

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

FABIANE OLIVEIRA FARIAS

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE SORO DE
LEITE E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO**

PONTA GROSSA

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

FABIANE OLIVEIRA FARIAS

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE SORO DE LEITE E
ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate (UEPG)
Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira (UEPG)

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

F224 Farias, Fabiane Oliveira
Produção de etanol de segunda geração a partir de soro de leite e água de maceração de milho/ Fabiane Oliveira Farias. Ponta Grossa, 2015.
76f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate.

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira.

1.Subprodutos. 2.Planejamento de experimentos. 3.Cinética fermentativa. 4.Bioetanol. 5.Monensina sódica. I.Demiate, Ivo Mottin. II. Nogueira, Alessandro. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV. T.

CDD: 664

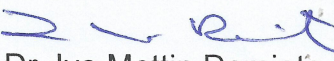
TERMO DE APROVAÇÃO

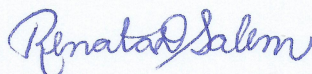
FABIANE OLIVEIRA FARIAS

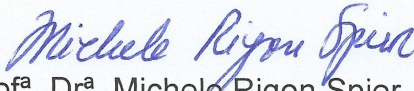
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE SORO DE LEITE E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:


Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate – UEPG


Profª. Drª. Renata Dinnies Santos Salem – UEPG


Profª. Drª. Michele Rigon Spier - UFPR

Ponta Grossa, 03 de fevereiro de 2015.

À minha família, dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus criador de todas as coisas, sem Ele não teria força e coragem suficiente para continuar apesar das adversidades que surgem no decorrer da vida.

Aos professores e com certeza também amigos, Ivo Demiate e Alessandro Nogueira, pela confiança em mim depositada e por estarem sempre disponíveis para auxiliar em todas as dúvidas, não só científicas, mas também dando conselhos que certamente levarei comigo por toda a vida.

Agradeço a minha mãe, Ione, que sempre me mostrou que quando acreditamos num sonho a luta é sempre válida, e que desistir não deve fazer parte dos meus pensamentos, obrigada por ser um exemplo de luta e coragem em minha vida!

Ao meu pai e anjo da guarda, Luiz Fernando, que acredito que dia a dia cuida de mim, e mesmo longe dos olhos é meu exemplo de humildade, amor e fé.

A minha irmã, Fernanda, que muitas vezes além de irmã, foi mãe, pai e principalmente amiga incentivando nos momentos difíceis, sendo exemplo de dedicação a ser seguido.

A minha afilhada, Lauren, alegria das nossas vidas, que na sua inocência de criança, muitas vezes me fez rir e me esquecer dos problemas que me cercavam.

Ao meu namorado, Diulhio, que em todos esses anos sempre me apoiou incondicionalmente em seguir meus sonhos. Acredito que ainda cresceremos muito juntos.

Às minhas amigas de anos, Ana Paula e Renata, e aquelas que o mestrado me trouxe, Aline, Andressa, Tâmisa, Priscila e Mayara, pela convivência e companhia de cada dia.

A Denise e ao Vitor que sempre estiveram disponíveis para me ajudar quando precisei.

A CAPES ao CNPq pelo apoio financeiro, a Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao Departamento de Engenharia de Alimentos e ao laboratório multiusuário (C-LABMU) pela estrutura disponibilizada, e a todas as empresas que forneceram materiais para serem utilizados neste estudo.

E a todos que de maneira geral contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e realização deste sonho, muito obrigada!

RESUMO

O crescimento da agroindústria gera além de impactos positivos, a preocupação pela alta geração de subprodutos que necessitam de uma disposição adequada. O soro de leite e a milhocina estão entre estes subprodutos que podem ser considerados de alto potencial poluidor se simplesmente forem descartados no ambiente, ou matérias primas potenciais para obtenção de novos produtos se considerarmos os nutrientes que ambos apresentam. Uma possível utilização destes subprodutos é na produção de bioetanol diminuindo os impactos tanto da alta geração de resíduos quanto do uso de combustíveis fósseis. O objetivo deste trabalho foi produzir etanol via fermentativa utilizando os subprodutos soro de leite e água de maceração de milho. Foram utilizadas ferramentas de planejamento de experimentos, para se estudar diferentes meios para produção de etanol de segunda geração a partir destes subprodutos. Neste estudo, dois meios fermentativos, um deles contendo 100 % de milhocina e o outro 25 % de soro de leite com 75 % de milhocina, ambos suplementados com glucose foram considerados os melhores para produção de bioetanol atingindo-se eficiência de fermentação em torno de 90 % para ambos. Os referidos meios também apresentaram resultados satisfatórios quando suplementados com melaço de cana de açúcar ou com açúcar mascavo, condições próximas às utilizadas para fermentações em escala industrial. Um dos principais problemas encontrados na produção de etanol foi a geração de ácido láctico resultante da contaminação do processo com bactérias ácido-láticas, sendo que tanto a pasteurização quanto o uso de antibióticos foram eficientes para controlar esses contaminantes. O uso de antibióticos, principalmente da monensina sódica, apresentou vantagens reduzindo a velocidade máxima de crescimento da levedura ($\mu_{\max}$), visto que menores valores para $\mu_{\max}$, segundo estudos, refletem em maiores índices de eficiência da fermentação. De maneira geral os resultados obtidos foram considerados satisfatórios, atingindo-se alto índice de produtividade em etanol (acima de $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e eficiência máxima de fermentação (N_b) de 93,85 % para o experimento contendo 100 % de milhocina utilizando o antibiótico monensina sódica como controle de contaminantes.

Palavras-Chave: subprodutos, planejamento de experimentos, cinética fermentativa, bioetanol, monensina sódica.

ABSTRACT

The agro-business growth beyond creating positive impacts generates the concern with the high level of by-products generation that require proper disposal. Cheese whey and corn steep liquor are among these by-products with high pollution potential if are simply discarded, but if considered the nutrients present in both of them, they are potential raw materials for obtaining new products. One possible use of those by-products is as substrates for bioethanol production, decreasing the impacts in high waste generation as well as the use of fossil fuels. The aim of this work was to produce bioethanol using the by-products whey and corn steep liquor. Experimental design tools were used to examine their technical viability for second-generation ethanol production. The worts, containing 100% corn steep liquor and 25% whey with 75% corn steep liquor, supplemented with glucose were considered superior for bioethanol production with fermentation efficiency reaching around 90 % for both of them. The worts also showed satisfactory results when supplemented with sugar cane molasses or brown sugar. One of the main problems found in ethanol fermentation was the lactic acid generation resulting from contamination with lactic acid bacteria, and in order to overcome that difficulty, pasteurization and use of antibiotics were made and showed good results in controlling contaminants. The use of antibiotics, especially of sodium monensin showed advantages by reducing the maximum rate of growth of yeast ($\mu_{\max}$), and as reported elsewhere lower $\mu_{\max}$ values reflects in higher rates of fermentation efficiency. In general the results were considered satisfactory reaching high level of ethanol productivity (above $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and maximum fermentation efficiency (N_b) of 93.85 % for the experiment with 100 % of corn steep liquor using monensin sodium antibiotic how to contaminants control.

Keywords: by-products, experimental design, fermentation kinetics, bioethanol, sodium monensin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma da obtenção da farinha de milho biju e subprodutos gerados.....	13
Figura 2: Lactose em suas conformações α e β	17
Figura 3: Esquema da hidrólise da lactose catalisada pela enzima β -d-galactosidase.	17
Figura 4: Catabolismo da glucose e da galactose pela <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Figura 5: Evolução dos biocombustíveis no Brasil.	23
Figura 6: Perfil de aminoácidos dos subprodutos agroindustriais milhocina e soro de leite utilizados neste estudo.	36
Figura 7: Curva de liberação de CO ₂ durante o processo fermentativo de diferentes mostos para a determinação do tempo de fermentação.....	42
Figura 8: Cinética Fermentativa para experimento 1: (a) consumo de açúcares fermentescíveis totais (AFT) e produção de etanol; (b) Consumo de nitrogênio e produção de biomassa.	45
Figura 9: Cinética Fermentativa para experimento 2: (a) consumo de açúcares fermentescíveis totais (AFT) e produção de etanol; (b) Consumo de nitrogênio e produção de biomassa.	46
Figura 10: Gráfico para determinação de $\mu_{\text{máx}}$ pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento para os ensaios: (a) Experimento 1 e (b) Experimento 2.	48
Figura 11: Curva de liberação de CO ₂ durante o processo fermentativo dos diferentes meios fermentativos utilizando diferentes fontes de açúcares.....	50
Figura 12: Comparação da produção de ácido láctico durante a fermentação pelo uso de diferentes meios de controle das bactérias lácticas.....	54
Figura 13: Curva de liberação de CO ₂ durante o processo fermentativo de diferentes meios fermentativos utilizando como antibiótico a monensina sódica cristalina em comparação com a pasteurização e ausência de controle de contaminantes.	57
Figura 14: Comparação da produção de ácido láctico após 27 horas de fermentação utilizando diferentes métodos de controle de contaminantes.....	59
Figura 15: Cinética Fermentativa para experimento 1 utilizando antibiótico: (a) consumo de açúcares fermentescíveis totais (AFT) e produção de etanol; (b) Consumo de nitrogênio e produção de biomassa.....	60
Figura 16: Cinética Fermentativa para experimento 2 utilizando antibiótico: (a) consumo de açúcares fermentescíveis totais (AFT) e produção de etanol; (b) Consumo de nitrogênio e produção de biomassa.....	61
Figura 17: Gráfico para determinação de $\mu_{\text{máx}}$ pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento para os ensaios: (a) Experimento 1 e (b) Experimento 2 utilizando antibiótico P. Maxx.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas da milhocina.	13
Tabela 2: Composição do soro de leite doce e ácido.....	15
Tabela 3: Delineamento experimental do tipo simplex centróide para mistura binária.	27
Tabela 4: Características físico-químicas da milhocina e do soro de leite.	33
Tabela 5: Compostos nitrogenados presentes na milhocina e soro de leite.....	35
Tabela 6: Eficiência da fermentação das diferentes misturas de subprodutos indicadas pelo planejamento de experimentos.....	37
Tabela 7: Parâmetros resultantes da fermentação alcoólica das diferentes misturas de soro de milhocina.....	38
Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) para Eficiência da Fermentação* em proporções dadas pelo planejamento de mistura.	41
Tabela 9: Coeficientes e respectivos erros padrão do modelo linear.	41
Tabela 10: Parâmetros do mosto durante a fermentação para os diferentes experimentos.	43
Tabela 11: Parâmetros resultantes da Fermentação dos experimentos avaliados em 27 h de processo.....	47
Tabela 12: Comparação dos valores preditos através do modelo linear e dos valores encontrados experimentalmente para eficiência da fermentação em 27 h de processo.....	47
Tabela 13: Parâmetros avaliados do mosto antes e após a fermentação alcoólica utilizando diferentes mostos e diferentes fontes de açúcares.....	51
Tabela 14: Parâmetros resultantes da fermentação alcoólica para os substratos das melhores misturas utilizando antibióticos.....	55
Tabela 15: Parâmetros do mosto durante a fermentação utilizando como antibiótico a monensina sódica.	58
Tabela 16: Resultados dos parâmetros da fermentação dos experimentos avaliados em 27 h de processo comparando métodos de controle de contaminantes.....	63

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	OBJETIVOS	11
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1.	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	12
3.1.1.	Água de maceração de milho.....	12
3.1.2.	Soro de leite	15
3.2.	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	18
3.2.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.2.2.	Controle de Contaminantes.....	21
3.3.	BIOETANOL E ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	22
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1.	MATERIAIS.....	25
4.2.	MÉTODOS	25
4.2.1.	Caracterização físico-química dos subprodutos	25
4.2.2.	Hidrólise do Soro de Leite.....	26
4.2.3.	Delineamento experimental	27
4.2.4.	Análise do etanol	28
4.2.5.	Determinação da biomassa seca	28
4.2.6.	Cinética Fermentativa.....	28
4.2.7.	Efeito da adição de diferentes fontes de açúcares ao mosto.....	31
4.2.8.	Uso de antibióticos para controle da contaminação microbiana	31
4.2.9.	Análise Estatística.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1.	Composição físico-química e compostos nitrogenados dos subprodutos	33
5.2.	Hidrólise do Soro de Leite.....	36
5.3.	Delineamento Experimental	37
5.4.	Cinética Fermentativa.....	42
5.4.1.	Efeito da adição de diferentes fontes de açúcares ao mosto.....	49
5.4.2.	Uso de antibióticos para controle da contaminação microbiana	53
6.	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

O uso de novas tecnologias para produção agrícola assim como o aumento da produção de alimentos resultam no crescimento da agroindústria brasileira. Junto a esse crescimento surge a preocupação com a geração de resíduos, que causam danos ao meio ambiente devido ao potencial poluidor resultante da sua disposição em lugares inadequados ou da falta de tratamento. Os resíduos ou subprodutos gerados em indústrias de alimentos ou agroindustriais recebem maior atenção por serem úteis na síntese de novos produtos, dentre estes, estão a água de maceração do milho e o soro de leite.

A água de maceração de milho ou milhocina é um subproduto da moagem úmida do milho, que apresenta baixo custo de obtenção e está amplamente disponível. Tem em sua composição carboidratos e aminoácidos livres, o que a torna uma excelente fonte de nutrientes para micro-organismos em inúmeros processos fermentativos de alta eficiência. O soro de leite é o principal subproduto da produção de queijos gerado em grandes volumes e apresenta elevada carga orgânica, atribuída ao alto teor de lactose, sendo uma fonte deficiente em nitrogênio para processos biológicos.

Esses subprodutos podem ser utilizados como mostos para fermentação alcoólica, sendo que nessa fermentação, compostos orgânicos como a glucose são transformados em etanol e dióxido de carbono. Este processo fermentativo é feito principalmente pelo micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae* e a presença de carbono e nitrogênio é essencial para o seu metabolismo. Sendo assim a mistura de soro de leite e milhocina pode suprir a necessidade de nutrientes dessa levedura.

O etanol, principal produto da fermentação alcoólica, tem sido muito estudado, pois quando é produzido por via biológica (bioetanol), evita o uso de combustíveis fósseis que são poluentes e não renováveis. Se produzido a partir de materiais como cana-de-açúcar, beterraba e milho, por exemplo, é chamado de etanol de primeira geração, e se produzido a partir de resíduos e/ou fontes alternativas, pode ser denominado etanol de segunda geração.

Este trabalho teve por objetivo caracterizar a água de maceração de milho e o soro de leite a fim de estabelecer misturas para a produção de etanol de segunda geração avaliando a eficiência da fermentação e sugerindo um processo de alta produtividade.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Produzir etanol via fermentativa utilizando água de maceração do milho e soro de leite como substrato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os subprodutos água de maceração de milho (proveniente da produção de farinha de milho biju) e soro de leite quanto às suas características físico-químicas e ao perfil de aminoácidos;
- Desenvolver um planejamento de misturas para otimização da composição do meio fermentativo utilizando água de maceração e soro de leite hidrolisado para produção de etanol de segunda geração tendo como variável de resposta o rendimento da fermentação;
- Avaliar o comportamento da cinética fermentativa utilizando diferentes fontes de açúcares e diferentes formas de controle de contaminantes (pasteurização e antibióticos) no mosto de melhor eficiência sugerido pela otimização do processo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

O acentuado crescimento do agronegócio brasileiro o coloca em posição de destaque no processo de desenvolvimento do país. A geração, adaptação, transferência e a adoção de inovações tecnológicas possibilitaram ganhos de produtividade expressivos na agroindústria (GASQUES; BASTOS, 2003). A agroindústria surge a partir do aumento da produção de alimentos com sistemas agrícolas mais intensivos e junto a ela vem a preocupação sobre geração de resíduos com potencial de causar danos ambientais, se não forem corretamente direcionados ou tratados (SCHNEIDER et al., 2011).

A produção de resíduos pode representar perda de biomassa e de nutrientes, além de aumentar o potencial poluidor associado à disposição inadequada dos mesmos, sendo encontrados na forma de resíduos sólidos, como o bagaço de cana, por exemplo, e de líquidos. Quando tratados ou transportados para disposição adequada, o alto custo desses procedimentos tem efeito direto sobre o preço do produto final (ROSA et al., 2011).

Os resíduos agrícolas e da indústria de alimentos, são caracterizados pela alta demanda química de oxigênio (DQO), demanda biológica de oxigênio (DBO) e sólidos solúveis, e estes particularmente, estão recebendo maior atenção, pois representam matérias-primas de possível utilização para a síntese de produtos úteis.

Embora muitos subprodutos já possuam alguma aplicação industrial, grande parte da biomassa residual das atividades agrícolas do Brasil ainda é inutilizada (PANDEY et al., 2000; SAAVEDRA et al., 2005; DIAS et al., 2013). Novas tecnologias são necessárias visto que os padrões de efluentes ultimamente têm se tornado mais rigorosos quanto à redução da carga orgânica e a exigência de remoção de nitrogênio está sendo especialmente reforçada (AIHARA, 2002).

3.1.1. Água de maceração de milho

Um dos produtos da moagem úmida do milho é a farinha de milho biju, produto típico de nosso país e muito utilizado na culinária em diferentes formas, sendo muito bem aceito pelos consumidores (ALESSI et al., 2009). A água de maceração do milho, ou milhocina, consiste em um importante subproduto da indústria de moagem úmida do milho sendo um substrato de baixo custo e disponível em larga escala. No processamento em via

úmida, a maceração do milho acontece após a limpeza e secagem do mesmo e esta água utilizada na maceração segue para a estação de tratamento apresentando valores médios de DQO de 14.000 mg L^{-1} e DBO de cerca de 11.000 mg L^{-1} (LOSS et al. 2009). O processamento desta farinha biju está exemplificado na Figura 1:

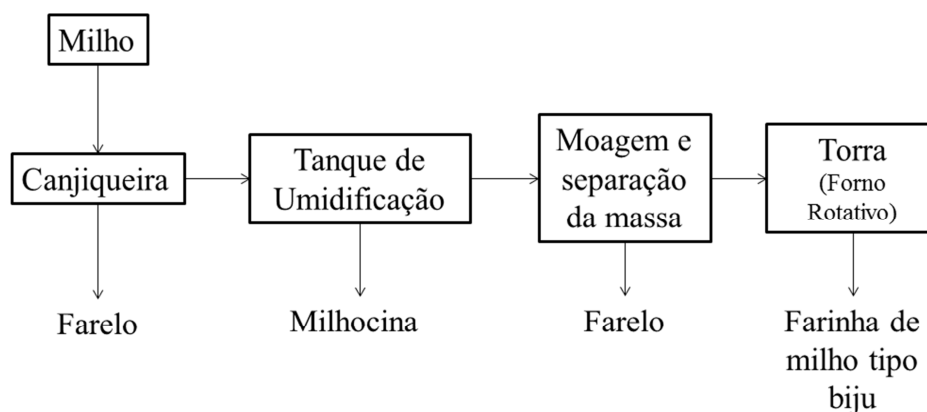


Figura 1: Fluxograma da obtenção da farinha de milho biju e subprodutos gerados.
Fonte: adaptado de Alessi et al. (2009)

As características físico-químicas da milhocina proveniente da produção de farinha de milho biju podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características físico-químicas da milhocina.

Parâmetros analíticos (mg L^{-1})	Milhocina
Sólidos totais	7819
Nitrogênio Total	1026
Açúcares	1000
Gordura	8,0
DQO*	14670
pH**	4,5

Fonte: Loss et al. (2009), * $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, ** adimensional.

Diferente da milhocina proveniente do processo de produção de farinha biju (Tabela 1) a milhocina proveniente da produção industrial de amido de milho possui sólidos solúveis que podem representar cerca de 40-50 % (m m^{-1}) do seu peso seco, em função do processo industrial de alta tecnologia que inclui a concentração desse líquido, também conhecido como *Corn Steep Liquor*. Independente da origem da milhocina, sua composição compreende uma mistura de açúcares redutores, dos quais glucose e frutose são predominantes, aminoácidos,

em sua maior parte na forma de aminoácidos livres, além de minerais, vitaminas e outros nutrientes elementares, sendo uma excelente fonte de nutrientes para os micro-organismos e que podem apresentar influência na produção de etanol (AMARTEY; JEFFRIES, 1994; GAO et al., 2011). Quanto aos aminoácidos presentes, os principais são prolina, cisteína, ácido aspártico e ácido glutâmico. Em relação aos elementos potássio, fósforo, enxofre, sódio e silício, sua composição depende fortemente dos processos de tratamento do milho (CHOI et al., 2013). A milhocina possui baixo custo e está amplamente disponível no mercado, além de ser uma rica fonte de nitrogênio e nutrientes para a maioria dos micro-organismos. É um produto agrícola renovável e economicamente viável utilizado com sucesso em inúmeros processos fermentativos e também como matéria prima na indústria farmacêutica (PAREKH et al., 1999; ALVIM et al., 2002; EDWINOLIVER et al., 2009; GAO et al., 2011).

A milhocina, em particular, constitui uma alternativa rentável para substituir os suplementos amplamente utilizados em processos fermentativos, como a peptona e o extrato de levedura, além de possuir vantagem para aplicação industrial se comparada a estes suplementos de alto custo; a milhocina também apresentou bons resultados para a substituição da peptona na suplementação de soro de leite utilizado em bioprocessos (AGARWAL et al., 2008; SILVA et al., 2010). A suplementação com baixos níveis de milhocina também atende às necessidades nutricionais compatíveis com o crescimento e fermentação de alto desempenho, de micro-organismos dos gêneros *Zymomonas*, *Streptomyces*, *Clostridium* e *Saccharomyces*, por exemplo, podendo diminuir os custos com adjuvantes nutricionais em fermentações de larga escala (LAWFORD; ROUSSEAU, 1997; AZEREDO et al., 2006; LAU et al., 2010; MADDIPATI et al., 2011). Além da suplementação, muitos estudos são feitos para utilização da milhocina na obtenção de produtos de maior valor agregado, como ácido succínico, enzimas, butanodiol, acetoína, acetona, butanol e etanol (CHOI et al., 2013; XI et al., 2013; YANG, et al., 2013).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias do Milho (ABIMILHO, 2013) cerca de 2,4 milhões de toneladas do milho produzido em 2013 foram utilizadas no consumo industrial em moagem úmida, contra 2,2 milhões de toneladas utilizadas industrialmente na moagem a seco e 1,02 milhões de toneladas utilizadas para o consumo humano “*in natura*”. Este fato confirma a grande geração da milhocina, visto que para cada quilograma de milho processado em via úmida utiliza-se um litro de água, aproximadamente, o que implica na necessidade de buscar novas alternativas para este subproduto.

3.1.2. Soro de leite

O soro de leite é o subproduto líquido obtido quando a caseína e gordura são separadas a partir da coagulação do leite (FRIGON et al., 2009). Trata-se do principal subproduto gerado na produção de queijos não só pela elevada carga orgânica como pelo grande volume, relacionado com a produtividade de cada tipo de queijo e também com o tipo de leite processado (CARVALHO et al., 2013). De maneira geral, são gerados cerca de nove litros de soro de leite para cada quilograma de queijo produzido. Este soro pode ser encontrado na forma de soro doce, com um pH de pelo menos 5,6, originado na produção de queijos por coagulação enzimática (por coalho), e soro de leite ácido, com um pH máximo de 5,1 obtido a partir da fabricação de queijos de coagulação ácida (ONWULATA; HUTH, 2009), os quais possuem pequenas diferenças em termos de composição, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Composição do soro de leite doce e ácido.

Parâmetros Analíticos (g 100 mL ⁻¹ , base úmida)	Soro Doce	Soro Ácido
Sólidos totais (ST)	6,4	6,2
Proteína	0,8	0,75
Gordura	0,5	0,04
Lactose	4,6	4,2
Cinzas	0,5	0,8
Ácido láctico	0,05	0,4

Fonte: Antunes (2003).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2012), a produção brasileira de queijos em 2012 foi de 46.200 toneladas, o que equivale à geração de aproximadamente 415 mil toneladas de soro de leite; em nível mundial, a produção de queijos no mesmo ano foi de 20 milhões de toneladas. Além do grande volume gerado, este subproduto possui uma alta carga poluente, sendo de risco considerável para a eutrofização em águas receptoras, devido ao teor nitrogênio total e fósforo presentes no mesmo representando um problema ambiental significativo. Apresenta também alta carga orgânica, com valores de DBO e DQO entre 30-50.000 mg L⁻¹ e 60-100.000 mg L⁻¹, respectivamente, atribuídos ao alto teor de lactose no soro (SISO, 1996; GELEGENIS et al., 2007; PRAZERES et al., 2012).

Por outro lado, o soro retém alguns nutrientes do leite, incluindo proteínas, lipídeos, lactose, vitaminas e minerais de grande potencial para a obtenção de produtos comercializáveis, o que desafia a indústria a enfrentar o soro como uma matéria-prima e não apenas como um resíduo (GUIMARÃES et al., 2010). A composição química, em seu peso seco, consiste principalmente de lactose, 70-75 % e proteínas solúveis, 10-15 % (FRIGON et al., 2009). Considerando a sua composição em carbono e nitrogênio e fósforo, estes componentes são encontrados na proporção aproximada de 200:3,5:1, o que, em princípio, faz com que o mesmo possa ser considerado uma fonte deficiente de nitrogênio para processos biológicos (PRAZERES et al., 2012).

Segundo Gänzle et al. (2008) existe um esforço contínuo para encontrar novos usos para o soro de leite que está diretamente ligado à descoberta de novos usos para lactose, o principal componente do soro, visto que as normas de descargas ambientais estão mais difíceis de serem cumpridas. As autoridades estão se tornando mais vigilantes em todas as regiões, e os tratamentos estão cada vez mais complexos e caros. O processo de fermentação de lactose reduz fortemente a carga poluente do soro de leite, contribuindo para minimizar problemas ambientais causados pelo excesso de soro gerado (SILVA et al., 2010).

A conversão da lactose presente no soro em etanol combustível, pode não apresentar vantagens econômicas se comparada com os processos atualmente estabelecidos, utilizando cana de açúcar ou milho. Porém visto que o soro é um subproduto, o uso da sua lactose representa vantagem sob outros aspectos por não se tratar de um alimento humano. A fermentação de soro de leite deve ser rápida para maximizar a produtividade de etanol do processo, mas junto a isso é fundamental a minimização da concentração de açúcar residual no efluente, uma vez que o tratamento de resíduos também faz parte dos objetivos do processo. Além do etanol combustível, o etanol de soro de leite pode ser adequado para o uso na indústria alimentícia, de bebidas, cosmética e farmacêutica, visto que o mesmo pode ser considerado potável; outras aplicações para o soro de leite em bioprocessos são a obtenção de ácidos orgânicos, glicerol, aminoácidos, goma xantana e até mesmo de compostos voláteis (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010).

Hidrólise da Lactose

A lactose (α -lactose) ou β -D-Galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucopiranosose (IUPAC, 1969) (Figura 2) é um dissacarídeo que compreende uma molécula de glucose ligada a uma molécula de galactose. Uma característica distintiva da lactose é sua manifestação em

diferentes estados dependentes da temperatura e das inter-relações físico-químicas estando presente em soluções aquosas nas formas α e β (GÄNZLE et al., 2008).

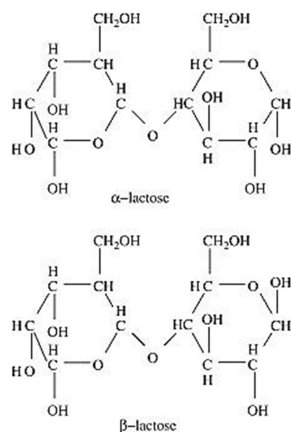


Figura 2: Lactose em suas conformações α e β .
Fonte: Gänzle et al. (2008)

A enzima responsável pela hidrólise da lactose (Figura 3) é a β -galactosidase, comumente chamada de lactase.

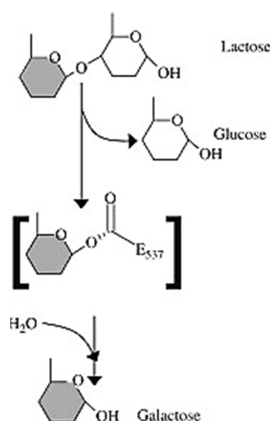


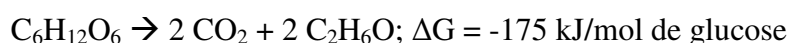
Figura 3: Esquema da hidrólise da lactose catalisada pela enzima β -d-galactosidase.
Fonte: Gänzle et al. (2008)

A lactase pode ser obtida a partir de micro-organismos, plantas e animais, e suas propriedades variam de acordo com a sua fonte, sendo que o uso de lactase de origem microbiana oferece várias vantagens sobre as demais. As fontes microbianas mais utilizadas para essa finalidade são *Kluyveromyces* sp e *Aspergillus* sp (PANESAR et al., 2007b).

3.2. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

De maneira geral podemos considerar como fermentação todo processo em que micro-organismos atuam sobre substratos orgânicos originando novos produtos, como: alimentos modificados, álcoois, solventes e ácidos orgânicos. Inúmeros produtos naturais ou seus derivados, de natureza orgânica, podem ser a base ou substrato para processos fermentativos (REGULY, 1996). No Brasil a via fermentativa é a maneira mais importante para obtenção de etanol, devido ao grande número de matérias-primas existentes em todo o país que podem ser utilizadas como substratos (LIMA et al., 2001).

A fermentação alcoólica é o processo onde os compostos orgânicos, principalmente a glucose ($C_6H_{12}O_6$), atuam como geradores e receptores de elétrons, gerando energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) e formando etanol (C_2H_6O) e dióxido de carbono (CO_2). A quebra anaeróbia da glucose é o mecanismo biológico mais antigo para obtenção de energia a partir de moléculas orgânicas combustíveis. Estas reações catabólicas acontecem com uma grande diminuição na energia livre de Gibbs (ΔG) e um valor negativo para ΔG corresponde à liberação de energia pelo sistema, resultando na produção de calor. Um balanço energético simplificado para a equação do catabolismo anaeróbico da glucose pela *Saccharomyces cerevisiae* pode ser descrito da seguinte forma (LENHINGER et al., 1986; VOLPE, 1997; STRYER et al., 2002; ANTONI et al., 2007):



O carbono, principal componente utilizado para produção de etanol, é utilizado também na formação de biomassa e dos coprodutos da fermentação (EL-MANSI et al., 2006). Muitos micro-organismos têm sido estudados para a produção de etanol por fermentação alcoólica, porém a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ainda permanece como a espécie de primeira linha, enquanto a bactéria *Zymomonas mobilis* também tem sido intensamente estudada e é considerada por alguns pesquisadores como potencial substituta da *S. cerevisiae* na produção de etanol. Outro micro-organismo em potencial para produção de etanol é a bactéria *Clostridium thermocellum* pela sua capacidade de converter resíduos celulósicos e celulose cristalina diretamente em etanol (EL-MANSI et al., 2006; BAI et al., 2008).

O processo fermentativo pode ocorrer de diferentes formas, entre elas: contínuo, semicontínuo e descontínuo. A fermentação descontínua é a mais utilizada e corresponde à inoculação de um meio com nutrientes em fermentador de modo que a fermentação ocorra

sobre condições ótimas, sem que nada seja adicionado durante o processo. O estudo cinético de um processo fermentativo consiste na análise da evolução da concentração de um ou mais componentes do sistema em função do tempo de fermentação podendo-se definir a velocidade com que o substrato será convertido em etanol, a concentração de biomassa produzida, a produtividade em etanol, a eficiência da fermentação e a velocidade de crescimento específico da levedura ($\mu_{\text{máx}}$) (LIMA et al., 2001; SCHMIDELL et al., 2001) fatores estes importantes para determinar a viabilidade do processo fermentativo.

Na fermentação descontínua a cinética de fermentação apresenta três fases características: fase preliminar, ou fase *lag*, correspondente a multiplicação celular no mosto e possui pequeno desprendimento de CO₂. Fase tumultuosa, ou fase *log*, onde acontece maior liberação de CO₂, aumento exponencial de etanol e diminuição da concentração de açúcar, e por fim, a fase estacionária onde cessa a liberação de CO₂ e a concentração de açúcares fermentescíveis é mínima. Estas três fases podem ser observadas também na construção da curva de liberação de CO₂ em função do tempo (REGULY et al., 1998; LIMA et al., 2001; SCHMIDELL et al., 2001).

Após a fermentação o mosto fermentado passa pelo processo de clarificação, para retirada das células em suspensão (biomassa) e de destilação para obtenção do etanol na sua forma pura. A destilação é o processo de separação de fases de uma mistura homogênea de líquidos, utilizado em inúmeros processos industriais, envolvendo a evaporação parcial de um líquido seguida pela total condensação do vapor, neste caso, correspondente ao etanol (STICHLMAIR; FAIR, 1998; SCHMIDELL et al., 2001).

3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras fazem parte do grupo dos micro-organismos protistas de células eucarióticas, e juntamente com os mofos, correspondem a um subnível dos fungos (REGULY, 1996). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é, de modo geral, considerada um micro-organismo seguro para uso em alimentos (GRAS), potente na utilização para a produção industrial de etanol podendo fermentar a glucose e outras hexoses presentes no meio fermentativo de forma eficiente, além de apresentar boa tolerância à presença de etanol, até 20 % (v v⁻¹) (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000; EL-MANSI et al., 2006; ANTONI et al. 2007). O uso de leveduras de panificação no Brasil em usinas de produção de álcool é bastante comum devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade (BASSO et al., 2008).

A falta de completo conhecimento da via metabólica original da *S. cerevisiae* não permite a produção de melhorias significativas na produção de etanol por intermédio desta levedura. A principal via metabólica envolvida na fermentação do etanol é a glicólise, através da qual uma molécula de glucose é metabolizada, e duas moléculas de piruvato são produzidas (MADIGAN; BROCK, 2009). Diversas cepas de *S. cerevisiae* prontamente fermentam, além da glucose, os monossacarídeos manose e frutose, e os dissacarídeos sacarose e maltose pela via Emden-Meyerhof, e o dissacarídeo lactose não é consumido por esta levedura. O monossacarídeo galactose, por sua vez, é fermentado por uma combinação da via Leloir, onde a galactose será convertida a glucose-6-fosfato, e da glicólise. A concentração de glucose geralmente conduzirá a uma completa repressão do metabolismo da galactose impedindo assim o consumo simultâneo de glucose e galactose (LELOIR, 1951; VAN MARIS et al., 2006). O catabolismo da glucose e da galactose pela *S. cerevisiae* pode ser observado na figura 4.

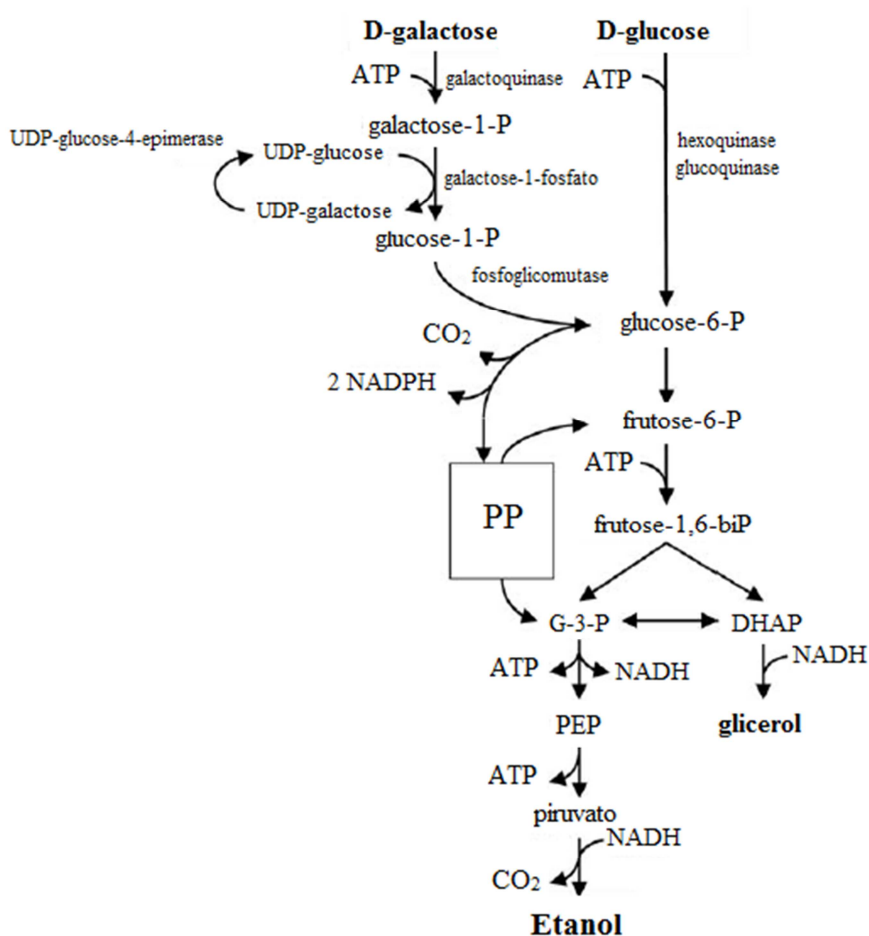


Figura 4: Catabolismo da glucose e da galactose pela *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte: adaptado de Van Maris et al. (2006).

Nota: ATP - adenosina trifosfato; NADPH nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; PP - via pentose fosfato; DHAP - fosfato de diidroxiacetona; PEP- fosfoenolpiruvato; NADH - dinucleótido de nicotinamida e adenina.

Os carboidratos, de grande importância para qualquer célula viva, compreendem a principal matéria-prima dos processos fermentativos por *S. cerevisiae*. O nitrogênio também é essencial para o metabolismo da levedura, sendo o segundo elemento mais utilizado durante o seu crescimento. O teor de nitrogênio afeta diretamente a cinética da fermentação; um meio deficiente de nitrogênio resulta em uma fermentação mais lenta (REGULY, 1996; ARIAS-GIL et al., 2007), sendo que outros fatores nutricionais importantes para a *S. cerevisiae* são as vitaminas, minerais, e os compostos fosfatados (SPIGNO et al., 2009). Quanto as condições físicas ideais para a *S. cerevisiae*, deve-se considerar a faixa de pH de atuação da levedura para produção de etanol, de 4,0 a 6,0, apresentando melhores resultados na faixa de 4,0 a 4,5, e a temperatura na faixa de 20 a 35 °C, (REGULY, 1998) sendo que os melhores resultados para obtenção de etanol se encontra em temperaturas próximas a 30 °C (ALDIGUIER et al., 2004).

3.2.2. Controle de Contaminantes

Na fermentação alcoólica, principalmente na produção industrial, deve-se considerar a contaminação bacteriana como um dos problemas mais comuns, causando danos ao processo e redução no rendimento e na produtividade da fermentação (MENECHIN et al., 2010; MUTHAIYAN et al., 2011). A contaminação por gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus* está sempre presente comprometendo o rendimento do processo. A presença de bactérias no mosto pode resultar na formação de compostos secundários, diminuindo a produção de etanol, pois competem com a levedura pelos nutrientes utilizados para seu crescimento, dificultam a conversão do carbono em etanol, reduzem o pH do meio e criam um ambiente desfavorável para muitos outros organismos, incluindo as leveduras. Entre os compostos secundários liberados no meio, com efeito inibitório para a *Saccharomyces cerevisiae*, estão os ácidos orgânicos: lático e acético. A contaminação com produção de ácido lático considera-se a nível industrial, a principal causa da floculação da levedura na fermentação alcoólica além de gerar uma perda de produção estimada entre 2 e 22 % (LIMA et al., 2001; SKINEER et al., 2004; NARENDRANATH; POWER, 2005; BECKNER et al., 2011; CAETANO et al., 2011).

Diversos métodos são utilizados para combate destes contaminantes, entre eles estão os antissépticos, como sulfitos, peróxido de hidrogênio e ureia; antibióticos, tais como a penicilina, virginamicina e a monensina e também podem ser usados métodos térmicos, tais como pasteurização e esterilização. Além destes, já existem estudos sobre o uso de compostos naturais para redução da carga microbiana (VOLPE, 1996; CHANG et al., 1997;

NARENDRANATH et al., 2000; SKINEER et al., 2004; MUTHAIYAN et al., 2011; COMPART et al., 2013). Os antissépticos criam um ambiente favorável para as leveduras e desfavorável para outros micro-organismos, entretanto, não são largamente utilizados e possuem restrições devido aos resíduos nos destilados. Os antibióticos possuem ação bacteriostática, são considerados econômicos, pois não exigem modificações nas técnicas e equipamentos além da ocorrência de fermentações mais puras e regulares e da vantagem da sua inativação durante a destilação. A escolha do antibiótico utilizado dependerá do seu custo no processo e normalmente são utilizados antibióticos efetivos contra bactérias Gram+ em concentração inferior a que afeta a levedura (PRESSMAN, 1976; HYNES et al., 1997; LIMA et al., 2001). A implementação de antimicrobianos biológicos tem sido apontada como alternativa que pode gerar um impacto positivo tanto na melhoria da fermentação quanto no valor econômico da produção de bioetanol (MUTHAIYAN et al., 2011).

3.3. BIOETANOL E ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Pesquisas nas áreas de biomassa e bioenergia ganham destaque reconhecendo que o petróleo mundial pertence a uma fonte finita e que seu esgotamento está ocorrendo muito mais rápido do que o previsto, além da degradação ambiental decorrente da geração de gases de efeito estufa, bem como de vazamentos acidentais. Inúmeras alternativas de energias renováveis, como o metanol, hidrogênio e o etanol, tornam-se importantes para substituição dos combustíveis fósseis, mas ainda há necessidade do desenvolvimento de tecnologias para reduções no custo de produção desses combustíveis de fontes renováveis (ZANIN et al., 2000; CARDONA; SÁNCHEZ, 2001; BAI et al., 2008; BEHERA et al., 2012). O bioetanol, sendo um produto proveniente de fontes renováveis de carbono e não de combustíveis fósseis, é um importante meio para a diminuição dos impactos ambientais negativos decorrentes dos poluentes gerados pela utilização dos combustíveis fósseis, além de reduzir a dependência das fontes de petróleo convencionais (CARDONA; SÁNCHEZ, 2001; MADIGAN; BROCK, 2009).

No Brasil foi criado o Proálcool, Programa Nacional do Álcool, após o primeiro choque do petróleo em 1974. Teve seu início em 1975 a fim de estimular a substituição da gasolina por álcool da cana no uso em automóveis e intensificar o uso de misturas de etanol e gasolina nos combustíveis para carros (SOCCOL et al., 2005) e desde então o consumo de etanol combustível está cada vez maior. A evolução dos biocombustíveis no Brasil pode ser observada na Figura 5:

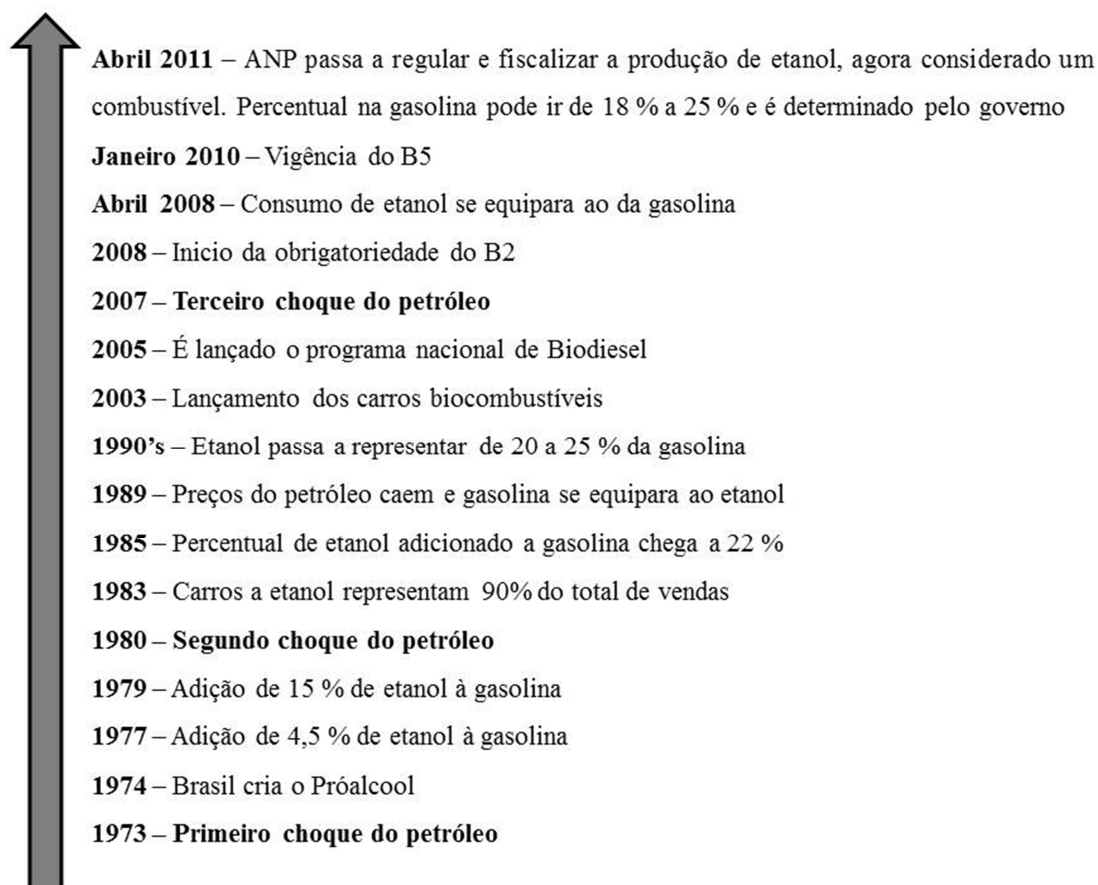


Figura 5: Evolução dos biocombustíveis no Brasil.

Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP (2014).

Nota: B2 - Obrigatoriedade de 2 % de Biodiesel no Diesel; B5 – Obrigatoriedade de 5 % de Biodiesel no Diesel.

O etanol de cana já é bem conhecido como um biocombustível eficiente e renovável promovendo, no Brasil, o desenvolvimento rural e a diversificação das fontes de energia. O etanol da cana também é responsável por reduzir a dependência das importações de petróleo e a geração de poluentes, sendo um substituto versátil para a gasolina, principalmente após a utilização da tecnologia *flex* dos veículos automotores. Além do uso como combustível o bioetanol, proveniente da agricultura e de resíduos, pode ser utilizado também na indústria farmacêutica e de perfumaria (ZANIN et al., 2000; COELHO et al., 2006; IBETO et al., 2011). O Brasil, juntamente com os Estados Unidos, é pioneiro na produção de bioetanol (USDA, 2014); segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2014), aproximadamente 45 % da energia e 18 % dos combustíveis consumidos no Brasil são de fontes renováveis.

A matéria prima para produção de bioetanol pode variar muito de acordo com sua origem e composição. Se for proveniente de materiais ricos em açúcar, principalmente de culturas agrícolas típicas (amido, cana de açúcar, beterraba, milho e mandioca, por exemplo),

resulta em etanol classificado como de primeira geração. Porém, a produção deste tipo de bioetanol é controversa, pois o uso de água e recursos agrícolas para produção de combustível ao invés da produção de alimentos pode gerar impactos no uso direto e indireto da terra devido ao cultivo de matéria-prima para a produção de biocombustíveis. Tendo em vista a necessidade de evitar esse impacto, surge o etanol de segunda geração, que deve ser produzido a partir de fontes alternativas, como as matérias-primas e tecnologias de refino e os resíduos agroindustriais, reduzindo o impacto na produção de alimentos e tornando-se uma forma de valorização de subprodutos. Apesar de parecer promissora, a tecnologia de produção de biocombustíveis de segunda geração ainda é muito complexa e necessita de intensos estudos científicos ao longo das próximas décadas. O custo deste tipo de combustível é um fator limitante para o uso em escala comercial, sendo que se pode assumir que esta tecnologia apenas chegará às destilarias após provar sua viabilidade técnica e econômica, sendo ainda necessária a produção responsável de etanol de primeira geração (LEITE et al., 2008; AMORIM et al., 2011; HARVEY; PILGRIM, 2011; RAMÍREZ; TRIANA, 2011).

Os principais alvos de pesquisa sobre processos de fermentação alcoólica são altas produtividades a partir de substratos baratos e renováveis reduzindo a demanda de energia. Para isto, o desenvolvimento de tecnologias baratas para produção de bioetanol tem sido destaque em muitas universidades, centros de pesquisas, empresas privadas e diferentes governos. Neste âmbito o Brasil está entre os países mais avançados do mundo em segurança energética e sustentabilidade atingindo altos níveis de energia renovável e ecologicamente sustentável (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007; CAZETTA et al., 2007; DODIĆ et al., 2009; CHOI et al., 2010; HARVEY; PILGRIM et al., 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

A água de maceração de milho utilizada neste estudo foi cedida por uma fábrica de Farinha de milho do tipo biju da cidade de Irati, Paraná, Brasil. A milhocina foi coletada diretamente do tanque de maceração após 48 horas de imersão do milho na mesma.

A maceração ocorre basicamente em duas etapas, sendo que numa primeira a canjica é adicionada aos tanques e adiciona-se água que fica em contato com os grãos por aproximadamente três horas, com o propósito de entumescimento do grão de milho, o qual aumentará de volume preenchendo todo tanque. Em seguida, uma pequena parte dessa água é escoada (o restante fica retida no grão de milho). Em uma segunda etapa de maceração completa-se novamente o tanque com água que permanecerá em contato com o milho por 48 horas e depois é descartada. Este processo utiliza no total aproximadamente um litro de água para cada quilograma de milho. O resíduo da segunda maceração consiste na milhocina que foi utilizado neste trabalho.

O soro de leite do tipo doce, proveniente da produção de queijo tipo Camembert, foi disponibilizado pela Escola Tecnológica de Leite e Queijos dos Campos Gerais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa, Paraná, Brasil). Os subprodutos foram acondicionados em frascos de polímero PET (politereftalato de etileno) e armazenados a -18 °C em freezer (Metalfrio, São Paulo, Brasil) até sua utilização.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Caracterização físico-química dos subprodutos

A composição físico-química dos subprodutos foi determinada através das seguintes análises: pH; fração sólida, por secagem em estufa e DQO segundo as metodologias propostas pela Associação Americana de Saúde Pública (APHA, 1998). Lipídios foram determinados por extração através do método de Bligh-Dyer (1959). Proteínas e nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (AOAC 2000); para determinação de proteínas utilizou-se o fator de correção de 6,25. O teor de cinzas foi por incineração em mufla, ambos seguindo os Métodos Oficiais de Análises da AOAC (2000). O perfil de açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.2.1.1. Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

Perfil de açúcares e ácidos orgânicos

A determinação de açúcares e ácidos orgânicos foi realizada por CLAE. Foi utilizado um sistema cromatográfico equipado com uma bomba quaternária (Waters 2695 Alliance, Milford MA, USA), degaseificador e um auto-injetor acoplado a um detector de arranjo de diodos (Waters 2998, Milford, MA, USA) seguido do detector de índice de refração (Waters RI 2414, Milford MA, USA). Os dados cromatográficos foram obtidos com o *software* Empower® 2. As amostras previamente preparadas foram filtradas em filtro de seringa 0,22µm e analisadas em coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300×7.8 mm) precedida por pré-coluna catiônica Cation-H (Bio-Rad) em condição isocrática utilizando como eluente uma solução 3,0 mM de ácido sulfúrico preparada em água ultra-pura (Milli-Q Integral®, Millipore®, São Paulo SP, Brasil) e filtrada em filtro de nylon de 45µm. O volume de injeção foi de 10 µL a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. A coluna e o detector de índice de refração foram mantidos a temperatura de 30 °C. As amostras analisadas foram comparadas com o tempo de retenção dos padrões de referência.

Perfil de aminoácidos

Os aminoácidos foram determinados por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) através de sistema cromatográfico (Alliance 2695, Waters, Milford, MA, USA) equipado com detector multi fluorescência (Waters 2475, Milford MA, USA) e coluna Pico Tag (3,9 X 150 mm). A análise foi realizada segundo metodologia AccQ TagTM utilizando kit completo da Waters.

4.2.2. Hidrólise do Soro de Leite

O soro de leite passou por uma fase prévia de hidrólise da lactose utilizando-se a enzima β-Galactosidase (Granolab do Brasil S.A, Curitiba, Paraná, Brasil).

A hidrólise do soro foi conduzida utilizando os parâmetros ótimos de pH e temperatura de atuação da enzima, de 6,5 e 40 °C, respectivamente, encontrados por Rossetto et al (2012) para soro de leite. A eficiência da hidrólise foi avaliada a partir do teor de glucose antes e depois da hidrólise pelo método enzimático de GOD (glucose PP, Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil) realizado segundo Dahlquist (1961). Os resultados obtidos por esta metodologia foram confirmados pela análise cromatográfica.

4.2.3. Delineamento experimental

Foram realizados testes preliminares (dados não mostrados) para a definição do planejamento de experimentos a ser utilizado e optou-se pelo planejamento de misturas binárias do tipo simplex centróide (BARROS et al., 2001). O planejamento foi composto por 5 diferentes misturas e realizando repetições dos ensaios com componentes puros totalizaram-se 8 experimentos, como exposto na Tabela 3. As frações de soro e milhocina correspondem as variáveis independentes e a resposta obtida para o planejamento, a variável dependente, é a eficiência da fermentação (N_b).

Tabela 3: Delineamento experimental do tipo simplex centróide para mistura binária.

Mistura	Fração de cada componente na mistura		Total
	Soro (X_1)	Milhocina (X_2)	
1	1,00	0,00	1,00
2	1,00	0,00	1,00
3	1,00	0,00	1,00
4	0,00	1,00	1,00
5	0,00	1,00	1,00
6	0,50	0,50	1,00
7	0,75	0,25	1,00
8	0,25	0,75	1,00

O processo fermentativo ocorreu de maneira descontínua e o tempo de fermentação foi determinado através de pesagens do fermentador, em intervalos de tempo pré-determinados de trinta minutos, que indicam a perda de massa resultante do CO_2 liberado (ROGER et al., 2002, ALBERTI et al., 2011).

Os experimentos foram realizados em fermentadores anaeróbios com 50 mL de mosto previamente pasteurizado (60 °C durante 30 minutos). O teor de açúcares fermentescíveis foi ajustado para aproximadamente 100 g L⁻¹ utilizando-se glucose. Utilizou-se um inóculo de 6 g L⁻¹ de levedura *S. cerevisiae* de panificação (Levedura seca ativa, Itaiquara, São Paulo, Brasil) adicionado diretamente ao mosto em temperatura ambiente. Ao fim da fermentação, fez-se o uso de centrífuga para a recuperação dos produtos da fermentação e remoção da levedura (REGULY, 2000), procedimento este citado na obtenção da biomassa seca (item 4.2.5). Os parâmetros iniciais e finais do mosto, de teores de ácidos orgânicos e de açúcares, foram determinados por CLAE. Também foram feitas análises de densidade e etanol conforme metodologia exposta no (item 4.2.4).

4.2.4. Análise do etanol

Foram retiradas 25 mL de amostra dos fermentadores e destiladas em micro destilador TE-012 (TECNAL, São Paulo, Brasil). Uma alíquota de 3 mL da amostra destilada foi analisada em densímetro digital (DMA 4500 M da Anton Paar, Graz, Áustria) que fornece o teor de etanol (% v v⁻¹) e a densidade (g cm⁻³). O teor de etanol foi utilizado para o cálculo da eficiência da fermentação e demais cálculos da cinética fermentativa.

4.2.5. Determinação da biomassa seca

Amostras dos fermentadores foram centrifugadas em centrífuga Rotina 420R, (Hettich, Tuttlingen, Alemanha) a 12000 g durante 10 min a 10 °C. O sobrenadante (fermentado) foi retirado e sobre a biomassa decantada adicionou-se água destilada, para lavar o precipitado retirando sólidos solúveis que podem provocar possíveis erros na análise. Agitou-se formando novamente uma suspensão e repetiu-se à centrifugação nas mesmas condições. A biomassa então foi transferida para o cadinho previamente calcinado (Mufla Jung 2810, Jung, Blumenau SC, Brasil) e pesado; quando necessário utilizou-se água destilada para auxiliar na retirada do precipitado dos tubos da centrífuga, evitando possíveis perdas. Em seguida, os cadinhos foram mantidos em estufa (ODONTOBRAS EL-1.4, Ribeirão Preto, SP, Brasil) a 105 °C por 24 horas, retirados e acondicionados em dessecador até resfriamento à temperatura ambiente, e pesados.

4.2.6. Cinética Fermentativa

As misturas, provenientes do planejamento, que apresentaram os melhores resultados em eficiência da fermentação (N_b), foram utilizadas para a determinação dos parâmetros da cinética fermentativa. O tempo de fermentação foi fixado em 27 horas, sendo realizadas pesagens dos fermentadores a cada trinta minutos e retiradas alíquotas de fermentados no intervalo de 4,5 horas, totalizando sete pontos para a cinética. Para determinação dos parâmetros no ponto inicial da fermentação foram retiradas alíquotas assim que o meio foi inoculado e homogeneizado. Os parâmetros da cinética fermentativa foram calculados conforme o descrito por Ribeiro e Horii (1999):

- Concentração celular produzida, segundo a Equação 1:

$$X = X_f - X_0 \quad (1)$$

X = concentração celular produzida (g matéria-seca L^{-1});

X_f = concentração celular final (g matéria-seca L^{-1});

X_0 = concentração celular inicial (g matéria-seca L^{-1}).

A concentração celular foi determinada conforme a metodologia de determinação de biomassa seca, exposta no item 4.2.5.

- Açúcar consumido, Equação 2:

$$S = -(S_f - S_0) \quad (2)$$

S = açúcar consumido (g L^{-1});

S_f = concentração final de açúcares (g L^{-1});

S_0 = concentração inicial de açúcares (g L^{-1}).

- Fator de conversão de substrato em biomassa, segundo a Equação 3:

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{X}{S} \quad (3)$$

$Y_{\frac{X}{S}}$ = Fator de conversão de substrato em biomassa.

X = Biomassa produzida (g L^{-1});

S = Substrato consumido (g L^{-1}).

- Etanol produzido, Equação 4:

$$P = P_f - P_i \quad (4)$$

P = etanol produzido (g L^{-1});

P_f = concentração de etanol final (g L^{-1});

P_i = concentração de etanol inicial (g L^{-1}).

- Fator de conversão de substrato em etanol, Equação 5:

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{P}{S} \quad (5)$$

$Y_{\frac{P}{S}}$ = Fator de conversão de substrato em etanol.

P = etanol produzido (g L⁻¹);

S = substrato consumido (g L⁻¹).

- Produtividade em etanol, Equação 6:

$$PR = \frac{P}{t} \quad (6)$$

PR = produtividade de etanol (g L⁻¹ h⁻¹),

t = tempo de fermentação (h).

Eficiência de fermentação $N_b(\%)$, com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac (51,1 g etanol → 100g glucose), Equação 7:

$$N_{b(\%)} = \frac{Y_{\frac{P}{S}}}{0,511} * 100 \quad (7)$$

Eficiência de processo $N_p(\%)$ com base na concentração inicial de açúcar S_0 , Equação 8:

$$N_{p(\%)} = \frac{P_f}{0,511 * S_0} * 100 \quad (8)$$

- Determinação da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$):

As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram determinadas por intermédio da construção do gráfico $\ln \frac{x}{x_0}$ em função do tempo, obtendo-se o valor de $\mu_{\text{máx}}$ pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento, através da equação 9 (STROPPIA et al., 2009).

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu_{m\acute{a}x} * t + b \quad (9)$$

$\ln \frac{x}{x_0}$ = logaritmo neperiano da concentração de leveduras na fase exponencial de crescimento;

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

t = tempo (h);

b = coeficiente linear da equação do logaritmo da concentração de leveduras em função do tempo de fermentação, na fase exponencial de crescimento.

Com estes dados foi construída a curva de cinética para o processo fermentativo em estudo, através de um modelo matemático não estruturado que considera quatro variáveis: concentração de células (biomassa), concentração de substrato, concentração de produto, e a taxa de evolução de CO_2 (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

4.2.7. Efeito da adição de diferentes fontes de açúcares ao mosto

Com a finalidade de se avaliar o potencial dos subprodutos como mosto para fermentação alcoólica em condições próximas a produção industrial, repetiu-se os experimentos que forneceram melhores resultados para Eficiência da Fermentação (N_b %) utilizando diferentes fontes de açúcares para substituir o uso de glucose. O mosto foi suplementado com o melaço de cana, comumente utilizado nas usinas sucroalcooleiras para produção de etanol, e com açúcar mascavo. A composição em açúcares do melaço da cana e do açúcar mascavo foi determinada através de CLAE. Os fermentados foram analisados em função do açúcar e nitrogênio consumidos, da acidez produzida além dos parâmetros de eficiência e produtividade. Paralelamente a estes experimentos substituiu-se o mosto (subprodutos) por água para avaliar o potencial dos nutrientes presentes nos subprodutos.

4.2.8. Uso de antibióticos para controle da contaminação microbiana

Um dos principais problemas observados na produção de bioetanol é a contaminação bacteriana, principalmente por bactérias produtoras de ácido ltico. Desta forma, foram realizados testes com diferentes antibióticos de uso em fermentação alcoólica fornecidos pela empresa Phibro *Ethanol Performance Group*® (Guarulhos, São Paulo, Brasil) avaliando-se a

eficiência do processo fermentativo (N_b %) e o teor de ácido láctico produzido durante a fermentação. Foram utilizados cinco diferentes antibióticos: um composto por virginamicina, outro por monensina sódica e os demais por uma combinação de antibióticos ionóforos e inertes. Todos foram previamente diluídos em etanol e adicionados ao mosto na concentração indicada pelo fornecedor de 5 mg L^{-1} , exceto para o composto virginamicina cuja concentração adicionada foi de 2 mg L^{-1} , seguindo dados encontrados na literatura (BISCHOFF et al., 2009). Todos os antibióticos foram aplicados aos mostos de melhor eficiência da fermentação, segundo o planejamento de experimentos, e os resultados foram comparados com os obtidos pelo mesmo mosto pasteurizado. Realizou-se a cinética completa do antibiótico com a melhor eficiência.

4.2.9. Análise Estatística

O delineamento experimental do tipo simplex centróide aplicado a uma mistura de dois componentes foi obtido através do *software* Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa OK, USA) para *Windows*. Dada a adequação do modelo, aplicou-se o método de otimização simultânea proposto por Derringer e Suich (1980), o qual utiliza a função de desejabilidade do experimento, neste caso maior eficiência da fermentação. Essa desejabilidade é dada através da equação do modelo aplicado (Equação 10), na qual Y é a resposta previsível, no caso a eficiência da fermentação, α_1 e α_2 , são os coeficientes de regressão linear e X_1 e X_2 , são as variáveis independentes (BRUNS et al., 2006) neste caso as frações de soro e milhocina na mistura.

$$Y = \alpha_1.X_1 + \alpha_2.X_2 \quad (10)$$

O mesmo *software* foi utilizado para avaliar os dados experimentais quanto à normalidade, segundo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$ dados considerados normais) e para os dados que não seguiram a distribuição normal, a transformação Box-Cox foi utilizada (Dados não mostrados). Avaliou-se também a homogeneidade de variância, utilizando-se o teste de Brown-Forsythe ($p > 0,05$ foi considerado como dado homogêneo), e então os dados paramétricos (normais e homogêneos) foram avaliados segundo análise de variância (ANOVA, p valor $< 0,05$ foi considerado significativo) seguida do teste de Fisher LSD para comparação de médias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição físico-química e compostos nitrogenados dos subprodutos

As características físico-químicas dos subprodutos, milhocina e soro de leite logo após sua coleta, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Características físico-químicas da milhocina e do soro de leite.

Parâmetro (g L ⁻¹)	Milhocina	Soro
pH*	4,30 ± 0,07	5,70 ± 0,05
Acidez (ácido láctico)	1,20 ± 0,10	0,49 ± 0,10
Sólidos Totais	20,80 ± 0,55	70,70 ± 0,56
Proteína	11,42 ± 1,13	8,58 ± 0,80
Cinzas	5,00 ± 0,10	5,45 ± 0,10
Lipídios	0,50 ± 0,11	4,43 ± 0,90
Açúcares	0,70 ± 0,15	48,52 ± 0,88
DQO	25,99 ± 1,02	97,59 ± 1,00

Nota: *adimensional

Loss et al. (2009) estudaram a milhocina proveniente da produção de farinha de milho do tipo biju, obtendo resultados semelhantes para os parâmetros físico-químicos avaliados no presente trabalho. Comumente os estudos científicos utilizam a milhocina proveniente do processo de fabricação de amido de milho comercial, a qual apresenta diferença na composição, visto que o teor de sólidos pode chegar a 50 % (MADDIPATI et al. 2011). Nesse processamento também ocorre adição de anidrido sulfuroso (SO₂) com a finalidade de auxiliar na liberação dos compostos solúveis do grão de milho; o SO₂ adicionado reage com a água formando ácido sulfuroso que juntamente com os ácidos orgânicos gerados por micro-organismos durante a maceração são responsáveis pelo baixo pH do subproduto (CHOI et al. 2013).

Embora a milhocina utilizada neste estudo não tenha sofrido a adição de SO₂, o pH permanece baixo devido a formação dos mesmos ácidos orgânicos pelos micro-organismos, fato comprovado pela grande quantidade de ácido láctico produzido por espécies de *Lactobacillus* durante a maceração do milho, mesmo em condições ácidas de pH (YANG et al. 2013). Embora deficiente em carboidratos, a milhocina é uma substância complexa que contém vários componentes nitrogenados, proteicos e não proteicos, sendo uma excelente

fonte de nitrogênio orgânico e de minerais tais como sódio e potássio (FONTES et al., 2008; GAO; YUAN, 2011; XI et al., 2013).

As características físico-químicas do soro de leite assim como a DQO estão de acordo com os valores encontrados por diversos autores para soro de leite doce (ANTUNES et al., 2003; SADDODUD et al., 2007; PRAZERES et al., 2012; YASMIN et al., 2013), sendo que variações nas características do soro de leite podem ser atribuídas a composição o leite e/ou diferentes técnicas de manipulação e processamento utilizadas pelas indústrias lácteas (ALSAED et al., 2013). A lactose corresponde ao componente de maior fração presente no soro de leite (considerando-se a fração sólida), e o teor de lipídios é relativamente baixo para todos os tipos de soro (GLASS; HEDRICK, 1977). Os elevados teores de proteína e açúcares são responsáveis pela alta carga poluente do soro de leite e também por dificultar o seu tratamento (GUIMARÃES et al., 2010). Em relação ao teor de cinzas presente no soro, mais de 50 % corresponde a NaCl e KCl (CHATZIPASCHALI; STAMATIS et al., 2012).

Devido ao alto teor de carboidratos, além das vitaminas, minerais e proteínas presentes, diversos processos biotecnológicos estão sendo desenvolvidos para o uso do soro de leite na obtenção de novos produtos. Além disso, as proteínas e peptídeos bioativos no soro estão sendo utilizados em produtos alimentares e na indústria farmacêutica, como por exemplo, na produção de enzimas como a protease (PANESAR et al., 2007a; GUIMARÃES et al., 2010; LADEIRA et al., 2012).

O conteúdo de nitrogênio, proteína e aminoácidos dos subprodutos (Tabela 5) foi analisado para avaliar o potencial dos mesmos como fonte de nitrogênio para a fermentação alcoólica, visto que o nitrogênio é um dos compostos mais utilizados pela levedura, sendo essencial para o seu crescimento.

Além dos componentes nitrogenados proteicos, ambos os subprodutos são ricos em nitrogênio amoniacal, o qual também é consumido pela levedura *S. cerevisiae*. A presença da amônia no meio pode também atrasar ou diminuir o consumo de vários aminoácidos, resultando num aumento geral do consumo de nitrogênio durante a fermentação (JIRANEK et al., 1995; VILANOVA et al., 2007; GAO; YUAN, 2011).

Tabela 5: Compostos nitrogenados presentes na milhocina e soro de leite.

Compostos nitrogenados mg L ⁻¹	Resíduos Agroindustriais	
	Milhocina	Soro de Leite
Proteína*	11,40 ± 1,30	8,5 ± 0,80
Nitrogênio Total*	1,80 ± 0,20	1,36 ± 0,10
NH ₃ (amônia)	26,55 ± 0,23	73,73 ± 0,60
Aminoácidos totais	711,21 ± 3,81	236,96 ± 1,72
Aspartato	13,93 ± 0,07	12,38 ± 0,06
Serina	46,25 ± 1,57	3,57 ± 0,03
Glutamato	43,13 ± 1,64	43,32 ± 0,34
Glicina	28,89 ± 0,77	14,66 ± 0,12
Histidina	11,33 ± 0,08	12,43 ± 0,08
Arginina	14,99 ± 0,60	17,18 ± 0,16
Treonina	18,02 ± 1,23	44,83 ± 0,33
Alanina	75,56 ± 0,22	8,03 ± 0,03
Prolina	321,53 ± 0,53	1,86 ± 0,15
Cisteína	18,47 ± 0,27	Nd
Valina	7,22 ± 0,05	4,41 ± 0,02
Metionina	43,55 ± 0,20	14,22 ± 0,11
Lisina	15,42 ± 0,30	6,60 ± 0,02
Isoleucina	Nd	27,65 ± 0,26
Leucina	40,32 ± 0,22	12,78 ± 0,08
Fenilalanina	12,56 ± 0,45	Nd

Nota: *g L⁻¹; nd: não detectado.

A milhocina apresenta como aminoácidos predominantes a prolina seguida da alanina, baixas concentrações de valina e a ausência isoleucina (Figura 6). Os aminoácidos da milhocina desempenham papel importante como componentes nutricionais do metabolismo básico celular (GAO; YUAN, 2011; CHOI et al., 2013; XIAO et al. 2013).

O soro de leite apresentou elevados teores dos aminoácidos isoleucina, treonina e glutamato e os aminoácidos cisteína e fenilalanina não foram detectados (Figura 6); outros autores também analisaram o perfil de aminoácidos do soro doce e encontraram altos teores para os mesmos aminoácidos, e uma baixa concentração de cisteína (GLASS; HEDRICK, 1977; YASMIN et al. 2013).

A alanina, presente na milhocina, e a isoleucina, presente no soro são os aminoácidos mais utilizados para o crescimento celular em bioprocessos (GAO; YUAN, 2011), o que

revela a potencialidade de se utilizar estes subprodutos como matérias-primas de baixo custo para obtenção de novos produtos e uso em bioprocessos.

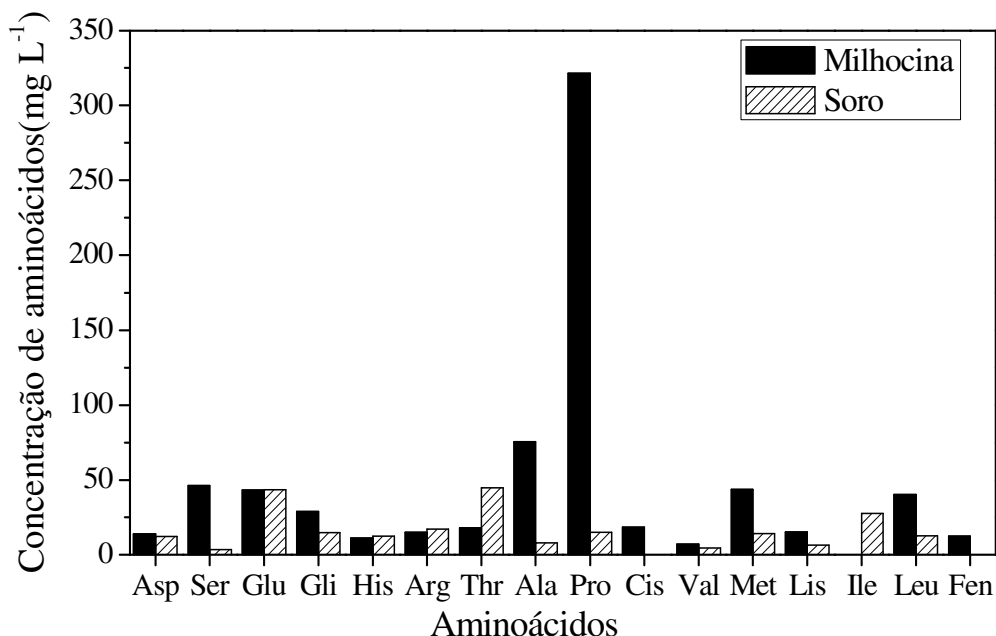


Figura 6: Perfil de aminoácidos dos subprodutos agroindustriais milhocina e soro de leite utilizados neste estudo.

Diferenças na composição de aminoácidos tanto do soro quanto da milhocina são resultantes dos diferentes métodos de processamento e da matéria-prima. O alto teor de aminoácidos totais da milhocina reforça a viabilidade do uso desta como fonte de nitrogênio para processos biológicos. O consumo de cada aminoácido e nitrogênio total pela levedura é diferente para cada linhagem, sendo que um meio suplementado ou rico em uma mistura de aminoácidos estimula o crescimento da levedura, resultando em uma fermentação mais rápida (THOMAS; INGLEDEW, 1990; JIRANEK et al., 1995).

5.2. Hidrólise do Soro de Leite

O uso de *S. cerevisiae* para a fermentação de lactose tem atraído muita atenção, sendo uma das estratégias para seu uso a obtenção de uma solução de lactose pré-hidrolisada, isto é, misturas de glucose e galactose visto que os dois açúcares podem ser fermentados pela *S. cerevisiae* em etanol. Em sua forma in natura a composição de açúcares do soro de leite é de 48,52 g L⁻¹ de lactose. Após a hidrólise neste trabalho, a composição de açúcares do soro correspondeu a: 15,60 g L⁻¹ de lactose, 19,40 g L⁻¹ de glucose e 13,52 g L⁻¹ de galactose, o que corresponde a uma eficiência de hidrólise de 66 %. Embora glucose e galactose sejam

consumidas pela levedura, o consumo de glucose é maior e mais rápido enquanto a galactose só passa a ser utilizada quando a glucose atinge níveis críticos (MEHAIA; CHERYAN, 1990; GUIMARÃES et al., 2010).

5.3. Delineamento Experimental

O delineamento experimental ou planejamento de misturas é uma ferramenta matemática utilizada para prever a resposta de saída com relação aos parâmetros de entrada, no caso os diferentes componentes da mistura, podendo ser utilizado para uma mistura de 2 a 30 componentes (RAJA et al., 2014). A resposta para uma mistura binária qualquer é uma média ponderada das respostas dos componentes puros, tendo como pesos as proporções X_1 e X_2 presentes na mistura. Sendo assim, para aumentar a precisão do modelo, foram realizadas repetições dos ensaios com os componentes puros (BARROS et al., 2001), como está mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Eficiência da fermentação das diferentes misturas de subprodutos indicadas pelo planejamento de experimentos.

Mistura	Fração dos Componentes		Variável de Resposta
	Soro (X_1)	Milhocina (X_2)	Eficiência da Fermentação (%)
1	1,00	0,00	78,88
2	1,00	0,00	77,72
3	1,00	0,00	71,88
4	0,00	1,00	91,86
5	0,00	1,00	93,07
6	0,50	0,50	79,83
7	0,75	0,25	77,27
8	0,25	0,75	89,83

Aplicando-se o planejamento de misturas, na prática, obteve-se maior eficiência para o experimento contendo apenas milhocina (ensaios 4 e 5). Mesmo em experimentos utilizando micro-organismos modificados o uso de soro de leite sem suplementação de nutrientes resulta em baixa produção de etanol e a adição de componentes nitrogenados ao meio pode aumentar significativamente esta produção (LEITE et al., 2000). Previamente ao cálculo de eficiência da fermentação houve a necessidade de avaliar alguns parâmetros no mosto antes e após a fermentação, assim como avaliar e calcular os parâmetros resultantes da fermentação (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros resultantes da fermentação alcoólica das diferentes misturas de soro de milhocina

Fração dos Componentes		Parâmetros Iniciais do mosto			Parâmetros Finais do mosto			Parâmetros resultantes da fermentação			
Soro (X ₁)	Milhocina (X ₂)	Acidez (g L ⁻¹)	AT (g L ⁻¹)	AF (g L ⁻¹)	Acidez (g L ⁻¹)	AT (g L ⁻¹)	AF (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	N _b (%)	N _p (%)	PR (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1,00	0,00	2,15 ± 0,05 ^e	140,94 ± 2,97 ^b	123,82 ± 2,56 ^b	4,84 ± 0,11 ^e	37,87 ± 0,12 ^b	20,15 ± 0,07 ^b	41,77 ± 0,15 ^d	78,88 ± 1,91 ^{cd}	66,03 ± 1,32 ^d	1,55 ± 0,01 ^d
1,00	0,00	2,15 ± 0,05 ^e	146,19 ± 0,76 ^a	128,51 ± 0,62 ^a	5,12 ± 0,10 ^f	39,73 ± 0,11 ^a	20,32 ± 0,07 ^a	42,97 ± 0,12 ^c	77,72 ± 0,00 ^{cd}	65,43 ± 0,25 ^d	1,59 ± 0,00 ^c
1,00	0,00	2,27 ± 0,06 ^e	145,00 ± 2,03 ^a	127,56 ± 1,77 ^a	5,18 ± 0,10 ^f	25,23 ± 0,10 ^c	12,22 ± 0,05 ^c	42,37 ± 0,47 ^{cd}	71,88 ± 1,21 ^e	65,00 ± 1,04 ^d	1,57 ± 0,02 ^{cd}
0,00	1,00	5,30 ± 0,25 ^a	107,14 ± 1,50 ^f	107,14 ± 1,50 ^e	6,90 ± 0,09 ^a	0,18 ± 0,00 ^g	0,18 ± 0,00 ^g	50,20 ± 0,79 ^a	91,86 ± 1,74 ^{ab}	91,72 ± 1,74 ^a	1,86 ± 0,03 ^a
0,00	1,00	5,16 ± 0,17 ^a	107,21 ± 1,52 ^f	107,21 ± 1,52 ^e	6,91 ± 0,08 ^a	0,24 ± 0,00 ^g	0,24 ± 0,00 ^g	50,83 ± 0,23 ^a	93,07 ± 1,11 ^a	92,88 ± 1,10 ^a	1,88 ± 0,01 ^a
0,50	0,50	3,66 ± 0,05 ^c	126,70 ± 0,70 ^d	119,45 ± 0,70 ^c	5,89 ± 0,02 ^c	12,30 ± 0,03 ^d	6,18 ± 0,02 ^d	46,20 ± 0,30 ^b	79,83 ± 0,94 ^c	75,69 ± 0,89 ^c	1,71 ± 0,01 ^b
0,75	0,25	3,34 ± 0,07 ^d	135,24 ± 0,54 ^c	123,39 ± 0,49 ^b	5,53 ± 0,05 ^d	11,72 ± 0,06 ^e	5,96 ± 0,03 ^f	46,37 ± 0,12 ^b	77,27 ± 0,23 ^d	73,54 ± 0,19 ^c	1,72 ± 0,01 ^b
0,25	0,75	4,21 ± 0,01 ^b	122,12 ± 2,62 ^e	116,00 ± 2,59 ^d	6,19 ± 0,12 ^b	10,49 ± 0,04 ^f	6,09 ± 0,04 ^e	50,43 ± 0,23 ^a	89,83 ± 2,41 ^b	85,11 ± 2,21 ^b	1,87 ± 0,01 ^a
p – Brown Forsythe*		0,50	0,68	0,70	0,90	0,45	0,44	0,63	0,66	0,71	0,63
p – ANOVA**		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: AT – açúcares totais (lactose + glucose + galactose); AF – açúcares fermentescíveis (glucose + galactose); N_b - Eficiência de fermentação (%); N_p - Eficiência de processo (%); PR – produtividade em etanol.

* Valores de probabilidade obtidos segundo o teste de Brown-Forsythe para homogeneidade de variâncias.

** Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único.

*** Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa de acordo com o teste de Fisher LSD (p<0,05).

O teor de açúcares fermentescíveis foi ajustado para o intervalo aproximado de 100 a 120 g L⁻¹ a fim de evitar um impacto negativo da presença de alto teor de açúcares que pode ser responsável por aumento da pressão osmótica do sistema prejudicando a levedura (SILVA et al., 2010). O maior teor de açúcares fermentescíveis finais (Tabela 7) nos experimentos contendo soro, se comparados ao contendo apenas milhocina, podem estar relacionados à baixa velocidade de consumo da galactose pela *S. cerevisiae*; da mesma forma, os açúcares totais destas misturas mostram que a lactose ainda presente no soro de leite (visto que este foi parcialmente hidrolisado) permanece intacta.

Comparando-se os valores de acidez dos experimentos contendo apenas soro e apenas milhocina (Tabela 7) com os valores de acidez encontrados na composição físico-química dos subprodutos (Tabela 4) pode-se observar um aumento considerável dos mesmos sugerindo que o processo lento de congelamento, assim como o descongelamento para uso na fermentação e o processamento térmico podem ter sido responsáveis por este fato devido à presença de bactérias lácticas nos mesmos.

A produção de ácido láctico é diretamente proporcional à concentração de milhocina (LIMA et al., 2009); uma vez que a presença de ácido láctico na milhocina acontece desde o processo de maceração e este ácido é um dos principais produtos conhecidos resultantes da maceração (GAO; YUAN, 2011). Se comparada à acidez dos experimentos contendo os componentes puros (Tabela 7), a milhocina possui uma acidez até 2,4 vezes maior que o soro antes da fermentação, mas esta diferença se reduz pela metade ao final da fermentação. O pH do mosto antes da fermentação varia de 4,08 para a amostra contendo apenas milhocina até 4,88 para a amostra contendo apenas soro, mas ao final da fermentação essa variação diminui de 3,98 para 4,16, sendo que quanto maior a proporção de soro na mistura, maior o pH da mesma. O pH encontra-se dentro da faixa esperada para fermentação alcoólica, devido a tolerância da levedura, que corresponde a faixa de pH de 4,0 a 6,0. A redução do pH está em concordância com o aumento da acidez no decorrer da fermentação, devido a formação de ácidos orgânicos, produtos secundários do metabolismo da glucose pela *S. cerevisiae*. O pH do meio pode baixar até 3,5, mas se o valor for inferior a 3,0 pode ocorrer inibição da levedura indicando ineficiência do processo de controle de contaminantes (DOMBEK et al., 1987; NARENDRANATH et al., 2001).

O teor de etanol (Tabela 7) foi significativamente maior para os experimentos contendo 100 % de milhocina e 25 % de soro com 75 % de milhocina, conseqüentemente estes obtiveram maiores valores de eficiência de fermentação, 93,07 % e 89,83 %, e maior produtividade, 1,88 g L⁻¹ h⁻¹ e 1,87 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Estes parâmetros foram

inversamente proporcionais à fração de soro na mistura, visto que quanto maior a proporção de soro na mistura maior a disponibilidade de galactose a qual é lentamente consumida pela *S. cerevisiae*. Desta forma, o experimento contendo apenas soro de leite apresentou os fatores produção de etanol, eficiência da fermentação e de processo e produtividade, significativamente menores dos que os demais experimentos. A alta concentração de levedura apresenta efeito positivo para um alto índice de etanol produzido, visto que quando estão presentes em baixas concentrações pode haver o desgaste das mesmas, requerendo regeneração, antes mesmo de consumir todo o substrato disponível para produção de etanol (OSUNKOYA; OKWUDINKA, 2011).

Silva et al. (2010) realizaram um experimento semelhante, utilizando uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada que consome a lactose como fonte de carbono, e soro de leite concentrado como substrato contendo 150 e 200 g L⁻¹ de lactose. Os resultados revelaram índices de produtividade de 0,74 e 0,63 g L⁻¹ h⁻¹ e suplementando os mesmos substratos com 10 g L⁻¹ de milhocina a produtividade foi para 1,22 e 0,57 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, indicando que a presença dos nutrientes provenientes da milhocina aumenta a velocidade da fermentação assim como a maior concentração de açúcares apresenta efeito negativo para a levedura.

Florêncio et al. (2013) estudaram diferentes concentrações de levedura e de sacarose a serem adicionadas para produção de etanol a partir de soro de leite não hidrolisado inoculado com *S. cerevisiae* de panificação atingindo nível máximo de eficiência da fermentação de 76,14 % quando foram adicionados 100 g L⁻¹ de sacarose ao soro de leite e 6,0 g L⁻¹ de levedura.

Analisando os índices de produtividade e eficiência da fermentação, obtidos no presente estudo, utilizando-se *S. cerevisiae* de panificação, os resultados foram considerados satisfatórios, além de demonstrar que a milhocina é uma boa fonte de nutrientes, como nitrogênio e vitaminas melhorando o desempenho da levedura.

Os dados do planejamento foram tratados estatisticamente, através de análise de variância (ANOVA), e os resultados obtidos estão na Tabela 8.

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) para Eficiência da Fermentação* em proporções dadas pelo planejamento de mistura.

	SQ	GL	QM	F	P
Modelo Linear	381,32	1	381,32	41,64	<0,01
Falta de ajuste	26,06	3	8,69	0,90	0,53
Erro Puro	28,88	3	9,63		
R ²	0,87				
R ² _{adj}	0,85				

Nota: * etanol produzido em 27 horas de fermentação;

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = média dos quadrados residuais; F = distribuição de Fisher; p= probabilidade de significância.

Existem diferentes formas de se avaliar a capacidade preditiva do modelo sendo elas: a comparação entre os valores de QM e F, onde o valor de QM deve ser maior que o de F, a falta de ajuste não deve ser significativa ($p > 0,05$), e também o valor dos coeficientes de determinação (R^2), sendo que para processos biológicos considera-se aceitável $R^2 \geq 0,70$. Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) podem explicar de 81 a 99 % a variância total das respostas confirmando a adequabilidade dos modelos, porém é necessária a avaliação de todos os parâmetros para indicar essa adequabilidade e não apenas o R^2 , como muitos autores consideram (LUNDSTEDT et al., 1998; BEZERRA et al., 2008; GRANATO et al., 2014).

Desta forma, e avaliando-se a Tabela 8, o modelo apresentou ajuste satisfatório considerando todos os fatores avaliados, além de valores de R^2 e de R^2_{adj} superiores a 0,85, sendo considerado preditivo e podendo ser utilizado para otimização do processo fermentativo a fim de maximizar a eficiência da fermentação.

Os coeficientes do modelo linear estão listados na Tabela 9, na qual Y é a resposta previsível, no caso a eficiência da fermentação (N_b), α_1 e α_2 , são os coeficientes de regressão linear e X_1 (fração de soro na mistura) e X_2 (fração de milhocina na mistura), são as variáveis independentes (BRUNS et al., 2006).

Tabela 9: Coeficientes e respectivos erros padrão do modelo linear.

Coeficiente	Valor	Erro Padrão
α_1	75,17	1,56
α_2	92,02	1,82

$$Y = \alpha_1 \cdot X_1 + \alpha_2 \cdot X_2$$

Aplicando o método de otimização simultânea (DERRINGER; SUICH, 1980) para máxima eficiência da fermentação obteve-se como ponto ótimo da produção de etanol

utilizando subprodutos agroindustriais o experimento contendo apenas milhocina. Para fins de validação do modelo, a condição otimizada foi aplicada para o desenvolvimento da cinética fermentativa, utilizando os mesmos procedimentos feitos anteriormente, comparando os dados previstos teóricos e os dados experimentais. Porém, devido à falta de diferença estatística entre os pontos contendo 100 % de milhocina e 25 % de soro com 75 % de milhocina, como pode ser observado na Tabela 7, para eficiência da fermentação e produtividade optou-se pela repetição e desenvolvimento da cinética fermentativa de ambos os pontos. A partir deste ponto serão denominados: experimento 1 (100 % de milhocina) e experimento 2 (25 % de soro com 75 % de milhocina).

5.4. Cinética Fermentativa

A fermentação foi acompanhada por pesagens indicando a massa de dióxido de carbono (CO_2) liberada no decorrer do processo conforme a Figura 7.

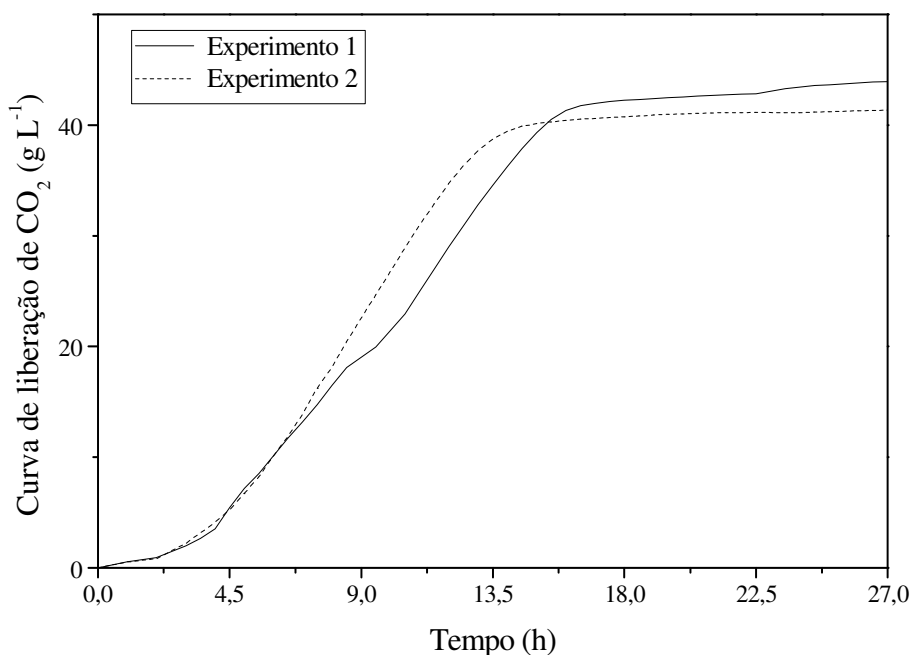


Figura 7: Curva de liberação de CO_2 durante o processo fermentativo de diferentes mostos para a determinação do tempo de fermentação.

Nota: Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina.

Na curva de liberação de CO_2 podem-se observar as três fases existentes no processo fermentativo (Figura 7): fase preliminar ou fase lag (entre 0 e 4,5 h); fase tumultuosa ou fase log (entre 4,5 e 18 h) e fase estacionária (a partir de 18 h). Na fase tumultuosa ocorre o maior

desprendimento de CO₂ e a glucose é rapidamente consumida pela levedura e consequentemente há maior produção de etanol (MEHAIA et al., 1990; SCHMIDELL et al., 2001). Todas estas fases podem ser facilmente observadas na Figura 7 e nos resultados da Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros do mosto durante a fermentação para os diferentes experimentos.

Tempo (h)	Ácido láctico (g L ⁻¹)	Nitrogênio (g L ⁻¹)	AF (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Densidade (g cm ⁻³)	PR (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Experimento 1						
0	5,38±0,27 ^d	1,06 ±0,33 ^a	106,82±3,20 ^a	0,00±0,00 ^g	0,99822±0,00 ^a	0,00±0,00 ^g
4,5	5,93±0,18 ^c	0,87±0,14 ^{ab}	91,98±4,08 ^b	4,83±0,15 ^f	0,99748±0,00 ^b	1,07±0,03 ^f
9	6,41±0,09 ^{ab}	0,72±0,00 ^{bc}	83,65±0,67 ^c	10,87±0,06 ^e	0,99657±0,00 ^c	1,21±0,01 ^e
13,5	6,43±0,11 ^a	0,53±0,11 ^{cd}	26,77±0,80 ^d	27,63±0,06 ^d	0,99419±0,00 ^d	2,05±0,00 ^c
18	6,08±0,07 ^{bc}	0,43±0,00 ^d	5,72±0,01 ^e	42,30±0,17 ^c	0,99211±0,00 ^e	2,35±0,01 ^a
22,5	6,24±0,29 ^{abc}	0,41±0,15 ^d	0,14±0,01 ^f	47,93±0,06 ^b	0,99137±0,00 ^f	2,13±0,00 ^b
27	6,51±0,21 ^a	0,39±0,04 ^d	0,13±0,33 ^f	50,77±0,55 ^a	0,99101±0,00 ^g	1,88±0,02 ^d
p – Brown Forsythe*	0,70	0,64	0,43	0,51	0,58	0,31
p – ANOVA**	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Experimento 2						
0	4,78±0,15 ^b	0,85±0,04 ^a	117,85±1,02 ^a	0,00±0,00 ^g	0,99825±0,00 ^a	0,00±0,00 ^g
4,5	5,84±1,04 ^a	0,77±0,04 ^a	97,50±0,90 ^b	4,77±0,81 ^f	0,99751±0,00 ^b	1,06±0,18 ^f
9	6,53±0,01 ^a	0,68±0,08 ^b	80,04±0,16 ^c	13,07±0,06 ^e	0,99624±0,00 ^c	1,45±0,01 ^e
13,5	6,22±0,03 ^a	0,46±0,04 ^c	15,69±0,28 ^d	40,87±0,06 ^d	0,99230±0,00 ^d	3,03±0,00 ^a
18	6,22±0,11 ^a	0,39±0,04 ^{cd}	4,78±0,03 ^e	42,80±0,17 ^c	0,99204±0,00 ^e	2,38±0,01 ^b
22,5	6,38±0,19 ^a	0,34±0,04 ^d	4,77±0,04 ^e	45,33±0,29 ^b	0,99168±0,00 ^f	2,01±0,01 ^c
27	6,31±0,14 ^a	0,36±0,00 ^d	4,68±0,28 ^e	49,83±0,15 ^a	0,99109±0,00 ^g	1,85±0,01 ^d
p – Brown Forsythe*	0,55	0,95	0,68	0,67	0,61	0,51
p – ANOVA**	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina; AF - açúcares fermentescíveis (glucose + galactose); PR – produtividade em etanol.

* Valores de probabilidade obtidos segundo o teste de Brown-Forsythe para homogeneidade de variâncias;** Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único; *** Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa de acordo com o teste de Fisher LSD (p<0,05).

A curva representando o mosto contendo 25 % de soro de leite (Experimento 2) atingiu a fase estacionária em menor tempo e teve perda de massa final menor que o mosto contendo 100 %

de milhocina (Experimento 1), o que pode estar relacionado à presença da galactose nesse meio, que embora seja utilizada pela *S. cerevisiae*, o seu consumo acontece em níveis inferiores ao da glucose, mesmo após exaustão da mesma (MEHAIA et al., 1990; PARK et al., 2014). Este fato pode ser confirmado com os dados da Tabela 10, na qual se observa que o mosto contendo 100 % de milhocina (Experimento 1) apresenta açúcar fermentescível residual de $0,13 \text{ g L}^{-1}$ enquanto para o meio contendo 25 % de soro de leite (Experimento 2) este foi de $4,68 \text{ g L}^{-1}$, correspondendo à galactose.

Para ambos os experimentos a produção de ácido láctico aconteceu nas primeiras horas de fermentação, ou seja, na fase *lag*, na qual a levedura ainda está se adaptando ao meio para produzir etanol e, então, após o início da produção máxima de etanol (fase *log*), a concentração de ácido láctico se torna constante. A duração da fase *lag* aumenta proporcionalmente a concentração de ácido láctico inicial do mosto e a concentração produzida (ABBOTT e INGLEDEW, 2004).

Para avaliar a cinética da fermentação utilizam-se as seguintes variáveis: quantidade de substrato transformado ou utilizado pela levedura, variação da concentração celular e a quantidade de produto formado, que, se colocadas em gráficos em função do tempo da fermentação representam a cinética do processo fermentativo (REGULY, 2000), como exposto nas Figuras 8 e 9.

O consumo de nitrogênio durante a fermentação está diretamente associado com a fase de crescimento e com a população máxima da levedura (ALBERTI et al., 2011). No presente estudo observou-se esse fenômeno, e a partir de 18 horas de fermentação quando termina a fase exponencial de crescimento e o consumo de nitrogênio é quase nulo (Figuras 8b e 9b). O mesmo pode ser observado para o consumo de açúcares e produção de etanol, sendo que na fase exponencial estes são máximos, permanecendo praticamente estáveis a partir de 18 horas de fermentação (Figuras 8a e 9a).

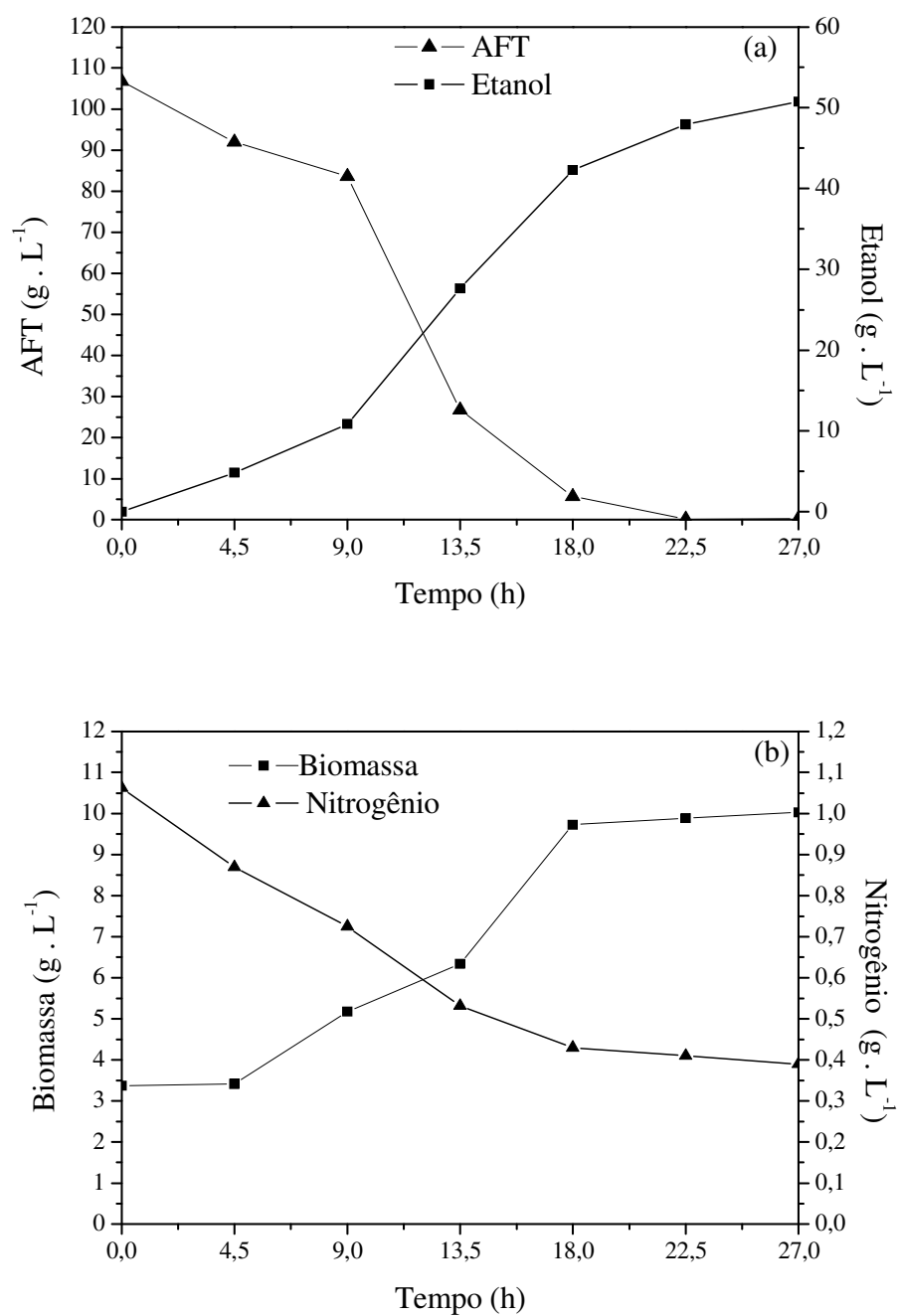


Figura 8: Cinética Fermentativa para experimento 1: (a) consumo de açúcares fermentescíveis totais (AFT) e produção de etanol; (b) Consumo de nitrogênio e produção de biomassa.

Nota: Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina.

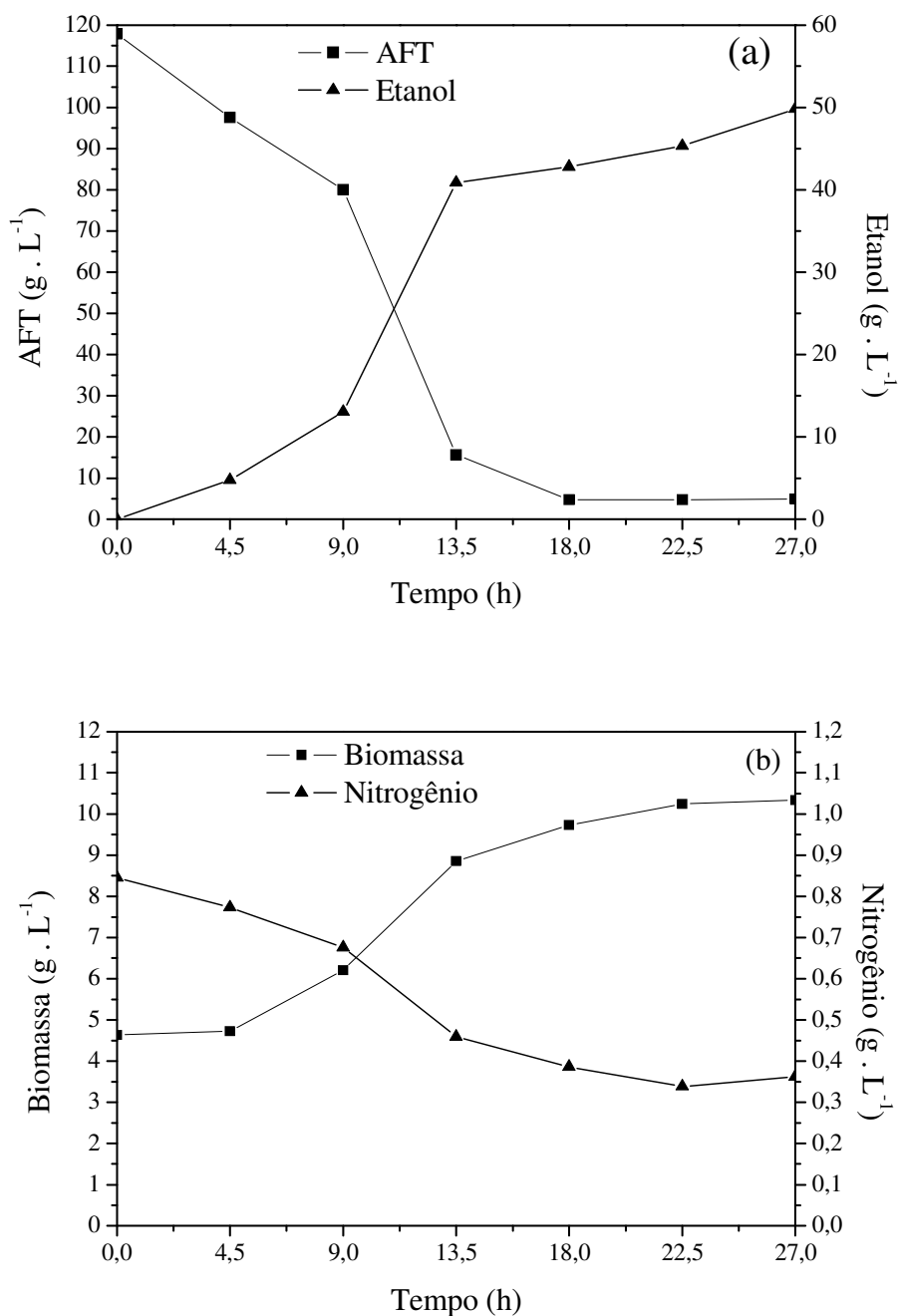


Figura 9: Cinética Fermentativa para experimento 2: (a) consumo de açúcares fermentescíveis totais (AFT) e produção de etanol; (b) Consumo de nitrogênio e produção de biomassa.

Nota: Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina.

Comparando-se a eficiência dos experimentos, para todos os parâmetros da fermentação (Tabela 11) o experimento contendo 100 % de milhocina apresentou melhores resultados, maior eficiência de fermentação e de processo como consequência do maior fator de conversão de substrato em etanol, porém o experimento contendo 25 % de soro também apresentou bons resultados. Todos os experimentos realizados obtiveram altos índices de produtividade, visto que industrialmente considera-se satisfatória uma produtividade superior

a $1,00 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Outros trabalhos também sugerem melhor produtividade em mostos alternativos suplementados com milhocina (DIEN et al., 2003).

Tabela 11: Parâmetros resultantes da Fermentação dos experimentos avaliados em 27 h de processo.

Parâmetros	Experimento 1	Experimento 2	p – Brown Forsythe*	p – ANOVA**
PR ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$1,88 \pm 0,02^a$	$1,85 \pm 0,01^b$	0,47	0,05
$Y_{\frac{P}{S}}$	$0,48 \pm 0,01^a$	$0,44 \pm 0,00^b$	0,36	<0,001
N_b (%)	$93,32 \pm 2,04^a$	$86,33 \pm 0,32^b$	0,36	<0,001
N_p (%)	$93,05 \pm 2,02^a$	$82,75 \pm 0,47^b$	0,41	<0,001
$Y_{\frac{X}{S}}$	$0,06 \pm 0,00^a$	$0,05 \pm 0,00^b$	0,21	<0,001

Nota: Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina; PR - produtividade em etanol; $Y_{\frac{P}{S}}$ - Fator de conversão de substrato em etanol (g g^{-1}); N_b - Eficiência de fermentação (%); N_p - Eficiência de processo (%); $Y_{\frac{X}{S}}$ - Fator de conversão de substrato em biomassa.

* Valores de probabilidade obtidos segundo o teste de Brown-Forsythe para homogeneidade de variâncias.

** Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único.

*** Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa de acordo com o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).

Na Tabela 12 são apresentados os valores de eficiência calculados pelo modelo, os valores práticos obtidos com a repetição dos experimentos e o erro absoluto do planejamento.

Tabela 12: Comparação dos valores preditos através do modelo linear e dos valores encontrados experimentalmente para eficiência da fermentação em 27 h de processo.

Fração dos Componentes		Valor Teórico (%)	Valor Prático (%)	Erro Absoluto (%)
Soro	Milhocina			
0,00	1,00	92,02	93,32	1,41
0,25	0,75	87,81	86,33	1,69

Comparando-se o valor teórico com o prático, o erro absoluto para ambos os experimentos foi menor que 10 %, limite para se considerar um modelo válido. O baixo valor do erro absoluto corresponde à boa reprodutibilidade dos experimentos.

A determinação de $\mu_{\text{máx.}}$ foi obtida por regressão linear, considerando-se o intervalo entre 9 e 18 horas de fermentação, correspondente a fase exponencial de crescimento, conforme exposto na Figura 10, onde a velocidade máxima específica de crescimento da levedura ($\mu_{\text{máx.}}$) foi de $0,07 \text{ h}^{-1}$ para o experimento 1 e de $0,05 \text{ h}^{-1}$ para o experimento 2.

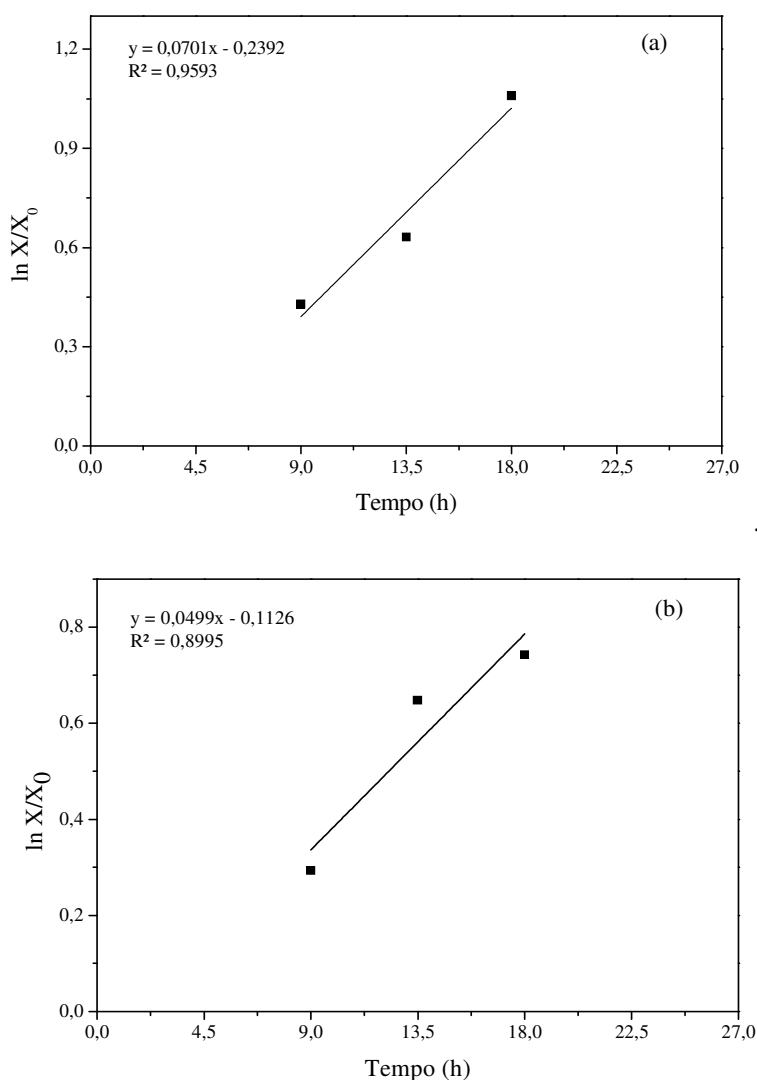


Figura 10: Gráfico para determinação de $\mu_{\text{máx}}$ pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento para os ensaios: (a) Experimento 1 e (b) Experimento 2.

Nota: Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina.

Andrietta et al. (1999) estudaram 12 diferentes grupos de leveduras utilizados em processos industriais de fermentação alcoólica e as classificaram levando em consideração suas características cinéticas de rendimento e produtividade. Para $\mu_{\text{máx}}$ os níveis foram: menor que 0,45 (baixo); entre 0,45 e 0,55 (médio) e maior que 0,55 h^{-1} (alto). Para $Y_{X/S}$ os níveis foram: menor que 0,041 (baixo); entre 0,041 e 0,044 (médio) e maior que 0,044 g g^{-1} (alto). Desta forma, a levedura utilizada neste estudo pode ser considerada de baixo nível de velocidade específica máxima de crescimento e alto nível de conversão de produto em biomassa. Um alto fator de conversão de substrato em biomassa é uma característica desejável

na etapa de propagação do fermento, pois corresponde a um rápido crescimento da levedura (OLIVEIRA et al., 2004; STROPPIA et al., 2009).

Estudos em quimiostatos indicam que em estado estacionário a velocidade específica máxima de crescimento habitualmente, se encontra na faixa entre $0,03 \text{ h}^{-1}$ e $0,40 \text{ h}^{-1}$. Alguns estudos mostram que uma alta densidade de células assim como a reciclagem de células e uma alta concentração de etanol podem contribuir para a redução do crescimento de leveduras e que um baixo valor de crescimento da levedura (menor que $0,1 \text{ h}^{-1}$) resulta em rendimentos elevados de etanol (90 % da conversão teórica de açúcar em etanol), assim como uma velocidade específica de crescimento inferior a $0,025 \text{ h}^{-1}$ pode aumentar o índice de etanol em até 3 % (BASSO et al., 2008; BASSO et al., 2011; BOENDER et al., 2009). Em ambos os experimentos a velocidade específica máxima de crescimento da levedura foi inferior a $0,1 \text{ h}^{-1}$, assim como ambos obtiverem eficiência de fermentação (rendimento) em torno de 90 %.

5.4.1. Efeito da adição de diferentes fontes de açúcares ao mosto

Foram realizadas fermentações utilizando diferentes fontes de carbono, como o açúcar mascavo e o melaço da cana, aproximando-se da produção industrial de etanol. Também se repetiu os ensaios com água mostrando a viabilidade do uso dos resíduos como fonte de nutrientes para a fermentação.

A fermentação foi acompanhada por pesagens indicando a massa de dióxido de carbono (CO_2) liberado durante a fermentação conforme a Figura 11. Na Tabela 13 podem-se observar os diferentes parâmetros dos mostos com diferentes fontes de carbono.

Tabela 13: Parâmetros avaliados do mosto antes e após a fermentação alcoólica utilizando diferentes mostos e diferentes fontes de açúcares.

Experimentos	Parâmetros Iniciais			Parâmetros Finais			Parâmetros resultantes da fermentação				
	Ácido láctico (g L ⁻¹)	AF (g L ⁻¹)	Nitrogênio (g L ⁻¹)	Ácido láctico (g L ⁻¹)	AF (g L ⁻¹)	Nitrogênio (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Y_P/S	N _b (%)	N _p (%)	PR (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1 + GLU	5,38±0,27 ^c	106,82±3,20 ^{cd}	1,06±0,33 ^a	6,51±0,21 ^b	0,31±0,00 ^e	0,39±0,04 ^{bc}	50,77±0,55 ^{bc}	0,48±0,01 ^b	93,32±1,04 ^b	93,05±1,02 ^b	1,88±0,02 ^{bc}
2 + GLU	4,78±0,15 ^d	117,85±1,02 ^a	0,85±0,04 ^a	6,31±0,14 ^{bc}	4,88±0,28 ^d	0,36±0,00 ^{bc}	49,83±0,15 ^c	0,44±0,00 ^c	86,33±0,32 ^c	82,75±0,47 ^c	1,85±0,01 ^c
3 + GLU	0,00±0,00 ^f	118,99±2,26 ^a	0,09±0,02 ^d	0,00±0,00 ^f	73,13±4,40 ^a	0,07±0,04 ^d	13,67±0,45 ^h	0,30±0,02 ^f	58,56±0,29 ^f	22,49±1,12 ^f	0,51±0,02 ^h
1 + MAS	3,62±0,14 ^e	104,73±0,56 ^d	1,00±0,08 ^a	5,36±0,02 ^d	2,17±0,09 ^{de}	0,52±0,02 ^{ab}	51,20±0,26 ^b	0,50±0,00 ^a	97,70±0,43 ^a	95,67±0,37 ^a	1,90±0,01 ^b
2 + MAS	3,59±0,14 ^e	113,34±3,92 ^b	0,92±0,97 ^a	3,88±0,03 ^e	9,05±3,78 ^c	0,63±0,08 ^a	34,43±0,06 ^e	0,33±0,02 ^c	64,79±0,41 ^e	59,50±0,50 ^d	1,28±0,00 ^e
3 + MAS	0,00±0,00 ^f	114,36±0,29 ^b	0,24±0,11 ^{cd}	0,00±0,00 ^f	24,46±0,05 ^b	0,21±0,04 ^{cd}	28,00±0,10 ^g	0,31±0,00 ^{ef}	60,95±0,42 ^{ef}	47,92±0,28 ^e	1,04±0,00 ^g
1 + MEL	6,75±0,33 ^a	109,93±0,75 ^c	0,94±0,10 ^a	8,08±0,21 ^{ca}	2,00±0,00 ^{de}	0,35±0,31 ^{bc}	52,53±1,72 ^a	0,49±0,01 ^{ab}	95,25±0,79 ^{ab}	93,51±0,74 ^{ab}	1,95±0,06 ^a
2 + MEL	5,88±0,07 ^b	108,39±0,26 ^c	0,54±0,01 ^b	6,15±0,25 ^c	9,10±2,63 ^c	0,53±0,02 ^{ab}	46,90±0,61 ^d	0,47±0,02 ^b	92,49±0,39 ^b	84,68±1,15 ^c	1,74±0,02 ^d
3 + MEL	0,00±0,00 ^f	107,11±1,23 ^{cd}	0,37±0,02 ^{bc}	0,00±0,00 ^f	26,67±0,02 ^b	0,30±0,10 ^c	32,73±0,21 ^f	0,41±0,00 ^d	79,64±0,75 ^d	59,81±0,32 ^d	1,21±0,01 ^f
p – Brown Forsythe*	0,31	0,64	0,71	0,59	0,63	0,40	0,19	0,40	0,39	0,62	0,19
p – ANOVA**	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina; Experimento 3 - substituição dos subprodutos como mosto por água; GLU - mosto suplementado com glucose; MAS - mosto suplementado com açúcar mascavo; MEL - mosto suplementado com melaço de cana; AF - açúcares fermentescíveis; Y_P/S - Fator de conversão de substrato em etanol. N_b - Eficiência de fermentação; N_p - Eficiência de processo; PR - produtividade em etanol.

* Valores de probabilidade obtidos segundo o teste de Brown-Forsythe para homogeneidade de variâncias; ** Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único;

*** Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa de acordo com o teste de Fisher LSD (p<0,05).

O reflexo da ausência de nutrientes do mosto pode ser observado na Figura 11 e Tabela 13 onde as curvas dos experimentos contendo água não apresentam as três fases características de liberação de CO₂ proveniente da fermentação e crescimento celular; sendo que para o experimento com água e glucose os índices de produtividade e eficiência foram ainda menores que os experimentos utilizando açúcar mascavo e melaço de cana, pois estes devido ao seu processamento ainda possuem alguns nutrientes além dos açúcares que podem de alguma maneira favorecer a levedura. Estes resultados indicam que a ausência dos nutrientes encontrados nos subprodutos: como nitrogênio, aminoácidos, minerais e vitaminas refletiram diretamente no crescimento da levedura resultando em alto teor de açúcar residual e baixa produtividade.

O melaço utilizado neste estudo apresentou 22 % de umidade, e sua composição em açúcares em base seca era de aproximadamente 53 % de frutose, 42 % de glucose e 5% de sacarose. Osunkoya e Okwudinka (2011) obtiverem composição semelhante para total de açúcares em melaço de cana e verificaram a existência de minerais no mesmo.

O açúcar mascavo utilizado contém 49 % de frutose, 40 % de glucose e 12 % de sacarose, todos fermentescíveis pela *S. cerevisiae*. A semelhança na composição de açúcares entre o melaço e o açúcar mascavo, se dá pelo fato do açúcar mascavo corresponder a uma combinação de açúcar branco com melaço da cana (YANG et al., 2007).

A diferença da produção de etanol através destas fontes de carbono (melaço de cana e açúcar mascavo), uma vez que a composição em glucose, frutose e sacarose de ambas são semelhantes, acontece pela acidez inicial do mosto e a produzida durante a fermentação. Os experimentos com melaço obtiveram acidez significativamente maiores que os experimentos com açúcar mascavo, e segundo Beckner et al. (2011), o ácido láctico possui efeito inibitório sobre a produção de etanol pela *S. cerevisiae*. Observou-se também a ausência de ácido láctico nos experimentos onde se utilizou água comprovando a presença bactérias lácticas contaminantes nos subprodutos.

Em todos os experimentos em que melaço de cana foi utilizado houve maior perda final pela liberação de dióxido de carbono se comparado com os demais.

Os experimentos que apresentaram maior eficiência de fermentação e processo foram aqueles que utilizaram como mosto apenas milhocina e como fonte de carbono o açúcar mascavo ou o melaço. Estes mostos se assemelham aos utilizados para produção de bioetanol em escala industrial.

Com o uso de glucose a liberação de dióxido de carbono (CO₂) foi similar para os experimentos 1 (100% de milhocina) e 2 (25 % de soro e 75 % de milhocina). Com uso de

açúcar mascavo, o experimento contendo soro teve uma maior velocidade de perda de massa no início, porém atingiu a fase estacionária em menor tempo resultando em menor produção final de etanol. Enquanto que, para o uso de melaço, o meio contendo apenas milhocina apresentou maior liberação CO_2 e a segunda maior produção de etanol em relação a todos os experimentos sendo superado apenas pelo meio de fermentação contendo milhocina e açúcar mascavo.

Basso et al. (2008) também realizaram ensaios fermentativos utilizando melaço e caldo de cana em uma concentração de 100 g L^{-1} de açúcares utilizando leveduras de panificação e obtiveram uma eficiência de fermentação de 88,1%. No presente trabalho maiores eficiências foram obtidas para diluição de melaço e açúcar mascavo em milhocina (Tabela 13).

O uso do melaço em sua forma pura apresenta efeito negativo para a fermentação alcoólica devido à alta pressão osmótica do mesmo, além disso, o melaço apresenta ausência de nutrientes para o crescimento da levedura sendo necessária a suplementação (SÁNCHEZ et al., 2007).

A combinação de milhocina como fonte de nutrientes, principalmente de nitrogênio, e o melaço, como fonte de carbono, apresenta vantagens tanto em relação aos índices de etanol produzido e produtividade quanto ao fato de ambos serem subprodutos agroindustriais produzidos em larga escala no Brasil, de baixo custo, e que podem ser utilizados como fonte de novos produtos de maior valor agregado e de ampla utilização. O resultado do uso de soro nestes experimentos poderia suprir uma parte da necessidade regional, de encontrar alternativas para destino e/ou valorização do mesmo.

O uso de melaço para a produção de etanol combustível é bastante viável devido sua alta disponibilidade principalmente em países tropicais com baixo custo e elevadas produções de etanol reduzindo os impactos do uso de culturas alimentares como milho, beterraba e cana para obtenção de bioetanol (SOCCOL et al., 2005; BEHERA et al., 2012).

5.4.2. Uso de antibióticos para controle da contaminação microbiana

A presença de ácido láctico é de especial interesse aos produtores de etanol visto que este é um potencial inibidor do crescimento das leveduras. Concentrações relativamente baixas de ácido láctico (2 a 6 g L^{-1}) afetam diretamente as leveduras diminuindo suas taxas de consumo de glucose e produção de etanol, enquanto concentrações maiores (8 a 10 g L^{-1}) reduzem fortemente o crescimento da levedura (NARENDRANATH et al., 2001). Tendo em

vista essa necessidade de controle da contaminação bacteriana, diferentes antibióticos são fornecidos para favorecer a fermentação alcoólica na produção de etanol combustível (PHIBRO, 2014). Os antibióticos utilizados foram enumerados de 1 a 5 para uso nos testes.

A acidez inicial do mosto assim como acidez produzida durante as 27 horas de fermentação utilizando os diferentes antibióticos em comparação com o mosto pasteurizado podem ser observadas na Figura 12.

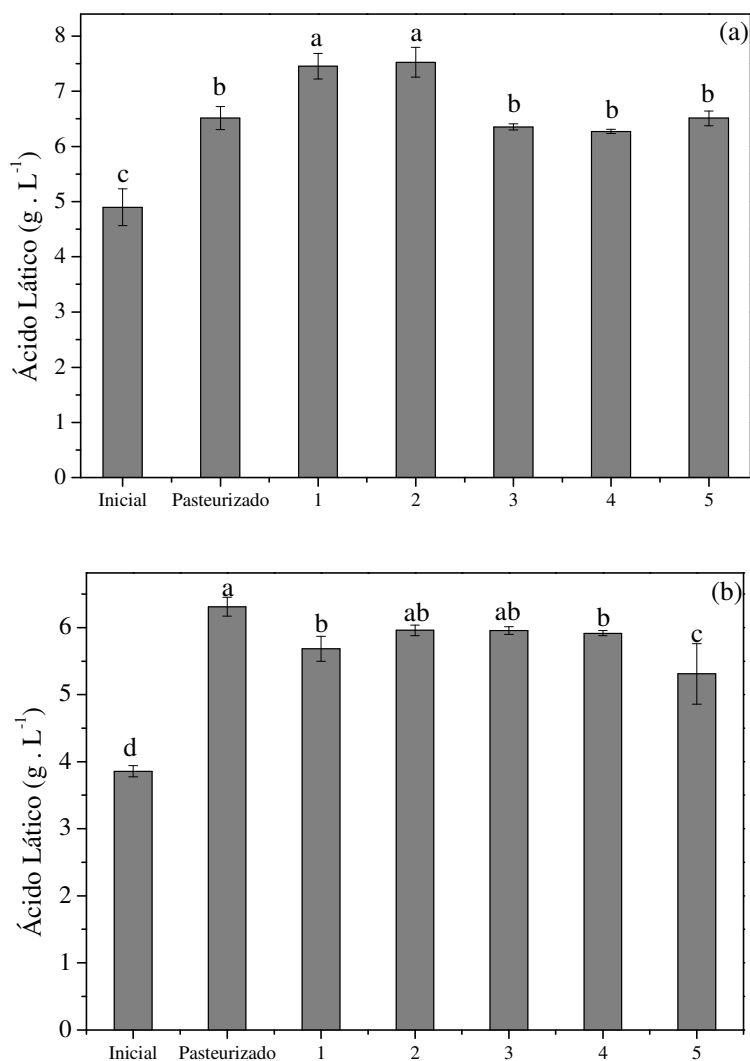


Figura 12: Comparação da produção de ácido láctico durante a fermentação pelo uso de diferentes meios de controle das bactérias lácticas.

Nota: (a) Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; (b) Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina; Colunas de 1 a 5: acidez final dos experimentos utilizando diferentes antibióticos em comparação com a acidez inicial e final dos experimentos utilizando pasteurização. Letras diferentes representam diferença significativa de acordo com o teste de Fisher LSD- $p < 0,05$.

Os parâmetros resultantes da fermentação, utilizando diferentes antibióticos, podem ser observados na tabela 14.

Tabela 14: Parâmetros resultantes da fermentação alcoólica para os substratos das melhores misturas utilizando antibióticos.

Tratamentos	Etanol (g L ⁻¹)	$Y_{\frac{P}{S}}$	N _b (%)	N _p (%)
Experimento 1				
Pasteurizado	50,77±0,55 ^a	0,48±0,01 ^{ab}	93,32±2,04 ^{ab}	93,05±2,02 ^{bc}
1	45,17±0,42 ^d	0,46±0,01 ^b	89,95±1,07 ^b	89,79±1,06 ^c
2	45,73±0,50 ^d	0,47±0,01 ^b	91,14±2,49 ^b	90,93±2,48 ^c
3	47,93±0,15 ^c	0,49±0,01 ^a	95,36±1,86 ^a	95,30±1,86 ^{ab}
4	47,87±0,15 ^c	0,49±0,01 ^a	95,24±2,10 ^a	95,17±2,09 ^{ab}
5	48,57±0,38 ^b	0,49±0,01 ^a	96,76±1,90 ^a	96,55±1,89 ^a
p – Brown Forsythe*	0,86	0,99	0,99	0,99
p – ANOVA**	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Experimento 2				
Pasteurizado	49,83±0,15 ^a	0,44±0,00 ^a	86,33±0,32 ^a	82,75±0,47 ^a
1	45,17±0,42 ^b	0,44±0,00 ^a	86,75±0,42 ^a	82,63±0,42 ^a
2	44,13±0,12 ^d	0,43±0,00 ^{ab}	84,82±0,16 ^c	80,74±0,13 ^c
3	44,67±0,06 ^c	0,44±0,00 ^a	85,26±0,43 ^{bc}	81,71±0,39 ^b
4	45,13±0,12 ^b	0,44±0,00 ^a	86,00±0,79 ^{ab}	82,57±0,46 ^a
5	42,63±0,15 ^e	0,42±0,00 ^b	82,83±0,39 ^d	77,99±0,35 ^d
p – Brown Forsythe*	0,53	0,68	0,68	0,96
p – ANOVA**	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: * Valores de probabilidade obtidos segundo o teste de Brown-Forsythe para homogeneidade de variâncias.

** Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único.

*** Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa de acordo com o teste de Fisher LSD (p<0,05).

Nota: (a) Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; (b) Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina; $Y_{\frac{P}{S}}$ - Fator de conversão de substrato em etanol; N_b - Eficiência de fermentação; N_p - Eficiência de processo; Colunas de 1 a 5: experimentos utilizando diferentes antibióticos.

Entre os antibióticos utilizados, aquele com 100 % de virginiamicina é um antibiótico composto que consiste em dois fatores (M e S) que interagem sinergicamente com os ribossomos inibindo a síntese proteica das bactérias gram positivas sendo efetivo contra a maioria das bactérias ácido-láticas (HAMDY et al., 1996; HYNES et al., 1997; ANDREOTTI; NICODEMO, 2004). Enquanto que os antibióticos ionóforos e inertes, incluindo a monensina sódica, têm sua forma de ação inibitória desses antibióticos através da catálise das trocas de sódio e prótons ou prótons e potássio na membrana da bactéria (PRESSMAN, 1976).

Além dos antibióticos mostrados na Tabela 14 foi realizado teste com o antibiótico formado por compostos naturais (Extrato cítrico 90 %, Ácido Ascórbico 2 %, Ácido Lático 2

%, Ácido Cítrico 1 %) e este não apresentou efeito contra as bactérias do mosto impedindo a produção de etanol (dados não mostrados).

Devido a diversidade de produtos fornecidos optou-se por selecionar aquele que melhor se aplica aos meios de fermentação deste estudo utilizando-se como controle de contaminação a produção de ácido láctico e realizar a cinética fermentativa deste.

Um nível de ácido láctico de 6 g L^{-1} deve ser considerado uma concentração industrial relevante, devido a ação das bactérias lácticas contaminantes da fermentação causando redução da eficiência da produção (NARENDRANATH et al., 2001). Relacionando-se esta informação com os parâmetros resultantes da fermentação (Tabela 14), o antibiótico que apresentou melhores resultados, menor acidez produzida e maior eficiência da fermentação, para ambos os experimentos (100 % milhocina e 25 % de soro com 75 % de milhocina) foi o de número 4, composto por 100% de monensina sódica cristalina.

A monensina sódica cristalina é um antibiótico poliéter e ionóforo, aplicado principalmente na área de saúde animal, mas também como controle de contaminantes em processos fermentativos e sua atividade antimicrobiana se dá por alterações de pH, que seletivamente forma complexos e transporta cátions de sódio através das membranas lipídicas dos micro-organismos levando a perturbações em processos celulares e culminando em morte celular (PAREKH et al., 2000; STROPPIA et al., 2000; LOWICKI; HUCZYNSKI, 2013).

A comparação da curva de liberação de dióxido de carbono dos diferentes controles de contaminantes para os diferentes experimentos está na Figura 13.

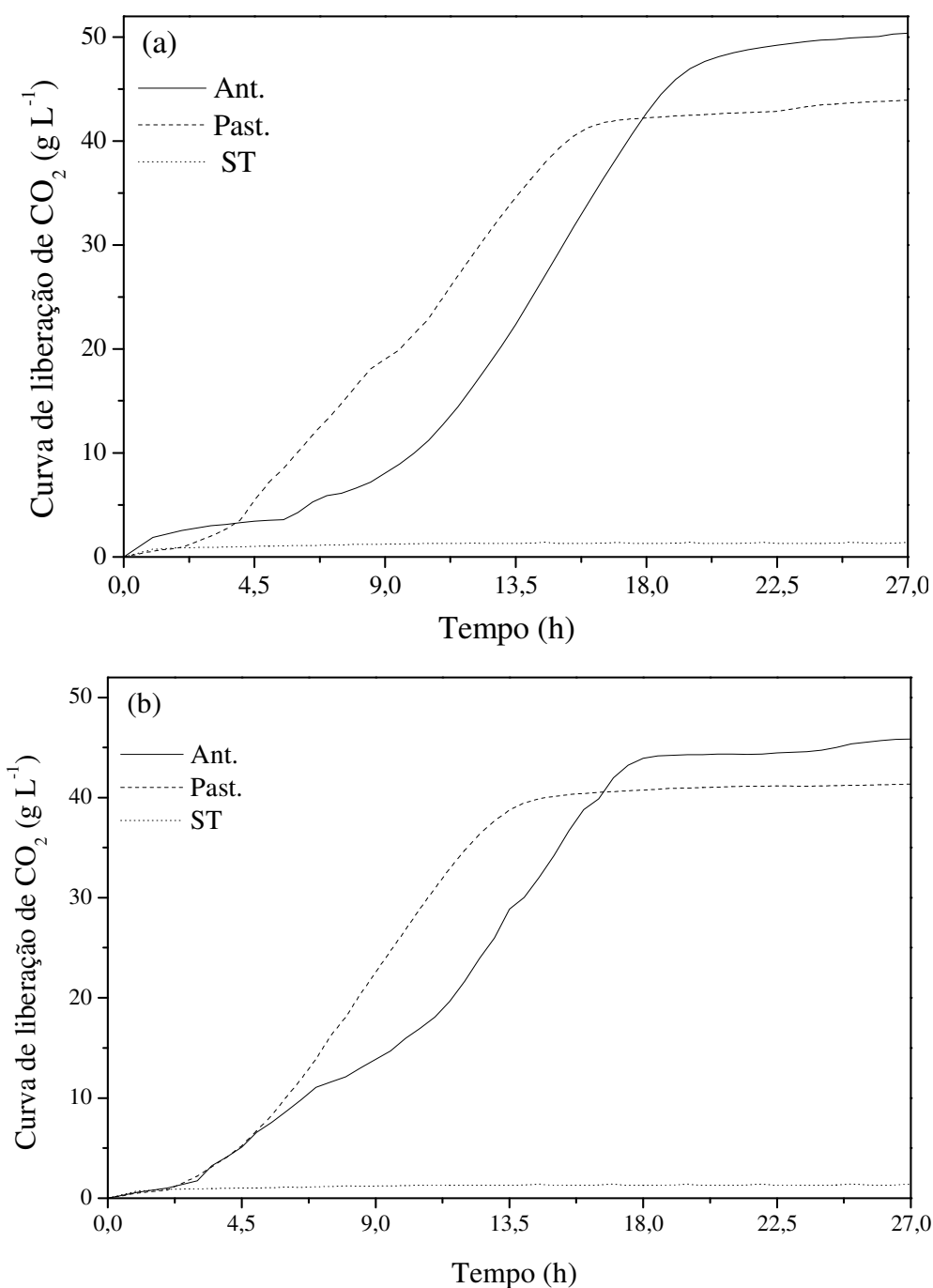


Figura 13: Curva de liberação de CO₂ durante o processo fermentativo de diferentes meios fermentativos utilizando como antibiótico a monensina sódica cristalina em comparação com a pasteurização e ausência de controle de contaminantes.

Nota: (a) Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; (b) Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina; Ant.: tratamento com antibiótico; Past.: tratamento térmico (pasteurização); ST: sem tratamento.

Segundo Stroppa et al. (2000) o antibiótico monensina reduz a carga de bactérias lácticas presentes na produção de etanol durante aproximadamente as seis primeiras horas de fermentação. Este fato pode explicar a maior duração da fase preliminar de liberação de CO₂

(Figura 13) se comparada ao mesmo experimento que passou pela pasteurização, visto que no mosto pasteurizado a redução da carga microbiana acontece previamente ao inóculo, enquanto com o uso de antibiótico isso acontece no próprio fermentador, simultaneamente à produção de etanol. Também se pode relacionar este fato a maior produção de ácido láctico (Tabela 15) durante as primeiras horas de fermentação tornando-se constante após certo tempo e a partir desse ponto a produtividade em etanol se torna máxima.

Tabela 15: Parâmetros do mosto durante a fermentação utilizando como antibiótico a monensina sódica.

Tempo (h)	Acido Láctico (g L ⁻¹)	Nitrogênio (g L ⁻¹)	AF (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	Densidade (g cm ⁻³)	PR (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Experimento 1						
0	5,80±0,27 ^c	0,80±0,02 ^a	106,45±1,82 ^a	00,00±0,00 ^f	0,996877±0,00 ^a	0,00±0,00 ^d
4,5	5,71±0,19 ^c	0,73±0,02 ^b	88,41±1,00 ^b	10,27±0,77 ^e	0,995343±0,00 ^b	2,28±0,24 ^b
9	5,82±0,04 ^c	0,60±0,02 ^c	72,49±0,92 ^c	15,83±0,23 ^d	0,994567±0,00 ^c	1,76±0,03 ^c
13,5	6,24±0,18 ^b	0,58±0,02 ^c	16,98±0,88 ^d	37,20±0,10 ^c	0,991573±0,00 ^d	2,76±0,01 ^a
18	6,33±0,17 ^{ab}	0,58±0,03 ^c	2,71±0,03 ^e	48,20±0,35 ^b	0,990173±0,00 ^e	2,68±0,02 ^a
22,5	6,40±0,29 ^{ab}	0,52±0,00 ^d	2,29±0,00 ^{ef}	49,60±0,26 ^a	0,989967±0,00 ^f	2,20±0,01 ^b
27	6,65±0,07 ^a	0,46±0,02 ^e	0,77±0,06 ^f	50,37±0,38 ^a	0,989847±0,00 ^f	1,87±0,01 ^c
p – Brown Forsythe*	0,95	0,06	0,54	0,68	0,22	0,44
P – ANOVA**	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Experimento 2						
0	4,37±0,05 ^d	0,76±0,04 ^a	118,68±0,20 ^a	00,00±0,00 ^g	0,996850±0,00 ^a	0,00±0,00 ^f
4,5	4,91±0,11 ^c	0,74±0,00 ^a	99,39±0,84 ^b	00,97±0,21 ^f	0,996770±0,00 ^a	0,21±0,05 ^e
9	4,92±0,02 ^c	0,65±0,02 ^b	51,55±0,36 ^c	22,33±0,47 ^e	0,993647±0,00 ^{ab}	2,48±0,05 ^b
13,5	5,23±0,01 ^b	0,63±0,04 ^b	5,59±0,08 ^d	42,23±0,15 ^d	0,993333±0,00 ^b	3,13±0,01 ^a
18	5,30±0,08 ^b	0,55±0,00 ^c	5,32±0,01 ^d	44,73±0,06 ^c	0,993395±0,00 ^b	2,49±0,00 ^b
22,5	5,49±0,07 ^a	0,48±0,04 ^d	4,42±0,05 ^e	45,57±0,06 ^b	0,990460±0,00 ^{bc}	2,03±0,00 ^c
27	5,57±0,06 ^a	0,46±0,02 ^d	4,26±0,09 ^e	52,20±0,10 ^a	0,989583±0,00 ^c	1,93±0,00 ^d
p – Brown Forsythe*	0,87	0,06	0,16	0,34	0,48	0,24
P – ANOVA**	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: AF – açúcares fermentescíveis (glucose+galactose); Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina. * Valores de probabilidade obtidos segundo o teste de Brown-Forsythe para homogeneidade de variâncias; ** Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único. *** Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa de acordo com o teste de Fisher LSD (p<0,05).

A produção final de ácido láctico para os diferentes tratamentos e para o experimento onde nenhum tratamento foi realizado se encontra na figura 14. Sem aplicação de tratamento prévio à fermentação (pasteurização ou uso de antibióticos) a acidez final dos experimentos foi de: 7,63 g L⁻¹ para o experimento contendo apenas milhocina e 7,28 g L⁻¹ para o experimento com 25% de soro, e não houve a produção de etanol devido à alta contaminação bacteriana (Figura 14).

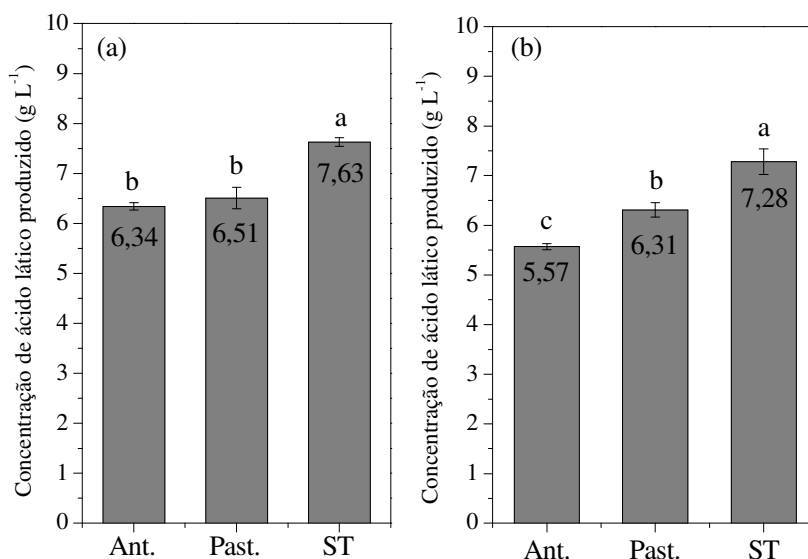


Figura 14: Comparação da produção de ácido láctico após 27 horas de fermentação utilizando diferentes métodos de controle de contaminantes.

Nota: (a) Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; (b) Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina; Ant.: tratamento com antibiótico; Past.: tratamento térmico (pasteurização); ST: sem tratamento.

*Letras diferentes representam diferença significativa de acordo com o teste de Fisher LSD- $p < 0,05$.

Com o uso da monensina sódica menores índices de ácido láctico foram atingidos, o que é favorável, pois segundo Mekanjuola et al. (1992) a contaminação por bactérias inibe a produção de etanol não só por competir com os açúcares junto a levedura, mas também por tornar a levedura incapaz de fazer pleno uso dos açúcares presentes. Desta forma, nas curvas de liberação de CO₂ observa-se que para ambos os meios a ausência de tratamentos contra contaminantes e a consequente alta presença de bactérias lácticas no mosto, inibe a ação da levedura *S. cerevisiae* impedindo a liberação de dióxido de carbono e a produção de etanol.

Em termos de cinética fermentativa o perfil de consumo de açúcar e nitrogênio assim como a produção de biomassa e etanol utilizando o antibiótico monensina sódica (Figuras 15 e 16) foi semelhante ao perfil resultante do mosto pasteurizado.

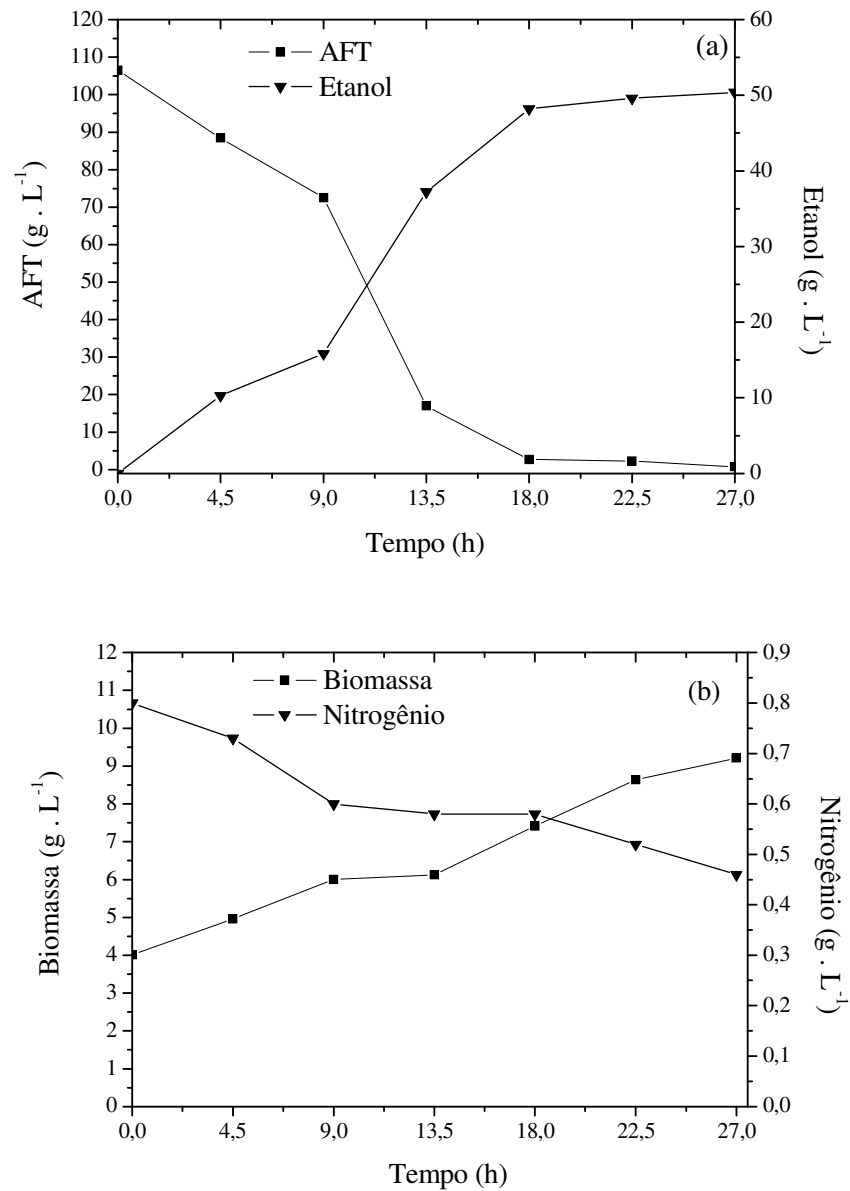


Figura 15: Cinética Fermentativa para experimento 1 utilizando antibiótico: (a) consumo de açúcares fermentescíveis totais (AFT) e produção de etanol; (b) Consumo de nitrogênio e produção de biomassa. Nota: Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina.

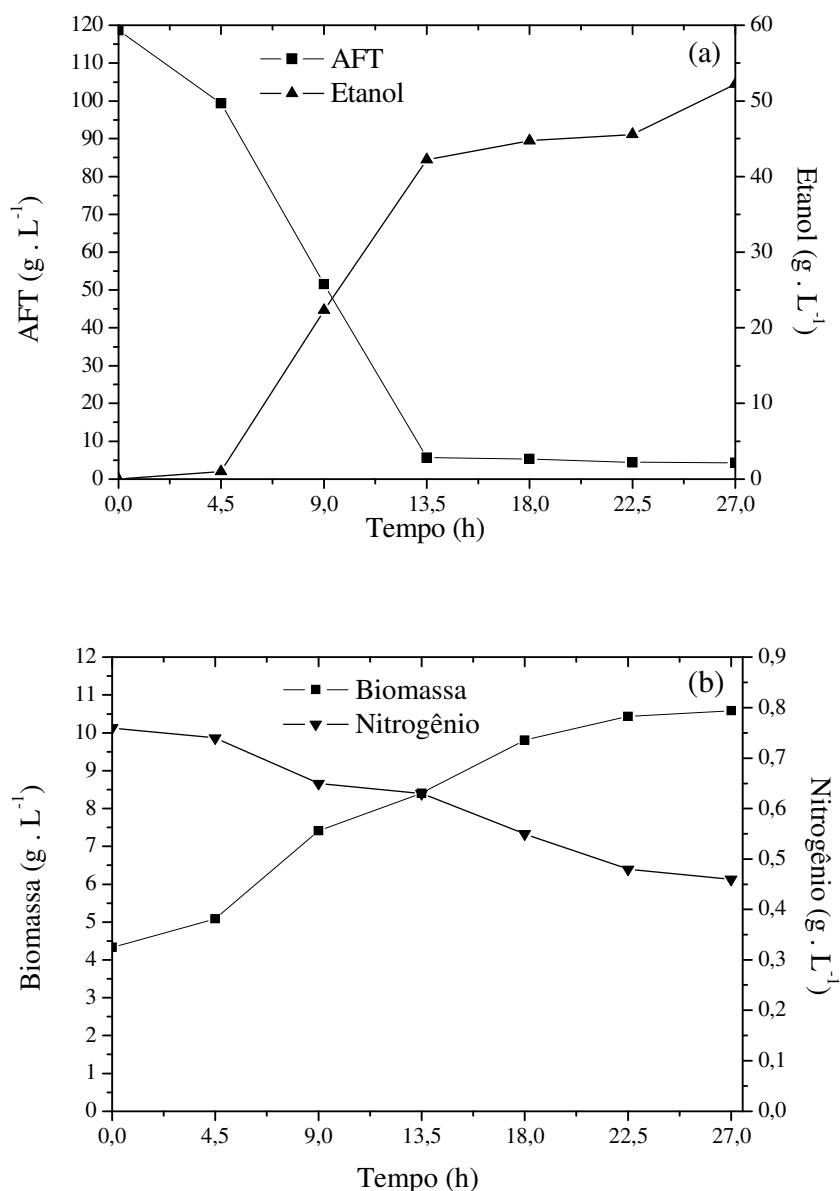


Figura 16: Cinética Fermentativa para experimento 2 utilizando antibiótico: (a) consumo de açúcares fermentescíveis totais (AFT) e produção de etanol; (b) Consumo de nitrogênio e produção de biomassa.
Nota: Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina.

Quanto à determinação de $\mu_{\text{máx.}}$ realizada por regressão linear no intervalo entre 9 e 18 horas de fermentação, a velocidade máxima específica de crescimento da levedura ($\mu_{\text{máx.}}$) utilizando o antibiótico como controle de contaminantes foi de $0,02 \text{ h}^{-1}$ para o experimento 0,00-1,00 e de $0,03 \text{ h}^{-1}$ para o experimento 0,25-0,75 (Figura 17). Ambos os valores foram inferiores aos obtidos a partir da fermentação de mosto pasteurizado os quais foram de $0,07 \text{ h}^{-1}$ para o experimento 0,00-1,00 e de $0,05 \text{ h}^{-1}$ para o experimento 0,25-0,75. Sendo assim, o uso de antibiótico reduz a velocidade máxima específica de crescimento da levedura, o que é

favorável, pois segundo alguns estudos, menores níveis de $\mu_{\text{máx.}}$ resultam em rendimentos elevados de etanol (BASSO et al., 2008; BASSO et al., 2011; BOENDER et al., 2009).

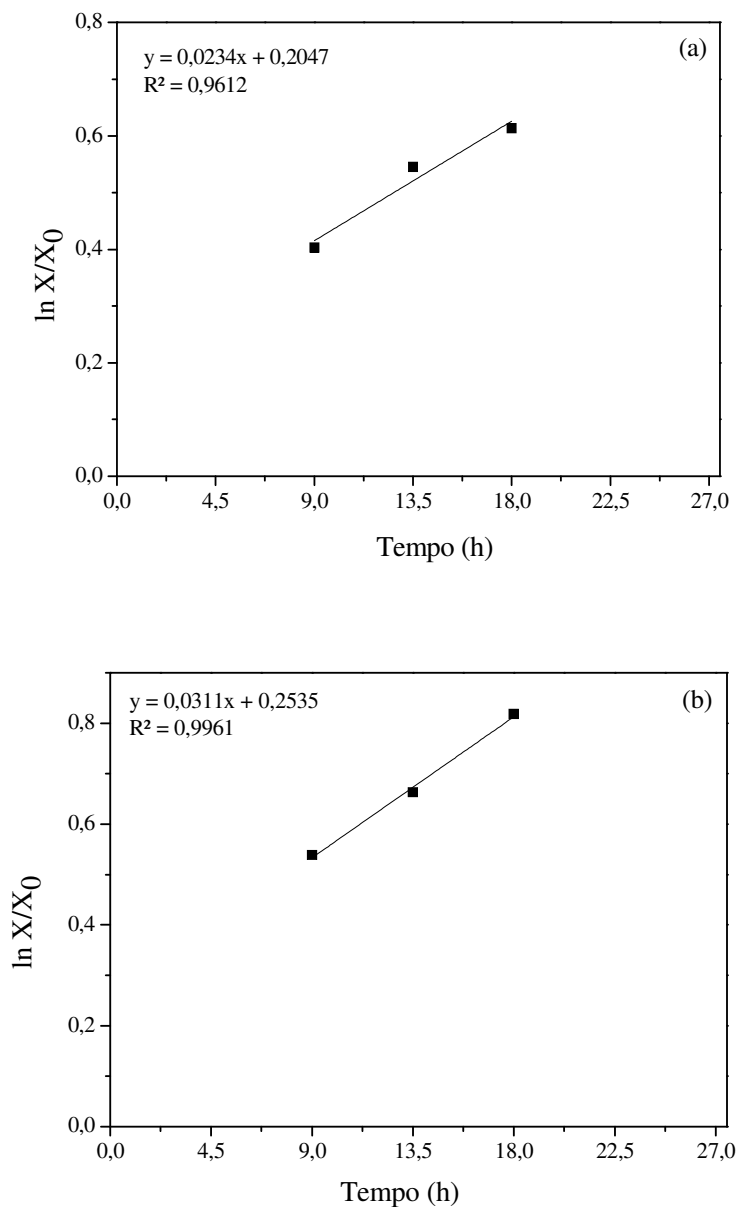


Figura 17: Gráfico para determinação de $\mu_{\text{máx}}$ pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento para os ensaios: (a) Experimento 1 e (b) Experimento 2 utilizando antibiótico P. Maxx.

Nota: Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina.

O menor valor de $\mu_{\text{máx}}$ refletiu diretamente na eficiência da fermentação e de processo. Na Tabela 16 pode-se observar que os mostos tratados com antibióticos apresentaram maior eficiência que o mesmo mosto pasteurizado. Comparando os diferentes

experimentos, o mosto contendo 100 % de milhocina apresentou melhores resultados do que aquele que continha 25 % de soro.

Tabela 16: Resultados dos parâmetros da fermentação dos experimentos avaliados em 27 h de processo comparando métodos de controle de contaminantes.

Parâmetros	Experimento 1		Experimento 2		p – Brown	p – ANOVA**
	Pasteurizado	Antibiótico	Pasteurizado	Antibiótico	Forsythe*	
$Y_{\frac{P}{S}}$	0,48±0,01 ^a	0,48±0,01 ^a	0,44±0,00 ^c	0,46±0,00 ^b	0,44	<0.01
N _b (%)	93,32±1,00 ^a	93,85±0,98 ^a	86,33±0,32 ^c	89,28±0,06 ^b	0,44	<0.01
N _p (%)	93,05±1,02 ^a	92,18±0,99 ^a	82,75±0,47 ^c	86,07±0,02 ^b	0,48	<0.01
$Y_{\frac{X}{S}}$	0,06±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a	0,05±0,00 ^b	0,05±0,00 ^b	0,28	<0.01

Nota: Experimento 1 - mosto contendo 100 % de milhocina; Experimento 2 - mosto contendo 25 % de soro e 75 % de milhocina; PR - produtividade em etanol; $Y_{\frac{P}{S}}$ - Fator de conversão de substrato em etanol (g g⁻¹); N_b - Eficiência de fermentação (%); N_p - Eficiência de processo (%); $Y_{\frac{X}{S}}$ - Fator de conversão de substrato em biomassa.

* Valores de probabilidade obtidos segundo o teste de Brown-Forsythe para homogeneidade de variâncias.

** Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único.

*** Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa de acordo com o teste de Fisher LSD (p<0,05).

Relacionando a Figura 14 com a Tabela 16, quanto maior a produção de ácido lático menor o rendimento (N_b) da fermentação em produção de etanol durante as 27 horas de fermentação para os experimentos em que foram utilizados os tratamentos.

O uso de antimicrobianos alternativos, como antibióticos, pode apresentar efeito positivo tanto na melhoria da fermentação quanto no valor econômico da produção de bioetanol em função de sua eficácia contra a maioria dos contaminantes presentes em sistemas industriais de fermentação por leveduras (MUTHAIYAN et al., 2011). Além disso, tratamentos como a pasteurização, necessitam de instalações diferenciadas, e elevado gasto energético para geração de calor e a necessidade de reduzir a temperatura do mosto antes da inoculação enquanto o antibiótico necessita de pequenas dosagens (2 a 5 ppm) para ser efetivo contra os contaminantes, podendo ser utilizado para tratamento do mosto nas próprias dornas de fermentação sem a necessidade de adaptação da planta de produção.

Quanto à biomassa e mosto residual, o resíduo de monensina, se controlada a sua concentração, pode ser destinado à alimentação animal visto que a monensina é usada extensivamente como promotora do crescimento principalmente em bovinos melhorando a conversão alimentar (ANDREOTTI e NICODEMO, 2004) sugerindo-se, então, uma utilização de toda biomassa residual gerada neste processo.

6. CONCLUSÕES

A milhocina, subproduto proveniente da produção de farinha de milho do tipo biju, apresenta-se deficiente em açúcares na sua composição físico-química, porém é rica em nitrogênio e aminoácidos livres, com destaque para a presença de prolina, podendo ser utilizado como fonte de nutrientes em inúmeros processos biológicos incluindo fermentação alcoólica.

Diferente da milhocina, o soro de leite é rico em lactose, um açúcar não fermentescível pela levedura alcoólica convencional. Porém, se o soro passar por um tratamento prévio de hidrólise da lactose, esta se torna uma mistura dos açúcares glucose e galactose, ambos consumidos pela levedura mais utilizada para produção de etanol, a *Saccharomyces cerevisiae*. Quanto a compostos nitrogenados do soro, destaca-se a presença de amônia, utilizada para crescimento microbiano.

Processos fermentativos em geral, necessitam tanto de fontes de carbono quanto de nitrogênio para melhor desempenho e eficiência. Desta forma ambos os subprodutos foram considerados aptos para o uso em bioprocessos. Através do planejamento de misturas binárias verificou-se que o aumento da eficiência da fermentação (N_b %) foi proporcional à presença de milhocina no meio.

Obteve-se um modelo preditivo que permitiu a otimização do processo fermentativo e repetindo-se os experimentos o erro absoluto entre os valores teóricos e práticos foi baixo (< 10 %).

Através da cinética fermentativa observaram-se com clareza as três fases existentes na fermentação alcoólica e obtiveram-se processos fermentativos considerados de alta eficiência e alta produtividade em produção de etanol atingindo eficiência máxima de 93,32 % e produtividade máxima de $1,88 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de etanol. Quanto ao cálculo da velocidade máxima de crescimento da levedura, ambos os experimentos avaliados apresentaram baixos níveis de crescimento de levedura e alto nível de conversão de substrato em biomassa o que é desejável para obtenção de rendimentos elevados de etanol.

Utilizando-se fontes alternativas de açúcares evidenciou-se que os nutrientes presentes nos subprodutos são de grande importância para o processo fermentativo, e que a mistura de melaço de cana de açúcar com milhocina é uma alternativa viável para a produção de bioetanol, visto que ambos são subprodutos amplamente disponíveis em países como o Brasil.

Avaliando-se diferentes tipos de controles de contaminantes da fermentação alcoólica pode-se observar que a produção de ácido láctico pelos micro-organismos contaminantes pode afetar fortemente a produção de etanol. Verificou-se que tanto o uso do tratamento térmico (pasteurização), quanto o uso de antibióticos, principalmente da monensina sódica cristalina, foram eficientes para o controle dos contaminantes presentes. O uso de antibióticos pode ser vantajoso em relação ao tratamento térmico, pois é de fácil aplicação, podendo ser utilizado na própria dorna de fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D. A.; INGLEDEW, W. M. Buffering capacity of whole corn mash alters concentrations of organic acids required to inhibit growth of *Saccharomyces cerevisiae* and ethanol production. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1313-1316, 2004.

ABIMILHO. **Consumo de milho humano e industrial do Brasil - 2013**. Disponível em: < <http://www.abimilho.com.br/estatistica/consumo> >. Acesso em: 29 ago. 2014.

AGARWAL, L.; DUTT, K.; MEGHWANSHI, G. K.; SAXENA, R. Anaerobic fermentative production of lactic acid using cheese whey and corn steep liquor. **Biotechnology letters**, v. 30, n. 4, p. 631-635, 2008.

AIHARA, R. Current Situation of Wastewater Treatment in Beverage Factories, the Best Treatment of Food Processing Wastewater Handbook. **Science Forum**, 2002. Disponível em:< https://www.env.go.jp/earth/coop/coop/document/male2_e/007.pdf> Acesso em: 08 out. 2014.

ALBERTI, A.; VIEIRA, R. G.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Apple wine processing with different nitrogen contents. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 551-558, 2011.

ALDIGUIER, A. S.; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J. L.; GUILLOUET S. E.; MOLINA-JOUVE C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamics behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, n. 4, p. 217- 222, 2004.

ALESSI, M. O.; RAUPP, D. D. S.; GARDINGO, J. R. Caracterização do processamento da farinha de milho biju para o aproveitamento dos subprodutos. **Publicatio UEPG - Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 9, n. 02, 2009.

ALSAED, A. K.; AHMAD, R.; ALDOOMY, H.; EL-QADER, S. A.; SALEH, D.; SAKEJHA, H.; MUSTAFA, L. Characterization, concentration and utilization of Sweet and acid whey. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 12, n. 2, p. 172-177, 2013.

ALVIM, I. D.; SGARBIERI, V. C.; CHANG, Y. K. Desenvolvimento de farinhas mistas extrusadas à base de farinha de milho, derivados de levedura e caseína. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 22, p. 171-176, 2002.

AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-Xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 2, p. 211-214, 1994.

AMORIM, H. V.; LOPES M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 1267-1275, 2011.

ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. F. **Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p. 50, 2004.

ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. Classificação das Cepas de Levedura de Processos Industriais de Fermentação Alcoólica Utilizando Capacidade Fermentativa. **Revista STAB - Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v. 17, n. 5, 1999.

ANP, **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Disponível em: <www.anp.gov.br> Acesso em: 08 out. 2014.

ANTONI, D.; ZVERLOV, V.; SCHWARZ, W.; ANTONI, D.; ZVERLOV, V.; SCHWARZ, W. Biofuels from microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 23-35, 2007.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Manole, 2003.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International: Agricultural chemicals, contaminants, drugs**. AOAC International, 2000.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Association, 1998.

ARIAS-GIL, M.; GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1312-1318, 2007.

AZEREDO, L. A. I.; LIMA, M. B.; COELHO, R. R. R.; FREIRE, D. M. G. A low-cost fermentation médium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 Using Feahter Meal and Corn Steep Liquor. **Current Microbiology**, v. 53, p. 335-339, 2006.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

BASSO, L.C.; DE AMORIM, H.V.; DE OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, T.O.; KOK, S.; DARIO, M.; ESPIRITO-SANTO, J.C.A.; MULLER, G.; SCHLOLG, P.S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J-M.; GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; STAMBUK, B. U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 649-703, 2011.

BARROS, B. N.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, E. B. **Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas, SP: 2001.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 387-394, 2011.

BEHERA, S.; MOHANTY, R. C.; RAY, R. C. Ethanol fermentation of sugarcane molasses by *Zymomonas mobilis* MTCC 92 immobilized in *Luffa cylindrica* L. sponge discs and Calcium alginate matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1499-1507, 2012.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 965-977, 2008.

BISCHOFF, K. M.; LIU, S.; LEATHERS, T. D.; WORTHINGTON, R. E.; RICH, J. O. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 117-122, 2009.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOENDER, L. G.; DE HULSTER, E. A.; VAN MARIS, A. J.; DARAN-LAPUJADE, P. A.; PRONK, J. T. Quantitative physiology of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero specific growth rates. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5607-5614, 2009.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS, B, N. **Statistical design-chemometrics**. Elsevier, v.25, 2006.

CAETANO, A.C.G.; MADALENO, L.L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

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

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, I. S. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 15, p. 2824-2828, 2007.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 301-309, 2000.

CHANG, I. S.; KIM, B. H.; SHIN, P. K. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1-6, 1997.

CHATZIPASCHALI, A. A.; STAMATIS, A. G. Biotechnological utilization with a focus on anaerobic treatment of cheese whey: current status and prospects. **Energies**, v. 5, p. 3492-3525, 2012.

CHOI, G. W.; UM, H. J.; KANG, H. W.; KIM, Y.; KIM, M.; KIM, Y. H. Bioethanol production by a flocculent hybrid, CHFY0321 obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 8, p. 1232-1242, 2010.

CHOI, J. D. R.; JANG, Y. S.; CHO, J. H.; SEUNG, D.; LEE, S. Y.; PAPOUTSAKIS, E. T.; BENNETT, G. N.; SONG, H. Characterization and evaluation of corn steep liquid in acetone-butanol-ethanol production by *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 2, p. 266-271, 2013.

COELHO, S. T.; GOLDEMBERG, J.; LUCON, O.; GUARDABASSI, P. Brazilian sugarcane ethanol: lessons learned. **Energy for Sustainable Development**, v. 10, n. 2, p. 26-39, 2006.

COMPART, D. P.; CARLSON, A. M.; CRAWFORD, G. I.; FINK, R. C.; DIEZ-GONZALEZ, F.; DICOSTANZO, A.; SHURSON, G. C. Presence and biological activity of antibiotics used in fuel ethanol and corn co-product production. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 5, p. 2395-2404, 2013.

DAHLQUIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose oxidase reagent. **Biochemical Journal**, v. 80, p. 547-51, 1961.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214-219, 1980.

DIAS, J. M. C. S.; SOUZA, D. T.; BRAGA, M.; ONOYAMA, M. M.; MIRANDA, C. H. B.; BARBOSA, P. F. D.; ROCHA, J. D. Resíduos agroflorestais e agroindustriais como matérias-primas de briquetes e péletes. **Jornal Biomassa BR**, v. 7, p. 10,00-1,002, 2013.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 258-266, 2003.

DODIĆ, S.; POPOV, S.; DODIĆ, J.; RANKOVIĆ, J.; ZAVARGO, Z.; JEVTIĆ MUČIBABIĆ, R. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 5, p. 822-827, 2009.

DOMBEK, K.; INGRAM, L. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1286-1291, 1987.

EDWINOLIVER, N. G.; THIRUNAVUKARASU, K.; PURUSHOTHAMAN, S.; ROSE, C.; GOWTHAMAN, M. K.; KAMINI, N. R. Corn steep liquor as a nutrition adjunct for the production of *Aspergillus niger* lipase and hydrolysis of oils thereof. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10658-10663, 2009.

EL-MANSI, E.M.T.; BRYCE, C.F.; DEMAINE, A.L.; ALLMAN, A. R. **Fermentation microbiology and biotechnology**. CRC press. 2nd ed, 2006.

FAO. Produção de queijos no Brasil. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**, 2011. Disponível em: < www.fao.org.br >. Acesso em: 29 ago 2014.

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

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

FRIGON, J. C.; BRETON, J.; BRUNEAU, T.; MOLETTA, R.; GUIOT, S. R. The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4156-4163, 2009.

GÄNZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685-694, 2008.

GAO, Y.; YUAN, Y. J. Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor in 2-keto-L-gulononic acid fermentation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 18, p. 9845-9853, 2011.

GASQUES, J. G.; BASTOS, E. T. Crescimento da Agricultura. **Agriculturas Amazônicas UFPA**, v. 60, Boletim de Conjuntura, 2003.

GELEGENIS, J.; GEORGAKAKIS, D.; ANGELIDAKI, I.; MAVRIS, V. Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. **Renewable Energy**, v. 32, n. 13, p. 2147-2160, 2007.

GLASS, L.; HEDRICK, T. I. Nutritional composition of sweet and acid-type dry whey. I. Major Factors Including Amino Acids. **Journal of dairy science**, v. 60, n. 2, p. 185-189, 1977.

GRANATO, D.; CALADO, V. M. A.; JARVIS, B. Observation on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014.

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

HAMDY, M. K.; TOLEDO, R. T.; SHIEH, C. J.; PFANNENSTIEL, M. A.; WANG, R. Effects of Virginiamycin on fermentation rate by yeast. **Biomass and Bioenergy**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 1996.

HARVEY, M.; PILGRIM, S. The new competition for land: Food, energy, and climate change. **Food Policy**, v. 36, n. 1, p. 40-51, 2001.

HYNES, S.; KJARSGAARD, D.; THOMAS, K.; INGLEDEW, W. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 284-291, 1997.

IBETO C. N.; OFOEFULE A. U.; AGBO K. E. A global overview of biomass potentials for bioethanol production: a renewable alternative fuel. **Trends in Applied Sciences Research**, v. 6, p. 410-425, 2011.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE. Amino Acid and Ammonium Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts from a Chemically Defined Medium. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, n. 1, p. 75-83, 1995.

IUPAC. **Tentative rules for carbohydrate nomenclature, Part I.** Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN): 1969.

LADEIRA, S. A.; DELATORRE, A. B.; ANDRADE, M. V. V.; MARTINS, M. L. L. Nota Científica: utilização da pectina, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus* sp. termofílico. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 92-98, 2012.

LAU, M. W.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 11, 2010.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. Corn Steep Liquor as a Cost-effective Nutrition Adjunct in High-Performance *Zymomonas* Ethanol Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63, n. 65, p. 287- 304, 1997.

LEITE, A. R.; GUIMARÃES, W. V.; ARAÚJO, E. F.; SILVA, D. O. Fermentation of sweet whey by recombinant *Escherichia Coli* KO11. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 212-215, 2000.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V.; CORTEZ, L. A. B.; GRIFFIN, W. M.; SCANDIFFIO, M. I. G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, p. 655-661, 2008.

LELOIR, L. F. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 33, n.2, p. 186-190, 1951.

LENHINGER, A.L.; MARZZOCO, A.; TORRES, B.; CHAMP, P.; BERG, J. **Princípios de bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 1986.

LIMA, C. J. B.; COELHO, L. F.; BLANCO, K. C.; CONTIERO, J. Response surface optimization of D(-)-lactic acid production by *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as an alternative nitrogen source. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 21, p. 5842-5846, 2009.

LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. v. 3 Ed. Edgard Blucher LTDA, São Paulo, SP, 2001.

LOSS, E.; ROYER, A. R.; BARRETO-RODRIGUES, M.; BARANA, A. C. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp. mushroom and optimization of its biological efficiency. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 2, p. 1522-1525, 2009.

LOWICKI, D.; HUCZYNSKI, A. Structure and Antimicrobial Properties of Monensin A and Its Derivatives: Summary of the Achievements. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 42, p. 3-40, 1998.

MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D. G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 350-357, 1992.

MADIGAN, M. T.; BROCK, T. D. **Brock biology of microorganisms**. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, 2009.

MADDIPATI, P.; ATIYEH, H. K.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L. Ethanol production from syngas by Clostridium strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6494-6501, 2011.

MEHAIA, M. A.; CHERYAN, M. Ethanol from hydrolyzed whey permeate using *Saccharomyces cerevisiae* in a membrane recycle bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 5, n. 2, p. 57-61, 1990.

MENEGHIN, M. C.; REIS, V. R.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Inhibition of bacteria contaminating alcoholic fermentations by killer yeasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, 2010.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 351-370, 2011.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Urea Hydrogen Peroxide Reduces the Numbers of Lactobacilli, Nourishes Yeast, and Leaves No Residues in the Ethanol Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4187-4192, 2000.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effectis of acetic acid and lactic acido on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in minimal médium **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 26, p. 171-177, 2001.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of Lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2239-2243, 2005.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 19-24, 2004.

ONWULATA, C. I.; HUTH, P. J. **Whey Processing, Functionality and Health Benefits**: v. 82, John Wiley & Sons, 2009.

OSUNKOYA, O. A.; OKWUDINKA, N. J. Utilization of sugar refinery waste (molasses) for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. **American Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 2, n. 4, p. 694-706, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 1-14, 2007a.

PANESAR, R.; PANESAR, P. S.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; BERA, M. B. Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 786-790, 2007b.

PAREKH, M.; FORMANEK, J.; BLASCHEK, H. P. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 2, p. 152-157, 1999.

PAREKH, M.; VINCI, V. A.; STROBEL, R. J. Improvement of microbial strain and fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 287-301, 2000.

PARK, J-H.; KIM, S-H. K.; PARK, H-D.; KIM, J. S.; YOON, J-J. Simultaneous utilization of galactose and glucose by *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain for ethanol production. **Renewable Energy**, v. 65, p.213-218, 2014.

PHIBRO. **Phibro Ethanol Performance Group**. Disponível em: <<http://www.ethanolperformancegroup.com>> Acesso em: 13 out. 2014.

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

PRESSMAN, B. C. Biological Applications of Ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, v. 45, p. 501-530, 1976.

RAJA, R. S.; MANISEKAR, K.; MANIKANDAN, V. Study on mechanical properties of fly ash impregnated glass fiber reinforced polymer composites using mixture design analysis. **Materials & Desing**, v. 55, p. 499-508, 2014.

REGULY, Júlio Carlos. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Ed. Universitária UFPel, Pelotas, RS. v. 1, 1996.

REGULY, Júlio Carlos. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Ed. Universitária UFPel, Pelotas, RS. v. 2, 1998.

REGULY, Júlio Carlos. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Ed. Universitária UFPel, Pelotas, RS. v. 3, 2000.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 2, p. 255-263, 1999.

ROGER, J.-M.; SABLAYROLLES, J.-M.; STEYER, J.-P.; BELLON-MAUREL, V. Pattern analysis techniques to process fermentation curves: Application to discrimination of enological alcoholic fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 7, p. 804-815, 2002.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. **Valorização de Resíduos da Agroindústria**. In: II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais. Foz do Iguaçu - PR. p. 98-105, 2011.

ROSSETTO, B. P.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Determination of the Activity of the Enzyme β -galactosidase by Lactose Whey Cheese. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 28-32, 2012.

SAAVEDRA, G. A.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Comunicado Técnico - Embrapa**, 2005.

SADDOUD, A.; HASSAIRI, I.; SAYADI, S. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. **Bioresource technology**, v. 98, n. 11, p. 2102-2108, 2007.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A.; Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. v. 2 Ed. Edgard Blucher LTDA, São Paulo, SP, 2001.

SCHNEIDER, V. E.; PERESIN, D.; TRENTIN, A. C.; BORTOLIN, T. A.; SAMBUICHI, R. H. R. **Resíduos Agrosilvopastoris I: Resíduos Orgânicos**. RESÍDUOS, P. N. D. Ministério do Meio Ambiente, 2011.

SILVA, A. C.; GUIMARÃES, P. M.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 9, p. 973-982, 2010.

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

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, n.9, p. 401-408, 2004.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; COSTA, B.; WOICIECHOWSKI, A. L. DE CARVALHO, J. C.; MEDEIROS, A. B. P.; FRANCISCO, A. M.; BONOMI, L. J. Brazilian biofuel program: An overview. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, n. 11, p. 897-904, 2005.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; LEITÃO, V. F.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil, **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SPIGNO, G.; FUMI, M.; DE FAVERI, D. Glucose syrup and corn steep liquor as alternative to molasses substrates for production of baking-quality yeast. **Chemical Engineering**, v. 17, p. 843-848, 2009.

STICHLMAIR, J. G.; FAIR, J. R. **Distillation: principles and practices**. New York: Wiley-VCH, 1998.

STROPPIA, C. T.; ANDRIETTA, M. G.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G. E. Use of penicillin and monensina to control bacteria. **International Sugar Journal**, v. 102; n. 1214, p. 78-94, 2000.

STROPPIA, C. T.; ALVES, J. G. L. F.; FIGUEIREDO, A. L. F. D.; CASTRO, C. C. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1978-1983, 2009.

STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Biochemistry**, 5th Edition. W. H. Freeman, 2002.

THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Fuel Alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2046-2050, 1990.

TRIANA, C. A. R. Energetics of Brazilian ethanol: Comparison between assessment approaches. **Energy Policy**, v. 39, n. 8, p. 4605-4613, 2011.

USDA – United States Department of Agriculture. **Biofuels**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/commodities/biofuels>>. Acesso em: 19 set 2014.

VAN MARIS, A. J.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, n.4, p. 391-418, 2006.

VILANOVA, M.; UGLIANO, M.; VARELA, C.; SIEBERT, T.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.77, n. 1, p. 145-157, 2007.

VOLPE, P. L. O. Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. **Química Nova**, v. 20, p. 528-534, 1997.

XI, Y.-L.; CHEN, K.-Q.; DAI, W.-Y.; MA, J.-F.; ZHANG, M.; JIANG, M.; WEI, P.; OUYANG, P.-K. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 775-779, 2013.

XIAO, X.; HOU, Y.; LIU, Y.; LIU, Y.; ZHAO, H.; DONG, L.; DU, J.; WANG, Y.; BAI, G.; LUO, GUOAN. Classification and analysis of corn steep liquor by UPLC/Q-TOF MS and HPLC. **Talanta**, v. 107, p. 344-348, 2013.

YANG, H.; WU, D.; HE, Y. Variety identification of brown sugar using short-wave near infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering**, v. 6788, n. 2, 2007.

YANG, T.-W.; RAO, Z.-M.; ZHANG, X.; XU, M.-J.; XU, Z.-H.; YANG, S.-T. Effects of corn steep liquor on production of 2,3-butanediol and acetoin by *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 11, p. 1610-1617, 2013.

YASMIN, A.; BUTT, M. S.; SAMEEN, A.; SHASHID, M. Physicochemical and Amino Acid Profiling of Cheese Whey. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 12, n. 5, 2013.

ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BON E. P.; GIORDANO, R. C.; DE MORAES, F. F.; ANDRIETTA, S. R.; DE CARVALHO, C.C.; MACEDO, I.C.; FO, D.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84, n. 86, p. 1147-1161, 2000.