

# NOVAS METODOLOGIAS PARA A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO SORO DE QUEIJO

L. DOMINGUES, N. LIMA e J.A. TEIXEIRA

Centro de Engenharia Biológica – IBQF, Universidade do Minho  
4700 – 320 Braga – Portugal.

## RESUMO

Em Portugal, são diariamente lançados no meio ambiente cerca de 1 milhão de litros de soro de queijo – fracção líquida resultante do fabrico de queijo. O impacte ambiental ocasionado por tal volume de efluentes, com elevada carga orgânica, é enorme. Recorrendo à tecnologia de DNA recombinante, modificou-se uma estirpe flocculante de *Saccharomyces cerevisiae* sendo-lhe conferida capacidade para fermentar lactose. Com esta estirpe foram realizados ensaios de fermentação em contínuo, utilizando como substrato soro de queijo desproteínizado, possibilitando operar a uma taxa de diluição máxima de  $0,45 \text{ h}^{-1}$ , correspondente a uma produtividade volumétrica em etanol de cerca de  $10 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , cerca de 7 vezes superior aos processos actualmente existentes. O processo integrado de recuperação da proteína e fermentação alcoólica permite uma redução superior a 90 % de CQO do soro, o que, por si só, se traduz numa enorme diminuição do impacte ambiental negativo, e, por outro lado, abre a porta à produção de etanol com viabilidade económica.

**PALAVRAS CHAVE:** Permeado do soro de queijo; fermentação alcoólica; fermentação contínua; flocculação; *Saccharomyces cerevisiae*.

## INTRODUÇÃO

Presentemente, o desenvolvimento de processos capazes de resolver proveitosamente o problema colocado por muitos efluentes industriais é um dos principais desafios da biotecnologia ambiental.

Entre os principais efluentes do sector de lacticínios encontra-se o soro de queijo, também denominado por soro de leite, traduzindo-se no líquido obtido após precipitação da caseína do leite. A produção de queijo é, deste modo, responsável pela geração de grandes quantidades de soro de queijo, que, se rejeitado como efluente, constitui um grave problema ambiental devido à sua elevada carga orgânica e difícil biodegradabilidade. O CQO (carência química de oxigénio) do soro chega a atingir  $60000 \text{ mgL}^{-1}$ , impossibilitando a sua incorporação num qualquer processo de tratamento tradicional de efluentes. Com o avanço da tecnologia, o fabrico de queijo passou de um processo tradicional, onde as pequenas quantidades de soro produzidas eram despejadas nos campos ou usadas como ração alimentar, para um processo industrial onde são produzidos diariamente milhares de litros de soro, cujo escoamento tem acrescidas

dificuldades, agravadas por tão elevada produção. Urge, assim, encontrar uma solução para a enorme quantidade de soro produzida por esta indústria agro-alimentar.

Em Portugal, a maioria das indústrias de lacticínios não contemplam ainda a fase de valorização de resíduos, sendo no entanto, um dos sectores com o qual o Ministério do Ambiente celebrou Contratos de Adaptação Ambiental e cuja adesão por parte das empresas foi voluntária. Actualmente, em virtude do referido Contrato, as empresas aderentes terão que cumprir a legislação ambiental vigente até 31 de Dezembro de 1999 [6].

As características do efluente obtido na produção de queijo que, por um lado, possui um elevado valor nutricional mas, por outro, é um potencial poluente, constituem um ponto de enormes pressões para que a indústria de lacticínios encontre alternativas para o seu uso [2]. O soro é constituído por água, lactose e 20 % das proteínas do leite (reconhecidas pelo seu elevado valor nutricional) e a maior parte das vitaminas e minerais deste. Na tabela I apresenta-se a constituição típica do soro de queijo doce.

Tabela I – Composição do soro de queijo doce.

<b>Componente</b>	<b>Concentração (%)</b>
Água	93-94
Lactose	4,5-5,0
Proteínas	0,8-1,0
Minerais	0,5-0,7
Gordura	0,1-0,5

Desde a Antiguidade (460 A.C.), o soro de queijo tem sido valorizado pelo Homem, sendo mesmo utilizado como ração animal ou suplemento de consumo humano. Ainda hoje o soro seco é largamente utilizado. No entanto, a quantidade produzida é geralmente superior às necessidades do mercado. Além de apresentar desvantagens deste ser muito flutuante, os custos de produção são elevados devido aos gastos energéticos do equipamento utilizado na secagem. A secagem é um processo cómodo que permite resolver o problema ambiental da descarga do soro sem criar resíduos adicionais derivados deste tratamento, não sendo, no entanto, economicamente atractivo.

Por cada litro de soro são desperdiçados cerca de 50 g de lactose e 10 g de proteína com elevado valor nutricional e funcional, criando condições para poder pensar-se num processo de valorização do soro com simultânea redução da carga poluente. Hoje em dia, o concentrado de proteínas de soro é a maior produção obtida a partir do soro de queijo, apenas ultrapassada pelas do soro em pó e do soro em pó desmineralizado [8]. O valor comercial deste produto está directamente relacionado com o seu teor proteico, podendo servir de aditivo na indústria de panificação (concentrados de 35 % de proteína) ou de ingrediente na confecção de alimentos infantis (concentrados com 92 % de proteína), este último com um preço dez vezes superior ao primeiro. O concentrado

proteico é obtido tipicamente por ultrafiltração, originando uma fracção rica em lactose, o permeado do soro de queijo. A obtenção do concentrado proteico, por si só, não se apresenta economicamente viável uma vez que apenas 1/6 do volume de soro serve para a produção de proteína, restando ainda um considerável volume de permeado de soro de queijo a manusear [1]. O permeado do soro pode ser utilizado para diversos fins, como alimentação de animais, produção de lactose, galactose, glucose, álcool, ácido láctico ou como constituinte em diversos produtos farmacêuticos e mesmo cosméticos. O factor determinante será, novamente, o aspecto económico. Alguns processos que utilizam o permeado do soro como substrato para fermentação alcoólica já se encontram implementados, nomeadamente na *New Zealand Cooperative Dairy Co.* na Nova Zelândia, na *Barbery Milk Products Lda.*, na Irlanda e em *Wisconsin*, nos E.U.A. O álcool obtido neste processo é essencialmente de dois tipos: álcool industrial e potável. O primeiro encontra aplicabilidade como combustível e o segundo como rectificador de bebidas alcoólicas. O processo de valorização do soro de queijo em causa encontra-se esquematizado na figura 1.

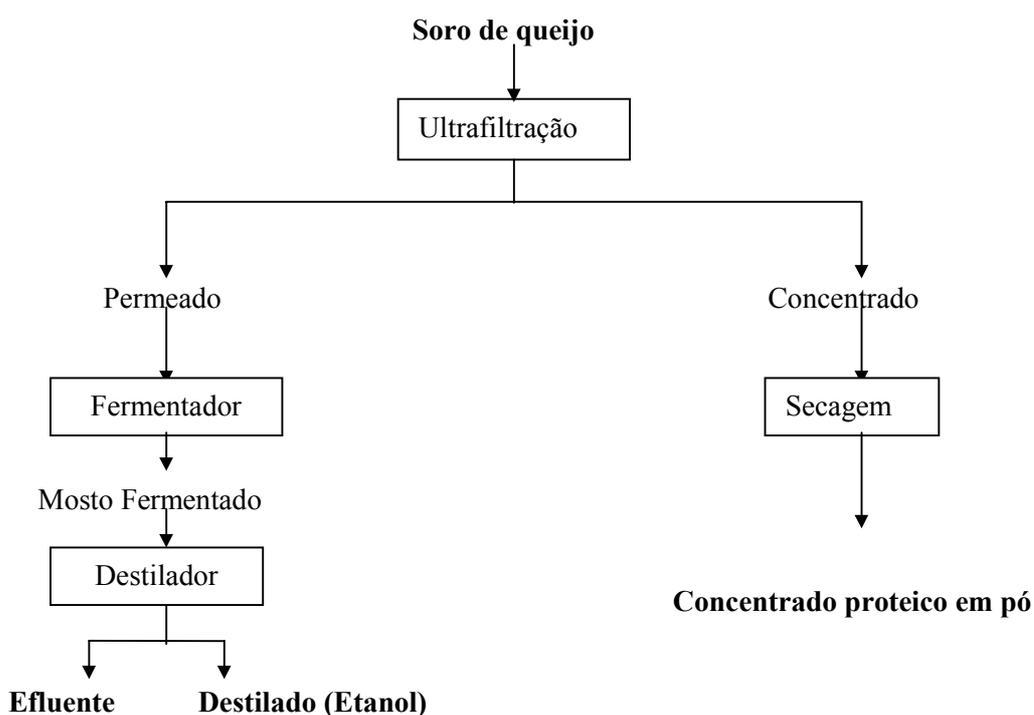


Fig. 1 – Esquema da valorização integral do soro de queijo [1].

Apesar dos processos de fermentação alcoólica do permeado de soro de queijo já estarem bem estabelecidos, existem ainda alguns aspectos passíveis de melhoramento. A utilização de fermentação em contínuo (os processos existentes utilizam fermentação por partidas) num sistema de alta densidade celular, é uma das alternativas a considerar. Estes sistemas baseiam-se na retenção de microrganismos no interior do fermentador,

utilizando para esse efeito diferentes técnicas. A imobilização de microrganismos e a incorporação de membranas no bioreactor, são algumas das técnicas utilizadas, sendo a floculação uma das mais atraentes.

A floculação (formação de agregados celulares) verifica-se espontânea e frequentemente em bactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas, células animais e vegetais. O seu aproveitamento em aplicações industriais remonta a várias décadas no sector cervejeiro e no tratamento de águas residuais com lamas activadas. Os bioreactores de alta densidade celular, quando operados continuamente, servem-se das propriedades de sedimentação rápida de células floculadas para reterem a biomassa no seu interior. Ao permitirem manter concentrações celulares elevadas, atingem produtividades e concentrações de produto muito superiores às dos sistemas convencionais. Outra vantagem destes sistemas é o melhoramento significativo dos processos de separação, tornando-os menos agressivos e com menores custos de produção já que a quantidade de células a separar por centrifugação ou filtração é reduzida fortemente. Refira-se ainda, a maior estabilidade destes sistemas de alta densidade celular a longo termo (comparativamente aos sistemas convencionais) e à protecção que apresentam contra contaminações.

Outro aspecto em que os processos de fermentação da lactose são passíveis de melhoramento não se prende com o processo em si, mas com o microrganismo utilizado na fermentação alcoólica da lactose. O microrganismo mais utilizado é a levedura do género *Kluyveromyces*, que fermenta naturalmente este açúcar apresentando, no entanto, problemas de inibição por etanol. As leveduras do género *Saccharomyces* são largamente utilizados na produção de alimentos e bebidas alcoólicas, representando os microrganismos de eleição para fermentação alcoólica.

Apesar de a levedura *Saccharomyces cerevisiae* fermentar uma grande variedade de açúcares, não é capaz de metabolizar a lactose, devido à ausência da enzima  $\beta$ -galactosidase (que hidrolisa este açúcar em glucose e galactose) e da permease da lactose, que permite a entrada da lactose para o interior das células. Têm surgido nos últimos anos, várias abordagens para a fermentação da lactose por *S. cerevisiae*. Uma das primeiras a surgir, utiliza a técnica de fusão de protoplastos, construindo híbridos de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* utilizadores de lactose [5]. No entanto, neste caso específico, a clonagem e transformação em *S. cerevisiae* é uma abordagem preferível e mais precisa.

No presente trabalho, construiu-se uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de metabolizar e fermentar a lactose, recorrendo à tecnologia do DNA recombinante. Assim, além de se poder utilizar o microrganismo de eleição para fermentação alcoólica na fermentação da lactose presente no permeado do soro, foi também possível operar em sistema de alta densidade celular com elevada produtividade em etanol.

## CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

### Descrição da Instalação Experimental

O bioreactor utilizado está representado na figura 2.

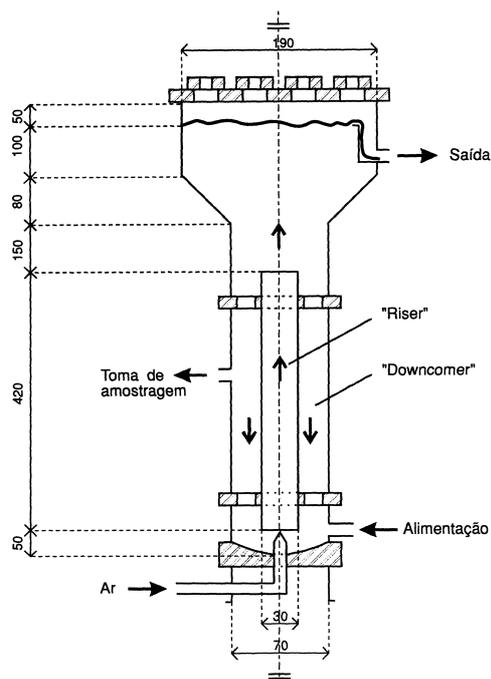


Fig. 2 - Esquema representativo do bioreactor *airlift*.

Trata-se de um *airlift* de circulação interna, do tipo tubo ascensor concêntrico, com um volume de 5,5 L. O ar é injectado imediatamente abaixo do tubo ascensor, através de um injektor de 1 mm de diâmetro, promovendo assim a mistura no interior do bioreactor. No topo, o alargamento cónico invertido permite uma área de desgaseificação e uma zona de desaceleração dos flocos. Parte do líquido fermentado transborda naturalmente para a zona de saída, e o restante é reciclado juntamente com a biomassa para a zona descensora ("downcomer") e novamente para o tubo ascensor ("riser"). Um anteparo semicilíndrico vertical na zona de saída, evita que um maior número de partículas sejam arrastadas pelo efluente. O sistema de regulação permite: controlo de temperatura  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ; controlo de pH por adição automática de amónia, para um *set-point* fixo de  $4 \pm 0,1$ ; controlo de espuma por adição de um anti-espuma (Sigma A-5551). O sistema foi arejado com ar esterilizado a um caudal entre 0,08 e 1 vvm. A taxa de diluição variou entre 0,1 e  $0,55 \text{ h}^{-1}$ .

### **Microrganismo utilizado**

A construção detalhada da estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de metabolizar a lactose encontra-se já descrita [3]. Resumidamente, desenvolveu-se um sistema de transformação que utilizou como estirpe hospedeira a levedura *S. cerevisiae* NCYC869-A3 (*Mat $\alpha$  Flo1 ura3*) e co-transformação dos vetores pKR1B-Lac4-1 (contém os genes *LAC4* e *LAC12* de *Kluyveromyces lactis*) e pYAC4 (contém a marca *URA3*). O gene *LAC12* de *Kluyveromyces lactis* codifica para uma permease da lactose permitindo assim, a entrada da lactose através da parede celular. O gene *LAC4* de *Kluyveromyces lactis* codifica para a proteína intracelular  $\beta$ -galactosidase que hidrolisa a lactose nos monossacáridos,  $\beta$ -D-glucose e  $\beta$ -D-galactose, açúcares metabolizáveis pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A marca auxotrófica *URA* permite a selecção dos transformantes na ausência de uracilo no meio de cultura. Com este sistema, obteve-se o transformante denominado T1 que se utilizou na fermentação alcoólica do permeado do soro de queijo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Características do permeado do soro de queijo**

Na tabela II apresenta-se a composição do permeado do soro de queijo, obtido após ultrafiltração do soro.

Tabela II – Composição do soro de queijo, permeado e concentrado [7].

Componente (%)	Soro	Concentrado	Permeado
Proteína	0,60	3,27	0,02
Azoto não proteico	0,20	0,30	0,18
Lactose	4,80	5,46	4,66
Cinza	0,55	0,77	0,50
Gordura	0,05	0,28	0
Sólidos Totais	6,2	10,1	5,4

Da leitura da tabela II, pode-se verificar que o permeado de soro é constituído por cerca de 50 gL<sup>-1</sup> de lactose e traços de outros nutrientes, tais como proteína, azoto e algumas vitaminas.

### **Fermentação descontínua do permeado do soro**

Numa primeira fase, tornou-se necessário verificar em cultura descontínua, se o transformante T1 era capaz de fermentar a lactose presente no permeado sem adição de qualquer outro nutriente. A necessidade de adição de outros nutrientes seria desvantajosa do ponto de vista económico. Como se pode observar na figura 3, em apenas 30 horas o transformante T1 metabolizou a totalidade de açúcar presente no permeado, produzindo etanol, com valores próximos do valor teoricamente esperado.

Além disso, estes valores são muito semelhantes aos previamente obtidos para meio sintético [4].

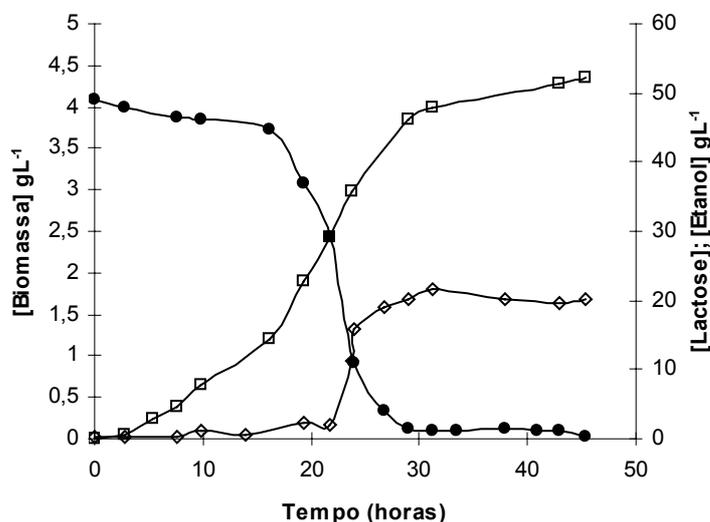


Fig.3 - Perfis de concentração celular (□), lactose (●), e etanol (◇) relativos ao transformante T1 em cultura agitada em matraz, utilizando como substrato o permeado de soro de queijo.

### Fermentação contínua do permeado do soro

Uma vez confirmada a viabilidade de utilização do permeado de soro como substrato para fermentação alcoólica, procedeu-se à fermentação em contínuo. Na figura 4 apresentam-se os diferentes parâmetros de fermentação medidos durante operação em estado pseudo-estacionário do bioreactor contínuo a taxas de diluição crescentes. A operação com permeado iniciou-se à taxa de diluição de  $0,1 \text{ h}^{-1}$  após atingir estado pseudo-estacionário com meio sintético. Após atingir concentrações de lactose residuais ( $< 1 \text{ gL}^{-1}$ ) a taxa de diluição foi sendo aumentada até o valor de  $0,55 \text{ h}^{-1}$ .

A concentração celular no interior do bioreactor aumentou até à taxa de diluição (D) de  $0,36 \text{ h}^{-1}$ , atingindo o valor máximo de  $42 \text{ gL}^{-1}$  (peso seco). Para D acima de  $0,45 \text{ h}^{-1}$  a concentração celular no interior do bioreactor diminuiu e aumentou na corrente de saída. Ao aumentar a taxa de diluição de  $0,45 \text{ h}^{-1}$  para  $0,5 \text{ h}^{-1}$ , a concentração de lactose residual aumentou para  $16 \text{ gL}^{-1}$ . Durante o período de operação com permeado de soro de queijo, a viabilidade celular manteve-se acima de 90%.

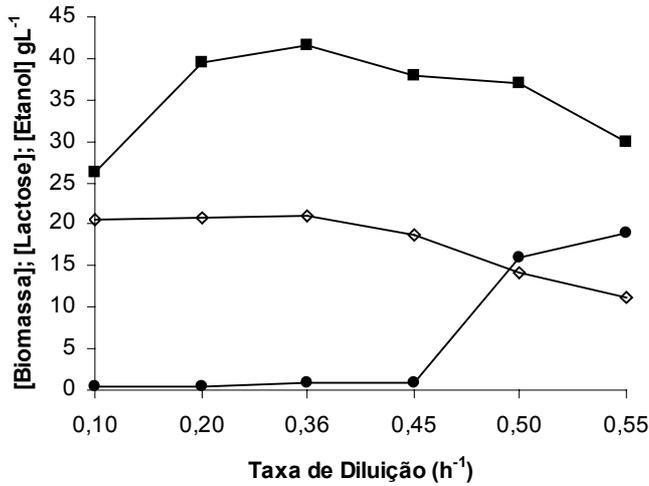


Fig.4 - Variação da concentração celular (■), lactose (●) e etanol (◇) em estado pseudo-estacionário com a taxa de diluição, para o bioreactor alimentado com permeado de soro de queijo.

Analisando dois parâmetros de grande importância, que são o rendimento de conversão em etanol ( $\eta$ ), expresso por

$$\eta(\%) = \frac{P}{(S_f - S)0.538} 100 \quad (\text{Eq.1})$$

e a produtividade em etanol, definida por

$$Q_p = DP \quad (\text{Eq.2})$$

pode constatar-se que o estado metabólico das células nos flocos se manteve constante nas taxas de diluição e condições de operação estudadas. Na figura 5, a produtividade em etanol, e o factor de conversão em etanol estão representados. Como se pode observar a produtividade em etanol aumenta até 0,45h<sup>-1</sup> de taxa de diluição, decrescendo posteriormente, enquanto que o factor de conversão em etanol se mantém constante até essa taxa de diluição decrescendo posteriormente.

Uma das principais vantagens dos sistemas de alta densidade celular é a sua resistência a contaminações. Para comprovar esse aspecto e uma vez que o permeado de soro não foi esterilizado, procedeu-se a um rastreio de contaminações ao bioreactor alimentado com permeado de soro. Uma vez que as bactérias são facilmente detectadas sob observação microscópica quando comparadas com *S. cerevisiae*, optou-se por um

rastreio selectivo para detectar leveduras contaminantes que são difíceis de discriminar opticamente. Este rastreio foi efectuado regularmente através de espalhamento em placas de meio de lisina (Oxoid CM191) e nenhuma levedura contaminante foi encontrada, comprovando-se desta forma a resistência destes sistemas a contaminações.

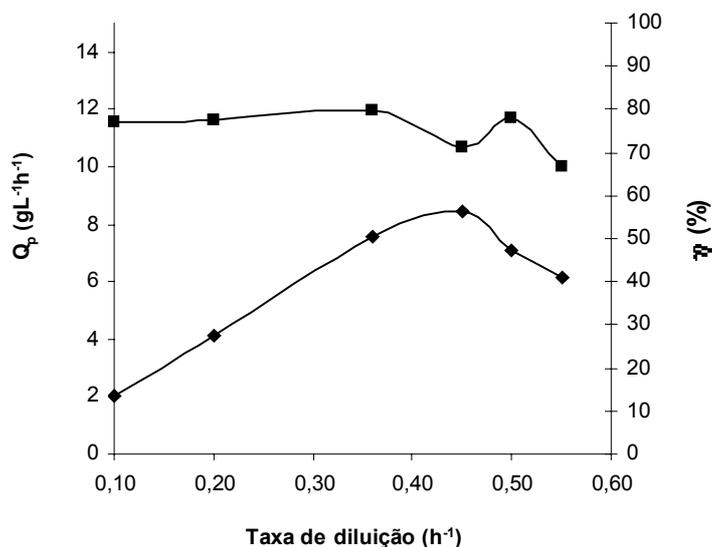


Fig. 5 - Variação da produtividade em etanol (◆), e factor de conversão em etanol (■) com a taxa de diluição para o bioreactor alimentado com permeado de soro de queijo.

Ao contrário dos concentrados proteicos que apresentam um alargado leque de utilizações e são economicamente atractivos, o permeado de soro é considerado como tendo pouco ou mesmo nenhum valor económico [9]. No entanto, os volumes produzidos são muito elevados, sendo pelo menos necessário algum tratamento antes da sua descarga como efluente. Através da incorporação da recuperação da proteína juntamente com a fermentação alcoólica uma redução superior a 90 % do CQO é obtida juntamente com a produção de etanol (ver tabela III). Além disso, o procedimento de fermentação aqui apresentado permite atingir estes objectivos a um baixo custo.

Tabela III – Caracterização físico-química do soro de queijo e do efluente final (obtido após fermentação e destilação do permeado do soro).

Parâmetro	Soro	Efluente final	Redução (%)
pH	5,5-6,5	3,8-4,3	-
CQO (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	76 076	7 221	91
CBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	67 067	2 133	97
SST(mgL <sup>-1</sup> )	11 440	262	98
Azoto Total (mgL <sup>-1</sup> )	1 329	705	47

## CONCLUSÃO

Construiu-se uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de utilizar o permeado do soro de queijo como única fonte de carbono e energia, fermentando cerca de 50 gL<sup>-1</sup> de lactose presente no permeado sem adição suplementar de qualquer outro nutriente. Com esta estirpe procedeu-se a ensaios em contínuo, num reactor *airlift* em cultura de alta densidade celular. A operação em contínuo permitiu eliminar a lactose do permeado, produzindo simultaneamente etanol. Para este sistema, obteve-se uma produtividade em etanol de cerca de 10 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> com um factor de conversão de 80 % do valor teórico e consumo total de lactose. A produtividade em etanol é largamente superior à obtida nos sistemas convencionais. Desta forma, abrem-se perspectivas atraentes à utilização do permeado de soro para fermentação alcoólica.

## NOMENCLATURA

P – Concentração de etanol

S – Concentração de lactose

X – Concentração celular

*Subscritos*

f – Concentração na alimentação

**Agradecimentos:** Os autores agradecem o apoio financeiro concedido pelo Instituto de Biotecnologia e Química Fina (IBQF), PROLAC e Agência de Inovação. Lucília Domingues é financiada por uma bolsa do programa PRAXIS XXI (BD/11305/97) da Fundação para a Ciência e Tecnologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BARRY, J.A. 1982. Alcohol production from cheese whey. *Dairy Industry International* **47**, 19-22.
- [2] DOMINGUES, L. 1996. Construção e caracterização de estirpes floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de utilizarem a lactose. Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga. 133 pp.
- [3] DOMINGUES, L., TEIXEIRA J.A. e LIMA N. 1999. Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 621-626.
- [4] DOMINGUES, L., DANTAS M.M., LIMA N. e TEIXEIRA J.A. 1999. Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnology and Bioengineering* (no prelo).
- [5] FARAHNAK, F., SEKI, T., RYU, D.Y. e OGRYDZIAK, D. 1986. Construction of lactose-assimilating and high ethanol producing yeasts by protoplast fusion. *Applied Environmental Microbiology* **51**, 362-367.
- [6] FERRAZ, A. 1999. Adaptação ambiental no sector dos lacticínios. *AIP Ambiente* **22**, 23-29.
- [7] KUMAR, V. 1988. Cloning and expression of the *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis, University of London.
- [8] HORTON, B. 1996. Wheys of recovery. *Whey processing* **5**, 39-40.
- [9] MOULIN, G. e GALZY P. 1984. Whey, a potential substrate for biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **1**, 347-373.