata após a remoção da proteína através do método ácido térmico.

Tabela 6 – Média dos resultados das análises físico-químicas do soro desproteínizado

Componentes	Média ± desvio padrão
pH	4,55 ± 0,01
Umidade (%)	93,70 ± 0,05
E.S.T (%)	6,30 ± 0,03
Acidez (°D)	12,30 ± 0,57
Sais Minerais (%)	0,35 ± 0,01
Lactose (%)	3,22 ± 0,01
Gordura (%)	(traços) 0,06 ± 0,05
Proteína (%)	0,65 ± 0,06

De acordo com a média dos resultados do soro de queijo desproteínizado, observa-se que ainda há alta concentração de lactose no soro (3,6%), redução de apenas 13,67%, isso é devido à retenção da lactose no aglomerado protéico. Valores semelhantes foram encontrados por FLORENTINO (2006).

Após remoção das proteínas, nota-se uma redução destas na ordem 74,2% em relação às existentes no soro *in natura*. Valores semelhantes foram obtidos por FLORENCIO (2008) quando utilizou a mesma temperatura e o mesmo método na precipitação, comprovando com isto a eficiência na absorção do método ácido térmico.

Verifica-se que após a aplicação do método ácido térmico a gordura apresenta-se apenas em traços (0,06%).

O pH do soro desproteínizado, de 4,55, encontra-se dentro da faixa adequada (4,0 - 4,5) para a levedura da *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica.

Quanto ao teor de cinzas, observa-se que houve redução de apenas 14,6%, aos quais estes são considerados de extrema importância para que ocorra a formação de álcool durante a fermentação, além de favorecer a ação das leveduras, aumentando o rendimento alcoólico da fermentação.

5.3 Acompanhamento cinético da fermentação alcoólica

A cinética dos processos fermentativos foi construída a partir das principais variáveis do sistema: Concentração de etanol produzido (g/L), concentração de sacarose (g/L) e concentração de biomassa (g/L). Os perfis podem ser observados nas Figuras 8 a 12.

Figura 8 -- Cinética fermentativa do Experimento 1 (CS = 120 g/L; CL = 10 g/L)

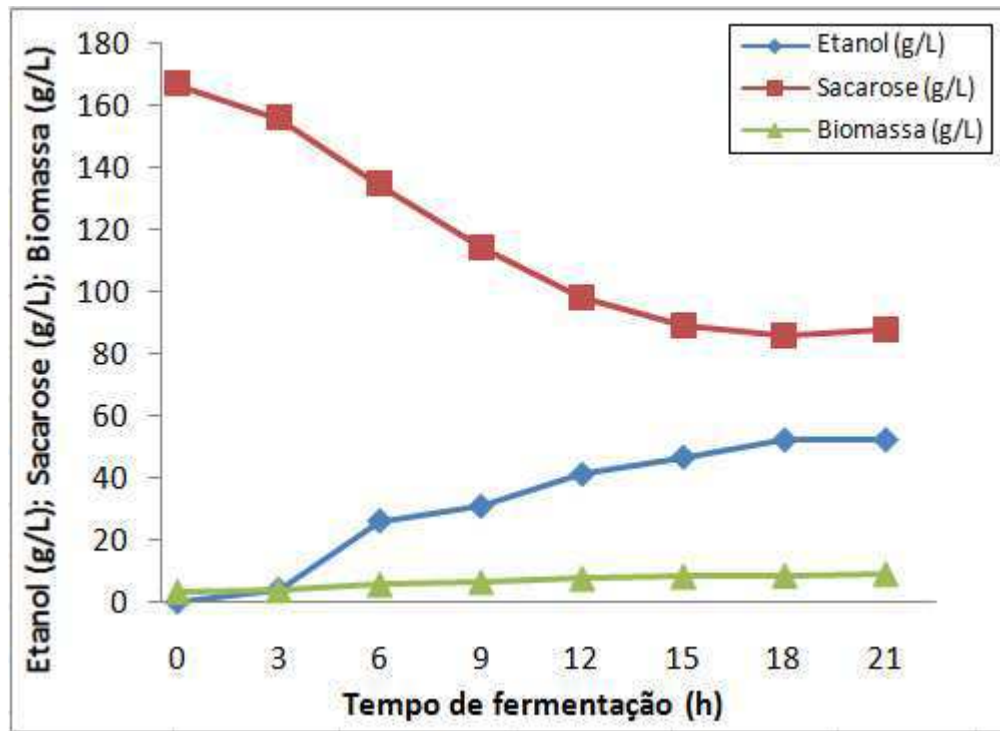


Figura 9 – Cinética fermentativa do Experimento 2 (CS = 180 g/L; CL = 10 g/L)

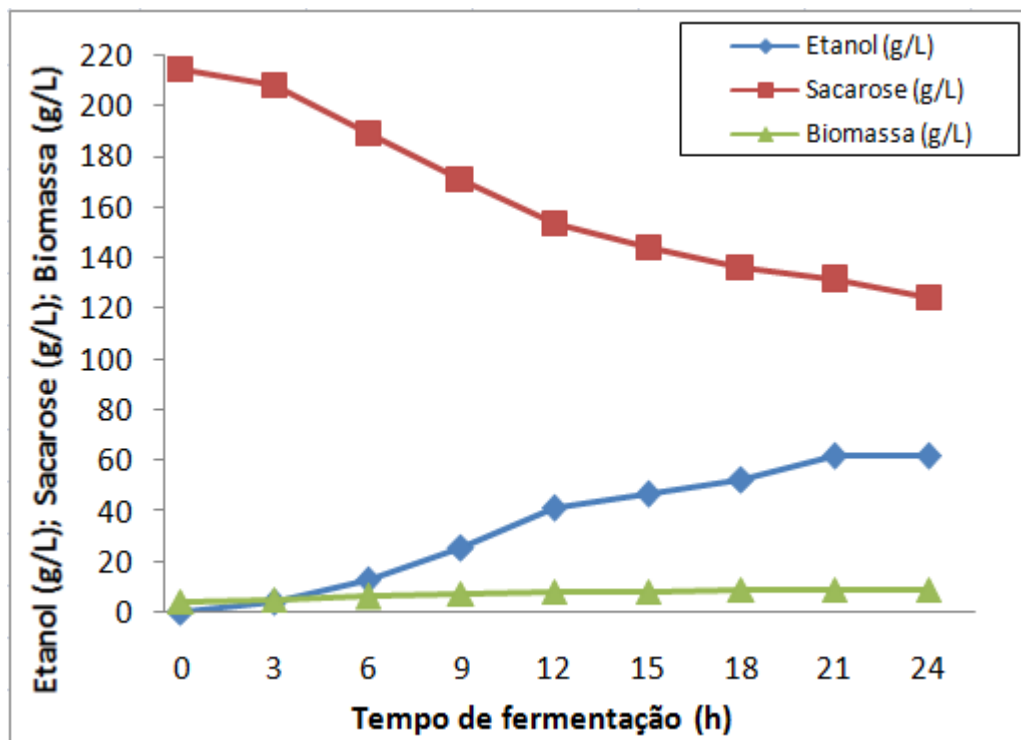


Figura 10 – Cinética fermentativa do Experimento 3 (CS = 120 g/L; CL = 16 g/L)

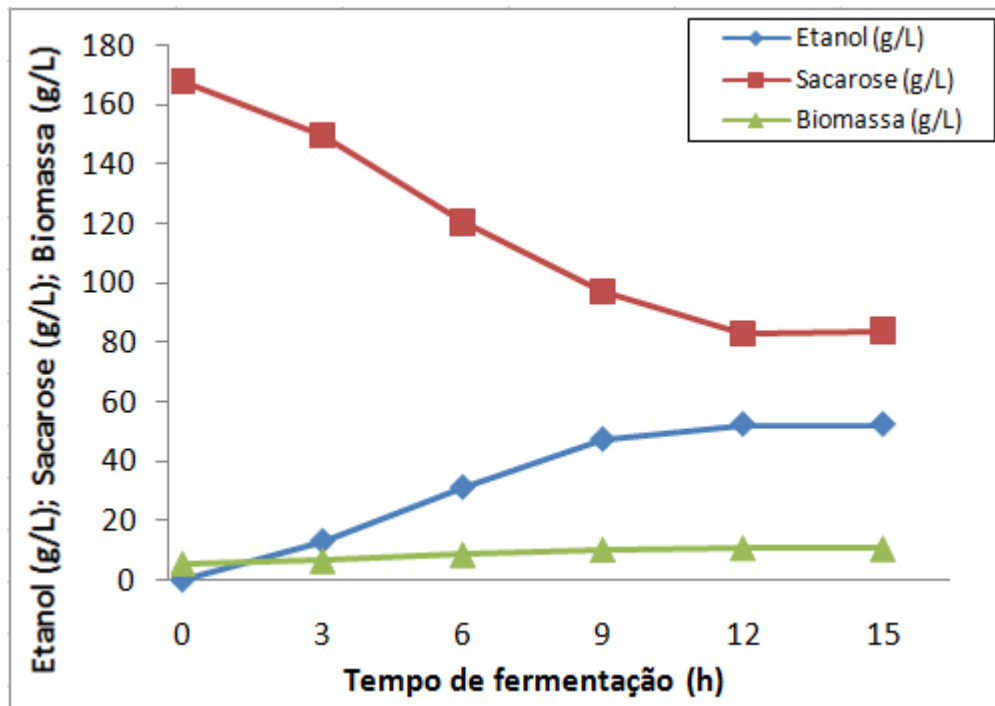


Figura 11 – Cinética fermentativa do Experimento 4 (CS = 180 g/L; CL = 16 g/L)

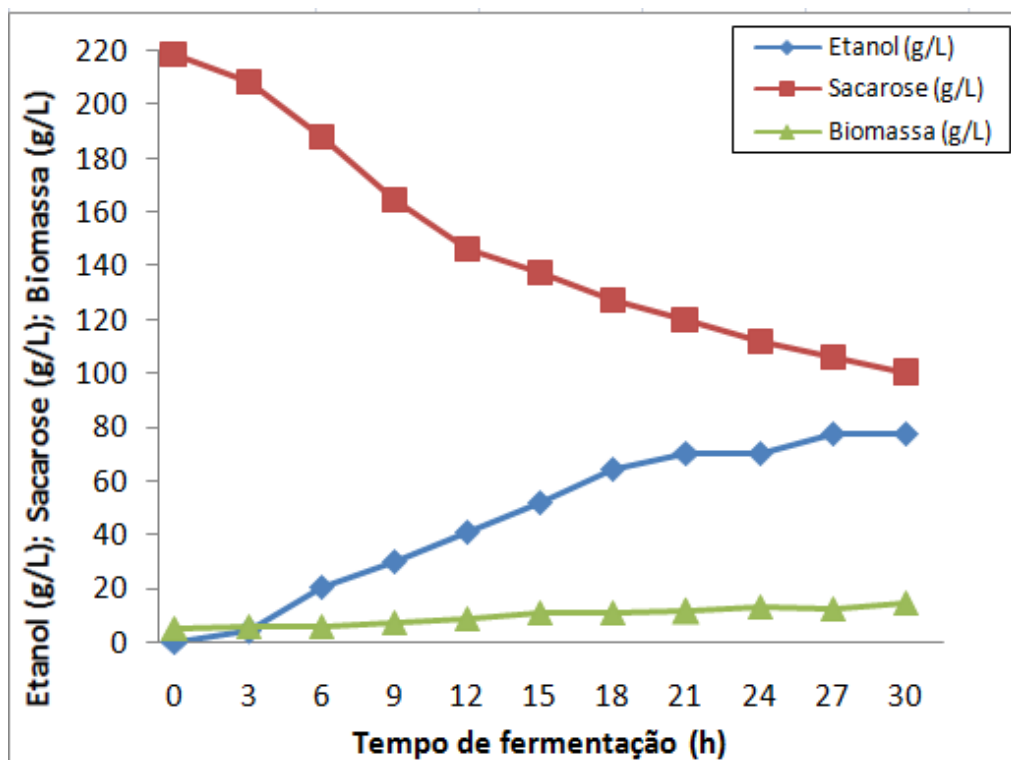
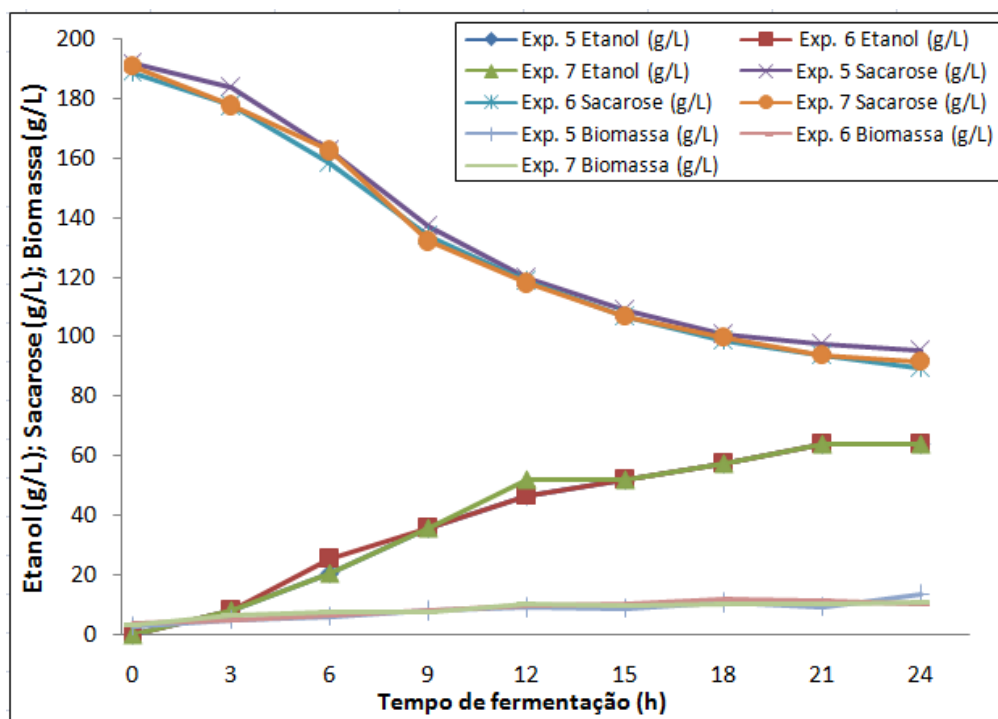


Figura 12 – Cinética fermentativa do ponto central - experimentos 5, 6 e 7 (CS=150 g/L; CL = 13 g/L)



Analisando a concentração de substrato (açúcar), observou-se que o consumo médio dos experimentos realizados foi de 50,1%. O menor consumo ocorreu no experimento 4 com 45,7% de fermentação. Apesar de este ter apresentado menor consumo, este foi o que apresentou maior conversão de açúcar em álcool, motivo este da escolha deste experimento para a destilação e obtenção do etanol neutro. FLORENTINO (2006) trabalhando com soro de queijo artesanal para fermentação alcoólica obteve um consumo de 66,81% em seu experimento de maior conversão, sendo este valor um pouco acima da média encontrada neste trabalho (44,56%) devido, possivelmente, à quantidade de sacarose adicionada ao meio (160 g/L).

Uma possível explicação para a redução do teor de açúcares ao final do processo é devido à hidrólise parcial da lactose pelos microrganismos oriundos da flora termorresistente contaminantes do leite cru, presentes no soro. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie que produz álcool a partir da glicose, e não é

capaz de utilizar diretamente a lactose como fonte de carbono, pois a mesma não possui o sistema β galactosidase, capaz de hidrolisar o açúcar do soro diretamente para etanol.

Observando-se as curvas de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* (Figuras 8 a 12) nota-se que a fase de adaptação (Lag) das células ocorreu em média nas seis primeiras horas de fermentação, período este relativamente curto devido à adaptação da levedura e a síntese das enzimas responsáveis pela quebra da molécula de sacarose em moléculas de frutose e glicose. Passadas 21 h inicia-se a fase estacionária nos experimentos 2, 4, 5, 6 e 7. No experimento 1 inicia-se nas 18h de fermentação e o experimento 3 após 12h de fermentação. Comportamentos semelhantes podem ser observados em trabalhos realizados por FLORENTINO (2006) e por FLORÊNCIO (2008) que também reaproveitaram o soro de queijo coalho em processos fermentativos.

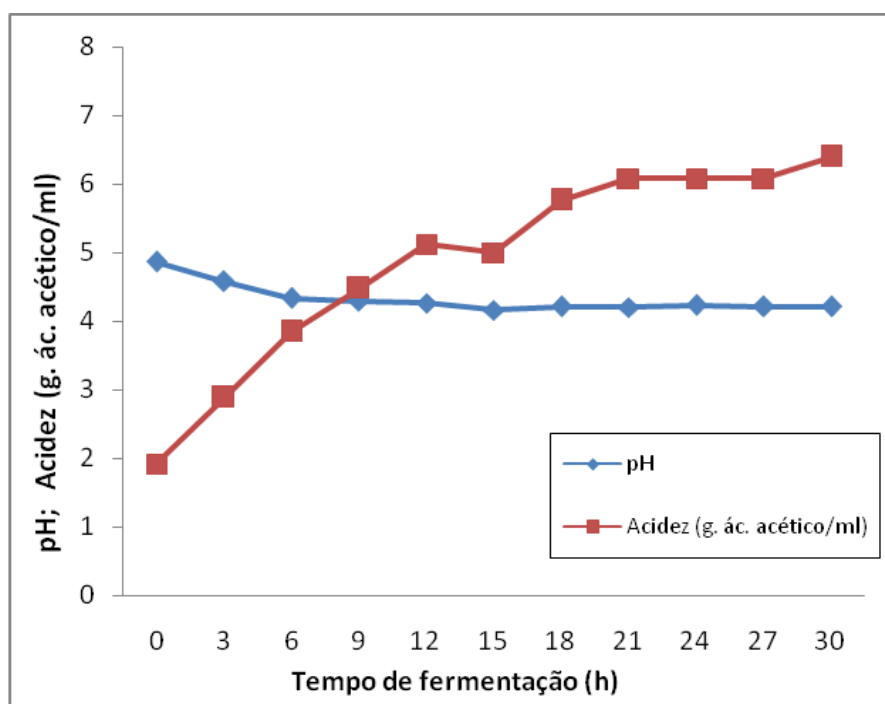
Com relação à produção de etanol, observa-se que a síntese significativa ocorreu no experimento 4 após 30 h de fermentação, ao qual obteve-se 9,8°GL ou 77 gramas de álcool por litro de fermentado devido a combinação de 180g/L de sacarose com 16g/L de levedura (inóculo), que promovem um aumento substancial de etanol.

Quanto aos experimentos do ponto central (experimentos 5, 6 e 7), nota-se que os perfis (concentração de etanol, concentração de sacarose e concentração de biomassa) nos três reatores não apresentam diferença significativa. Observa-se com isso que houve boa reprodutibilidade dos dados experimentais quando realizou-se três fermentações consecutivas com as mesmas condições operacionais.

5.3.1 Monitoramento do pH e acidez

A Figura 13 apresenta os perfis do pH e da acidez, em função do tempo, nas condições do experimento 4 que apresentou maior produtividade (180g/L de sacarose e 16g/L de inóculo), definidas através de Planejamento experimental (Tabela 4).

Figura 13 - Perfil do pH e acidez durante a fermentação



Com relação aos valores de pH, observou-se que houve uma variação, embora limitada, sendo a esperada, visto que em trabalhos similares de processos fermentativos em que houve a utilização da *Saccharomyces cerevisiae*, também se encontraram valores relativamente próximos ao encontrado por FLORENCIO (2008). Valores semelhantes também foram constatados por FLORENTINO (2006) ao qual iniciou a fermentação do soro de queijo com adição da *Saccharomyces cerevisiae* com um pH de 5,92 e terminou a fermentação após 42 horas com pH de 4,18. Neste estudo, o pH ótimo para o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* ficou entre 4,16 e 4,92; está dentro da faixa de pH ótimo encontrado na literatura, com pouca variação.

A atividade da *Saccharomyces cerevisiae*, responsável pela conversão da sacarose em etanol, resultou na redução do pH devido à formação de ácidos orgânicos (ácidos succínico, láctico, acético e outros) e consequente aumento da acidez do meio de fermentação ao longo do tempo.

Como esperado, o perfil de evolução da acidez ao longo do processo fermentativo se mostrou inversamente relacionado com o do pH, que atingiu o valor de 6,4 em 30 horas. Os valores encontrados para a acidez estão dentro do

esperando visto que, na literatura, também se encontram valores semelhantes aos estudos realizados por TORRES NETO et al., (2006).

5.4 Análise estatística do processo fermentativo utilizando a metodologia de superfície de resposta

Analisou-se a cinética de fermentação alcoólica em relação à produtividade, conforme Tabela 7, considerando-se os tempos de fermentação de cada experimento.

Tabela 7 – Valores da produtividade para cada experimento e por tempo de fermentação

Experimentos	CS	CL	Produtividade (g/L.h)
1	120 g/L	10 g/L	2,89
2	180 g/L	10 g/L	2,93
3	120 g/L	16 g/L	4,34
4	180 g/L	16 g/L	2,86
5	150 g/L	13 g/L	3,04
6	150 g/L	13 g/L	3,04
7	150 g/L	13 g/L	3,04

Na Tabela 8 são apresentados o modelo de regressão, o respectivo coeficiente de determinação (R^2) e o Teste F para os dados da produtividade, com os coeficientes estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

Tabela 8 – Modelo empírico decodificado para a produtividade analisados ao nível de 95% de confiança

Modelo empírico	R^2	Teste F
Produtividade = $3,16^* + 0,345CS^* - 0,36CL^* - 0,38CS \times CL^*$	0,95	3,61

*Coeficientes significativos ao nível de 95% de confiança

Estão apresentados na Tabela 9 os valores da ANOVA para produtividade ao nível de 95 % de confiança.

Tabela 9 – Análise de variância para a produtividade ao nível de 95% de confiança

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Teste F
Regressão	1,5721	4	0,393	3,61
Resíduo	0,0792	3	0,0264	
Total	1,6513	6		
R^2	0,95			
F_{tab}	4,12			

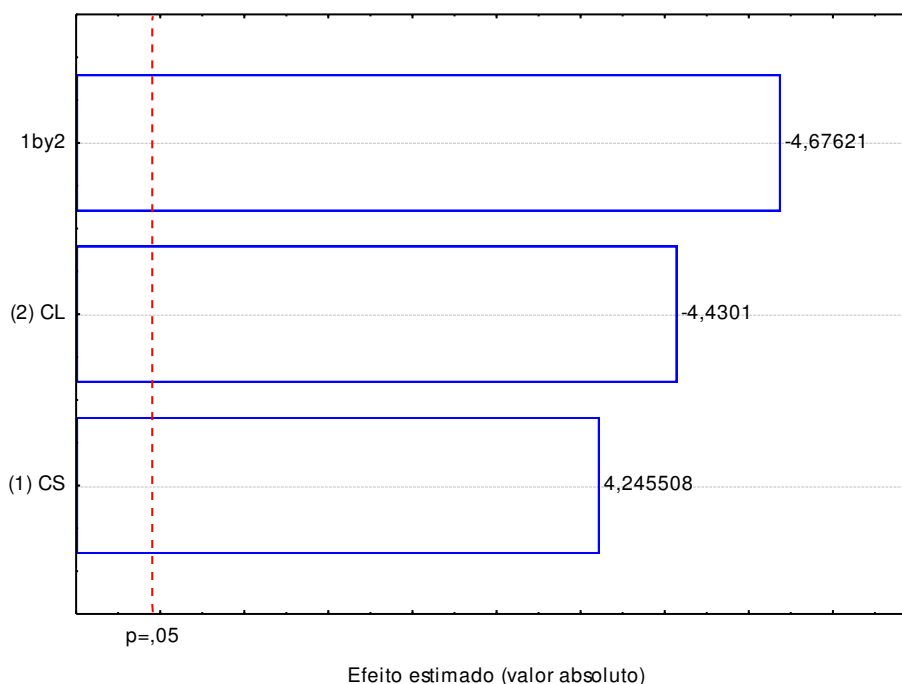
G.L. – grau de liberdade; S.Q. – soma dos quadrados; Q.M. – quadrado médio dos desvios

O F calculado foi 14,886 e o F tabelado 0,95.4,7 (BARROS NETO et al., 1996) foi 4,12 observando-se que o modelo é estatisticamente significativo para 95% de confiança pois a razão entre F calculado e F tabelado foi 3,61; segundo BARROS NETO et al. (1996) para que o modelo tenha validade estatística, de acordo com o Teste F, o valor da razão F calculado em relação a F tabelado deve ser acima de 1,0.

5.4.1 Diagrama de Pareto

O diagrama de Pareto ilustra os efeitos das variáveis estudadas (concentração de levedura e sacarose) e suas interações. Este diagrama compreende um gráfico de barras horizontais que está associado aos efeitos de cada variável individualmente e suas interações, na qual o efeito é tão significativo quanto mais a direita da linha vermelha (valor de p) ele estiver, no nível de significância de 95% de confiança, confirmando os resultados obtidos na figura 14. Nesta mesma Figura as barras fornecem os resultados dos efeitos das variáveis e estão dispostas de modo decrescente.

A Figura 14 indica no gráfico de Pareto, os efeitos significativos para produtividade a nível de 95% de confiança para a estimativa dos efeitos.

Figura 14 - Gráfico de Pareto para produtividade

Observando a Figura 14 verifica-se que os efeitos da concentração de levedura, concentração de sacarose e os efeitos da interação entre levedura e sacarose apresentaram-se estatisticamente significativos. A interação entre a concentração de sacarose e a concentração de levedura foi à variável de entrada de maior influência.

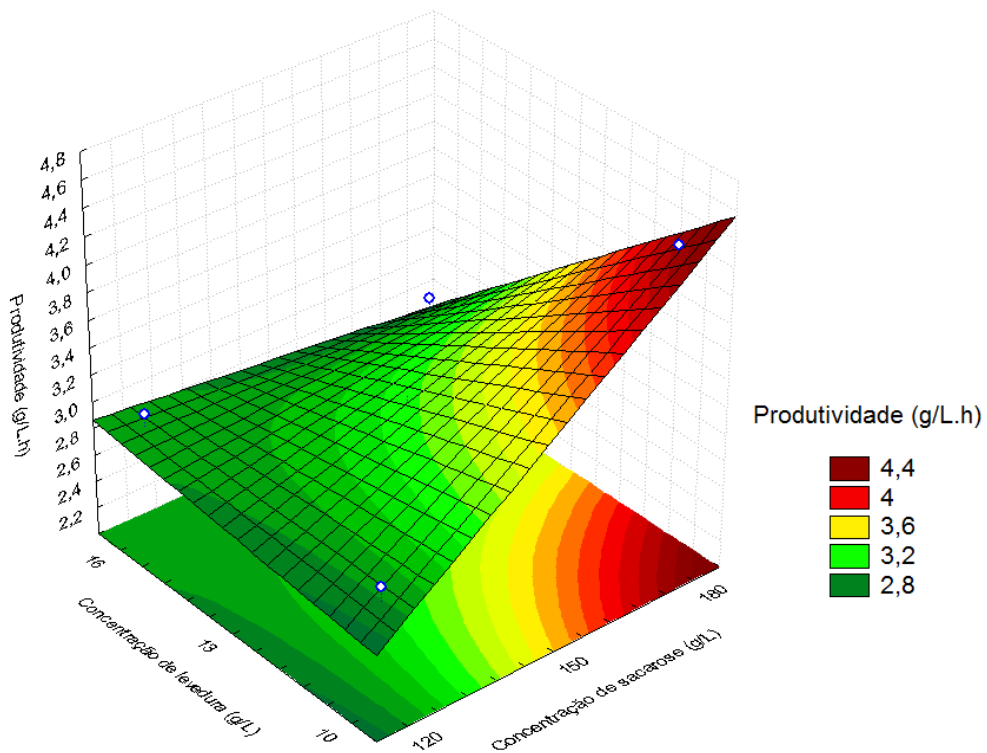
5.4.2 Superfície de resposta

As variáveis de entrada envolvidas no processo fermentativo foram analisadas seguindo a metodologia de superfície de resposta.

A Figura 15 apresenta a superfície de resposta gerada pelo programa Statistica 7.0 com base na variável dependente produtividade. Neste gráfico observa-se os efeitos das variáveis de entrada concentração de sacarose (g/L) e concentração de levedura(g/L) sobre a produtividade (g/L.h). Verifica-se que a concentração de sacarose apresenta influência positiva, ou seja, quando passa do nível -1 para o nível +1 a produtividade aumenta. Por outro lado, a concentração de

levedura apresenta influência negativa, ou seja, quando passa do nível -1 para o nível +1 a produtividade diminui.

Figura 15 - Superfície de resposta para a produtividade em função da concentração de levedura e da concentração de sacarose



5.5 Caracterização físico-química do etanol neutro

A Tabela 10 apresenta os resultados da caracterização do etanol neutro, obtido através de destilação convencional.

Tabela 10 – Média dos resultados das análises físico-químicas do etanol neutro

Parâmetros analisados	Média ± desvio padrão	Referência
pH	6,07 ± 0,12	6,5 < pH < 7,5
Acidez (mg de ác. acético/L)	1,07 ± 0,26	10 mg/L máx
Massa Específica a 20° (Kg/m ³)	851,30 ± 0,03	889 Kg/ m ³ máx
Condutividade elétrica (μS/Cma 25°C)	2,21 ± 0,01	50 μS/m máx
Teor Alcoólico a 20°C (°GL)	77,00 ± 0,0	até 96,1°GL

O valor de pH do etanol neutro produzido foi 6,07, ficando abaixo da faixa recomendada que é entre 6,5 a 7,5. Esse pH abaixo do valor mínimo justifica-se pela não remoção de impurezas voláteis presentes no fermentado, sendo necessário realizar uma bidestilação para que se obtenha a neutralidade real desse etanol. QUEIRÓZ (2013) estudando a obtenção do álcool neutro a partir de resíduos (cabeça e cauda) oriundos da fabricação de cachaça por destilação convencional, obteve um álcool neutro com pH de 6,9.

A acidez do etanol produzido foi 1,07mg de ác. acético/L. De acordo com as especificações da GIASA (2012), o valor máximo estipulado é de 10mg/L, estando o etanol produzido dentro das especificações exigidas.

A massa específica do etanol neutro produzido foi de 851,3 Kg/m³, ou seja, valor próximo ao determinado nas especificações técnicas do etanol neutro (GIASA, 2012), que é de 889 Kg/ m³.

Quanto à condutividade elétrica, com valor médio de 2,21 μS/Cma a 25°C, foi bem inferior ao máximo determinado pela GIASA (2012), que é de 50 μS/Cma.

A graduação alcoólica do etanol neutro obtido a partir do soro de queijo foi de 77°GL, o qual se encontra dentro das especificações da destilaria GIASA (2012) que determina um teor de no máximo 96,1°GL. QUEIRÓZ (2013) estudando a obtenção do álcool neutro a partir de resíduos (cabeça e cauda) oriundos da fabricação de cachaça por destilação convencional, e obteve um álcool neutro com graduação alcoólica de 85°GL.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, com o aproveitamento do soro de queijo coalho em processos fermentativos para a obtenção de etanol neutro, pode-se concluir que:

- O soro *in natura* apresentou componentes químicos acima da média encontrada em outros queijos que também utilizam o processo de coagulação enzimática. Isso se deve as precárias condições de processamento do queijo coalho que resulta em perdas na composição química no queijo “coalho”, resultando em um soro com maior retenção dos componentes do leite. Isso o coloca como potencial produtor de subprodutos com maior valor agregado e em processos fermentativos;
- Quanto à desproteinização do soro, observou-se que o método ácido térmico empregado mediante a utilização de ácido cítrico e temperatura de 90°C, na remoção das proteínas do soro apresentou eficiência, pois houve uma redução destas na ordem 74,2% em relação às existentes no soro *in natura*;
- Com relação ao processo de fermentação alcoólica realizado, conclui-se que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou bom desempenho na conversão da sacarose. O experimento 4 foi o que apresentou maior conversão quando combinou-se 180g/L de sacarose com 16g/L de inoculo, obtendo-se assim um fermentado com graduação alcoólica de 9,8°GL;
- Os efeitos da concentração de levedura, concentração de sacarose e da interação entre essas se apresentaram estatisticamente significativos em nível de 95% de confiança, sendo que a concentração de levedura foi a variável de maior influência;
- O etanol neutro obtido atingiu uma graduação alcoólica de 77°GL, ou seja, dentro das especificações exigidas pela legislação, que é de no máximo 96,1°GL;

- A fermentação do soro de queijo com objetivo de produzir etanol neutro apresenta-se como uma alternativa tecnicamente viável e promissora, pois além de reduzir o potencial poluidor desse resíduo ainda pode gerar produtos de alto valor agregado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. R. **Processamento do leite e Tecnologia de produtos lácteos** / Luiz Ronaldo de Abreu. – Especialização Lavras: UFLA/FAEPE, 2005.

ALMEIDA, E. P.; **Diagnóstico das Queijeiras em Pombal e Região**. SEBRAE/PB; p.02-08, 2010.

ALEGRE, R. M. **Contribuição ao estudo de aproveitamento de soro de queijo para produção de lactose e etanol**. 1988. 178p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas.

ALVES, T. L. M.; Cinética do Crescimento Microbiano. In: **Curso Prático em Engenharia de Bio-processos** - Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 16^a ed., 3^a rev. Gaithersburg: Published by AOAC International, 1997. v.2, cap. 32, p.1-43.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. **Biotecnologia Industrial: Alimentos e Bebidas Produzidas por Fermentações**. v.5. Ed. Blucher, São Paulo, p.245, 2001.

ARAÚJO, M. S. **Produção de etanol a partir do soro de queijo “tipo coalho”**. 2008. 53p. Monografia (Graduação em Química Industrial). Universidade Estadual da Paraíba.

BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 179f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BARBOSA, H. R., TORRES, B. B.. **Microbiologia Básica**. São Paulo. Ed. Atheneu, 216p. 1998.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001, 401 p.

BASTOS, V. D. **Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias**. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.

BAROUD, R. **“Etanol”**. In: Manual Econômico da Indústria Química, v.1, 2006. Centro de Pesquisas e Desenvolvimento – CEPED, pp. 301-311.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. J. S. Características microbiológicas de armazenamento e de embalagem de queijo de coalho comercializados na cidade de fortaleza CE. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 95. p. 44-47, 2002.

CARVALHO, L. **Açúcar e Álcool – Agrobusiness**, São Paulo Ano 64, nº 720 pg. 32 novembro 2008.

CASTILLO, F. **Lactose metabolism by yeast**. R. Yeast Biotechnology and Biocatalysis, New York, p. 297-230, 1990.

CONAMA, **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. RESOLUÇÃO Nº 430, DE 13 DE MAIO DE 2011.

DALLAS, P.; Uso de Derivados do Soro em Aplicações de Produtos de Consumo. **Revista Leite e Derivados**. Ano VIII nº 46 p.48-50,1999.

DORAN, M. **Princípios de Ingeniería de los Bioprocessos**. Zaragoza: Acribia, ss,1998.

FLORENCIO, I. M.; **Estudo do aproveitamento do Lactosoro de coagulação Enzimática para Fermentação e Produção de Aguardente**. 2008. 71p.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Campina grande, 2008.

FLORENTINO, E. R. **Aproveitamento do soro de queijo de coagulação enzimática**. 2006. 138f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. 2ed. São Paulo: Ed. Globo, 1991. 297p.

GIASA (GRAMAME INDÚSTRIA DE ÁLCOOL), 2012 - Pedras de Fogo – Paraíba.

GUIMARÃES, THAIS MARTINS. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces Cerevisiae* para elaboração de vinho**. Curitiba, 2005.

LIMA, Urgel de Almeida. **Biotecnologia Industrial** - Processos Fermentativos e Enzimáticos/Urgel de Almeida Lima – outros componentes: Eugênio Aquarone, Walter Borzani, Wilibaldo Schmidell. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2001.

MAYER, F. D. **Desenvolvimento da Tecnologia de Destilação Adequada à Produção de Álcool Combustível em Pequena Escala**. 2010. 109p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Santa Maria.

MICHEL, Raul José S. Júnior; **Obtenção do álcool etílico hidratado, com graduação alcoólica para uso automotivo: validação de um processo em batelada**. 2010. 146p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Santa Maria.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W.G. **Aguardente de cana**. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. 2005. 66f.

OLIVEIRA, M. N.; **Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais**/editora Maricê Nogueira de Oliveira. São Paulo: Atheneu Editora, 2009.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal – Volume 2**, Editora Artmed, Porto Alegre - RS, 2005.

PEDROSA, L. da S. **Controle adaptativo de uma coluna piloto de destilação em batelada com interferência de composição através de redes neurais artificiais**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, São Paulo/SP.

PORRO, D. et al. Development of high cell density cultures of engineered *Saccharomyces Cerevisiae* cells able to grow on lactose. **Biotechnol. Lett.**, v.14, p.1085-1088, 1992.

QUEIRÓZ, V. de S. **Obtenção de etanol líquido neutro a partir dos resíduos (cabeça e cauda) oriundos da fabricação de cachaça por processo de destilação convencional e assistido por micro-ondas para obtenção de álcool gel**. 2013. 103f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, Campina Grande.

RASOVSKY, E. M. **Álcool: Destilarias**, Instituto do Açúcar e do Álcool. Rio de Janeiro: Coleção Canavieira, 2009.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo: perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente **Revista Food Ingredientes**, n.17, p. 20-24, 2002.

RODRIGUES, Denise Celeste Godoy de Andrade; SANTOS, Telma Temóteo dos; **MANUAL DE PRÁTICAS DE PROCESSOS BIOQUÍMICOS**, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1 ed. Editora Casa do Pão. Campinas; SP. 326 p. 2005.

RUBIO-TEIXEIRA, M. et al. Lactose utilization by *saccharomyces cerevisiae* expressing *klyveromyces lactis* LAC genes. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 97-106, 2000.

SANTOS, F. A.; Aspectos microbiológicos do queijo “tipo coalho” comercializado em Fortaleza – Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)**, Curitiba, v. 13, n.1, p. 37-46, jan/jun, 2001.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo; Edgard Blucher, 2001, v. 2, 541p.

SILVA, C. A.; CASTRO GOMEZ, R.J.H. Estudo de um Processo Fermentativo Utilizando Soro de Leite e a Levedura *Kluyveromyces fragilis* . **Semina: Ci. Agr.**, Londrina, v.16,nº1p.17-21,1995.

SINGH, H.; Waungana, A. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. **International Dairy Journal**. 11, p. 543–551, 2001.

SIQUEIRA, I. M. C. S. Importância e utilização dos derivados de soro de queijo. **Revista Higiene alimentar**, v. 16, n. 37, p. 31-35, 2002.

TOLKACH, A.; Kulozik, U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **Journal of Food Engineering**. 67, p.13–20, 2005.

TORRES NETO, A. B.; **Estudo da pré-hidrólise ácida da palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill)**. Campina Grande-PB. 2010. 8 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Campina Grande.

VERÁS, A. L. S.; Estudo do Impacto Ambiental. **Revista Leite e Derivados**. Ano VI nº43, p. 18-34, 1997.

VIEIRA, P. Secagem: Uma alternativa rentável para o Leite e para o Soro. **Revista Leite e Derivados**, Ano IX, n. 49, p. 46-51. 1999.