

KAREN FERNANDA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DO ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO
SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL EM
FERMENTAÇÕES COM REUTILIZAÇÃO DE
CÉLULAS A 34 °C**

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

São Paulo
2008

KAREN FERNANDA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DO ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO SOBRE A
PRODUÇÃO DE ETANOL EM FERMENTAÇÕES COM
REUTILIZAÇÃO DE CÉLULAS A 34 °C**

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Laluce.

São Paulo
2008

Aos meus pais Antonio Carlos (*in memoriam*) e Carlene, minha irmã

Karina, familiares e amigos pelo apoio, confiança e o amor.

Serei sempre grata a vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ajudar em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

A Profa Dra Cecilia Laluze pelo incentivo, pela confiança, pela dedicação e por seus ensinamentos.

A minha querida irmã Karina Cibele de Oliveira pelo amor, pelo incentivo, pelo apoio durante o início do meu doutorado, pela amizade, pelo carinho, enfim, por tudo que você fez e faz por mim.

Aos meus pais Antonio Carlos de Oliveira (*in memoriam*) e Carlene Costa de Oliveira pelo amor, pelo carinho, pelo apoio, pelo incentivo e pela confiança.

Aos integrantes e amigos do grupo Suave Balanço, minha segunda família, Geraldo Luís Iani, Paulo Campos Garcia, Vanusa Vilani, Anderson Pólito, André Nogueira, Ângela Bueno, Camila Mazzeu, Élder Bueno, Fernanda Falcão, Fernando César Antunes, José Henrique Lopes, Joyce Gomes, Juliana Maris Martinez, Isabel Cristina, Mariana Rita Nogueira Bechara, Patrícia Lelli, Patrícia Aparecida Lourenço e Priscila Viana pela amizade, pelo carinho, pelo apoio, pela compreensão, pelos momentos de alegria e diversão.

Aos meus amigos de faculdade Evaneide Nascimento Lima, Fabiano Gonsalves Meira, Cristina Santana Francisco pela amizade, pelo apoio e companheirismo.

Aos amigos e colegas do laboratório: Crisla Serra Souza, Meline Rezende Moraes, Gedaias Bertouso da Silva, Jéssica Carolina Medina Gallardo, Leonardo de Almeida Ferreira e Silva, Maria Olívia Campos Masiero e Fernando Delfino pela parceria, pela colaboração e a boa convivência.

Ao instrutor de loga Paulo Sérgio Ribeiro, sua esposa Eliana Chapadeiro Ribeiro e ao professor de inglês David Nicholson pelo exemplo, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pelo carinho e pelos momentos de alegria e sabedoria.

Aos prof. Dr João Olímpio Tognolli e profa. Dra Marisa Veiga Capela pela assessoria na área de Estatística e a profa. Dra Maria Lúcia Gonsales da Costa Araújo pela assessoria na área de Engenharia.

Ao programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia pela oportunidade de cursar o doutorado.

A FAPESP e a CAPES pela bolsa concedida a mim e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente comigo neste momento da minha vida.

“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

OLIVEIRA, K. F. de. **Efeitos do ácido lático adicionado sobre a produção de etanol em fermentações com reutilização de células a 34 °C**. 2008. 191 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O ácido lático produzido por bactérias lácticas constitui um sério problema nas fermentações industriais. Por este motivo, os efeitos deste ácido adicionado sobre a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético foram estudados no presente trabalho. Assim, foi possível estudar as perturbações causadas pelo ácido lático de uma cultura mista contendo bactérias e leveduras. Além disto, o meio sintético foi utilizado a fim de evitar as variações na composição da matéria-prima, que ocorre no caso o melaço de cana-de-açúcar durante estocagem. Inicialmente, dois planejamentos fatoriais foram realizados em batelada simples agitada. Após a validação dos dados estatísticos, uma produção máxima de etanol ($72,1 \text{ g.L}^{-1}$) e uma boa retenção de viabilidade celular (86,4%) foram conseguidas utilizando-se inóculo bastante alto (40 g.L^{-1} , massa seca) em batelada simples contendo 200 g.L^{-1} de sacarose inicial. Nas condições otimizadas, experimentos em batelada simples foram realizados em mini-reatores operando a 34 °C e em presença de 0 a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido lático adicionado. Com o aumento da concentração do ácido lático adicionado, o pH do meio tornou-se bastante baixo (2,3 a 2,7). Por este motivo, outros experimentos de fermentação foram realizados em batelada simples, nas quais o pH inicial foi reajustado para 4,5 logo após adição de todos os componentes do meio ao reator. O reajuste do pH inicial causou um aumento significativo tanto na produtividade e na velocidade específica máxima de etanol quanto na viabilidade final. Depois disto, a batelada simples, as bateladas alimentada continuamente e por pulsos foram comparadas em presença de ácido lático adicionado ao meio. Observou-se que no processo alimentado continuamente houve menor e um consumo de açúcar mais lento, uma perda maior em viabilidade e maior produção de biomassa que na batelada simples enquanto que o processo de batelada alimentada por pulsos e mostrou resultados bem semelhantes aos da batelada simples. A elevação da concentração do ácido lático ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$ a $4,0 \text{ g.L}^{-1}$) nos reatores permitiu a tamponagem do meio sintético logo após o reajuste inicial de pH para 4,5. Nestas condições, observou-se semelhança entre os dados obtidos em batelada simples e batelada alimentada por pulsos. Em batelada alimentada por pulsos, verificou-se que a diminuição da quantidade de inóculo levou a maiores perdas de viabilidade celular por causa do aumento do ácido adicionado. De uma maneira geral, a presença de ácido lático acelerou a fermentação nos três tipos de processo. Fermentações sucessivas foram realizadas, adicionando-se 3 pulsos de sacarose a cada ciclo de fermentação (180 g.L^{-1} no meio final) e um total de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido lático, mostraram que a levedura 63M perdeu viabilidade para depois mantê-la após o terceiro ciclo de fermentação indicando uma de adaptação da levedura ao processo. Além disto, houve uma redução na proteína intracelular em presença de ácido lático e um aumento na acidez total ao longo dos ciclos sucessivos de fermentação. No entanto, as produções de glicerol e de trealose intracelulares aumentaram e foram semelhantes nas fermentações tanto em presença quanto em ausência de pulsos de ácido lático.

Palavras-chave: Produção de etanol; Levedura; Fermentação; Ácido lático; *Saccharomyces*; Planejamento fatorial.

ABSTRACT

OLIVEIRA, K. F. de. **Effects of the lactic acid added to the medium on the ethanol production on fermentations with cell reuse at 34 °C.** 2008. 191 f. Ph. D. Thesis - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Lactic acid production by lactic bacteria is a serious problem in industrial fermentations. For this reason, the effects of this added acid to the medium on the ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic medium were studied in the present work. In this way, it was possible to study the perturbations caused by the lactic acid in a mixed fermentation containing lactic bacteria and yeasts. In addition, synthetic medium was used to avoid variations in raw material as in the case of the sugar-cane molasses, during the storage. Initially, two factorial planning were applied to a agitated simple batch. After the validation of statistical data, maximal ethanol production (72.1 g.L^{-1}) with well retention of viability (86.4%) were obtained using high inoculum size (40 g.L^{-1} , dry weight) in a simple batch fermentation containing 200 g.L^{-1} initial sucrose. In the optimized conditions, experiments in simples batch were carried out in mini-reactors at 34 °C and in presence of 0 to $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ added lactic acid. With the increase in the concentration of the added lactic acid the pH of the medium became very low (2.3 to 2.7). For this reason, another fermentation experiments were carried out in simple batch cultures, in which the initial pH was readjusted to 4.5 just after the addition of all of medium compounds to the reactor. The readjustment of initial pH caused a significant increase in both the ethanol productivity and maximal-specific rate of ethanol production as well as in final viability. After that, simple batch, continuous-fed batch and pulses-fed batch cultures were compared in the presence of added lactic acid. It was observed that in continuous-fed batch process occurred slower and lower sugar uptake, greater drops in viability followed by increases in biomass production than simple batch process, while the pulses-fed batch process gave data similar to simple those obtained in batch process. The raise in lactic acid concentration into the reactors from 2.0 to 4.0 g.L^{-1} led to the pH buffering of the synthetic medium of synthetic medium after readjusting of the initial to pH for 4.5. Under such conditions, the simple batch and pulses-fed batch processes gave similar results. In pulses-fed batch culture, the decreases in inoculum size caused drops in viability due to increases in the concentration of added lactic acid. Usually, the presence of lactic accelerated the fermentation in three type of process. Fermentations with cell reuse were carried out in fed-batch process were carried out by feeding the reactors three sucrose pulses (180 g.L^{-1} in the final medium) and a total 2.0 g.L^{-1} lactic acid showed that the yeast 63M lost viability which started to be recovered after the third cycle and this indicated an adaptation of the yeast to process conditions. In addition, the intracellular protein decreased while the total acidity increased in the presence of lactic acid during the succession of fermentation cycles. However, the intracellular formation of glycerol and trehalose increased showing similar results in fermentations with and without addition of lactic acid.

Keywords: Ethanol production; Yeast; Fermentation; Lactic acid; *Saccharomyces*; Factorial planning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formas dissociadas e não dissociadas do ácido lático que podem estar presente no meio de cultura e entrar dentro da célula de levedura.....	26
Figura 2 - Distribuição F para graus de liberdade $gl_1=6$ e $gl_2=28$, com região crítica $\alpha=0,05$ marcada em escuro.....	32
Figura 3 - Forma geral da distribuição qui-quadrado (χ^2) para $gl=2$ com a região de significância ($\alpha=0,05$) sombreada.	34
Figura 4 - Curva de crescimento da levedura 63M em meio sintético (THOMAS <i>et al.</i> , 1998) com 100 g.L^{-1} de sacarose e 20 g.L^{-1} de extrato de levedura a 125 rpm por 12 h a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. A quantidade de inóculo inicial foi de $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ com agitação de 125 rpm por 24h a $30 \text{ }^\circ\text{C}$	38
Figura 5 - Ilustração de um mini-reator encamisado com volume total de 200 mL, com agitação magnética, sensores de pH e temperatura, condensador, amostrador e 2 entradas de alimentação.....	40
Figura 6 - Ilustração do sistema de fermentação em Erlenmeyers com capacidade para 250 mL acoplado com um sistema de amostragem.....	41
Figura 7 - Variação de volume durante o processo de batelada alimentada pela adição da solução de sacarose numa vazão constante de $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$ durante 2 horas.....	43
Figura 8 - Ilustração de um sistema de alimentação contínua obtida por meio de macrogotas com uma pinça rolete acoplados ao mini-fermentador.....	46
Figura 9 - Variação de volume durante o processo de batelada alimentada por pulsos decrescentes (10 mL, 8 mL e 7 mL) da solução de sacarose a durante 2 horas.....	49
Figura 10 - Curva-padrão dos grupos redutores da sacarose para a dosagem do açúcar residual pelo método de 3,5 DNS (MILLER, 1959). A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular $b= 137,35$, fator de correlação da reta ($R^2=0,999$) e fator de conversão de absorbância em concentração de açúcares redutores ($F_1=0,00728$) para o espectrofotômetro FEMTO modelo 432 C.....	51
Figura 11 - Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura 63M com valores de absorbância. O coeficiente de correlação para a reta ($y= a+b.x$) foi de 0,9999, o coeficiente angular a foi de 1,0577 e o fator de correlação absorbância em biomassa seca (F) foi de 0,956 para o espectrofotômetro FEMTO modelo 432 C. As células foram propagadas em meio sintético (THOMAS <i>et al.</i> , 1998) contendo 100 g.L^{-1} de sacarose e enriquecido com 20 g.L^{-1} de extrato de levedura.....	52
Figura 12 - Curva-padrão de solução de soroalbumina bovina para a dosagem do de proteína total pelo método do Biureto (ROBYT e WHITE,	

1987). A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular $b = 79,8$, fator de correlação da reta ($R^2 = 0,998$) e fator de conversão de absorvância em concentração de proteína ($F_3 = 0,126$) para o espectrofotômetro FEMTO, modelo B 382..... 54

Figura 13- Curva-padrão de solução de triglicérides para a dosagem de glicerol. A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: fator de correlação da reta ($R^2 = 0,999$) e fator de conversão de absorvância em concentração de proteína ($F_4 = 680$) para o espectrofotômetro FEMTO, modelo B 382..... 55

Figura 14- Curva-padrão de solução de glicose para a dosagem de trealose. A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: fator de correlação da reta ($R^2 = 0,999$) e fator de conversão de absorvância em concentração de proteína ($F_4 = 403$) para o espectrofotômetro FEMTO, modelo B 382..... 56

Figura 15- Planejamento composto central para três fatores (variáveis independentes). As bolas cinza correspondem à parte cúbica (ensaios de um fatorial 2^2) enquanto as bolas pretas representam a parte em forma de estrela..... 64

Figura 16- Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados dos fatores sobre a produção de etanol pela levedura 63M após 4h de fermentação em meio sintético. Os valores da produção de etanol foram obtidos de um planejamento fatorial 2^3 com ponto central e $\alpha = 0,05$; **A**= ácido lático adicionado, **B**= quantidade inicial de inóculo e **C**= concentração inicial de sacarose..... 68

Figura 17- Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados dos fatores sobre a viabilidade da levedura 63M após 4h de fermentação em meio sintético. Os valores da viabilidade foram obtidos de um planejamento fatorial 2^3 com ponto central e $\alpha = 0,05$; **A**= ácido lático adicionado, **B**= quantidade inicial de inóculo e **C**= concentração inicial de sacarose..... 69

Figura 18- Gráficos de superfície de resposta para a produção de etanol. **A**: sacarose x inóculo com ácido lático fixo em $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; **B**: sacarose x ácido lático com inóculo fixo em 35 g.L^{-1} e **C**: inóculo x ácido lático com sacarose fixa em 150 g.L^{-1} 73

Figura 19- Gráficos de superfície de resposta para a viabilidade. **A**: sacarose x inóculo com ácido lático fixo em $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; **B**: sacarose x ácido lático com inóculo fixo em 35 g.L^{-1} e **C**: inóculo x ácido lático com sacarose fixa em 150 g.L^{-1} 77

Figura 20- Curvas dos parâmetros de fermentação em batelada simples da levedura 63M em função do tempo em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) nas condições previstas pela a validação teórica: $0,65 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido lático, 40 g.L^{-1} de inóculo e 200 g.L^{-1} de sacarose inicial. As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers sem o reajuste do pH inicial (após a inoculação) e a 34°C 79

Figura 21- Efeito do ácido lático adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) sobre a

produção específica (A), a velocidade específica de crescimento (B) e a velocidade específica de crescimento (C) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial..... 83

Figura 22- Efeito do ácido láctico adicionado (0,2 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹) sobre a produção específica de etanol (A), a velocidade específica de produção de etanol (B) e a velocidade específica de crescimento (C) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial. As fermentações foram realizadas sem o reajuste do pH inicial (após a inoculação) e a 34 °C..... 89

Figura 23- Efeito da adição de duas concentrações de ácido láctico (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) sobre os parâmetros da fermentação da levedura 63M em função do tempo em batelada com alimentação contínua de sacarose 800 g.L⁻¹ (25 mL) numa vazão de 0,2 mL.min⁻¹ por 2h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998). As fermentações foram realizadas com o reajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C..... 95

Figura 24- Efeito das concentrações de ácido láctico (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) sobre os parâmetros de fermentação da levedura 63M em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C..... 100

Figura 25- Efeito das concentrações altas de ácido láctico adicionado (3,0 g.L⁻¹ a 4,0 g.L⁻¹) sobre os parâmetros de fermentação da levedura 63M em função do tempo em batelada simples em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o reajuste do pH inicial para 4,5 (após a inoculação) e a 105

Figura 26- Efeito das concentrações altas de ácido láctico adicionado (2,0 g.L⁻¹ a 4,0 g.L⁻¹) sobre os parâmetros de fermentação da levedura 63M em função do tempo em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) a 34 °C e com o reajuste do pH inicial para 4,5 (após a inoculação)..... 109

Figura 27- Efeito da concentração de sacarose (15% a 20% em p.v⁻¹) sobre os parâmetros fermentativos da levedura 63M em função do tempo de fermentações em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de hora em hora em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) e 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado. As fermentações foram realizadas com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) e a 34 °C..... 114

Figura 28- Efeito da concentração de inóculo (2% a 4%, p.v⁻¹ em relação ao volume total de meio) sobre os parâmetros fermentativos da levedura 63M em função do tempo de fermentações em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético

(THOMAS *et al.*, 1998) em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado. As fermentações foram realizadas com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) e a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 118

Figura 29- Efeito da adição de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ (em relação ao volume total de meio) de ácido láctico no início do processo (-◇-) e nos pulsos junto com a alimentação com sacarose (-x-) sobre a viabilidade (parte A) e o etanol produzido (parte B) da levedura 63M em função do tempo de fermentações em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 720 g.L^{-1} adicionados a cada hora em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998). As fermentações foram realizadas com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) e a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 121

Figura 30- Efeito da adição de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ (em relação ao volume total de meio) de ácido láctico no início do processo (-◇-) e nos pulsos junto com a alimentação com sacarose (-x-) sobre a produção de biomassa (parte A) e valores de pH (parte B) da levedura 63M em função do tempo de fermentações em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 720 g.L^{-1} adicionados a cada hora em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998). As fermentações foram realizadas com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) e a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 120

Figura 31 – Efeito da presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico sobre a viabilidade da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose (180 g.L^{-1} e uma quantidade de células de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$). As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 122

Figura 32– Efeito da presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico sobre o brotamento da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose (180 g.L^{-1} uma quantidade de células de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$). As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo de fermentação..... 127

Figura 33– Efeito da presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico a produção de etanol da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose (180 g.L^{-1} uma quantidade de células de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$). As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo de fermentação..... 128

Figura 34– Efeito da presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico a produção de biomassa da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose (180 g.L^{-1} uma quantidade de células de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$). As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo de fermentação..... 129

Figura 35– Efeito da presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico as variações de pH na fermentação da levedura 63M em ciclos sucessivos com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose (180 g.L^{-1} e uma quantidade de células de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$). As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo de fermentação..... 130

Figura 36– Variações na viabilidade da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples por 3 h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 132

Figura 37– Variações no brotamento da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 133

Figura 38– Variações no etanol produzido pela levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples por 3h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 134

Figura 39– Variações no açúcar consumido pela levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples por 3 h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 135

Figura 40– Variações na biomassa produzida pela levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples por 3h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 136

Figura 41– Variações nos valores de pH produzido pela levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples por 3 h. A quantidade

de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 137

Figura 42– Variações na proteína total intracelular da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2h), seguida por batelada simples por 3 h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 138

Figura 43– Variações no glicerol intracelular da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2h), seguida por batelada simples por 3 h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 139

Figura 44– Variações na trealose intracelular da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2h), seguida por batelada simples por 3h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 140

Figura 45– Variações na acidez total dos meios de cultura fermentado pela levedura 63M em ciclos sucessivos com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2h), seguida por batelada simples por 3 h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo..... 141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição das soluções estoque utilizadas no preparo do meio sintético descrito por THOMAS <i>et al.</i> (1998).....	38
Tabela 2- Condições de desenvolvimento do processo descontínuo (batelada simples) em mini-reatores.....	42
Tabela 3- Condições do processo descontínuo alimentado com sacarose.....	43
Tabela 4- Condições do processo em batelada com alimentação por pulsos de volumes decrescentes de uma solução concentrada de 800 g.L ⁻¹ de sacarose.....	47
Tabela 5- Primeiro planejamento fatorial 2 ³ completo com um ponto central usando três variáveis independentes frente à produção de etanol e à retenção de viabilidade da levedura híbrida 63M em meio sintético (THOMAS <i>et al.</i> , 1998) após 4h de fermentação em batelada simples a 34 °C.....	62
Tabela 6- Níveis dos pontos axiais e fatores codificados utilizados num planejamento 2 ³ composto central completo da fermentação da levedura 63M por 4h a 34 °C.....	63
Tabela 7- Condições das variáveis independentes e respostas previstas para a validação da levedura 63M em batelada simples em meio sintético a 34 °C utilizando o programa MiniTab 14.0.....	65
Tabela 8- Matriz do primeiro planejamento fatorial 2 ³ com um ponto central composto por 3 variáveis independentes para a produção de etanol e a viabilidade da levedura 63M em batelada simples após 4h de fermentação a 34 °C.....	67
Tabela 9- Matriz do segundo planejamento fatorial 2 ³ composto central constituído por 3 variáveis independentes para a produção de etanol e viabilidade da levedura 63M em batelada simples após 4h de fermentação a 34 °C.....	70
Tabela 10- Análise de variância do modelo para a produção de etanol pela levedura 63M em meio sintético após 4h a 34 °C.....	71
Tabela 11- Coeficientes de regressão estimados para a produção de etanol pela levedura 63M em meio sintético após 4h a 34 °C.....	72
Tabela 12- Análise de variância para o modelo de viabilidade da levedura 63M fermentada em meio sintético por 4h a 34 °C.....	75
Tabela 13- Coeficientes de regressão estimados para viabilidade da levedura 63M fermentada em meio sintético por 4h a 34 °C.....	76
Tabela 14- Efeito do ácido láctico adicionado (0,2 g.L ⁻¹ a 1,0 g.L ⁻¹) sobre os parâmetros cinéticos das fermentações com a levedura 63M em batelada simples sem o reajuste de pH inicial a 34 °C.....	82
Tabela 15- Efeito do reajuste do pH inicial 4,5 sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada simples a 34 °C contendo do ácido láctico adicionado (0,0 g.L ⁻¹ a 1,0 g.L ⁻¹).....	88

Tabela 16- Efeito da concentração do ácido lático sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada com alimentação contínua ($0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ por 2h) com o reajuste de pH inicial para 4,5.....	94
Tabela 17- Efeito das concentrações de ácido lático adicionado sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos decrescentes e com o reajuste de pH inicial para 4,5 a $34 \text{ }^\circ\text{C}$	99
Tabela 18- Efeito das concentrações altas de ácido lático adicionado ($3,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada simples com o reajuste de pH inicial para 4,5 a $34 \text{ }^\circ\text{C}$	104
Tabela 19- Efeito das concentrações altas de ácido lático adicionado ($2,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a $4,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos com o reajuste de pH inicial para 4,5 a $34 \text{ }^\circ\text{C}$	108
Tabela 20- Efeito da concentração e sacarose sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos em meio sintético e com $3,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido lático adicionado e com o reajuste de pH inicial para 4,5 a $34 \text{ }^\circ\text{C}$	113
Tabela 21- Efeito da quantidade de inóculo sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos em meio sintético contendo um total de $180 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarose em presença de $3,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido lático adicionado e com o reajuste de pH inicial para 4,5 a $34 \text{ }^\circ\text{C}$	117
Tabela 22- Efeito da composição do meio de enriquecimento da levedura 63M por 16 horas e a ser utilizado como inóculo de ciclos de fermentação a serem realizados em dias consecutivos.....	124

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 INCIDÊNCIA E INTERFERÊNCIA DE BACTÉRIAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL	22
BACTÉRIAS PRESENTES NA MATÉRIA-PRIMA	22
PERTURBAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO PELAS BACTÉRIAS LÁTICAS	24
2.2 EFEITOS DE ESTRESSES SOBRE A FERMENTAÇÃO	24
ESTRESSE ÁCIDO	25
ESTRESSE ALCOÓLICO	26
OUTROS TIPOS DE ESTRESSES	28
2.3 TIPOS DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ETANOL	29
2.4 METODOLOGIAS ESTATÍSTICAS COMO FERRAMENTA PARA A OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS	30
2.5 ESTATÍSTICA INFERENCIAL PARA COMPARAÇÃO E ANÁLISE DE RESULTADOS	30
TESTES DE HIPÓTESES	31
TESTE <i>F</i> PARA COMPARAÇÕES ENTRE VARIÂNCIAS	31
ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA COMPARAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS QUANTITATIVAS	32
TESTE DE HIPÓTESES QUE COMPARA DUAS MÉDIAS	33
COMPARAÇÕES ENTRE PROPORÇÕES: TESTE DO QUI-QUADRADO DE ADERÊNCIA OU AJUSTAMENTO	33
2.6 CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO COM REUTILIZAÇÃO DE CÉLULAS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 LEVEDURAS UTILIZADAS E MANUTENÇÃO DA CULTURA	36
3.2 REAGENTES UTILIZADOS	36
3.3 MEIOS UTILIZADOS	36
MEIO YPD	36
MEIO SINTÉTICO	36
3.4 PROPAGAÇÃO DO INÓCULO E PREPARO DO LEITE DE LEVEDURA	37
PROPAGAÇÃO DO INÓCULO	37
PREPARO DO LEITE DE LEVEDURA	39

3.5 DESCRIÇÃO DOS MINI-REATORES	39
3.6 FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA	40
FERMENTAÇÕES EM ERLLENMEYERS	40
FERMENTAÇÕES EM MINI-REATORES	41
3.7 FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA ALIMENTADA DE FORMA CONTÍNUA POR SACAROSE	42
3.8 FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA ALIMENTADA POR PULSOS DECRESCENTES	45
3.9 CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO COM REUTILIZAÇÃO DE CÉLULAS	48
3.10 ESTOCAGEM DA LEVEDURA ENTRE OS CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO	49
3.11 MEDIDAS PARA O ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO	49
MEDIDA DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS	50
MEDIDA DE BIOMASSA CELULAR	51
DOSAGEM DE ETANOL EXTRACELULAR	51
MEDIDA DE VIABILIDADE CELULAR	52
MEDIDA DE ACIDEZ TOTAL	53
PROTEÍNA TOTAL INTRACELULAR PELO MÉTODO DO BIURETO	53
GLICEROL INTRACELULAR EM LEVEDURA	54
TREALOSE INTRACELULAR EM LEVEDURA	55
3.12 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO	58
VELOCIDADES INSTANTÂNEAS DE CRESCIMENTO E DE CONSUMO DE SACAROSE E FORMAÇÃO DE ETANOL	56
VELOCIDADES INSTANTÂNEAS MÁXIMAS DE CRESCIMENTO E DE CONSUMO DE SACAROSE E FORMAÇÃO DE ETANOL	56
VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE FORMAÇÃO DE BIOMASSA E PRODUTO E DE CONSUMO DE SUBSTRATO	57
FATOR DE CONVERSÃO DO SUBSTRATO EM PRODUTO	58
PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE ETANOL E CONSUMO ESPECÍFICO DE AÇÚCAR	59
3.13 USO DE TESTES DA ESTATÍSTICA INFERENCIAL PARA COMPARAÇÃO DE RESULTADOS	59
COMPARAÇÕES ENTRE PROPORÇÕES: TESTE DO QUI-QUADRADO (χ^2) DE ADERÊNCIA OU AJUSTAMENTO	59
TESTE <i>F</i> PARA COMPARAÇÕES ENTRE VARIÂNCIAS	60
TESTE <i>T</i> QUE COMPARA DUAS MÉDIAS	60
ANÁLISE DE VARIÂNCIA - ANOVA	61

3.14 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL	62
PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL	62
SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL	63
ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	64
VALIDAÇÃO DAS EQUAÇÕES DOS MODELOS	65
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL EM BATELADA SIMPLES CONTENDO ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO POR METODOLOGIAS ESTATÍSTICAS	66
4.1.1 PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL	66
EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL	66
EFEITOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR	68
4.1.2 SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL	69
PRODUÇÃO DE ETANOL	69
VIABILIDADE	74
4.1.3 VALIDAÇÃO	78
4.1.4 DISCUSSÃO	
4.2 FERMENTAÇÕES A 34°C EM MINI-REACTORES CONTENDO CONCENTRAÇÕES BAIXAS (MAIORES OU IGUAIS A 1,0 g.L⁻¹) DE ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO	80
4.2.1 FERMENTAÇÕES DE SACAROSE EM BATELADA SIMPLES	80
EXPERIMENTOS FEITOS SEM AJUSTE DE pH INICIAL	80
4.2.1.1 DISCUSSÃO	84
EXPERIMENTOS FEITOS COM AJUSTE DO pH INICIAL APÓS ADIÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO	86
4.2.1.2 DISCUSSÃO	89
4.2.2 FERMENTAÇÕES EM BATELADA CONTÍNUA ALIMENTADA COM SOLUÇÃO DE SACAROSE	90
4.2.2.1 DISCUSSÃO	95
4.2.3 FERMENTAÇÕES EM BATELADAS ALIMENTADAS POR PULSOS DE VOLUMES DECRESCENTES	96
4.2.3.1 DISCUSSÃO	101
4.3 ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAR OS EFEITOS DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁTICO A 34°C	101
4.3.1 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES ALTAS (> 1,0 g.L ⁻¹) DE ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO SOBRE CULTURAS EM BATELADA SIMPLES	101
4.3.1.1 DISCUSSÃO	103
4.3.2 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES ELEVADAS DE ÁCIDO LÁTICO (>1,0 g.L ⁻¹) SOBRE CULTURAS DE BATELADA ALIMENTADA POR	

PULSOS DE VOLUMES DECRESCENTES	105
4.3.2.1 DISCUSSÃO	109
4.3.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE EM CULTURAS DE BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS EM PRESENÇA DE ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO (> 1,0 g.L⁻¹)	110
4.3.3.1 DISCUSSÃO	114
4.3.4 EFEITO DA QUANTIDADE DE INÓCULO EM CULTURAS EM BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS EM PRESENÇA DE ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO	115
4.3.4.1 DISCUSSÃO	119
4.3.5 EFEITO GRADUAL DA ADIÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO JUNTAMENTE COM A SACAROSE DURANTE A ALIMENTAÇÃO DO REATOR POR PULSOS DE pH AJUSTADO PARA 4,5	120
4.3.5.1 DISCUSSÃO	123
4.4 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DE CÉLULAS ENTRE CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO EM PRESENÇA DE ÁCIDO LÁTICO	123
4.4.1 DISCUSSÃO	124
4.5 CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO EM PRESENÇA DE ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO COM A LEVEDURA 63M	122
4.5.1 TENTATIVAS DE REALIZAR CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO EM PRESENÇA DE 3,0 g.L ⁻¹ DE ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO	125
4.5.2 CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO JUNTAMENTE COM OS PULSOS DE SACAROSE, PORÉM SEM AJUSTE DO pH DAS SOLUÇÕES DOS PULSOS	131
4.5.2.1 DISCUSSÃO	142
5 CONCLUSÕES	144
REFERÊNCIAS	146
ANEXO A- GRÁFICOS RELATIVOS À ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	154
ANEXO B- FERMENTAÇÕES EM MINI REATORES COM BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁTICO	158
ANEXO C- FERMENTAÇÕES EM MINI-REATORES COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁTICO	176

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido a espécie mais utilizada para produzir etanol (ZALDIVAR *et al.*, 2001¹ *apud* COT *et al.*, 2007), pois este gênero de levedura é geralmente reconhecido como seguro (GRAS). Esta levedura pode produzir até 20% de etanol fermentando de fontes de carbono, de preferência aquelas moléculas de açúcar contendo seis átomos de carbono (COT *et al.*, 2007).

Na indústria de produção do etanol combustível, a contaminação microbiana é um dos maiores problemas, pois a redução do rendimento do etanol diminui o lucro das usinas. Além disto, estes contaminantes bacterianos geram ácidos orgânicos fracos que inibem o crescimento das leveduras produtoras de etanol. Uma alternativa para aliviar o problema da contaminação microbiana (bacteriana) é utilizar diversos aditivos químicos diversos ou os antibióticos que inibem ou retardam o crescimento de bactérias (DEOLIVA-NETO e YOKOYA, 2001). Mas estes aditivos elevam os custos destas indústrias e aumentam os riscos de poluição do meio ambiente, sempre que não forem destruídos durante a destilação. No entanto, resultados descritos na literatura sugerem que a presença de ácidos fracos no processo pode aumentar o rendimento alcoólico (BAYROCK *et al.*, 2003). Além disto, estudos recentes (BAYROCK e INGLEDEW, 2004) mostraram um aumento na produtividade de etanol da ordem de 3,2 vezes na presença de ácido láctico adicionado ao meio de fermentação.

Cultivos com alta densidade de células têm sido usados com sucesso para a produção de etanol, principalmente utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Por outro lado, fermentação em batelada alimentada com reutilização de células é o processo mais aplicado na produção de etanol em diversos países. Altos níveis de biomassa usados na fermentação de batelada alimentada minimizam os efeitos prejudiciais do substrato e/ ou produtos inibidores com redução dos custos associados à etapa de preparação do inóculo (RIESENBERG e GUTHKE, 1999).

Os estudos das respostas dos microrganismos às situações de estresse são de grande importância para entender como as células podem responder e se adaptar

¹ ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 56, n. 1-2, p. 17-34, 2001.

às várias mudanças nos ambientes em que vivem e as respostas celulares podem ser semelhantes ou diferentes dependendo do tipo do processo (ATTFIELD *et al.*, 2001). Durante o processo de produção de etanol, as células de leveduras estão sujeitas a várias situações de estresse (ATTFIELD, 1997), mas o estresse osmótico e o estresse alcoólico são os mais importantes. O estresse osmótico é causado por altas concentrações de açúcar (em torno de 200 g.L⁻¹). As células de leveduras devem resistir a este tipo de estresse para crescer e realizar a fermentação alcoólica (CARRASCO *et al.*, 2001).

O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito do ácido lático adicionado o etanol produzido pela levedura 63M a 34 °C. Para isto, as seguintes etapas foram cumpridas:

- a) planejamento fatorial e de superfície de resposta para a otimização das condições de produção de etanol em presença de ácido lático;
- b) efeito do reajuste do pH inicial em bateladas simples contendo ácido lático adicionado em quantidades crescentes;
- c) efeitos do tipo de processo e do tipo de alimentação sobre a produção de etanol na presença de ácido lático externo adicionado em mini-reatores;
- d) comparação das concentrações de ácido lático adicionadas às bateladas simples e alimentadas por pulsos;
- e) efeito da concentração de sacarose e da quantidade de inóculo em processo de batelada alimentada por pulsos em presença de ácido lático;
- f) determinação das variações em parâmetros fisiológicos em fermentações sucessivas com reutilização de células em presença de ácido lático adicionado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INCIDÊNCIA E INTERFERÊNCIA DE BACTÉRIAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL

BACTÉRIAS PRESENTES NA MATÉRIA-PRIMA

No Brasil, o caldo-de-cana é a principal matéria-prima utilizada pelas usinas sucroalcoleiras para a produção de etanol. Além disto, o caldo-de-cana é uma fonte muito rica em nutrientes orgânicos e inorgânicos os quais favorecem a proliferação de diversos microrganismos. O caldo-de-cana também possui grandes quantidades de água e seu valor de pH oscila entre 5,0 e 5,5. Esta faixa de pH ácido favorece o crescimento de diversas espécies de bactérias coexistentes no mosto o qual serve de matéria-prima para a produção de álcool. Outros fatores estão relacionados com a colheita contribuem significativamente com a quantidade de microrganismos no caldo da cana-de-açúcar, tais como: variedades de cana, variações nas condições climáticas, pragas, doenças da cana, tipo de transporte, armazenamento, tempo de estocagem, estado da cana que vai ser processada na usina (limpa, suja, molhada, seca, queimada, fresca, envelhecida, deteriorada, com raízes, perfurada por insetos; SILVA, 1974² *apud* GALLO e CANHOS, 1991). Por este motivo, os microrganismos existentes no caldo de cana são encontrados nos solos e vegetais, tais como: os bolores, as leveduras e as bactérias. As bactérias lácticas e acéticas, em suas formas esporuladas ou não, podem ser encontradas em um ou mais pontos da usina de produção de álcool. Canas saudáveis podem conter de 10^1 a 10^8 bactérias.g⁻¹ e 10^1 a 10^3 bolores e leveduras.g⁻¹ (MAYEUX, 1960³ *apud* GALLO e CANHOS, 1991). Estes microrganismos estão presentes no processo de produção de etanol. Por exemplo, as bactérias acéticas são comuns nas moendas e nas peneiras removedoras do bagacilho. No setor de fermentação e destilação, as leveduras que promovem a fermentação alcoólica são predominantes. No entanto, as bactérias

² SILVA, M. H. Controle da inversão no caldo de cana. **Sugar y Azucar**, p. 41, 1974.

³ MAYEUX, P. A. **Some studies on the microbial flora of sugar cane**. M.S. Thesis, Louisiana State University, 1960.

láticas, que produzem ácido lático utilizando a matéria-prima, são as principais causas da preocupação dos usineiros (BOLETIM TÉCNICO DA COPERSUCAR, 1983⁴ *apud* GALLO e CANHOS, 1991). Por este motivo, estas bactérias são os contaminantes mais prejudiciais ao processo de fermentação devido a tolerância delas a temperaturas elevadas, resistência a valores de pH baixos e capacidade delas de crescerem rapidamente. *Bacillus* podem crescer bem e produzir ácido lático a 50 °C (PATEL *et al.*, 2005). Além disto, *Lactobacilos* têm sido capazes de crescer em meio contendo uma concentração de 10% (v.v⁻¹) de etanol (HYNES *et al.*, 1997).

As bactérias presentes na cana causam a deterioração da mesma, reduzindo o tempo de estocagem, gerando produtos metabólicos indesejáveis ao processo. Isto causa problemas que dificultam as etapas anteriores à fermentação e criam ambientes desfavoráveis às leveduras no processo de fermentação alcoólica. ALMEIDA (1940⁵ *apud* GALLO e CANHOS, 1991) descreveu os fatores que propiciam as infecções na fermentação alcoólica, tais como: má condição de armazenamento do melaço, má assepsia da sala de fermentação, má limpeza das dornas e resfriamento insuficiente das mesmas, ausência de controle da acidez e dos nutrientes do mosto, falta de treinamento dos funcionários e falta de assistência técnica. GALLI (1961⁶ *apud* GALLO e CANHOS, 1991) também descreve os problemas indesejáveis da fermentação alcoólica. Estes problemas são atribuídos à fermentação acética, causada pelas seguintes espécies de bactérias: *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianum*, *A. acetosum*, *A. kuntzeianum* e *A. suboxydans.*, As seguintes espécies ocorrem na fermentação láctica: *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. leischmanii* e *Streptococcus lactis*. Por outro lado, a fermentação butírica ocorre devido a presença das seguintes espécies: *Clostridium pasteurianum* e *C. Saccharobutyricum*. A produção de dextrans é atribuída ao *Leuconostoc mesenteroides*, enquanto que a produção de levânio é atribuída às espécies dos gêneros *Bacillus*, *Aerobacter* e *Streptococcus*.

⁴ BOLETIM TÉCNICO DE COPERSUCAR. 1989. **Controle microbiológico da usina de açúcar e álcool**. 22, 2-17.

⁵ ALMEIDA, J. R. **Álcool e destilaria**. Piracicaba, Nathanael dos Santos, Mimeogr. Cap. V, p. 55-85.1940.

⁶ GALLI, Z. F. **II Semana de fermentação alcoólica: fermentação do mel final das usinas de açúcar**. Piracicaba, Inst. Zimotécnico, v. 2, p. 297-304, 1961.

PERTURBAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO PELAS BACTÉRIAS LÁTICAS

As bactérias consomem nutrientes da matéria-prima (com conseqüente redução dos níveis de etanol) para produzir ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático que inibe o crescimento e o metabolismo da levedura, levando-a a morte celular (NARENDRANATH *et al.*, 2001). O ácido lático é produzido em anaerobiose por bactérias lácticas através do consumo do piruvato pela ação da lactato desidrogenase que requer NADH (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2001). *Lactobacilos* consomem açúcar como a principal fonte de energia por via homofermentativa (ácido lático como principal produto final) ou heterofermentativa (produzindo etanol e ácido lático). As leveduras também produzem ácido lático, porém, não excedendo 100-300 mg.L⁻¹ (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2001). Porém, as leveduras podem ainda consumir o ácido lático em condições aeróbicas e em ausência de glicose. Vias anabólicas, enzimas e mecanismos de transporte podem ser inibidos em presença de glicose (CASAL *et al.*, 1996). Assim, as células de levedura reprimidas por glicose são incapazes de assimilar formas aniônicas dos ácidos orgânicos, mas as formas não dissociadas atravessam a membrana celular por difusão simples (GANCEDO e SERRANO, 1989). Em meio de cultivo, o rendimento da biomassa (Y_{ATP} , grama de biomassa produzida por mol.L⁻¹ de ATP gerado) diminui quando a concentração de ácido acético aumenta de zero para 190 mmol.L⁻¹ (PAMPULHA e LOUREIRO-DIAS, 2000). Quanto maior a diferença entre os valores de pH intra- e extracelular, maior se tornará o consumo de ATP exigido para permitir crescimento e sobrevivência celular.

2.2 EFEITOS DE ESTRESSES SOBRE A FERMENTAÇÃO

O pH intracelular é importante para a atividade de um número grande de enzimas (pH ótimo em torno da faixa do pH fisiológico) e manter a condutividade dos canais iônicos. O pH parece ser importante, também, no controle do ciclo de divisão celular e na capacidade de proliferação das células (MADSHUS, 1988).

ESTRESSE ÁCIDO

Em cultivos em anaerobiose, a forma aniônica do ácido láctico pode ser transportada para o interior das células pelo sistema de simporte de prótons com uma estequiometria ácido-próton de 1:1 (CÁSSIO *et al.*, 1987; NARENDRANATH *et al.*, 2001), conforme descrito na **Figura 1**. A forma não dissociada do ácido láctico é capaz de atravessar a membrana plasmática por difusão passiva, em meio contendo glicose, mesmo em ausência de um transportador. A permeabilidade da membrana pela forma não dissociada deste ácido aumenta exponencialmente em pH na faixa de 3,0 a 6,0 (CÁSSIO *et al.*, 1987), porém a difusão diminuiu com o aumento do pH. Uma vez dentro da célula, o ácido láctico dissocia-se, acidificando o citosol, devido ao pH intracelular acima de seu pKa (3,86). Para manter a homeostase intracelular (pH interno), o excesso de prótons tem que ser transportado para fora da membrana plasmática através da ação da ATPase que utiliza ATP para a sua atividade (HOLYOAK *et al.*, 1996). De acordo com vder Rest *et al.* (1995), a atividade de ATPase consome uma energia em forma de ATP estimada de 10% a 15% do ATP total. Isto aumenta a velocidade dos fluxos glicolíticos devido à necessidade de aumentar os níveis de ATP e conseqüentemente aumenta a velocidade da produção de etanol (PALMQVIST *et al.*, 1999). O consumo excessivo desta energia pode levar a perdas em crescimento celular e outras atividades metabólicas essenciais (BRUL e COOTE, 1999). Em situação de estresse ácido, a célula perde a sua capacidade de manter seu pH interno e suas atividades fisiológicas após um período de tempo maior, e isto leva a inibição do crescimento e finalmente à morte celular. A aparente resistência (retenção de viabilidade) da levedura *S. cerevisiae* (BAYROCK e INGLEDEW, 2004) frente às altas concentrações de ácido láctico pode ser atribuída à resistência natural da linhagem utilizada, devido às características peculiares do seu metabolismo e seu genoma, à composição do meio complexo o qual contém agentes com atividade tamponante (THOMAS *et al.*, 1998) e, ainda, à forma de operação do processo. O meio de cultivo pode ser composto por agentes tamponantes que mantêm o pH do meio em valores acima do pKa do ácido láctico ($\geq 3,86$). A maior capacidade em manter o pH em meio contendo hidrolisado de amido de milho durante a fermentação ficou evidente quando o pH deste tipo de meio e de um meio sintético foram ajustados a 4,5 (ABBOTT e INGLEDEW, 2004).

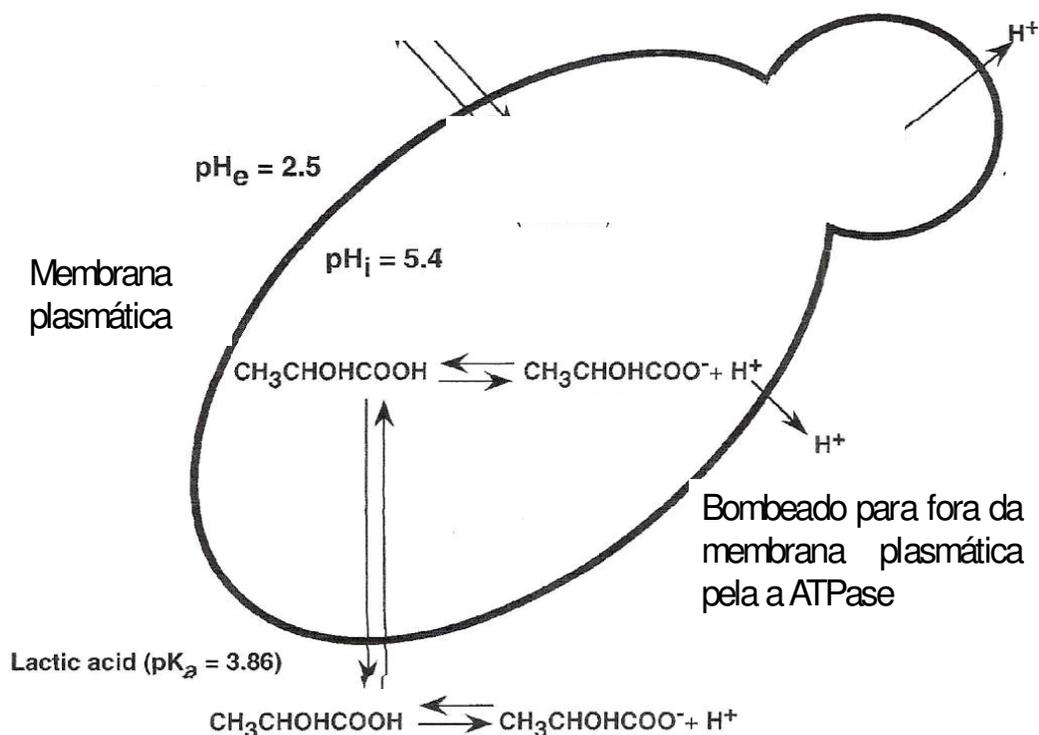


Figura 1 - Formas dissociadas e não dissociadas do ácido láctico que podem estar presente no meio de cultura e entrar dentro da célula de levedura.

Fonte: Modificado de NARENDRANATH *et al.*, 2001.

ESTRESSE ALCOÓLICO

O álcool etílico é o maior produto metabólico da fermentação das leveduras sendo, quantitativamente, o produto de maior importância biotecnológica. Concentrações altas de etanol são inibitórias e letais para as leveduras uma vez que o etanol entra nas células da levedura por difusão passiva, causando um aumento à fluidez e perturbando a integridade das membranas. Os sítios de ação do etanol nas células de leveduras são as proteínas da membrana plasmática, proteínas hidrofóbicas das mitocondriais, do núcleo, dos vacúolos e do retículo endoplasmático. O poder indutor do etanol, sobre a formação de mutantes de *S. cerevisiae* com deficiência respiratória (perda de DNA mitocondrial), resulta em danos causados sobre a membrana mitocondrial e não sobre DNA nuclear (WALKER, 1998). Parece que o aumento da fluidez da membrana pelo etanol deve ser o principal fator responsável pelo aparecimento de “petites” ou mutantes mitocondriais (CHI e ARNEBORG, 1999). Além disto, os efeitos inibitórios do etanol

aumentam de forma sinérgica, não somente a altas temperaturas, mas também pela limitação por nutrientes (especialmente de íons Mg^{2+}) e outros subprodutos metabólicos, tais como outros alcoóis, aldeídos, ésteres, ácidos orgânicos, ácidos graxos, compostos carbonílicos e fenólicos. Entre as respostas adicionais ao estresse das células pelo etanol, a elevação dos níveis de trealose celular é, sem dúvida, a mais conhecida (KIM *et al.*, 1996).

A literatura descreve uma grande variedade de estudos sobre as respostas da *S. cerevisiae* frente às concentrações de etanol, sendo o principal deles é a síntese de proteínas de estresse, seguida por estudos dos aumentos dos níveis de trealose intracelular e glicerol e modulação dos processos de troca iônica (TRABALZINI *et al.*, 2003⁷ *apud* RICCI *et al.*, 2004). A trealose preserva a integridade de membranas biológicas, estabiliza proteínas em seu estado inativo, e suprime a agregação e desnaturação de proteínas, mantendo-as parcialmente em estado de empacotamento (SINGER e LINDQUIST, 1998⁸ *apud* LUCERO *et al.*, 2000). LILLIE e PRINGLE (1980) observaram que células de leveduras consomem a glicose exógena devido ao acúmulo de glicogênio intracelular quando aproximadamente metade da glicose original tinha sido consumida. Outras modificações ocorreram ao mesmo tempo, incluindo redução da atividade da via glicolítica e aumento do nível de síntese de proteína (FRANÇOIS *et al.*, 1987⁹ *apud* PARROU *et al.*, 1999) bem como a indução de proteínas de estresses e choque térmico (VARELA *et al.*, 1995¹⁰ *apud* PARROU *et al.*, 1999). Tanto o glicogênio quanto a trealose são indicadores das mudanças nas condições nutricionais. (LILLIE e PRINGLE, 1980). No entanto, TRABALZINI *et al.* (2003⁷ *apud* RICCI *et al.*, 2004) estudaram o proteoma da linhagem de *S. cerevisiae* e observaram que a expressão de álcool desidrogenase (ADH) é um indicativo da resposta ao estresse fermentativo/alcoólico. A expressão de ADH não é reprimida sob condição de estresse e algumas enzimas do metabolismo de carboidrato não são proteolizadas (inativadas) como resposta ao estresse.

As leveduras *Saccharomyces* resistentes ao etanol podem crescer em presença de 8 a 12% (v.v⁻¹) e sobreviver às exposições de até 15% (v.v⁻¹) de álcool

⁷ TRABALZINI, L.; PAFFETTI, A.; SCALONI, A. *et al.* Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.**, v. 370, p. 35-46, 2003.

⁸ SINGER, M.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro. **Mol. Cell**, v. 1, p. 639-648, 1998.

⁹ FRANÇOIS, J.; ERASO, P.; GANCEDO, C. Changes in the concentration of cAMP, fructose 2,6-biphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 164, p. 551-559, 1987.

¹⁰ VARELA, J. C.; PRACKELT, U. M. MEACOCK, P. A. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, p. 6232-6245, 1995.

(INGRAM e BUTTKE, 1984¹¹ *apud* LUCERO *et al.*, 2000). No entanto, há pelo menos uma via metabólica em *Saccharomyces* que é muito sensível às altas concentrações de etanol, como por exemplo, a endocitose que é fortemente inibida por concentrações de 2-6% (v.v⁻¹) de etanol (LUCERO *et al.*, 1997¹² *apud* LUCERO *et al.*, 2000). Endocitose é o mecanismo no qual células eucarióticas assimilam proteínas e outras macromoléculas do ambiente externo para o acúmulo em sua própria membrana plasmática (GELI e RIEZMAN, 1998¹³ *apud* LUCERO *et al.*, 2000).

Sob condições enológicas, a atividade da fermentação por levedura diminui quando a fonte de nitrogênio foi consumida e o meio ainda contém altas concentrações de açúcar. Esta redução da fermentação foi acompanhada pela endocitose e degradação de açúcares de transporte (VOLLAND *et al.*, 1994¹⁴ *apud* LUCERO *et al.*, 2000).

OUTROS TIPOS DE ESTRESSES

Comparativamente, as bactérias lácticas usualmente crescem melhor a temperaturas mais elevadas (50 °C, por exemplo) que as leveduras e, assim, passam a competir pelo açúcar com vantagens crescentes à medida que a temperatura se eleva (PATEL *et al.*, 2005). A velocidade de produção de etanol e sua concentração final diminuíram em presença de ácido lático quando a temperatura do meio foi elevada para 37 °C (GRAVES *et al.*, 2007). Isto pode causar um colapso do processo, com grandes prejuízos para a destilaria. Quanto maior for o tempo de exposição à contaminação, maior será o gasto com desinfecção e com reinício de um novo ciclo sucessivo de fermentação. Dependendo do porte de uma destilaria, milhares de litros de etanol podem deixar de ser produzidos diariamente.

Embora as velocidades de fermentação e crescimento da levedura possam ser afetadas em presença de lactobacilos, a contaminação bacteriana pode ser reduzida no meio e nas linhas de produção da indústria quando as fermentações forem

¹¹ INGRAM, I. O.; BUTTKE, T. M. Effects of alcohol on micro-organisms *Adv. Microb. Physiol.*, v. 25, p. 253-300, 1984.

¹² LUCERO, P.; PEÑALVER, E.; MORENO, E. *et al.* Moderate concentrations of ethanol inhibit endocytosis of the yeast trehalose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Environ. Microbiol.*, v. 63, p. 3831-3836, 1997.

¹³ GELI, M. L.; RIEZMAN, H. Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J. Cell Sci.*, v. 111, p. 1031-1037, 1998.

¹⁴ VOLLAND, C.; URBAN-GRIMAL, D.; GERAUD, G. *et al.* Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 9833-9841, 1994.

realizadas com alta densidade de células (THOMAS *et al.*, 2001). Além dos aumentos em níveis de ácido lático pela contaminação bacteriana, aumentos concomitantes em glicerol externo foram observados pelos mesmos autores.

2.3 TIPOS DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ETANOL (ÇAYLAK *et al.*, 1998)

Etanol pode ser produzido por três tipos de processos industriais: bateladas simples, batelada alimentada e processo contínuo.

Em fermentação em batelada simples, o substrato e a cultura de levedura são adicionados junto com outros nutrientes ao reator. Atualmente, a maioria do etanol produzido é conduzido pelo processo de batelada simples e batelada alimentada, pois o custo do investimento é mais baixo, não requer muito controle e pode ser acompanhado por técnicos sem maiores conhecimentos sobre o processo.

Em processo contínuo, a alimentação com o substrato é feita pelo bombeamento contínuo para dentro de um frasco agitado onde os microrganismos estão em estado ativado. O produto, que é retirado no topo no bioreator, contém etanol, células e açúcar residual.

O processo de batelada alimentada de forma descontínua pode ser definido como uma combinação entre o processo de batelada simples com o processo contínuo. Neste processo, a solução de nutrientes é adicionada em intervalos constantes, enquanto que o fermentado é removido de maneira descontínua. A principal vantagem do processo de batelada alimentada é a inibição da repressão catabólica que é suprimida ou diminuída pela alimentação intermitente do substrato. Se o substrato exerce um efeito inibitório, as suas adições intermitentes melhoram a produtividade da fermentação pela manutenção de uma baixa concentração de substrato durante o processo. É essencial manter a cultura em volume constante em processo contínuo, sendo que variações no volume processo ocorrem em batelada alimentada.

2.4 METODOLOGIAS ESTATÍSTICAS COMO FERRAMENTA PARA A OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS

Em tecnologia de fermentação, a otimização do meio de cultivo é um procedimento laborioso e consome tempo, principalmente quando o número de variáveis é grande. Para isto, métodos clássicos são utilizados os quais envolvem mudanças de uma ou mais variáveis independentes enquanto as outras variáveis são mantidas fixas. Uma alternativa para reduzir o tempo e o custo consiste no uso de métodos estatísticos os quais são mais eficientes na otimização de sistemas microbianos (DUFF *et al.*, 1973¹⁵ *apud* RATNAM *et al.*, 2005). Além disto, planejamentos experimentais têm sido usados por muitas décadas e podem ser adaptados em diversas etapas de uma estratégia de otimização (KIM *et al.*, 2005¹⁶ *apud* UMA MAHESWAR RAO e SATYANARAYANA, 2007). O planejamento fatorial completo tem sido normalmente usado como uma importante etapa para se obter os efeitos e interações significativas entre as variáveis, bem como para o direcionamento de experimentos futuros em busca de melhores respostas para os processos fermentativos. Além disto, a metodologia de superfície de resposta tem sido usada para identificar e quantificar uma variedade de interações diferentes entre os parâmetros fermentativos e tem sido extensamente aplicada para em otimização de meios e condições de processos fermentativos, resultando na redução na variabilidade operacional e redução de seus custos operacionais.

2.5 ESTATÍSTICA INFERENCIAL PARA COMPARAÇÃO E ANÁLISE DE RESULTADOS

A estatística inferencial é uma parte da estatística que estabelece métodos que permitem tomar decisões através de hipóteses previamente formuladas. Esta decisão é sempre acompanhada por um risco de erro (α). Nos sub-itens abaixo, um

¹⁵ DUFF, R. J.; DEFEO, J. A.; ROBINSON, R. A. *et al.* Abstracts of Papers, 166th **American Chemical Society National Meetings**, Chicago, Micro, p. 28, 1973.

¹⁶ KIM, H. M.; KIM, J. G.; CHO, J. D., *et al.*, Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **Bioresource Technol.**, v. 96, n. 10, p. 1175-1182, 2005.

resumo das partes da estatística inferencial utilizada no presente trabalho está descrito.

TESTES DE HIPÓTESES (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

Hipóteses estatísticas são suposições realizadas com base no valor dos parâmetros das populações (conjunto de dados experimentais). As hipóteses estatísticas levantadas devem ser explícitas quanto ao tipo de teste envolvido e, também, devem permitir a comparação de parâmetros. Sendo assim, as hipóteses estatísticas sempre comparam dois ou mais parâmetros, e elas afirmam se estes parâmetros são iguais ou não. Estas hipóteses se dividem em dois tipos, tais como: a) Hipótese nula (H_0) que estabelece igualdade entre os parâmetros; b) Hipótese alternativa (H_A) que é contrária à hipótese nula e estabelece diferenças entre os parâmetros. Como os testes de hipótese são aplicados aos dados de amostras, existe um risco máximo admitido para erro (α) ao se afirmar se que há uma semelhança entre dois parâmetros se esta semelhança existir. Este erro (α) é também chamado de nível de significância. Por fim, o teste de hipóteses é um procedimento estatístico em que se rejeita ou não uma hipótese com um risco máximo de erro. Por convenção, a hipótese testada é sempre a nula (H_0). Se a hipótese nula (que indica igualdade) for rejeitada, automaticamente a hipótese alternativa (que indica diferença) é aceita.

TESTE F PARA COMPARAÇÕES ENTRE VARIÂNCIAS (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

As hipóteses que comparam duas variâncias são duas: a hipótese nula (H_0) que estabelece igualdade entre as variâncias das amostras ($s_A^2 = s_B^2$, s = símbolo de variâncias para amostras A e B) enquanto que a hipótese alternativa (H_A) estabelece diferenças entre as variâncias ($s_A^2 \neq s_B^2$). A estatística calculada para o teste consiste na razão F entre as variâncias das amostras. Os valores de F calculado (F_{calc}) são obtidos através da equação $F_{calc} = s_A^2 / s_B^2$, e estes valores seguem uma distribuição F assimétrica conforme mostrado na **Figura 2**. O valor crítico de F (F_{crit}) depende do

nível de significância (α), do número dos graus de liberdade (gl, graus de liberdade= número de componentes -1) de cada amostra. O F_{crit} é indicado por $F_{\alpha;glA;glB}$.

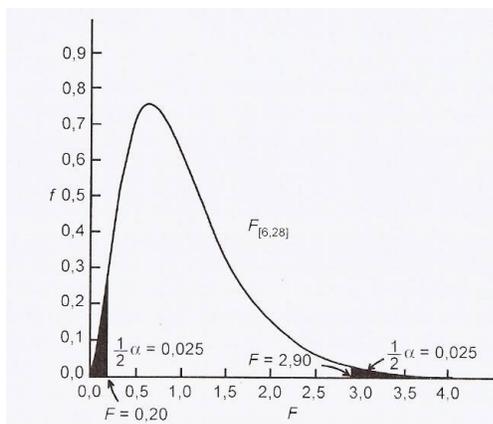


Figura 2- Distribuição F para graus de liberdade $gl_1=6$ e $gl_2=28$, com região crítica $\alpha=0,05$ marcada em escuro.
Fonte: CALLEGARI-JACQUES, 2003.

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA COMPARAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS QUANTITATIVAS (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

A análise de variância é uma poderosa técnica estatística desenvolvida por R. A. Fisher. Esta técnica é utilizada para comparar todas as médias de um experimento em um único teste e visa identificar ao menos uma diferença entre os grupos, se ela existir. Um dos modelos mais simples de ANOVA é uma técnica que analisa os dados de um *delineamento completamente casualizado* a um critério de classificação (*One way ANOVA*). A técnica da ANOVA faz dois tipos de comparações:

- um compara a variação global de médias de cada grupo (ou condição) do experimento com a média geral de todos os grupos (ou condições);
- outro compara a média de cada um dos componentes de um grupo com a média deste grupo.

A hipótese nula (H_0) a ser testada é se todas as médias experimentais são iguais (Por exemplo, $H_0: \bar{x}_A = \bar{x}_B = \bar{x}_C = \bar{x}_D = \bar{x}_E$). Este tipo de teste identifica pelo menos uma diferença entre os grupos de médias com um nível de significância estabelecido (α), caso esta diferença exista.

TESTE DE HIPÓTESES QUE COMPARA DUAS MÉDIAS (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

O teste T é utilizado para comparar médias de duas populações quanto a uma variável quantitativa. Por exemplo, em muitos experimentos biológicos e da área de saúde são realizados com duas amostras independentes, denominadas *grupo-experimental* e *grupo-controle*. Outro objetivo seria comparar médias populacionais, com a diferença que estas médias são desconhecidas. O teste t parte da hipótese de nulidade de que as médias das duas populações são iguais, ou seja:

$$H_0 : \mu_A = \mu_B$$

Onde, H_0 é hipótese nula que estabelece igualdade entre as médias das amostras. Isto é, se esta suposição for verdadeira, da diferença ($\mu_A - \mu_B$) é zero. A hipótese alternativa H_A é que as médias das amostras são diferentes ($\mu_A - \mu_B$) são diferentes de zero. Além disto, a escolha do nível de significância (α) é necessária para o cálculo dos graus de liberdade (gl) e escolha do t_{crit} . Os graus de liberdade são calculados da seguinte forma: (gl= tamanho da amostra_A + tamanho da amostra_B - 2). O valor de t_{crit} depende do nível de significância e dos graus de liberdade: $t_{crit} = t_{\alpha,gl}$, e este valor é tabelado. No entanto, o valor de t_{calc} depende de variância das amostras.

COMPARAÇÕES ENTRE PROPORÇÕES: TESTE DO QUI-QUADRADO DE ADERÊNCIA OU AJUSTAMENTO (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

As comparações entre proporções, como as viabilidades de células, são feitas através do teste do qui-quadrado (χ^2). Este teste serve para comparar variáveis qualitativas politômicas, ou seja, variáveis que são estudadas em mais de duas situações diferentes. O teste de aderência serve para verificar se uma distribuição de freqüência dos valores observados ($valor_{observado}$) ajusta-se a uma distribuição de valores esperados ($valor_{esperado}$). As hipóteses que comparam duas ou mais populações são: hipótese nula (H_0) que estabelece igualdade entre estas

populações e a hipótese alternativa (H_A) que estabelece diferenças entre estas populações.

A distribuição dos valores de qui-quadrado (χ^2) está descrita na **Figura 3**. O valor crítico de χ^2 (χ^2_{crit}) depende do nível de significância (α), do número dos graus de liberdade (gl), onde [graus de liberdade= (no. linhas_{tabela}-1) x (no. colunas_{tabela}-1)].

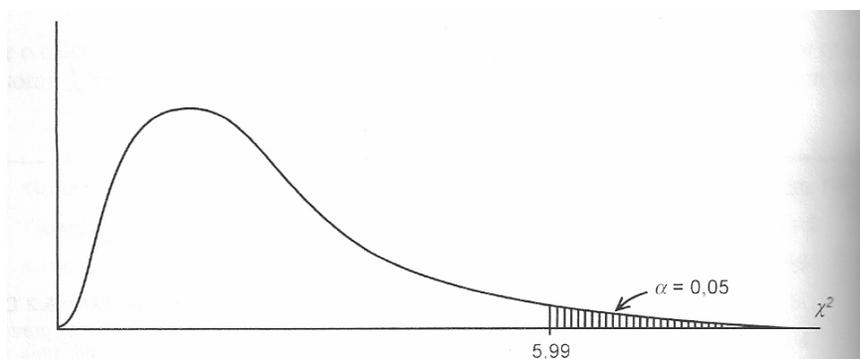


Figura 3- Forma geral da distribuição qui-quadrado (χ^2) para $gl=2$ com a região de significância ($\alpha=0,05$) sombreada.
Fonte: CALLEGARI-JACQUES, 2003; p. 132).

2.6 CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO COM REUTILIZAÇÃO DE CÉLULAS

A literatura descreve poucos trabalhos relacionados com a produção de etanol em sistemas com reciclagem de células (DAMIANO e WANG, 1985; MORIMURA *et al.*, 1997; PERES *et al.*, 2001; LALUCE *et al.*, 2002). Uma fermentação com ciclo de células consiste em uma fermentação que se reutiliza sucessivamente as células de levedura através do processo de separação ou adição de células. Neste tipo de fermentação, as células podem ser recolhidas em sistemas de retenção celular (por ex.: centrifugação, microcentrifugação, sedimentação) ou sistemas com recuperação de etanol (GROOT *et al.*, 1992).

Nas usinas de produção de etanol, células de leveduras são expostas a diversos tipos de estresses, principalmente em sistemas de reciclagens ou reutilização de células. Este tipo de fermentação é realizado para reduzir os custos na produção industrial de etanol a partir de melaço. Para isto, aumentos no

rendimento e produtividade de etanol, reduções em resfriamento das dornas e custos com a destilação, bem como no volume de vinhaça são necessários.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LEVEDURAS UTILIZADAS E MANUTENÇÃO DA CULTURA

As seguintes linhagens foram utilizadas:

- a) linhagem da levedura híbrida *Saccharomyces cerevisiae* 63M. Esta linhagem foi construída a partir de leveduras isoladas de dornas de fermentação industrial (e também possui a capacidade de ser termotolerante LALUCE *et al.*, 2002);
- b) linhagem de levedura industrial BG1, cuja cultura pura foi doada pela Zilor, Energia e Alimentos, Usina S. José, Macatuba-SP.

Estas linhagens foram estocadas em meio **YPD** (ver **item 3.3 de Materiais e Métodos**) inclinado a 4 °C, e repicada a cada dois meses. Culturas frescas das duas leveduras foram utilizadas nos experimentos.

3.2 REAGENTES UTILIZADOS

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau analítico.

3.3 MEIOS UTILIZADOS

Os meios de estocagem, de propagação e de fermentação, utilizados no presente trabalho foram os seguintes.

MEIO YPD (SHERMAN *et al.*, 1999)

Os constituintes do meio líquido YPD foram: 1% de extrato de levedo, 2% de peptona e 2% de glicose (todos em p.v⁻¹). Este meio foi solidificado com agar 2%.

MEIO SINTÉTICO

O meio sintético utilizado teve como base o meio descrito por THOMAS *et al.* (1998), contendo com algumas modificações, por exemplo, a sacarose foi adicionada no lugar da glicose. A composição original dos componentes no meio

sintético descrito por THOMAS *et al.* (1998) desprovido da glicose foi a seguinte: 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,86 mM de K_2HPO_4 ; 6,25 mM de KH_2PO_4 ; 2,03 mM de MgSO_4 , 0,68 mM de CaCl_2 ; 1,7 mM de NaCl ; 100 μM de ZnSO_4 ; 24,0 μM de H_3BO_3 , 1,8 μM de KI ; 20 $\mu\text{M g.L}^{-1}$ de MnSO_4 ; 10,0 μM de CuSO_4 ; 1,5 μM de Na_2MoO_4 ; 1,5 μM de CoCl_2 ; 1,23 μM de FeCl_3 . As seguintes vitaminas foram esterilizadas por filtração: 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de biotina, 2,0 mg.L^{-1} de pantotenato de cálcio, 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ácido fólico, 10 mg.L^{-1} de myo-inositol, 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de niacina, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ácido *p*-aminobenzoico, 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de piridoxina, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de riboflavina e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloreto de tiamina. A concentração final de ergosterol foi 0,004% e de Tween 80 foi de 0,4% no meio.

O meio sintético usado no presente trabalho foi realizado com a mistura de várias soluções contendo diferentes componentes do meio agrupados de acordo com a solubilidade deles. As seguintes soluções estoques para fazer 100 mL de meio, contendo células de levedura, estão descritas abaixo na **Tabela 1**.

3.4 PROPAGAÇÃO DO INÓCULO E PREPARO DO LEITE DE LEVEDURA

PROPAGAÇÃO DO INÓCULO

O pré-inóculo foi preparado com a inoculação de uma alça de cultura pura e fresca da levedura desejada em porções de 100 mL meio YPD (ver **item 3.3 de Materiais e Métodos**) contidas em Erlenmeyers de 250 mL. Este pré-inóculo foi cultivado numa mesa agitadora operando a 125 rpm por 12h a 30 °C.

A propagação foi realizada em porções de 50 mL de meio sintético em Erlenmeyers de 250 mL. (THOMAS *et al.*, 1998), como descrito na **Tabela 1**. Este meio foi preparado com 100 g.L^{-1} de sacarose e enriquecido com 20 g.L^{-1} de extrato de levedura (adicionada na solução B) para induzir o acúmulo da biomassa (5 vezes, ver **Figura 4**). A quantidade inicial de células de levedura no meio de propagação foi de 0,9 g.L^{-1} inóculo que ocorreu em uma mesa giratória a 125 rpm por 12h a 30 °C. A **Figura 4** mostra a curva de crescimento da levedura 63M com e sem extrato de levedura, nas condições descritas acima.

Tabela 1- Composição das soluções estoque utilizadas no preparo do meio sintético THOMAS *et al.* (1998)

Soluções estoques	V/100mL(mL) ^a	Composição	Esterilização
Solução A	25	400 g.L ⁻¹ a 800 g.L ⁻¹ de sacarose	Autoclave, (121 °C, 20 min)
Solução B	38	1,32 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,85 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ ; 0,15 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄ ; 0,5 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,1 g.L ⁻¹ de CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,1 g.L ⁻¹ de NaCl a pH 5,0	Autoclave, (121 °C, 20 min)
Solução C ou Solução de sais	1	5,12 g.L ⁻¹ de ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,148 g.L ⁻¹ de H ₃ BO ₃ ; 0,03 g.L ⁻¹ de KI; 0,378 g.L ⁻¹ de MnSO ₄ .H ₂ O; 0,391 g.L ⁻¹ de CuSO ₄ .5H ₂ O; 0,043 g.L ⁻¹ de Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O; 0,054 g.L ⁻¹ de CoCl ₂ .6H ₂ O; 0,055 g.L ⁻¹ de FeCl ₃ .6H ₂ O a pH 2,0	Autoclave, (121 °C, 20 min)
Solução D ou Solução de vitaminas	0,2	0,01 g.L ⁻¹ de biotina, 1,0 g.L ⁻¹ de pantotenato de cálcio, 0,01 g.L ⁻¹ de ácido fólico, 5,0 g.L ⁻¹ de myo-inositol, 0,2 g.L ⁻¹ de niacina, 1,0 g.L ⁻¹ de ácido p-aminobenzóico, 0,2 g.L ⁻¹ de cloreto de piridoxina, 0,1 g.L ⁻¹ de riboflavina e 0,1 g.L ⁻¹ de cloreto de tiamina. Dissolvidos a 60 °C, pH 7,0.	Filtração em membrana GSWP 02500 da Milipore
Solução E	0,8	5 g.L ⁻¹ de ergosterol dissolvido em etanol absoluto e Tween 80 (50%, v.v ⁻¹),	-

^a O volume final do meio foi completado a 100 mL com 25 mL de solução de células e 10 mL da mistura (solução de ácido láctico, solução de NaOH 3 mol.L⁻¹ ou HCl 3 mol.L⁻¹ esterilizada e água esterilizada).

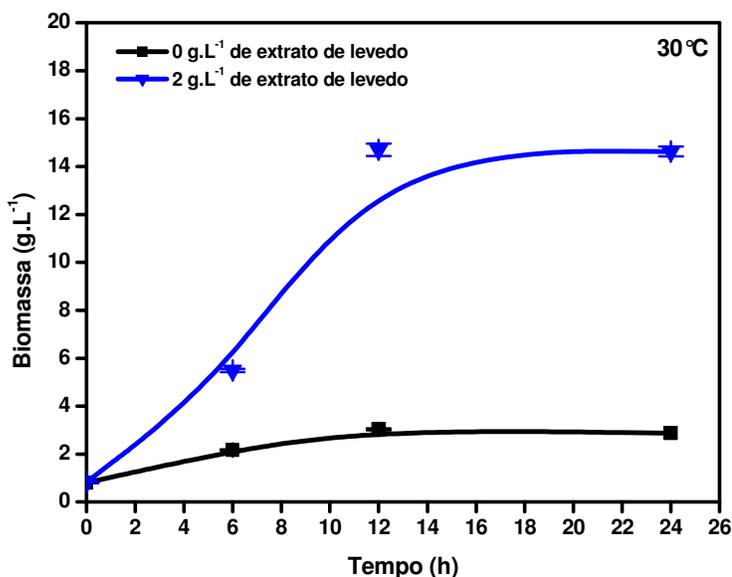


Figura 4- Curva de crescimento da levedura 63M em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com 100 g.L⁻¹ de sacarose e 20 g.L⁻¹ de extrato de levedura a 125 rpm por 24h a 30 °C. A quantidade de inóculo inicial foi de 0,9 g.L⁻¹.

PREPARO DO LEITE DE LEVEDURA

Após a propagação, as células foram coletadas por centrifugação a $5000 \times g$ durante dois minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e re-suspensas em mesmo volume de célula com água deionizada esterilizada. A lavagem das células foi repetida mais uma vez e, depois disto, as células foram re-suspensas em água deionizada esterilizada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, resultando no denominado leite de levedura (160 g.L^{-1} , massa seca ou 16%, p.v⁻¹) utilizado para inocular os mini-reatores.

3.5 DESCRIÇÃO DOS MINI-REACTORES

Os ensaios de fermentação só foram realizados com a chegada do conjunto de mini-reatores com capacidade de 200 mL (processo FAPESP no. 2005/01498-6) em nosso laboratório fabricado pela empresa Marconi S.A., Piracicaba, Brasil, modelo MA 5002/4/200. Este sistema possui quatro mini-reatores (200 mL de volume total), sendo cada um deles equipado com o seguinte (ver **Figura 5**): a) agitador magnético (100 rpm), b) condensador para circulação de água a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, destinado a condensar os vapores de etanol, c) uma entrada para um sensor para medidas de pH durante a fermentação, d) uma entrada para o sensor de temperatura, e) entrada para alimentação e saída para retirada de amostras. A temperatura dos mini-reatores foi mantida constante a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. A adição de antiespumante não foi necessária nas condições de nossos experimentos, uma vez que os volumes de espuma gerados não chegaram a causar problemas. Os reatores e foram esterilizados a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e a uma atmosfera de pressão por 20 min em autoclave.

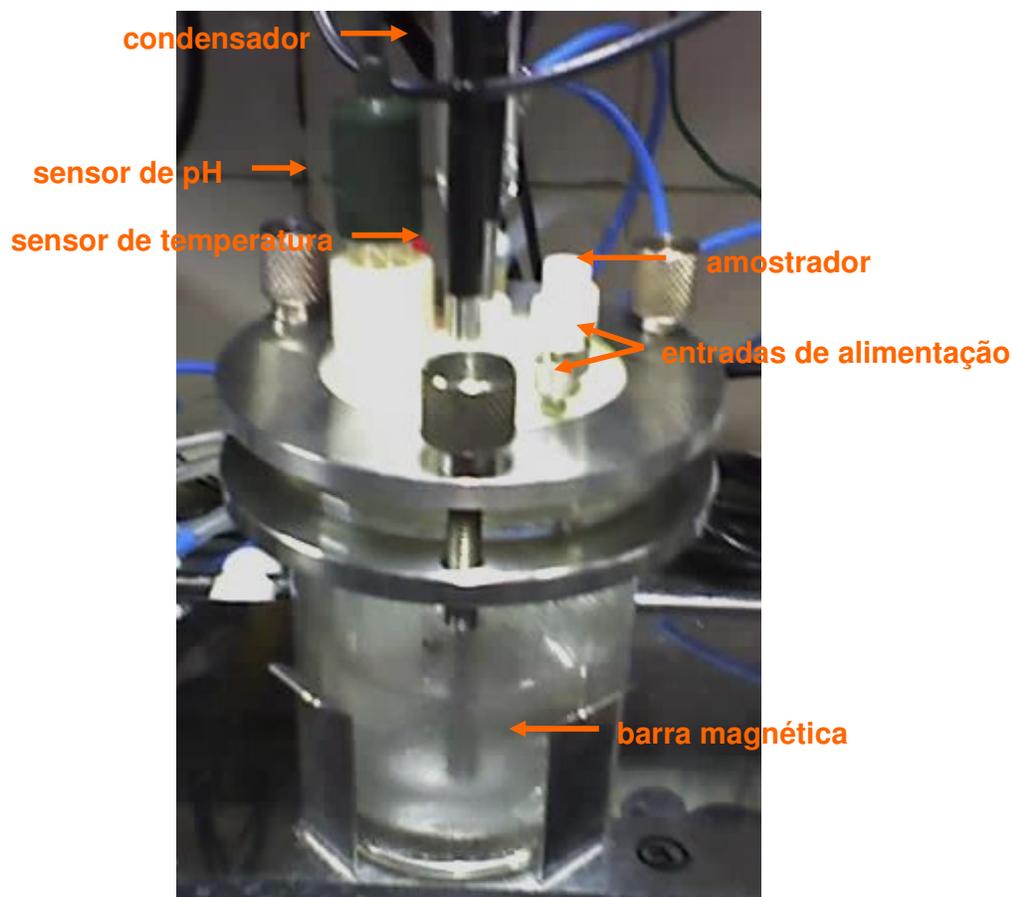


Figura 5- Ilustração de um mini-reator encamisado com volume total de 200 mL, com agitação magnética, sensores de pH e temperatura, condensador, amostrador e 2 entradas de alimentação.

3.6 FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA

FERMENTAÇÕES EM ERLENMEYERS

O processo descontínuo (batelada simples) ocorreu em Erlenmeyers, com capacidade para 250 mL, vedados com uma rolha de borracha na qual foi adaptado um sistema de amostragem, conforme mostrado na **Figura 6**. Este sistema era composto de uma rolha de borracha contendo dois tubos de vidro: um tubo de vidro curto com algodão hidrofóbico para o escape de gás e outro tubo de vidro longo que foi usado para coletar amostras do meio de fermentação no fundo do Erlenmeyer. Este tubo de vidro ou amostrador foi construído com mangueiras de silicone nas extremidades e a mangueira da extremidade superior fechada com uma pinça e

algodão para vedar o sistema de fermentação. O volume inicial da fermentação foi de 100 mL sendo que a quantidade inicial de células variou de 20 g.L⁻¹ a 40 g.L⁻¹ (correspondente a 4% em p.v⁻¹ e 12% v.v⁻¹), a concentração de ácido láctico adicionado de 0,0 a 4,0 g.L⁻¹ e a quantidade inicial de sacarose de 100 a 250 g.L⁻¹. Este sistema não permitiu o acompanhamento dos valores do pH inicial, nem do reajuste do mesmo após a adição de ácido láctico. Os Erlenmeyers foram colocados em uma mesa agitadora operando numa rotação de 100 rpm a 34 °C durante 4h.

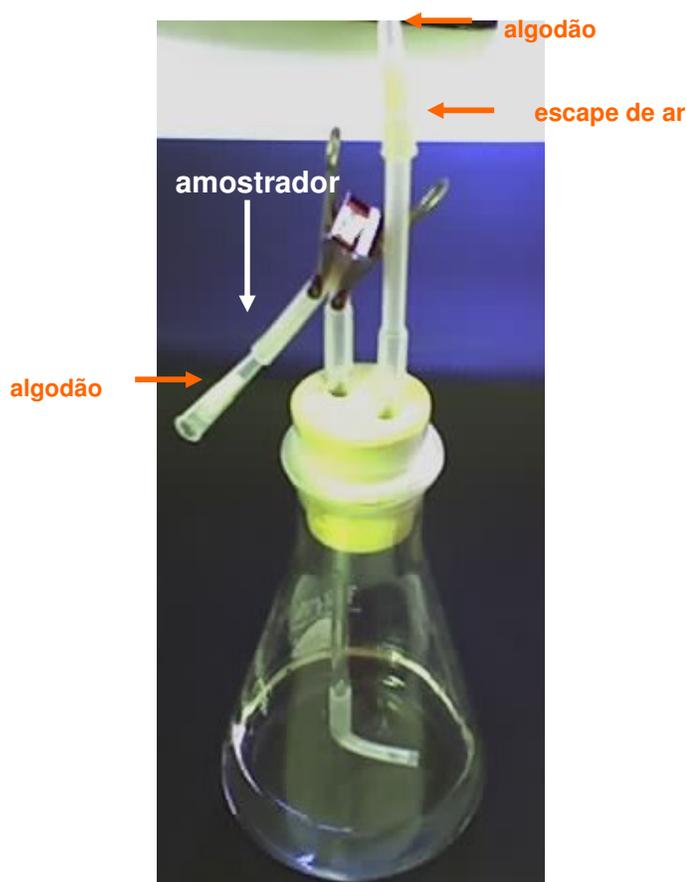


Figura 6- Ilustração do sistema de fermentação em Erlenmeyers com capacidade para 250 mL acoplado com um sistema de amostragem.

FERMENTAÇÕES EM MINI-RETORES

A batelada simples foi realizada com a adição inicial de todos os componentes do meio no mini-reator, sem variação de volume (100 mL) do meio durante o processo. Este processo foi submetido a uma agitação de 100 rpm e a 34 °C. Um

volume de meio sintético (desprovido de fonte de carbono) concentrado 2,5 vezes (40 mL) e a pH 4,5 foi inicialmente adicionado ao sistema de fermentação, previamente esterilizado em autoclave. Em seguida, 25 mL de uma suspensão concentrada do inóculo (suspensão com 160 g.L^{-1} de células em massa seca), foi adicionada ao mini-reator de modo a atingir 4% em p.v⁻¹ (40 g.L^{-1} ou 12%, v.v⁻¹) de células considerando o volume final do meio no reator (100 mL). Um volume de 25 mL de solução concentrada de sacarose (600 g.L^{-1} a 800 g.L^{-1}) foi adicionada ao reator. Para garantir a sobrevivência das células, adições simultâneas do volume desejado da solução de ácido láctico 85% e da solução de NaOH ($3,0 \text{ mol.L}^{-1}$) foram realizadas para reajustar o pH inicial para 4,5. O volume das soluções de ácido láctico e NaOH adicionados não ultrapassou um volume de 10 mL. Em seguida, uma primeira amostragem de 0,5 mL do meio de fermentação foi retirada para ensaios. A **Tabela 2** descreve concentrações iniciais de sacarose e inóculo no processo descontínuo.

Tabela 2- Condições de desenvolvimento do processo descontínuo (batelada simples) em mini-reatores.

Características do processo	(g.L ⁻¹)
Sacarose inicial	200
Inóculo inicial	40

3.7 FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA ALIMENTADA DE FORMA CONTÍNUA POR SACAROSE

O processo de fermentação alimentado (batelada com alimentação contínua) foi realizado com a adição inicial do meio sintético e do inóculo ao mini-reator. A diferença entre este processo e o descontínuo foi que a fermentação iniciou sem adição da solução de sacarose. Além disto, o volume do mini-reator variou de 75 mL para 100 mL (ver **Figura 7**) após a adição do mesmo volume de solução concentrada de sacarose. O volume da suspensão concentrada de células inóculo (160 g.L^{-1}) foi o mesmo do processo descontínuo (25 mL), mas a quantidade inicial de inóculo no reator foi maior (53 g.L^{-1}) neste processo (ver **Tabelas 2 e 3**), devido

ao volume inicial menor do fermentador (75 mL). Este processo também foi submetido a uma agitação de 100 rpm e a 34 °C.

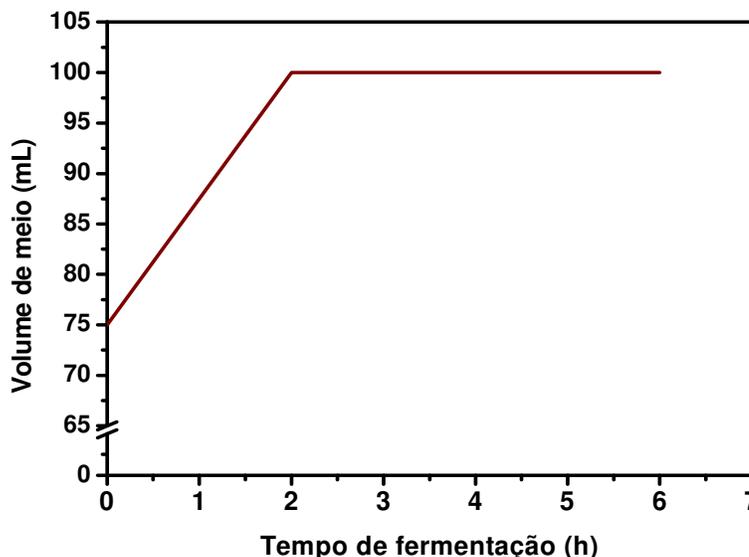


Figura 7- Variação de volume durante o processo de batelada alimentada pela adição da solução de sacarose numa vazão constante de $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 2 horas.

Tabela 3- Condições do processo descontínuo alimentado com sacarose.

Características do processo	Quantidades
Quantidade inicial de inóculo	$53 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
Concentração inicial de sacarose	$\sim 0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
Vazão da alimentação de sacarose	$0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Tempo de alimentação de sacarose	2h

Um volume de 40 mL de meio sintético (desprovido de fonte de carbono) concentrado 2,5 vezes e a pH 4,5 foi inicialmente adicionado ao fermentador, previamente esterilizado em autoclave. Em seguida, um volume de 25 mL de uma suspensão concentrada do inóculo ($160 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de células, em massa seca) foi adicionada ao mini-reator de modo a adicionar 4%. Para garantir a sobrevivência das células, realizou-se a adição simultânea do volume desejado da solução de ácido láctico 85% e da solução de HCl ($3,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) para reajuste do pH inicial para 4,5. Por fim, o sistema foi alimentado com a adição de um volume de 25 mL da solução de sacarose de $800 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 2 horas com uma vazão constante de 0,2

$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Esta vazão pequena foi conseguida com o uso de um sistema de macrogotas controladas por pinça rolete, como mostra **Figura 8**. Após a alimentação contínua de 2h, o processo continuou em batelada simples por mais 4h. A concentração inicial de sacarose no meio foi nula no início da fermentação. A fermentação foi realizada por 6h a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ para verificar o consumo total de açúcar. Amostras de aproximadamente 0,5 mL foram retiradas do mini-reator a cada hora e a primeira amostra foi retirada após o início da alimentação com a solução de sacarose.

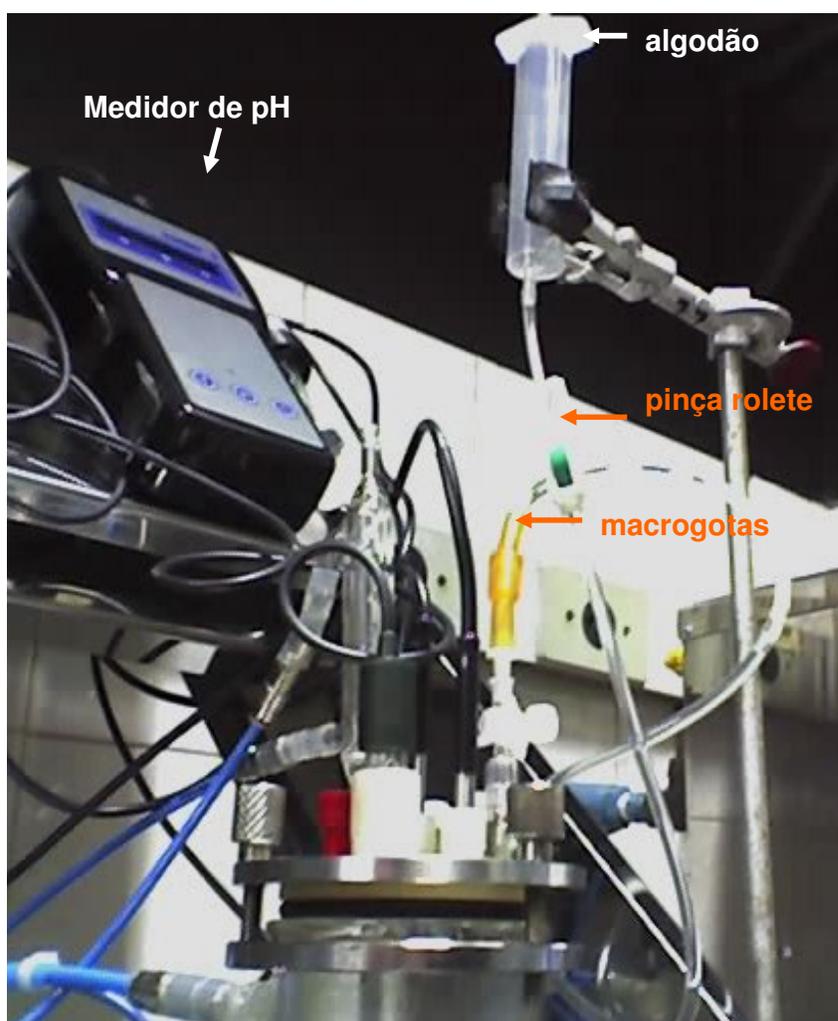


Figura 8- Ilustração de um sistema de alimentação contínua obtida por meio de macrogotas com uma pinça rolete acoplados ao mini-fermentador.

3.8 FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA ALIMENTADA POR PULSOS DECRESCENTES

O processo de fermentação descontínuo alimentado por pulsos (batelada alimentada por pulsos) também foi realizado com a adição inicial do meio sintético e do inóculo ao mini-reator. A diferença entre este processo e processo descontínuo alimentado foi que o mesmo volume de sacarose (25 mL) foi adicionados por 3 pulsos decrescentes (10 mL, 8 mL e 7 mL) da solução de sacarose. Além disto, o volume do mini-reator variou de 85 mL (após a adição do primeiro pulso de sacarose) para 93 mL (adição do segundo pulso após 1h) e o volume permaneceu constante em 100 mL (adição do terceiro pulso) após 2h de fermentação (ver **Figura 9**). O volume da suspensão concentrada de células inóculo foi o mesmo do processo descontínuo e do processo descontínuo alimentado, mas a quantidade inicial de inóculo no reator foi de 47 g.L^{-1} (ver **Tabela 4**), pois o volume inicial do fermentador foi de 85 mL. Este processo também foi submetido a uma agitação de 100 rpm e a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Além disto, este tipo de processo foi realizado com duas variações na composição da alimentação, mas mantendo a mesma quantidade de sacarose adicionada nos pulsos (ver **Tabela 4**) ou reduziu-se proporcionalmente a quantidade total de sacarose adicionada para diminuir a produção de etanol, conforme a necessidade do experimento. Estas modificações foram as seguintes:

- a) adição por pulsos da solução de ácido láctico misturada com a solução de sacarose e com a solução de NaOH para o ajuste do pH a 4,5;
- b) adição por pulsos da solução de ácido láctico misturada com a solução de sacarose e sem a solução de NaOH que foi adicionada logo após a adição dos pulsos.

Um volume de 40 mL de meio sintético com o pH 4,5 (desprovido de fonte de carbono) concentrado 2,5 vezes foi inicialmente adicionado ao reator, previamente esterilizado em autoclave. Em seguida, volumes variados (até 25 mL) de uma suspensão concentrada do inóculo (suspensão com 160 g.L^{-1} de células, em massa seca), foram adicionados ao mini-reator de modo a atingir 2% a 4% (p.v⁻¹) de células

em relação ao volume final do meio no reator (100 mL). Por fim, o sistema foi alimentado por um volume de 25 mL de soluções de sacarose de concentrações variadas, dependendo do experimento (soluções de sacarose de 600 g.L^{-1} para a concentração final de 15% em p.v⁻¹; de 720 g.L^{-1} para a concentração final de 18% em p.v⁻¹; de 800 g.L^{-1} para a concentração final de 20% em p.v⁻¹) adicionado por 3 pulsos decrescentes por um período de duas horas a partir do tempo zero, sendo a fermentação concluída após um período de 4h a 6h para consumo total de açúcar e amostras de aproximadamente 0,5 mL foram retiradas do mini-reator a cada hora.

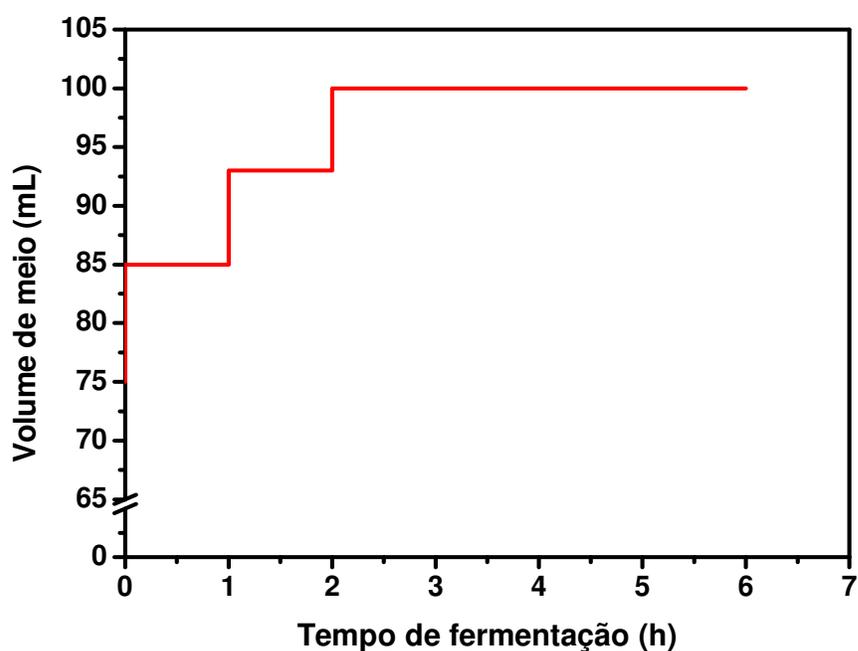


Figura 9- Variação de volume durante o processo de batelada alimentada por pulsos decrescentes (10 mL, 8 mL e 7 mL) da solução de sacarose a durante 2 horas.

A adição de ácido láctico foi realizada de três formas diferentes, conforme descrito abaixo.

Adição de um único pulso de ácido láctico no início da fermentação

Os passos da alimentação com solução de sacarose foram os seguintes:

- a) Adição de um primeiro pulso de 10 mL de solução concentrada de sacarose perfazendo um volume de 75 mL;

- b) Para garantir a sobrevivência das células, realizou-se a adição simultânea da quantidade desejada de ácido láctico 85% e de solução de NaOH ($3,0 \text{ mol.L}^{-1}$) para reajustar de imediato o pH inicial para 4,5. O volume das soluções de ácido láctico e NaOH adicionados não ultrapassaram o volume final de 10 mL (volume final no reator de 85 mL);
- c) Em seguida, uma primeira amostragem de 0,5 mL de meio foi retirada para ensaios. Após 60 min da adição do primeiro pulso, retirou-se a segunda amostra e fez-se a adição do segundo pulso contendo 8 mL da solução concentrada de sacarose;
- d) Após 60 min do segundo pulso, retirou-se a terceira amostra e terceiro pulso de 7 mL foi adicionado.

Tabela 4- Condições do processo em batelada com alimentação por pulsos de volumes decrescentes de uma solução concentrada de 800 g.L^{-1} de sacarose.

Características do processo	Quantidades no reator
Volume inicial do meio de fermentação	85 mL
Volume final do meio de fermentação	100 mL
Concentração inicial de sacarose	94 g.L^{-1}
Quantidade inicial de inóculo	47 g.L^{-1}
Quantidade de sacarose no primeiro pulso adicionado em 0h	8,0 g
Quantidade de sacarose no segundo pulso adicionado após 1h	6,4 g
Quantidade de sacarose no terceiro pulso adicionado após 2h	5,6 g

Adição ácido láctico nos pulsos da solução de sacarose com o pH ajustado para 4,5

Os passos da alimentação com 35 mL solução de sacarose 720 g.L^{-1} contendo $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de solução de ácido láctico 85% e com o pH ajustado a 4,5 foram os seguintes:

- a) Adição de um primeiro pulso de 14 mL de solução concentrada de sacarose perfazendo um volume de 75 mL;
- b) Em seguida, realizou-se a adição simultânea da quantidade desejada de ácido láctico 85% e de solução de NaOH ($3,0 \text{ mol.L}^{-1}$) para reajustar de imediato o pH

inicial para 4,5, uma primeira amostragem de 0,5 mL de meio foi retirada para ensaios;

c) Após 60 min, retirou-se a segunda amostra e fez-se a adição do segundo pulso contendo 11 mL da solução concentrada de sacarose;

d) Após 60 min do segundo pulso, retirou-se a terceira amostra e terceiro pulso de 10 mL foi adicionado.

Adição ácido láctico nos pulsos da solução de sacarose e reajuste do pH a 4,5 no fermentador

Os passos da alimentação com 27 mL solução de sacarose 720 g.L^{-1} contendo $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de solução de ácido láctico 85% foram os seguintes:

a) adição de um primeiro pulso de 11 mL de solução concentrada de sacarose contendo ácido láctico com a adição da solução de NaOH ($3,0 \text{ mol.L}^{-1}$) para reajustar o pH inicial para 4,5;

b) Em seguida, uma primeira amostragem de 0,5 mL de meio foi retirada para ensaios;

c) Após 60 min, retirou-se a segunda amostra e fez-se a adição do segundo pulso contendo 9,5 mL da solução concentrada de sacarose ácido láctico com a adição da solução de NaOH ($3,0 \text{ mol.L}^{-1}$) para reajustar o pH inicial para 4,5;

d) Após 60 min do segundo pulso, retirou-se a terceira amostra e terceiro pulso de 8,5 mL da solução de sacarose contendo ácido láctico com a adição da solução de NaOH ($3,0 \text{ mol.L}^{-1}$) para reajustar de imediato o pH inicial para 4,5 foi adicionado.

3.9 CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO COM REUTILIZAÇÃO DE CÉLULAS

Após a propagação das células, estas são adicionadas ao fermentador contendo meio sintético como descrito no **item 3.4** para fermentação em batelada alimentada por pulsos de sacarose. Após o término do ciclo de fermentação, o meio fermentado foi centrifugado a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min e $5000 \times g$, as células foram coletadas e o sobrenadante foi submetido a ensaios e descartado. O concentrado de células foi re-suspenso no meio de estocagem selecionado como descrito abaixo no

item 3.10 para então serem utilizados, no dia seguinte, em novo ciclo de fermentação.

3.10 ESTOCAGEM DA LEVEDURA ENTRE OS CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO

Após a realização do primeiro ciclo de fermentação, as células foram separadas do meio por centrifugação ($5000 \times g$ por 1 min) e em seguida, foram re-suspensas em 20 mL das seguintes soluções, perfazendo um total de nove condições diferentes de estocagem das suspensões de células:

Condição A: água deionizada contendo 50 g.L^{-1} de sacarose, 20 g.L^{-1} de extrato de levedura e pH 4,0;

Condição B: água deionizada contendo 100 g.L^{-1} de sacarose, 20 g.L^{-1} de extrato de levedura e pH 4,0.

Um total de 20 mL das soluções descritas foi adicionado a um Erlenmeyer de 125 mL, com uma densidade de células de 15 g.L^{-1} em ensaios para a seleção do meio de estocagem. No entanto, durante as fermentações em ciclos sucessivos, um total de 100 mL das soluções descritas foi adicionado a um Erlenmeyer de 250 mL, com uma densidade de células de 40 g.L^{-1} . Ambos os procedimentos foram colocados em mesa agitadora (125 rpm) a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 horas. A biomassa e a viabilidade foram analisadas no início e no final do tratamento.

3.11 MEDIDAS PARA O ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO FERMENTATIVO

Todas as medidas descritas abaixo foram feitas em duplicata e calculou-se a média e o desvio-padrão para cada uma destas medidas.

MEDIDA DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

O açúcar redutor total foi determinado através do método baseado na redução do açúcar pelo ácido 3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

Curva padrão de açúcar redutor

Soluções:

a) Reagente de ácido 3,5- dinitrossalicílico (100 mL) contendo: 30 g de tartarato de sódio e potássio, 1,6 g de hidróxido de sódio e 1 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico.

Solução padrão de sacarose 0,1%.

Solução de ácido clorídrico 6M.

Solução de hidróxido de sódio 2,4M.

A mistura de reação (1,0 mL) foi desenvolvida com a adição de 0,8 mL de amostra (solução de sacarose ou sobrenadante de cultura) mais água destilada e 0,2 mL de solução de ácido clorídrico 6M em tubos de ensaio. Em seguida, estes tubos foram incubados a 60 °C durante 7 min. A reação foi interrompida com adição de 1,0 mL de hidróxido de sódio 2,4 mol.L⁻¹. A reação colorida ocorreu com a adição de 2,0 mL do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico, seguido por aquecimento a 100 °C durante 5 minutos em banho de água fervente. As leituras foram feitas no espectrofotômetro FEMTO modelo 432 C a 546 nm. A curva foi linear em toda a faixa de absorbância medida (de 0 a 1 unidade de absorbância, **Figura 5**). O fator de conversão (inverso da tangente desta curva) da medida de absorbância em concentração de açúcares redutores (**fator F**, na **Figura 10**) foi de 0,00728. A concentração de açúcar foi calculada da seguinte forma:

$$[\text{g.L}^{-1}] = F_1 \cdot \Delta A_{546\text{nm}} \cdot \text{diluição}$$

Onde $\Delta A_{546\text{nm}}$ = diferença da medida de absorbância entre os tubos contendo água (controle) e os tubos contendo as soluções padrão de sacarose, em concentrações variadas, medidas a 546 nm.

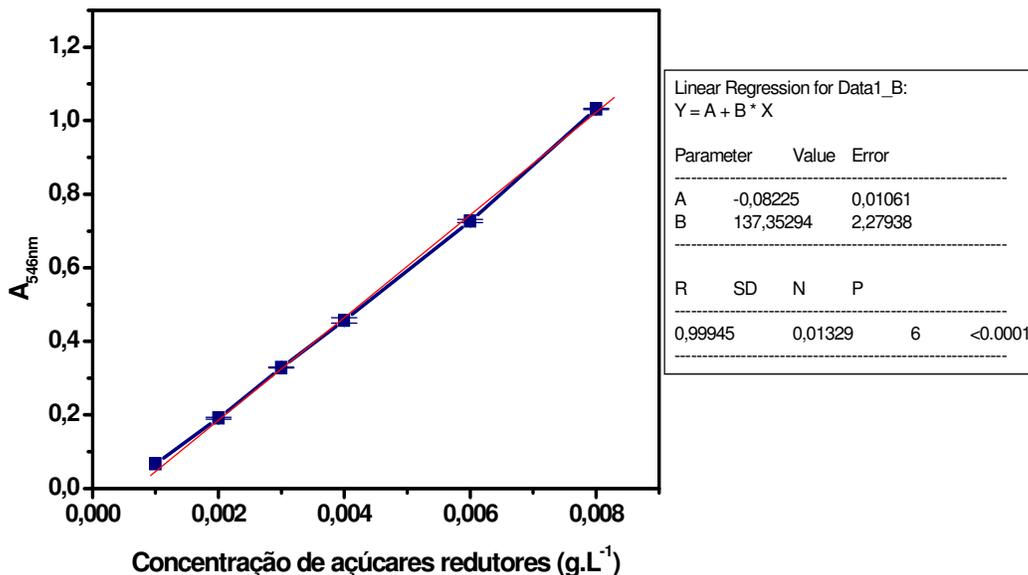


Figura 10- Curva-padrão dos grupos redutores da sacarose para a dosagem do açúcar residual pelo método de 3,5 DNS (MILLER, 1959). A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular $b = 137,35$, fator de correlação da reta ($R^2 = 0,999$) e fator de conversão de absorbância em concentração de açúcares redutores ($F_1 = 0,00728$) para o espectrofotômetro FEMTO modelo 432 C.

MEDIDA DE BIOMASSA CELULAR

Uma curva analítica foi feita para relacionar a massa seca da levedura com a medida de absorbância, conforme mostrado na **Figura 11**. As medidas de massa seca foram feitas com suspensões de células de levedura lavadas com água destilada em membranas de éster de celulose com 25 mm de diâmetro e 0,65 μm de porosidade (Millipore, DAWP 02500). As medidas de massa seca foram determinadas numa balança analítica após a secagem de células em forno de microondas em potência baixa por 15 min. Os valores de absorbância foram determinados por medidas no espectrofotômetro FEMTO modelo 432 C a 570 nm. O cálculo da concentração de massa seca de células foi o seguinte:

$$[\text{g.L}^{-1}] = F_2 \cdot \text{diluição} \cdot \Delta A_{570\text{nm}}$$

Onde, $\Delta A_{570\text{nm}}$ = diferença da medida de absorvância entre o tubo-controle e o tubo contendo suspensões de células medidas a 570 nm. F_2 =fator de conversão de medida de absorvância em massa seca (**Figura 11**).

DOSAGEM DE ETANOL EXTRACELULAR

A concentração de etanol foi determinada nos sobrenadantes das culturas separados por centrifugação a 15000 x g a 4 °C. As medidas foram feitas utilizando-se um cromatógrafo gasoso com um detector de ionização de chama (Instrumentos científicos, mod. CG-37, São Paulo, Brasil).

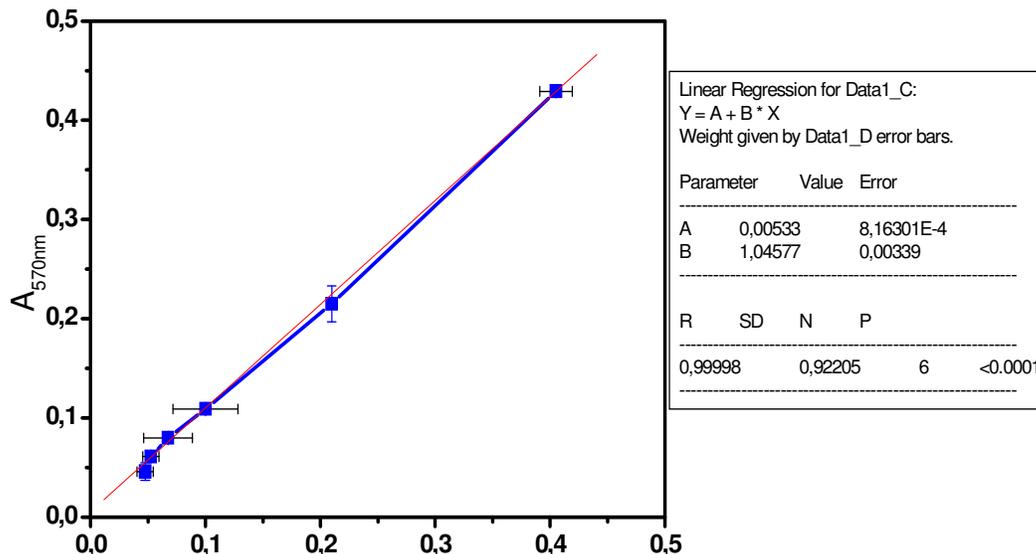


Figura 11- Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura 63M com valores de absorvância. O coeficiente de correlação para a reta ($y = a + b \cdot x$) foi de 0,9999, o coeficiente angular a foi de 1,0577 e o fator de correlação absorvância em biomassa seca (F) foi de 0,956 para o espectrofotômetro FEMTO modelo 432 C. As células foram propagadas em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 100 g.L^{-1} de sacarose e enriquecido com 20 g.L^{-1} de extrato de levedura.

MEDIDA DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada pelo método de azul de metileno descrito por LEE *et al.* (1981). A contagem das células foi determinada em câmara de Neubauer.

Reagente azul de metileno

A composição do reagente azul metileno foi a seguinte: 10 g.L⁻¹ de glicose; 0,42 g.L⁻¹ de KCl; 0,48 g.L⁻¹ de CaCl₂.6H₂O; 0,2 g.L⁻¹ de NaHCO₃; 9,0 g.L⁻¹ de NaCl; 0,25 g.L⁻¹ de azul de metileno; água deionizada.

MEDIDA DE ACIDEZ TOTAL (YOKOYA, 1995)

Um volume de 10 mL do sobrenadante do meio de fermentação foi adicionado em um balão volumétrico de 250 mL. Em seguida, adicionou-se 3 gotas de solução de fenolftaleína 1% e o volume foi completado para 250 mL. A mistura foi transferida para em Erlenmeyer de 500 mL e foi titulada com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 N até a viragem solução incolor para rósea pálida. O volume da solução de hidróxido de sódio foi anotado para o cálculo da acidez total. O cálculo da acidez total foi realizado usando o ácido sulfúrico como padrão para ser comparado com dados da literatura.

PROTEÍNA TOTAL INTRACELULAR PELO MÉTODO DO BIURETO (ROBYT e WHITE, 1987)

O processo de extração da proteína total foi realizado com uma quantidade de 100 mg (massa seca) de células de levedura que foram re-suspensas em 1,0 mL de solução tampão de extração Tris/HCl 0,01 M, pH 7,2 e adicionados em um tubo de vidro com parede espessa de 5 mL contendo 1 g de microesferas de vidro a 4 °C. Em seguida, os tubos foram congelados a -20 °C. As células foram rompidas em um agitador de tubos durante 4 ciclos de agitação de 30s e permanência em banho de gelo por 30s nos intervalos entre as agitações. As micro-esferas de vidro e as células foram separadas por centrifugação rapidamente em tubos Falcon a 12000 x g por 3 min a 4 °C. Em seguida, as proteínas coaguladas foram separadas por centrifugação rapidamente em tubos Falcon a 12000 x g por 5 min a 4 °C.

O reagente do Biureto foi preparado da seguinte maneira: 0,3 g de CuSO₄.5H₂O e 0,9 g de tartarato de sódio e potássio dissolvidos em 50 mL de NaOH 0,2N contendo 0,5 g de KI. O volume do reagente foi completado para 100 mL.

A mistura da reação foi a seguinte: 2,0 mL de amostra mais 3,0 mL do reagente de Biureto. A mistura de reação foi incubada por 10 min a 37 °C. As leituras de absorbância foram feitas a 540 nm e a solução de soroalbumina 1,0% foi utilizada como solução-padrão para a obtenção da curva analítica. O cálculo da concentração de proteína intracelular, expressa em $\text{g}_{\text{proteína}}.\text{g}_{\text{célula}}^{-1}$, foi o seguinte:

$$[\text{g}_{\text{proteína}}.\text{g}_{\text{célula}}^{-1}] = F_3 \cdot \text{diluição} \cdot \Delta A_{540\text{nm}}$$

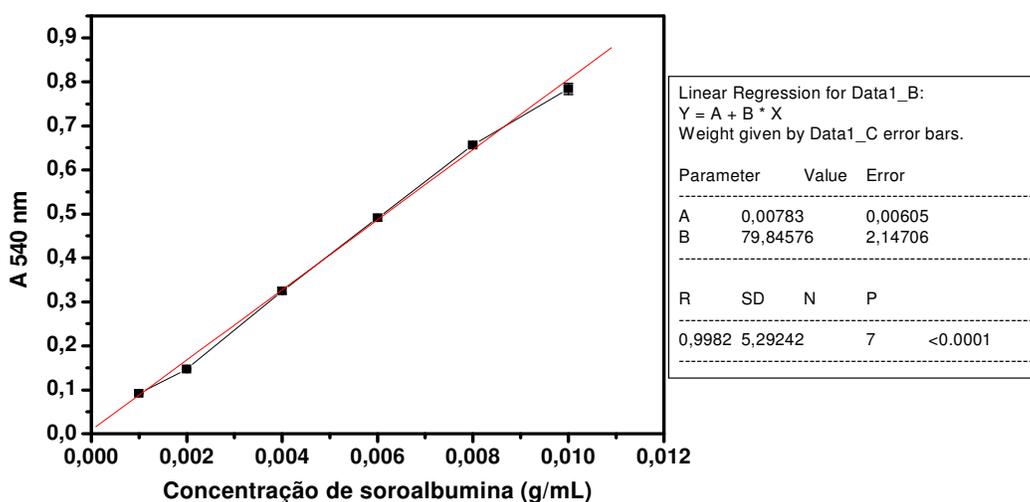


Figura 12- Curva-padrão de solução de soroalbumina bovina para a dosagem do de proteína total pelo método do Biureto (ROBYT e WHITE, 1987). A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: coeficiente angular $b = 79,8$, fator de correlação da reta ($R^2 = 0,998$) e fator de conversão de absorbância em concentração de proteína ($F_3 = 0,126$) para o espectrofotômetro FEMTO, modelo B 382.

GLICEROL INTRACELULAR EM LEVEDURA (PERES *et al.*, 2005)

O processo de extração foi realizado da mesma maneira que para a medida de proteína total, com a diferença na solução tampão Tris/HCl 0,1M a pH 7,5, como descrito no item anterior.

O sobrenadante foi ensaiado usando o kit enzimático (tipo B-40) para triglicérides (Doles), Goiânia, GO. A mistura da reação foi: 0,4 mL de sobrenadante mais 2,0 mL do coquetel de reagente colorido contendo glicerol quinase, glicerol

fosfato oxidase e peroxidase. Os tubos foram incubados por 10 min a 37 °C e a medida de absorbância foi monitorada a 510 nm. A quantidade de glicerol foi expressa em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de células (massa seca).

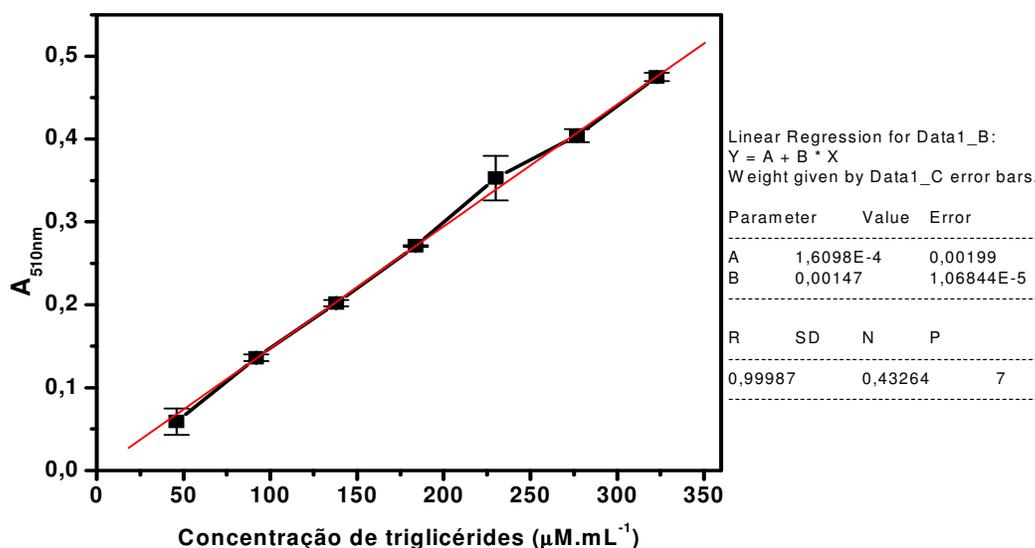


Figura 13- Curva-padrão de solução de triglicérides para a dosagem de glicerol. A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: fator de correlação da reta ($R^2 = 0,999$) e fator de conversão de absorbância em concentração de proteína ($F_4=680$) para o espectrofotômetro FEMTO, modelo B 382.

TREALOSE INTRACELULAR EM LEVEDURA (PERES *et al.*, 2005)

O processo de extração foi realizado da mesma maneira que para a medida de proteína total, como descrito no item anterior e com a diferença na solução tampão acetato de sódio (contendo 30 mM de CaCl_2) 0,1 M a pH 5,5.

O sobrenadante foi ensaiado usando o kit enzimático (CAT no. 02200) da Laborlab, Guarulhos, SP. A mistura da reação foi: 100 μL de tampão acetato de sódio (contendo 30 mM de CaCl_2) 0,1 M a pH 5,5, 100 μL de extrato de extrato celular, 200 μL preparação enzimática de trealase comercial da Sigma (no. de lote) 0,5 U/mL. A mistura foi incubada por 60 min a 50 °C. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição dos tubos em banho de água fervente por 5 min. Imediatamente, os tubos foram colocados em banho de gelo. As proteínas coaguladas foram separadas

por centrifugação rapidamente em tubos Falcon a 12000 x g por 3 min. A glicose liberada durante a hidrólise da trealose foi determinada em sobrenadante livre de proteína pelo kit de glicose (LabTest): 5 mL do reagente de cor + 50 µL do sobrenadante. Os tubos foram incubados por 10 min a 37 °C e a medida de absorbância foi monitorada a 525 nm. A quantidade de trealose foi expressa em $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ de células (massa seca).

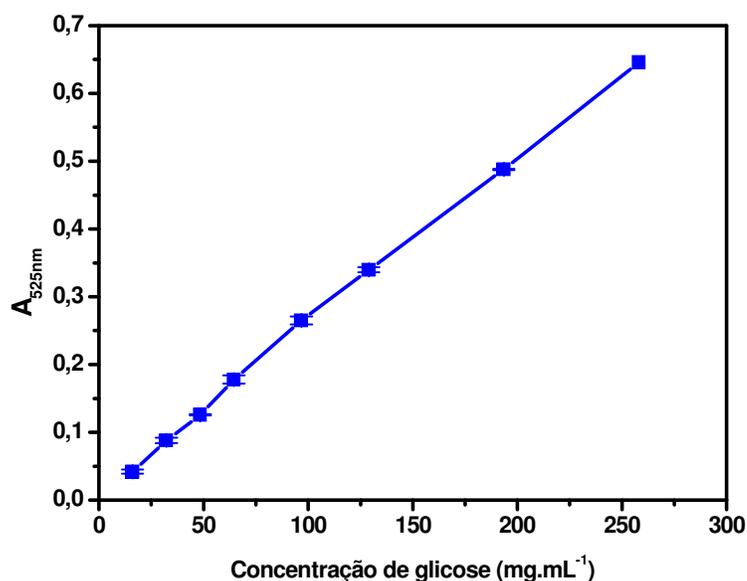


Figura 14- Curva-padrão de solução de glicose para a dosagem de trealose. A regressão linear da curva $y = a + b.x$ mostrou o seguinte: fator de correlação da reta ($R^2 = 0,999$) e fator de conversão de absorbância em concentração de proteína ($F_4=403$) para o espectrofotômetro FEMTO, modelo B 382.

3.12 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO

VELOCIDADES INSTANTÂNEAS DE CRESCIMENTO E DE CONSUMO DE SACAROSE E FORMAÇÃO DE ETANOL (RIVERA *et al.*, 2006)

As velocidades instantâneas de crescimento (r_x), de formação de etanol ou produtividade (r_p) e de consumo de açúcar (r_s) foram determinadas através do cálculo da derivada das curvas de tempo de formação de biomassa (X), de produção de etanol (P) e de consumo de açúcar (S). O cálculo de derivada foi realizado pelo programa Microcal Oringin 6.0.

VELOCIDADES INSTANTÂNEAS MÁXIMAS DE CRESCIMENTO E DE CONSUMO DE SACAROSE E FORMAÇÃO DE ETANOL

As velocidades instantâneas máximas de crescimento ($r_{X(máx)}$), de consumo de açúcar ($r_{S(máx)}$) e a produtividade máxima ($r_{P(máx)}$) foram obtidas pelo valores máximos calculados para as velocidades instantâneas de crescimento (r_X), de formação de etanol (r_P) e de consumo de açúcar (r_S), conforme descrito no item anterior. Estes valores das velocidades instantâneas máximas foram independentes do tempo de fermentação.

VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE FORMAÇÃO DE BIOMASSA E PRODUTO E DE CONSUMO DE SUBSTRATO

As velocidades específicas de crescimento (μ_X), de produção de etanol (μ_P) e de consumo de açúcar (μ_S) foram calculadas de hora em hora através das fórmulas abaixo:

Velocidade específica de crescimento (μ_X) no tempo t

$$\mu_{X(t)} = \frac{r_{X(t)}}{X_{(t)}}$$

Onde $r_{X(t)}$ é a velocidade instantânea de crescimento no tempo t e $X_{(t)}$ é a quantidade de biomassa no tempo t.

Velocidade específica de formação de etanol (μ_P) no tempo t

$$\mu_{P(t)} = \frac{r_{P(t)}}{X_{(t)}}$$

Onde $r_{P(t)}$ é a velocidade instantânea de formação de produto no tempo t e $X_{(t)}$ é a quantidade de biomassa no tempo t .

Velocidade específica de consumo de sacarose (μ_S) no tempo t

$$\mu_{S(t)} = \frac{r_{S(t)}}{X_{(t)}}$$

Onde $r_{S(t)}$ é a velocidade consumo de açúcar no tempo t e $X_{(t)}$ é a quantidade de biomassa no tempo t .

FATOR DE CONVERSÃO DO SUBSTRATO EM PRODUTO ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi calculado da seguinte forma:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_f - S_0}$$

Onde P_f é a concentração de etanol final da curva de tempo (quando não se tem açúcar), P_0 é a concentração inicial de etanol, S_f é a concentração de açúcar final da curva de tempo (quando não se tem açúcar) e S_0 é a concentração inicial de açúcar.

PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE ETANOL E CONSUMO ESPECÍFICO DE AÇÚCAR

Produção de etanol em relação à biomassa (P_X)

A produção de etanol em relação à biomassa (P_X) foi calculada da seguinte forma:

$$P_{x(t)} = \frac{P_{(t)}}{X_{(t)}}$$

Onde P_t é a concentração de etanol no tempo t e $X_{(t)}$ é a quantidade de biomassa no tempo t .

Consumo de açúcar em relação a biomassa (S_x)

O consumo de açúcar em relação à biomassa (S_x) foi calculado da seguinte forma:

$$S_{x(t)} = \frac{S_{(t)}}{X_{(t)}}$$

Onde S_t é a concentração de açúcar no tempo t e $X_{(t)}$ é a a quantidade de biomassa no tempo t .

3.13 USO DE TESTES DA ESTATÍSTICA INFERENCIAL PARA COMPARAÇÃO DE RESULTADOS (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

COMPARAÇÕES ENTRE PROPORÇÕES: TESTE DO QUI-QUADRADO (χ^2) DE ADERÊNCIA OU AJUSTAMENTO

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi realizado para a comparação entre as medidas de viabilidade. Este teste foi realizado no programa Excel através do comando "TESTE.QUI(intervalo_controle;intervalo_obtido)". O nível de significância admitido para este teste foi de 5% ($\alpha=0,05$). O programa Excel forneceu o valor da probabilidade p do teste χ^2 . A interpretação do teste do qui-quadrado foi feita da seguinte maneira: -se o valor de p for maior que o nível de significância ($p>0,050$), aceita-se a hipótese nula de que as médias comparadas são iguais; -se o valor de p for menor que o nível de significância ($p<0,050$), rejeita-se a hipótese nula de que as médias comparadas são iguais.

TESTE *F* PARA COMPARAÇÕES ENTRE VARIÂNCIAS (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

O teste *F* foi realizado para a comparação entre as variâncias das médias dos valores obtidos nos experimentos. Este teste foi realizado no programa Excel através da Ferramenta de Análise “Teste-F: duas amostras para variâncias”. Os intervalos de dados do experimento-controle e o do experimento obtido foram inseridos na caixa de diálogo do teste *F*. Além disto, o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) também foi inserido na mesma caixa de diálogo. O programa Excel forneceu o valor da probabilidade *p* do teste *F*.

A interpretação do teste do qui-quadrado foi feita da seguinte maneira: -se o valor de *p* for maior que o nível de significância ($p>0,050$), se aceita a hipótese nula de que as variâncias das médias comparadas são iguais; -se o valor de *p* for menor que o nível de significância ($p<0,050$), rejeita-se a hipótese nula de que as variâncias das médias comparadas são iguais.

TESTE *T* QUE COMPARA DUAS MÉDIAS (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

O teste *t* foi realizado para a comparação entre as médias dos valores obtidos nos experimentos. Antes de se aplicar o teste *t*, algumas observações foram verificadas. Para que o resultado de um teste *t* para amostras independentes seja válido, as amostras têm que ser aleatórias e tem que ter distribuição normal ou aproximadamente normal. Outra observação importante foi que verificou-se a homogeneidade das variâncias das amostras antes de se realizar o teste *t* para amostras independentes, usando o teste *F*.

Inicialmente, o teste *F* foi realizado para verificar a igualdade entre as variâncias das médias a serem comparadas, conforme descrito no item anterior. Em seguida, o teste *t* foi realizado no programa Excel através da Ferramenta de Análise “Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes” quando as variâncias das médias eram iguais e “Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes” quando as variâncias das médias eram diferentes. Os intervalos de dados do experimento-controle e o do experimento obtido foram inseridos na caixa de diálogo do teste *t*. Além disto, a hipótese nula (H_0) e o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$)

também foram inseridos na mesma caixa de diálogo. O programa Excel forneceu o valor da probabilidade p para teste t .

A interpretação do teste do t foi feita da seguinte maneira: -se o valor de p for maior que o nível de significância ($p > 0,050$), se aceita a hipótese nula de que médias comparadas são iguais; -se o valor de p for menor que o nível de significância ($p < 0,050$), rejeita-se a hipótese nula de que as das médias comparadas são iguais.

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - ANOVA (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

A análise de variância foi uma técnica utilizada para comparar todas as médias de um experimento em um único teste e visa identificar ao menos uma diferença entre as medidas, se ela existir. Para realizar esta análise, alguns testes foram realizados previamente, como o teste de normalidade das variáveis e o teste F para verificar a igualdade entre as variâncias.

A análise de variância foi realizada no programa Excel através da Ferramenta de Análise “ANOVA: fator único”. As médias de cada variável (por ex.: biomassa, etanol, produtividade, entre outras) estudada em diversas condições diferentes (por ex.: presença de concentrações diferente de ácido láctico) foram comparadas nos tipos de processos estudados (por ex.: batelada simples, batelada com alimentação contínua ou batelada alimentada por pulsos). O nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) também foi inserido na mesma caixa de diálogo. O programa Excel forneceu o valor da probabilidade p para ANOVA.

A interpretação da ANOVA foi feita da seguinte maneira: -se o valor de p for maior que o nível de significância ($p > 0,050$), se aceita a hipótese nula de que as médias das variáveis dos processos são iguais; -se o valor de p for menor que o nível de significância ($p < 0,050$), rejeita-se a hipótese nula que as médias das variáveis dos processos são iguais.

3.14 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

Os experimentos de otimização do processo de produção de etanol foram realizados em duas etapas, a saber: a) um primeiro planejamento fatorial com o objetivo de fazer investigações preliminares sobre as condições ótimas da fermentação; b) um segundo planejamento fatorial para encontrar as condições ótimas da fermentação.

PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL

O primeiro delineamento experimental, utilizado no presente trabalho, foi o planejamento fatorial 2^3 completo com ponto central no qual foi gerado pelo programa MINITAB Realese 14.0 (Minitab Inc., Pennsylvania, USA). Neste tipo de planejamento, pode-se conhecer os efeitos das três variáveis independentes (concentração de ácido láctico, quantidade de inóculo e concentração de sacarose descritas na **Tabela 5**) frente às respostas desejadas (produção de etanol e viabilidade). As variáveis independentes foram estudadas em dois níveis diferentes (+1 e -1), além do nível zero que corresponde ao ponto central. Este primeiro planejamento fatorial gerou um total de 9 experimentos que foram repetidos 2 vezes em duplicata (total de 36 experimentos). O nível de significância admitido para a análise dos resultados do planejamento fatorial foi de 5% ($\alpha=0,05$) e os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

Tabela 5- Primeiro planejamento fatorial 2^3 completo com um ponto central usando três variáveis independentes frente à produção de etanol e à retenção de viabilidade da levedura híbrida 63M em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) após 4h de fermentação em batelada simples a 34 °C.

Variáveis independentes	Símbolos	Níveis e faixas (g.L ⁻¹)		
		-1	0	+1
Concentração de ácido láctico	A	0	0,5	1,0
Quantidade de inóculo	B	24	32	40
Concentração de sacarose	C	150	200	250

Os experimentos de fermentação foram realizados em batelada simples com porções de 100 mL meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contidas em frascos

Erlenmeyers de 250 mL. Estes frascos foram cultivados numa mesa agitadora operando numa rotação de 100 rpm a 34 °C durante 4 horas conforme descrito no item 3.4 de **Materiais e Métodos**.

SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL

O segundo planeamento fatorial foi realizado para refinar a otimização do processo de fermentação em presença de ácido láctico adicionado. Um planeamento 2^3 composto central completo foi utilizado no presente trabalho. Três variáveis independentes ou fatores (concentração de ácido láctico adicionado, quantidade de inóculo inicial e concentração de sacarose) e dois níveis (mínimo e máximo), conforme descrito na **Tabela 6**. Esta combinação de fatores e níveis gerou 14 experimentos resultantes tanto de pontos cúbicos quanto axiais. Estes 14 experimentos somados aos 6 experimentos do ponto central (sextuplicata) resultaram em um total de 20 experimentos. A **Figura 15** mostra um planeamento composto central para três fatores e dois níveis (2^3). As medidas do conjunto de 20 experimentos foram feitas em duplicata. A probabilidade de erro utilizada para a análise dos resultados do segundo planeamento fatorial foi de 5% ($\alpha=0,05$).

Tabela 6- Níveis dos pontos axiais e fatores codificados utilizados num planeamento 2^3 composto central completo da fermentação da levedura 63M por 4h a 34 °C.

Variáveis independentes	Faixas (g.L ⁻¹) e níveis		
	mínimo	ponto central	máximo
Concentração de ácido láctico (A)	0,0 (-1)	0,5 (0)	1,0 (+1)
Quantidade inicial de inóculo (B)	30 (-0,25)	35 (0,375)	40 (+1)
Concentração inicial de sacarose (C)	100 (-1)	150 (-0,5)	200 (0)

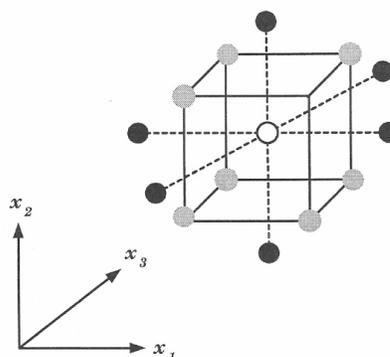


Figura 15- Planejamento composto central para três fatores (variáveis independentes). As bolas cinza correspondem à parte cúbica (ensaios de um fatorial 2^2) enquanto as bolas pretas representam a parte em forma de estrela.
Fonte: BARROS-NETO e SCARMINIO, 2003; p. 281.

ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A análise de variância (ANOVA) é um método utilizado para avaliar numericamente a qualidade do ajuste do modelo tanto para o etanol produzido quanto para a retenção da viabilidade da levedura 63M. O coeficiente de determinação (R^2) resultante do modelo indica o melhor ajuste do modelo às respostas estudadas e que este ajuste pode ser explicado pelas variáveis independentes e suas respostas (ZOLMAN, 1993). Análise por regressão também indica uma medida da origem e do grau de correlação entre as variáveis independentes e suas respostas. Um modelo bem ajustado (valores de R^2 acima de 0,9) explica a maioria das interações entre as variáveis independentes frente às respostas estudadas. O valor máximo de R^2 de 1,00 indica que o modelo ajustado tem uma excelente previsão da resposta estudada (HAALAND, 1989).

A análise de superfície de resposta foi utilizada para as respostas estudadas (etanol e viabilidade). A função de segunda ordem para as respostas estudadas frente às três variáveis independentes estudadas foi:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 X + \beta_3 S + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} X^2 + \beta_{33} S^2 + \beta_{12} AX + \beta_{13} AS + \beta_{23} XS + \dots + \epsilon \text{ (Eq. 1).}$$

Onde Y_i é resposta prevista, etanol produzido (Y_1 , g.L⁻¹) e viabilidade (Y_2 , %); A (ácido láctico), X (inóculo inicial) e S (sacarose inicial) são as variáveis independentes; b_0 é uma constante de regressão, β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares; β_{11} , β_{22} e β_{33} são coeficientes quadráticos; β_{12} , β_{13} e β_{23} são coeficientes de interação; e corresponde a erros aleatórios.

Gráficos de superfície de resposta e de contorno foram gerados pelo programa STATISTICA (6.0) da Statsoft Inc. (2325 East 13th street, Tulsa, OK, 74 104, USA). O nível de significância utilizado para o ajuste do modelo foi de 5% ($p = 0.05$).

VALIDAÇÃO DAS EQUAÇÕES DOS MODELOS

A validação do modelos do etanol e viabilidade da levedura 63M, obtidos pelo segundo planejamento de composto central, foi feita por fermentações em batelada simples com porções de 100 mL meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contidas em frascos Erlenmeyers de 250 mL. As condições de fermentação obtidas pela validação teórica (0,65 g.L⁻¹ de ácido láctico, 40 g.L⁻¹ de inóculo inicial e 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial foram previstas pelo programa MiniTab 14.0 e estão descritas na **Tabela 7**. A **Tabela 7** mostra as condições previstas para as variáveis independentes através da validação dos resultados calculada (teórica) utilizando o programa MiniTab 14.0, bem como as respostas previstas e suas desejabilidades parciais e globais. As fermentações foram cultivadas em triplicata sem o reajuste do pH inicial após a inoculação numa mesa agitadora operando numa rotação de 100 rpm a 34 °C durante 4 horas (veja item **3.4** de **Materiais e Métodos**).

Tabela 7- Condições das variáveis independentes e respostas previstas para a validação da levedura 63M em batelada simples em meio sintético a 34 °C utilizando o programa MiniTab 14.0.

Solução global	Respostas previstas
Ácido láctico= 0,65 g.L ⁻¹	Viabilidade= 80,4%, desejabilidade= 0,958
Inóculo= 40 g.L ⁻¹	Etanol= 80,0 g.L ⁻¹ ; desejabilidade= 0,933
Sacarose= 200 g.L ⁻¹	Desejabilidade composta=0,945

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL EM BATELADA SIMPLES CONTENDO ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO POR METODOLOGIAS ESTATÍSTICAS

4.1.1 PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL

O primeiro planejamento fatorial 2^3 completo com um ponto central foi procedido com o objetivo de se realizar uma investigação preliminar dos efeitos das variáveis independentes (ácido lático adicionado, inóculo inicial e concentração de sacarose inicial) sobre processo de produção de etanol pela levedura 63M após 4h de fermentação (**ver Tabelas 5 e 6 de Materiais e Métodos**). Neste experimento, o pH do meio de fermentação não foi reajustado após a adição do ácido lático. A **Tabela 8** mostra os resultados dos 36 experimentos resultantes do planejamento fatorial 2^3 completo com um ponto central. Estes experimentos foram realizados de maneira aleatória. Para fazer a avaliação dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas (etanol produzido e viabilidade da levedura 63M) foram realizados gráficos de Pareto.

EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL

A **Figura 16** mostra o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes sobre a produção de etanol pela levedura 63M em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998). Este gráfico mostra a relevância dos efeitos das variáveis independentes que afetaram a produção de etanol. A variável que mais afetou a produção de etanol foi a quantidade de inóculo inicial (5 vezes o limite mínimo de efeito). A segunda variável que mais afetou a produção de etanol foi o ácido lático (cerca de 4 vezes o limite mínimo de efeito). Além disto, tanto as interações entre o ácido lático, o inóculo e a sacarose quanto às interações entre o ácido lático e o inóculo também apresentaram efeitos sobre a produção de etanol (2 vezes o limite mínimo da interação).

Tabela 8- Matriz do primeiro planejamento fatorial 2^3 com um ponto central composto por 3 variáveis independentes para a produção de etanol e a viabilidade da levedura 63M em batelada simples após 4h de fermentação a 34 °C.

Experimentos (ordem padrão)	Variáveis independentes (g.L ⁻¹)			Respostas	
	A: Ácido láctico	B: Inóculo	C: Sacarose	Etanol (g.L ⁻¹)	Viabilidade (%)
1	0,0	24	150	65,8	72,4
2	0,0	24	150	68,3	82,7
3	0,0	24	150	66,2	74,3
4	0,0	24	150	65,7	83,6
5	1,0	24	150	54,7	51,0
6	1,0	24	150	55,3	58,9
7	1,0	24	150	50,7	62,3
8	1,0	24	150	49,3	61,0
9	0,0	40	150	72,1	86,6
10	0,0	40	150	70,9	84,8
11	0,0	40	150	74,1	84,3
12	0,0	40	150	77,7	85,8
13	1,0	40	150	71,8	52,2
14	1,0	40	150	76,5	61,2
15	1,0	40	150	76,5	70,8
16	1,0	40	150	75,0	67,1
17	0,0	24	250	70,1	82,2
18	0,0	24	250	67,0	85,2
19	0,0	24	250	61,3	87,5
20	0,0	24	250	61,7	72,6
21	1,0	24	250	59,4	81,0
22	1,0	24	250	64,5	85,1
23	1,0	24	250	47,2	27,6
24	1,0	24	250	45,5	36,4
25	0,0	40	250	93,2	95,9
26	0,0	40	250	83,8	92,6
27	0,0	40	250	86,2	92,0
28	0,0	40	250	88,4	94,3
29	1,0	40	250	67,2	48,4
30	1,0	40	250	68,8	56,8
31	1,0	40	250	62,3	40,9
32	1,0	40	250	65,2	35,7
33	0,5	32	200	67,6	71,3
34	0,5	32	200	67,7	66,7
35	0,5	32	200	66,7	68,6
36	0,5	32	200	67,0	71,9

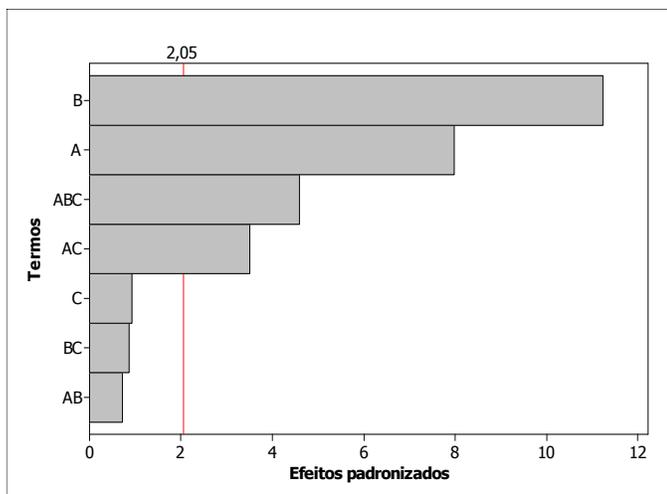


Figura 16- Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados dos fatores sobre a produção de etanol pela levedura 63M após 4h de fermentação em meio sintético. Os valores da produção de etanol foram obtidos de um planejamento fatorial 2^3 com ponto central e $\alpha=0,05$; **A**= ácido lático adicionado, **B**= quantidade inicial de inóculo e **C**= concentração inicial de sacarose.

O efeito da quantidade inicial do inóculo sobre a produção de etanol foi positivo, isto é, quanto maior o aumento da concentração inicial de inóculo, maior a produção de etanol. No entanto, a presença de ácido lático sozinho e suas interações com a quantidade de inóculo ou com a concentração de sacarose tiveram efeito negativo (reduziram) a produção de etanol (dados não mostrados, **ver Figura 46 do item 1 do Anexo A**).

EFEITOS SOBRE A RESPOSTA VIABILIDADE CELULAR

A **Figura 17** mostra o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes sobre a viabilidade celular da levedura 63M após 4h de fermentação em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998). Neste gráfico, observou-se que o único fator que afeta a viabilidade é o ácido lático (3 vezes o limite mínimo de efeito). O efeito do ácido lático foi negativo, isto é, a presença deste ácido causou perdas na viabilidade da levedura 63M no processo de produção de etanol (dados não mostrados, **ver Figura 47 do item 1 do Anexo A**).

4.1.2 SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL

PRODUÇÃO DE ETANOL

O segundo planejamento fatorial foi realizado para definir a região ótima das concentrações das variáveis independentes (ácido lático adicionado, sacarose inicial e inóculo inicial) para uma produção de etanol máxima com retenção de viabilidade da levedura 63M. As seguintes etapas foram realizadas:

- a) análise de variância dos resultados das respostas obtidas;
- b) geração das equações dos modelos das respostas gerados após um planejamento de composto central 2^3 ;
- c) análise de superfície de resposta mostrando as condições ótimas das respostas obtidas.

A **Tabela 9** mostra os resultados dos 20 experimentos resultantes do planejamento fatorial 2^3 composto central completo. Estes experimentos também foram realizados de maneira aleatória. Os resultados destes experimentos foram analisados pela metodologia de superfície de resposta (MSR).

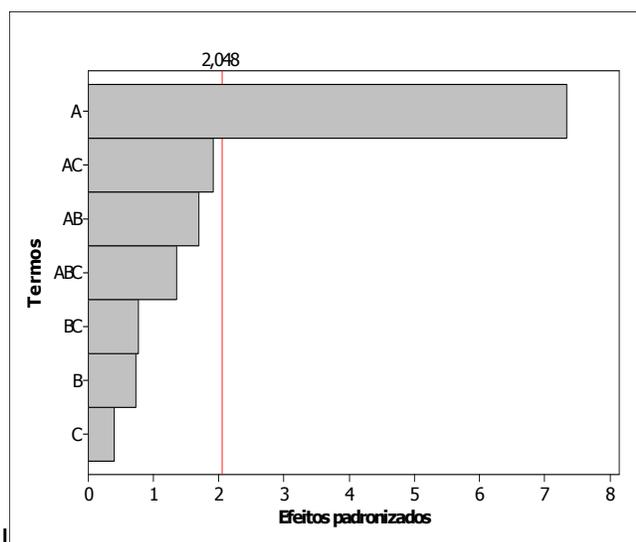


Figura 17- Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados dos fatores sobre a viabilidade da levedura 63M após 4h de fermentação em meio sintético. Os valores da viabilidade foram obtidos de um planejamento fatorial 2^3 com ponto central e $\alpha=0,05$; **A**= ácido lático adicionado, **B**= quantidade inicial de inóculo e **C**= concentração inicial de sacarose.

Tabela 9- Matriz do segundo planejamento fatorial 2^3 composto central constituído por 3 variáveis independentes para a produção de etanol e viabilidade da levedura 63M em batelada simples após 4h de fermentação a 34 °C.

Experimentos (ordem padrão)	Variáveis independentes (g.L ⁻¹)			Respostas	
	A: Ácido láctico	B: Inóculo	C: Sacarose	Etanol (g.L ⁻¹)	Viabilidade (%)
1	0,0	35	150	76,2	85,2
2	0,2	32	120	58,9	79,7
3	0,2	32	180	72,5	86,6
4	0,2	38	120	57,2	85,2
5	0,2	38	180	83,9	89,1
6	0,5	30	150	71,6	79,4
7	0,5	35	100	45,0	73,4
8	0,5	35	150	78,0	70,3
9	0,5	35	150	75,9	69,3
10	0,5	35	150	75,6	68,6
11	0,5	35	150	75,5	69,9
12	0,5	35	150	77,1	75,9
13	0,5	35	150	76,9	75,2
14	0,5	35	200	72,3	76,3
15	0,5	40	150	72,3	79,0
16	0,8	32	120	59,8	89,2
17	0,8	32	180	60,5	63,0
18	0,8	38	120	60,4	67,6
19	0,8	38	180	79,5	67,3
20	1,0	35	150	72,3	65,6

Análise de variância para a produção de etanol

A análise de variância (ANOVA) para o etanol produzido está descrita na **Tabela 10**. Este tipo de análise fornece diversos valores que indicam um melhor ajuste do modelo matemático obtido para a produção de etanol. O teste F foi um teste de hipóteses realizado para verificar a variabilidade da regressão (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Para cada valor de F foi calculado um valor absoluto correspondente (p -valor) que permitiu comparar os dados da análise de variância. A **Tabela 10** mostra a análise de variância para a produção de etanol de uma maneira simplificada enquanto que a **Tabela 23 (Anexo A**, tabela numeradas em sequência a última tabela do texto) é uma versão completa. O p -valor para a regressão relativa a produção de etanol foi significativa ($p < 0,050$). Além disto, o modelo de produção de etanol foi melhor representado por uma regressão quadrática ($p > 0,050$). Porém, a falta de ajuste (**Tabela 10**) do modelo de produção de etanol foi significativa ($p < 0,050$), mas estes resultados indicam que as variáveis

independentes estudadas (ácido láctico adicionado, quantidade de inóculo inicial e concentração de sacarose inicial) podem satisfatoriamente explicar a produção de etanol pela linhagem 63M através de um modelo de equação matemática.

Tabela 10- Análise de variância do modelo para a produção de etanol pela levedura 63M em meio sintético após 4h a 34 °C.

Fonte	p- valor
Regressão	0,000
Linear	0,095
Quadrática	0,000
Interação	0,001
Falta de ajuste	0,012

p-valor= valor absoluto do teste F (Fisher).

Geração da equação do modelo para o etanol produzido

Após verificar a variabilidade do modelo, os coeficientes da equação do modelo do etanol foram calculados e estão descritos de forma simplificada na **Tabela 11**. O teste *T* foi aplicado para indicar a significância dos coeficientes do modelo (BURKERT *et al.*, 2004) e o *p*-valor expressou a probabilidade calculada em relação ao valor do teste *T*. A tabela completa dos coeficientes do etanol está descrita na **Tabela 24 (Anexo A)**. Como mostrado na **Tabela 11**, o coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de produção de etanol foi de 0,970. Este valor indica que 97,0% da variação observada para a produção de etanol foi atribuída às variáveis independentes estudadas (ácido láctico adicionado, sacarose inicial e inóculo inicial). A **Tabela 11** também mostra que tanto o termo quadrático da sacarose (C^2) quanto o termo quadrático do inóculo (B^2) foram significantes para o modelo da produção de etanol ($p < 0,050$ para ambos). Apenas o coeficiente linear da sacarose (*C*) foi significativo ($p < 0,050$) para o modelo da produção de etanol. A interação da sacarose com o ácido láctico (*AC*) e a interação da sacarose e o inóculo (*BC*) também foram significativas ($p < 0,050$). Por outro lado, tanto o coeficiente linear quanto o quadrático do ácido láctico (*A* e A^2) não foram significativos ($p > 0,050$) para o modelo (**Eq. 2**). Além disto, tanto a interação entre o ácido láctico e o inóculo quanto os termos lineares do ácido láctico (*A*) e do inóculo (*B*) também não foram

significativos ($p > 0,050$). Por isto, os coeficientes A, B, A^2 e AB foram omitidos da **Equação 2**.

Tabela 11- Coeficientes de regressão estimados para a produção de etanol pela levedura 63M em meio sintético após 4h a 34 °C.

Termos	Símbolos	Coefficientes	p- valor
Constante	-	-173,808	0,114
Ácido láctico	A	1,703	0,963
Inóculo	B	7,962	0,142
Sacarose	C	1,057	0,020
Ácido láctico * Ácido láctico	A^2	-11,708	0,119
Inóculo * Inóculo	B^2	-0,207	0,013
Sacarose * Sacarose	C^2	-0,007	0,000
Ácido láctico * Inóculo	AB	1,375	0,164
Ácido láctico * Sacarose	AC	-0,285	0,011
Inóculo * Sacarose	BC	0,044	0,001

p = probabilidade do teste T. $R^2=97,0\%$; $R^2(\text{ajustado})=94,3\%$.

A seguinte equação (**Eq. 2**) representa o modelo ajustado para a produção de etanol.

$$Y_1 (\text{etanol, g.L}^{-1}) = -173,81 + 1,06C - 0,21B^2 - 0,01C^2 - 0,29 AC + 0,04 BC \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde A é a concentração de ácido láctico adicionada, B é a quantidade inicial de inóculo e C é a concentração inicial de sacarose.

Análise de superfície de resposta para o etanol

Os gráficos de superfície de resposta e de contorno do modelo ajustado para a produção de etanol confirmaram os resultados obtidos pela análise de variância e pelos coeficientes de regressão. A parte **A** da **Figura 18** mostra os efeitos da concentração inicial de sacarose e da quantidade inicial de inóculo sobre o etanol produzido pela levedura 63M em meio sintético quando a concentração de ácido láctico adicionado foi fixa em $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Neste gráfico (**Figura 18**), pode-se observar os efeitos da regressão quadrática obtida para a variável sacarose e linear obtida para a quantidade do inóculo inicial sobre a produção de etanol. A concentração de etanol produzida foi maior quando as fermentações foram iniciadas com

quantidades máximas tanto de inóculo (35 a 40 g.L^{-1}) quanto de sacarose (160 a 200 g.L^{-1}).

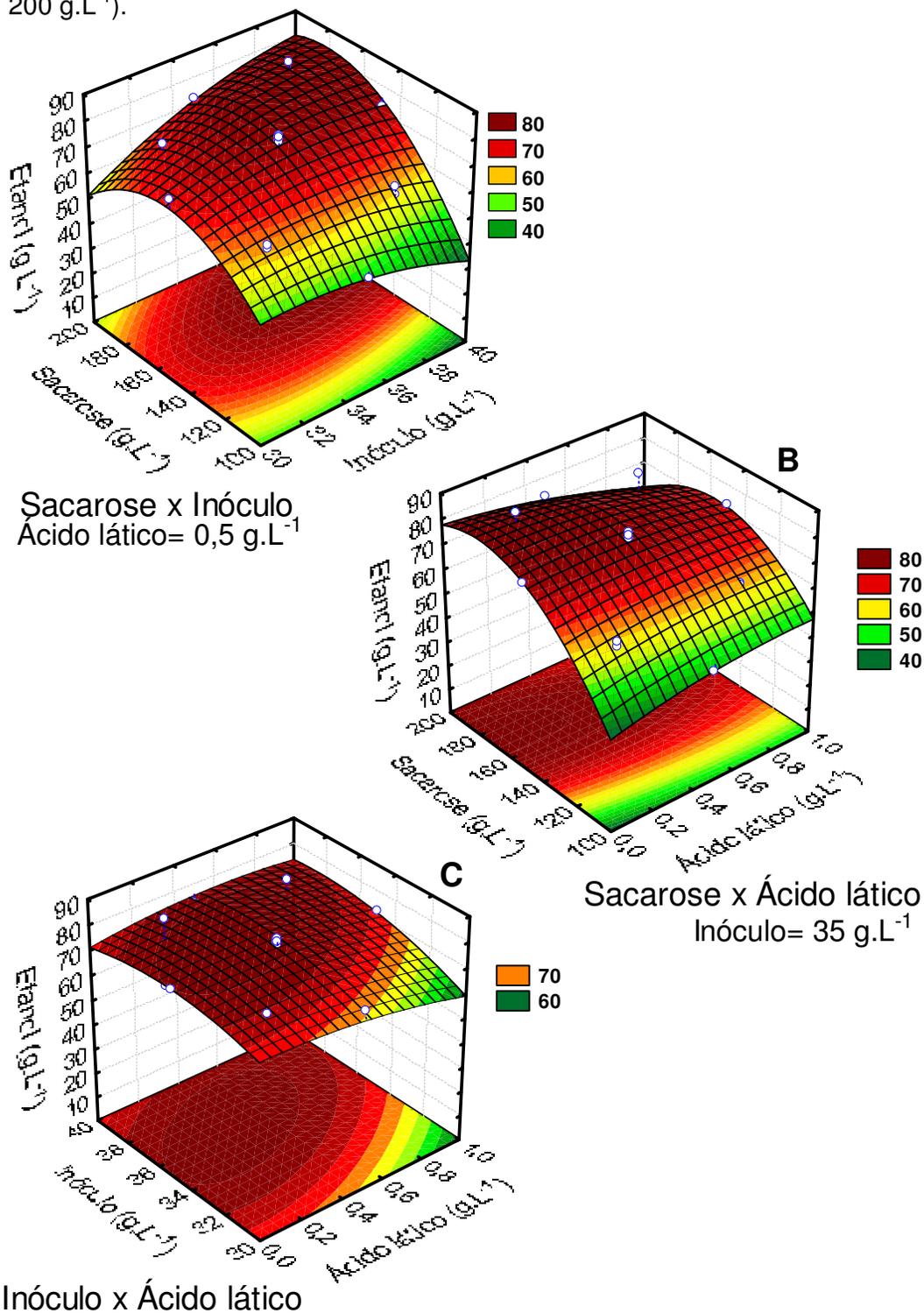


Figura 18- Gráficos de superfície de resposta para a produção de etanol. **A:** sacarose x inóculo com ácido láctico fixo em $0,5$ g.L^{-1} ; **B:** sacarose x ácido láctico com inóculo fixo em 35 g.L^{-1} e **C:** inóculo x ácido láctico com sacarose fixa em 150 g.L^{-1} .

A parte **B** da **Figura 18** mostra os efeitos da concentração inicial de sacarose e do ácido láctico adicionado sobre o etanol produzido pela levedura 63M em meio sintético quando a quantidade de inóculo inicial foi mantida fixa em 35 g.L^{-1} . Neste gráfico, a sacarose também apresentou um efeito de regressão quadrática sobre a produção de etanol, enquanto que o do ácido láctico apresentou um efeito de regressão linear. Diante disto, verifica-se que o etanol produzido foi maior em fermentações que foram iniciadas com concentrações mínimas de ácido láctico e (0,0 a $0,8 \text{ g.L}^{-1}$) e máximas de sacarose (faixa de 140 a 200 g.L^{-1}).

A parte **C** da **Figura 18** mostra os efeitos da quantidade inicial de inóculo e da concentração ácido láctico adicionado sobre a produção de etanol pela levedura 63M em meio sintético quando a concentração de sacarose foi mantida fixa em 150 g.L^{-1} . Neste gráfico, a quantidade de inóculo apresentou um efeito de regressão quadrática sobre a produção de etanol, enquanto que o do ácido láctico exerce um efeito de regressão linear. Diante disto, verificou-se que o etanol produzido foi máximo em fermentações iniciadas com quantidades altas de inóculo (faixa de 34 a 40 g.L^{-1}) e com concentrações mínimas de ácido láctico e (de 0,0 a $0,8 \text{ g.L}^{-1}$).

VIABILIDADE

Análise de variância do modelo

A **Tabela 12** está descrevendo os coeficientes da viabilidade de uma maneira simplificada enquanto que a **Tabela 24 (Anexo A)** mostra os dados completos gerados.

A análise de regressão para a viabilidade foi significativa ($p < 0,050$). Além disto, o modelo da viabilidade foi melhor representado por uma regressão linear ($p > 0,050$). Por fim, a falta de ajuste (**Tabela 12**) do modelo de produção de etanol foi significativa ($p < 0,050$). Assim, estes resultados indicam que as variáveis independentes estudadas (ácido láctico adicionado, quantidade de inóculo inicial e concentração de sacarose inicial) podem satisfatoriamente explicar o modelo da relativa viabilidade da linhagem 63M através de um modelo de equação matemática (**Eq. 3**).

Tabela 12- Análise de variância para o modelo de viabilidade da levedura 63M fermentada em meio sintético por 4h a 34 °C.

Fonte	p- valor
Regressão	0,005
Linear	0,016
Quadrática	0,075
Interação	0,018
Falta de ajuste	0,135

p-valor= valor absoluto do teste F (Fisher).

Geração da equação do modelo para a viabilidade celular

O ajuste do modelo para a viabilidade celular da levedura 63M foi diferente do ajuste do modelo para o etanol. Como mostra a **Tabela 13**, o coeficiente de determinação (R^2) para o modelo da viabilidade foi de 0,845. Este valor indica que 84,5% da variação em viabilidade foi atribuída às variáveis independentes estudadas (ácido láctico adicionado, sacarose inicial e inóculo inicial). Os coeficientes da equação do modelo para viabilidade foram calculados e apresentados de forma simplificada como descrito na **Tabela 13**. O teste T foi aplicado para indicar a significância dos coeficientes do modelo (BURKERT *et al.*, 2004) e o p-valor expressa a probabilidade calculada em relação ao valor do teste T . A **Tabela 26 (Anexo A)** está descrita de forma completa contendo os valores do teste T .

A **Tabela 13** mostra os coeficientes da equação da viabilidade sendo linear o coeficiente do ácido láctico adicionado (A) e quadrático o coeficiente do inóculo (B) os quais foram significantes para a equação modelo da viabilidade ($p < 0,050$ em ambos os casos). Entre os coeficientes quadráticos da equação modelo, apenas o coeficiente quadrático B^2 , relativo à quantidade de inóculo, foi significativo ($p < 0,050$). A interação da sacarose com o ácido láctico (AC) foi significativa ($p < 0,050$). Por outro lado, o coeficiente linear da sacarose (C) não foi significativo ($p > 0,050$) e tanto o coeficiente quadrático do ácido láctico (A^2) quanto o da sacarose (C^2) não foram significativos ($p > 0,050$) para o modelo. A interação do inóculo com o ácido láctico (AB) e do inóculo com a sacarose (BC) também não foram significativas ($p > 0,050$). Por estes motivos, os coeficientes C, A^2 , C^2 , AB e BC não estão presentes na **Equação 3**, descrita abaixo:

$$Y_2 \text{ (viabilidade, \%)} = 620,37 + 160,02A - 27,05B + 0,34B^2 - 0,52 AC \text{ (Eq. 3)},$$

Onde A é a concentração de ácido láctico adicionado, B é a quantidade inicial de inóculo e C é a concentração inicial de sacarose.

Tabela 13- Coeficientes de regressão estimados para viabilidade da levedura 63M fermentada em meio sintético por 4h a 34 °C.

Termos	Símbolos	Coefficientes	p- valor
Constante	-	620,373	0,009
Ácido láctico	A	160,028	0,039
Inóculo	B	-27,046	0,017
Sacarose	C	-1,387	0,086
Ácido láctico * ácido láctico	A ²	19,481	0,166
Inóculo * Inóculo	B ²	0,340	0,025
Sacarose * sacarose	C ²	0,002	0,221
Ácido láctico* Inóculo	AB	-3,514	0,071
Ácido láctico * Sacarose	AC	-0,518	0,014
Inóculo * Sacarose	BC	0,032	0,097

p-valor= probabilidade do teste T. R²=84,5%; R²(ajustado)=70,5%.

Análise de superfície de resposta para a viabilidade

Os gráficos de superfície de resposta e de contorno do modelo ajustado para viabilidade confirmaram os resultados obtidos pela análise de variância (**Tabela 12**) e pelos coeficientes de regressão (**Tabela 13**). A parte **A** da **Figura 19** mostra a viabilidade da levedura 63M em meio sintético em função da concentração inicial de sacarose e quantidade inicial de inóculo. Neste caso, a concentração de ácido láctico adicionado foi fixa em 0,5 g.L⁻¹. Neste gráfico, o efeito de regressão linear do inóculo inicial ao modelo da viabilidade foi confirmado. Por isto, tanto o efeito da sacarose quanto do ácido láctico sobre o modelo da viabilidade foram mínimos.

A parte **B** da **Figura 19** mostra a viabilidade da levedura 63M em meio sintético em função da concentração inicial de sacarose e quantidade inicial de inóculo. Neste caso, a quantidade de inóculo inicial foi mantida fixa em 35 g.L⁻¹. Neste gráfico, o efeito de regressão linear do ácido láctico sobre a viabilidade também foi confirmado. Sendo assim, verificou-se que a viabilidade foi maior em fermentações contendo concentrações baixas de ácido láctico (próximas a 0,0 g.L⁻¹) enquanto a viabilidade sofreu pouco efeito da concentração inicial da sacarose.

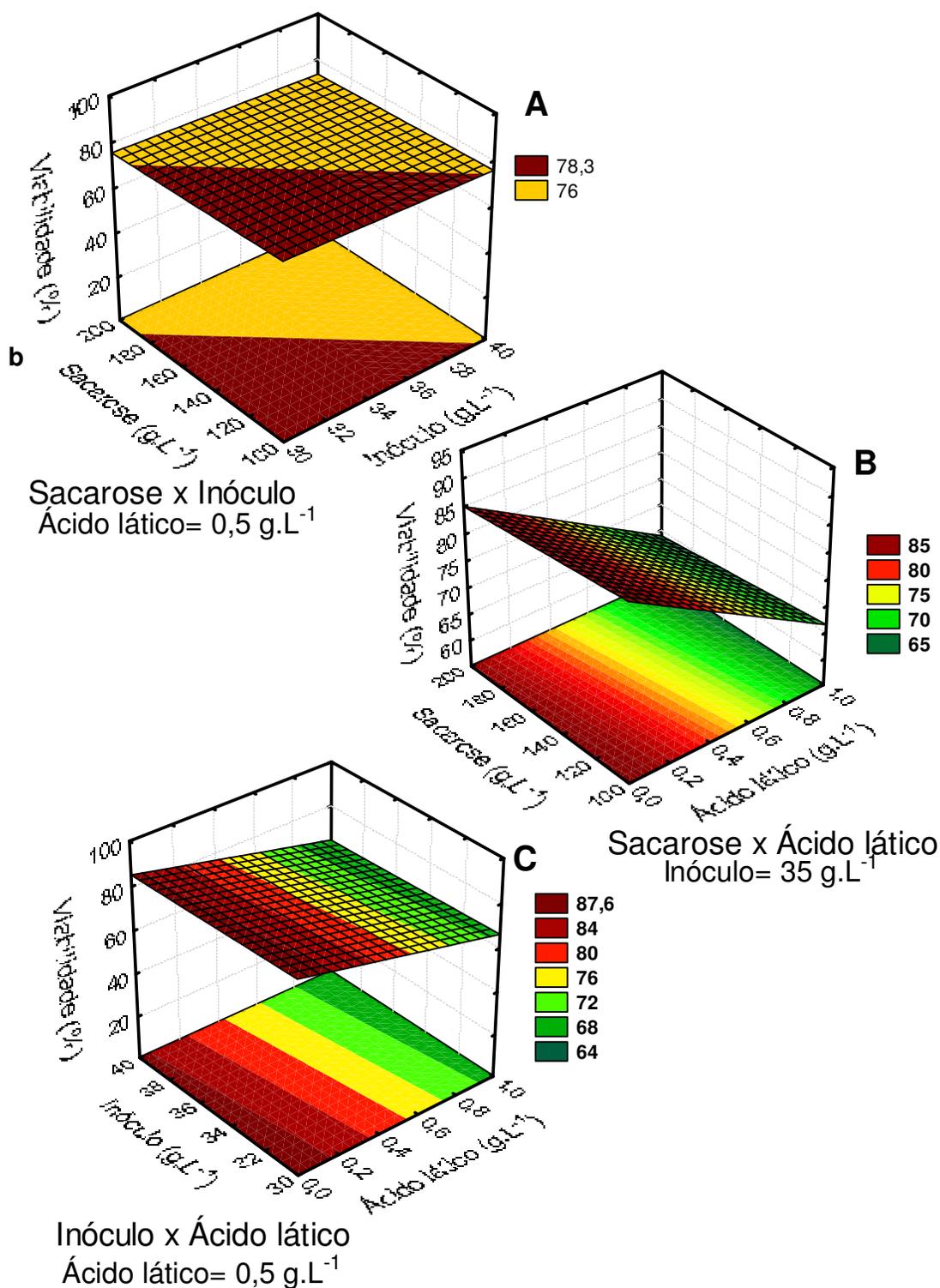


Figura 19- Gráficos de superfície de resposta para a viabilidade. **A:** sacarose x inóculo com ácido láctico fixo em $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; **B:** sacarose x ácido láctico com inóculo fixo em 35 g.L^{-1} e **C:** inóculo x ácido láctico com sacarose fixa em 150 g.L^{-1} .

A parte **C** da **Figura 19** mostra a viabilidade da levedura 63M em meio sintético em função da concentração inicial de sacarose e quantidade inicial de inóculo em concentração de sacarose fixa em 150 g.L^{-1} . Neste gráfico, tanto a quantidade inicial de inóculo quanto o ácido láctico adicionado exerceram efeitos de regressão de natureza linear sobre o modelo da viabilidade. Diante disto, verificou-se que viabilidade foi maior em fermentações contendo concentrações mínimas de ácido láctico e (próximas a $0,0 \text{ g.L}^{-1}$). Além disto, o efeito da quantidade de inóculo inicial sobre a retenção de viabilidade também foi mínimo.

A análise de variância, de superfície de resposta e o teste *T* sobre os coeficientes foram ferramentas importantes para descrever em forma de equação os efeitos das variáveis independentes (ácido láctico, quantidade de inóculo e concentração de sacarose) nos modelos da produção de etanol (**Eq. 2**) e viabilidade. O modelo de produção de etanol mostrou um ajuste ótimo através de uma regressão quadrática. As variáveis independentes que mais contribuíram para este tipo de regressão foram a quantidade de inicial de inóculo e a concentração inicial de sacarose. Por outro lado, o modelo para a viabilidade celular mostrou um bom ajuste através de uma regressão linear e as variáveis que mais contribuíram para isto foram a quantidade inicial de inóculo e o ácido láctico adicionado.

4.1.3 VALIDAÇÃO

A validação experimental dos tratamentos estatísticos obtidos para a levedura 63M foi realizada em batelada simples, em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) e nas condições obtidas com a validação teórica ($0,65 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico, 40 g.L^{-1} de inóculo e 200 g.L^{-1} de sacarose inicial descrita na **Tabela 7** em **Materiais e Métodos**. As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers sem o reajuste do pH inicial para 4,5 após a inoculação e a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. A **parte A** da **Figura 20** mostra que a produção de etanol após 4h de fermentação foi de $72,1 \text{ g.L}^{-1}$ (previsto de $80,0 \text{ g.L}^{-1}$) e 90 g.L^{-1} após 6h a **parte B** da **Figura 20** mostra que a viabilidade após 4h de fermentação foi de 86,4% (previsto de 80,4%) e 75% após 6h.

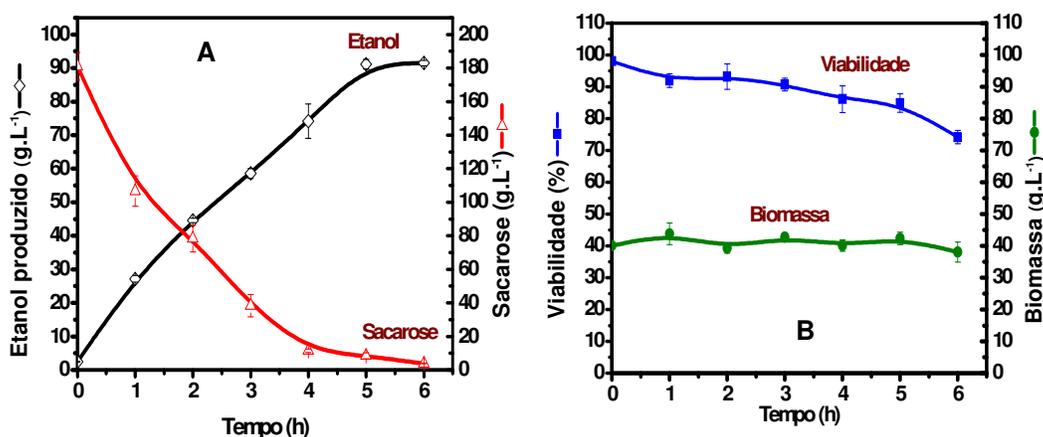


Figura 20- Curvas de tempo dos parâmetros de fermentação em batelada simples da levedura 63M em função do tempo em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) nas condições previstas pela a validação teórica: 0,65 g.L⁻¹ de ácido láctico, 40 g.L⁻¹ de inóculo e 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial. As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers sem o reajuste do pH inicial (após a inoculação) e a 34 °C.

4.1.4 DISCUSSÃO

A validação do planejamento de superfície de resposta confirmou que as melhores condições para a produção de etanol na presença de ácido láctico foram as seguintes: 0,65 g.L⁻¹ de ácido láctico, 40 g.L⁻¹ de inóculo e 200 g.L⁻¹ sacarose. Nestas condições, a viabilidade final foi de 86,4% e a produção de etanol foi de 72,1 g.L⁻¹ após 4h de fermentação. Assim, a presença de 0,65 g.L⁻¹ de ácido láctico causou em certo efeito negativo sobre a viabilidade, apesar de sua concentração ser baixa, certamente devido ao valor muito baixo do pH do meio. Estas condições ótimas não serão as mesmas em um outro processo, mas as interações entre as variáveis independentes deverão ser da mesma natureza, ou seja, os efeitos sinérgicos sobre a produção de etanol da interação entre sacarose e tamanho do inóculo em presença de ácido láctico devem ser mantidos pelo menos em grau qualitativo.

A literatura descreve poucos trabalhos sobre a metodologia de superfície de resposta para otimizar o processo de produção de etanol por leveduras. A maioria destes artigos utiliza como resposta o etanol produzido e/ou produtividade como resposta. O presente projeto descreve a otimização da produção de etanol a 34 °C com retenção da viabilidade pela linhagem 63M da levedura *S. cerevisiae* ajustando-

se a concentração de sacarose, o tamanho do inóculo e a concentração do ácido láctico adicionado ao meio definido e sem reajuste do pH do meio após inoculação.

4.2 FERMENTAÇÕES A 34 °C EM MINI-RETORES CONTENDO CONCENTRAÇÕES BAIXAS (MENORES OU IGUAIS A 1,0 g.L⁻¹) DE ÁCIDO LÁCTICO ADICIONADO

4.2.1 FERMENTAÇÕES DE SACAROSE EM BATELADA SIMPLES

Como as fermentações em Erlenmeyers não permitiram o acompanhamento das variações em valores de pH, as fermentações em batelada simples foram realizadas em um novo sistema de mini-reatores acoplados a medidores de pH. Os experimentos em mini-reatores permitiram realizar medidas de pH durante toda a fermentação e foram indispensáveis para o estudo dos efeitos da acidez láctica. As condições otimizadas para a produção de etanol obtidas nos estudos estatísticos realizados em Erlenmeyers foram reavaliadas em mini-reatores.

EXPERIMENTOS REALIZADOS SEM AJUSTE DE pH INICIAL

Justificativa

Estes experimentos foram realizados para comparar os dados da batelada simples otimizados em Erlenmeyers com os dados obtidos em mini-reatores simulando condições semelhantes. A agitação e a manutenção da temperatura, certamente, não foram as mesmas, pois os mini-reatores possuíam agitação magnética e permaneceram em banho-de-água termoestabilizado. Além disto, este sistema de fermentação permitiu o acompanhamento em variações de pH do meio durante a fermentação e a obtenção de medidas para cálculos cinéticos.

Descrição

Nos experimentos descritos abaixo na **Tabela 14**, ácido láctico foi adicionado na faixa de 0,2 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹ no início das fermentações contendo 20% (p.v⁻¹) de

sacarose e o pH inicial não foi reajustado após a inoculação com a levedura 63M a 34 °C (item 3.6 de **Materiais e Métodos**). As variações nos parâmetros cinéticos de fermentação foram acompanhadas em função do tempo (período de até 6h) em processo de batelada simples estão descritas na **Figura 21** e **Tabela 14**:

Efeito do ácido láctico sobre os parâmetros cinéticos de fermentação

O tempo da fermentação em batelada simples sem o reajuste do pH inicial foi mais curto tanto no experimento-controle e na fermentação contendo 0,2 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado (5h) quanto nas fermentações contendo ácido láctico adicionado na faixa de 0,5 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹ (6h) como mostrado na **Tabela 14** e **Figura 51 (parte A, Anexo B)**.

Os valores do pH inicial foram da ordem de 2,29 a 2,68 e as suas variações durante a fermentação foram pequenas como mostrado na **Tabela 14** e **Figura 48 (parte B, Anexo B)**.

A viabilidade da levedura 63M (diminuiu significativamente no final das fermentações contendo de 0,5 g.L⁻¹, 0,8 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado ($p < 0,050$ nos três casos) como mostrado na **Tabela 14** e **Figura 48 (parte A, Anexo B)**.

A biomassa final (X_f) foi menor nas fermentações contendo 0,2 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado ($p < 0,050$ nos três casos) como mostrado na **Tabela 14** e **Figura 50 (parte A, Anexo B)**. Um acúmulo significativo de biomassa foi observado apenas na fermentação contendo 0,8 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado ($p = 0,002 < 0,050$).

O etanol final produzido (P) pela levedura 63M foi mais alto na fermentação contendo 0,2 g.L⁻¹ de ácido láctico quando comparada com o etanol produzido na fermentação-controle ($p < 0,050$) como descrito na **Tabela 14** e na **Figura 49 (parte A, Anexo B)**.

A produção máxima de etanol ($P_{x(max)}$) em relação a biomassa das fermentações contendo 0,2 g.L⁻¹ e 0,5 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foram maiores que a mesma produção do experimento-controle ($p < 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 14**, **Figura 21 (parte A)** e **Figura 52 (parte A, Anexo B)**. No entanto, o consumo de sacarose em relação à biomassa ($S_{x(max)}$) foi maior nas

fermentações contendo 0,5 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹ de ácido lático do que o mesmo consumo obtido no experimento-controle (p<0,050) como descrito na **Tabela 14**, **Figura 49 (parte A, Anexo B)** e **Figura 52 (parte D, Anexo B)**.

Tabela 14- Efeito do ácido lático adicionado (0,2 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹) sobre os parâmetros cinéticos das fermentações com a levedura 63M em batelada simples sem o reajuste de pH inicial a 34 °C.

Parâmetros cinéticos ^{1,2}	Concentração de ácido lático ³ (g.L ⁻¹)				
	0,0	0,2	0,5	0,8	1,0
Tempo_{final} (h)	5	5	6	6	6
pH_{inicial}	2,68	2,64	2,64	2,53	2,29
pH_{final}	3,29	3,33	3,23	3,16	2,90
Viabilidade_{inicial} (%) p (Teste χ^2)	<u>97,5±0,3</u> -	<u>97,8±1,0</u> (0,067)	<u>97,8±1,6</u> (0,887)	<u>99,3±1,1</u> (0,800)	<u>94,5±0,8</u> (0,652)
Viabilidade_{final} (%) p (Teste χ^2)	<u>92,7±0,2</u> -	<u>87,1±1,3</u> (0,386)	77,9±2,3 (0,016)	67,5±2,1 (0,000)	59,6±2,0 (0,000)
Biomassa_{final} (X_f, g.L⁻¹) p (Teste t)	44,2±1,9^a -	36,7±1,3 ^b (0,025)	35,6±0,6 ^b (0,014)	41,8±0,3^a (0,119)	39,5±0,8 ^b (0,046)
[Etanol]_{final} (P, g.L⁻¹) p (Teste t)	89,0±0,5 ^a -	102,0±0,4^b (0,001)	92,5±2,7 ^a (0,158)	89,0±4,3 ^a (0,498)	86,8±2,6 ^a (0,224)
[ART]_{final} (g.L⁻¹)	0,6±0,1	0,8±0,1	1,0±0,1	1,6±0,1	2,6±0,1
P_{x(max)} (g_{etanol}·g_{células}⁻¹) p (Teste t)	2,01±0,04 ^a -	2,78±0,04^b (0,003)	2,70±0,07^b (0,007)	2,16±0,07 ^a (0,118)	2,20±0,08 ^a (0,096)
S_{x(max)} (g_{açúcar}·g_{células}⁻¹) p (Teste t)	2,15±0,1 ^a -	2,25±0,04 ^a (0,256)	2,88±0,06^b (0,015)	3,52±0,04^b (0,004)	2,75±0,05^b (0,021)
r_{P(max)} (g.L⁻¹·h⁻¹) p (Teste t)	21,±0,4 ^a -	24,2±0,2^b (0,009)	23,3±5,0 ^a (0,350)	16,3±3,4 ^b (0,015)	19,5±0,9 ^b (0,004)
r_{X(max)} (g.L⁻¹·h⁻¹) p (Teste t)	2,00±0,01^a -	0,50±0,06 ^b (0,001)	1,00±0,07 ^a (0,003)	0,85±0,03 ^b (0,001)	0,70±0,03 ^b (0,001)
r_{S(max)} (g.L⁻¹·h⁻¹) p (Teste t)	48,8±2,2^a -	45,5±1,5^a (0,170)	47,7±2,7^a (0,391)	31,9±1,0 ^b (0,010)	34,9±1,7 ^b (0,019)
Y_{P/S} (g_{etanol}·g_{açúcar}⁻¹) p (Teste t)	0,45±0,07 ^a -	0,51±0,03 ^a (0,238)	0,47±0,10 ^a (0,430)	0,45±0,05 ^a (0,492)	0,44±0,05 ^a (0,473)
μ_{P(max)} (h⁻¹) p (Teste t)	0,48±0,0 ^a -	0,63±0,02^b (0,015)	0,51±0,02 ^a (0,137)	0,40±0,09 ^a (0,272)	0,50±0,03 ^a (0,308)
μ_{S(max)} (h⁻¹) p (Teste t)	1,12±0,12^a -	1,19±0,03^a (0,228)	1,31±0,06^a (0,097)	0,82±0,03 ^b (0,030)	0,90±0,05^a (0,076)

¹ Médias sublinhadas não diferem do experimento controle (sem ácido lático) pelo teste do χ^2 ($\alpha=0,05$);

² Médias indicadas pela mesma letra não diferem do experimento controle (sem ácido lático) pelo teste t ($\alpha=0,05$);

³ Concentração de ácido lático adicionado no início da fermentação em relação ao volume final do meio. P_{X(max)}: produção máxima de etanol em relação a biomassa; S_{X(max)}: consumo máximo de açúcar em relação a biomassa; r_{P(max)}: produtividade máxima; r_{X(max)}: velocidade máxima de crescimento; r_{S(max)}: velocidade máxima de consumo de açúcar; Y_{P/S}: fator de conversão de açúcar em etanol; μ_{P(max)}: velocidade máxima específica de produção de etanol; μ_{S(max)}: velocidade máxima específica de consumo de açúcar.

Uma produtividade máxima (r_P) maior do que do experimento-controle a foi observada na fermentação contendo 0,2 g.L⁻¹ de ácido lático adicionado (p<0,050), como mostrado na **Tabela 14** e **Figura 49 (parte B, Anexo B)**. Além disto, as

velocidades máximas de crescimento (r_x) obtidas nas fermentações contendo ácido láctico foram menores do que a velocidade obtida no experimento-controle ($p < 0,050$ em todos os casos) como mostrado na **Tabela 14, Figura 50 (parte B, Anexo B) e Figura 52 (parte D, Anexo B)**.

Os fatores de conversão de açúcar em etanol ($Y_{P/S}$) nas fermentações contendo ácido láctico não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,050$ em todos os casos, **Tabela 14**).

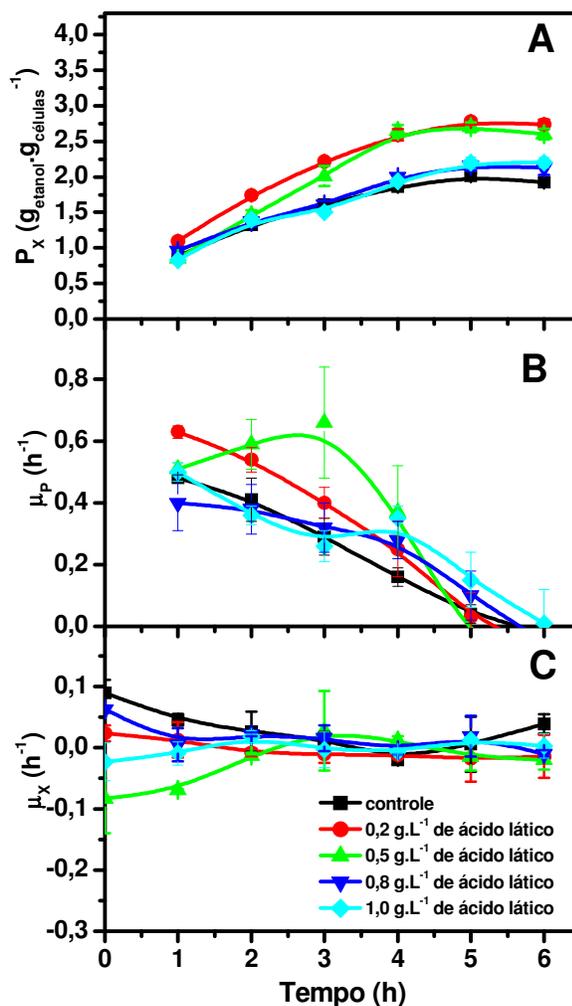


Figura 21- Efeito do ácido láctico adicionado (0,2 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹) sobre a produção de etanol em relação a biomassa (A), a velocidade específica de produção de etanol (B) e a velocidade específica de crescimento (C) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial.

A velocidade específica máxima de produção de etanol ($\mu_{P(max)}$) observada na fermentação contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado também foi maior do que a velocidade obtida na fermentação-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 14, Figura 21 (parte B do anexo B) e Figura 52 (parte B, Anexo B)**. No entanto, a velocidade específica de crescimento (μ_X) foi praticamente constante em todos os casos (**parte C da Figura 21**). Além disto, a velocidade máxima específica de consumo de sacarose ($\mu_{S(max)}$) obtida nas fermentações contendo $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ foi menor do que a velocidade observada no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 14 e Figura 52 (parte, Anexo B)**.

4.2.1.1 DISCUSSÃO

Um estímulo do ácido láctico adicionado sobre a fermentação ocorreu apesar da falta de reajuste do pH inicial. Os melhores valores da produção máxima de etanol em relação a biomassa (P_X) de foram obtidos em presença na faixa de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ do ácido láctico enquanto que o maior valor da velocidade específica máxima de produção de etanol ($\mu_{P(Max)}$) ocorreu com $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico no processo de batelada simples e sem o reajuste do pH. GRAVES *et al.* (2006) também observou um aumento na velocidade de produção de etanol durante a fermentação de hidrolisado de amido de milho contendo de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado. Estes estímulos podem ser explicados pelos aumentos da produtividade máxima (r_P) e da velocidade máxima específica de produção de etanol (μ_P) nestas condições. Além disto, o aumento da concentração de ácido láctico adicionado reduziu os valores de viabilidade somente acima de 4h de fermentação e em concentrações de ácido láctico adicionado acima de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Isto também ocorreu com o consumo de açúcar em relação a biomassa ($P_{X(max)}$) e velocidade máxima de consumo de açúcar ($r_{S(max)}$), incluindo a velocidade específica ($\mu_{S(max)}$). Assim, a presença de ácido láctico adicionado foi benéfica ao processo numa concentração na faixa de $0,2-0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Provavelmente, este aumento no consumo de açúcar pela levedura 63M resultou o uso da energia gerada que foi suficiente para restaurar o pH interno (VAN DER REST *et al.* 1995) em concentrações de até $0,2-0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido adicionado. Acima desta faixa, o consumo excessivo de energia pelas células de levedura pode fazê-las perder a capacidade de manter o pH interno delas e suas

atividades fisiológicas. PALMQVIST *et al.* (1999) descrevem a necessidade da levedura de aumentar os níveis de ATP para expulsar os prótons intracelulares aumenta a velocidade da via glicolítica, e isto aumenta a velocidade da produção de etanol.

O aumento da atividade fermentativa foi compensado por quedas em biomassa que mostraram valores mínimos na faixa de 0,2-0,5 g.L⁻¹ de ácido lático adicionado, sendo que em fermentações acima de 0,2 g.L⁻¹ deste ácido ocorreram perdas em viabilidade. De fato, a cultura de levedura produz menos biomassa por estar gastando energia na restauração do pH interno.

EXPERIMENTOS REALIZADOS COM AJUSTE DO pH INICIAL APÓS ADIÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO

Justificativa

As fermentações em batelada simples sem o reajuste do pH para 4,5 mostraram que os valores de pH foram mantidos muito baixos durante toda a fermentação causando de perdas em viabilidade (ver **Tabela 14**). A elevação e manutenção do pH externo ao redor de 4,5 variaram o equilíbrio de ionização do ácido, minimizando sua difusão para o interior da célula com conseqüências no processo fermentação, incluindo os seus parâmetros cinéticos. IMAI e OHNO (1995) descreveram que o pH interno das leveduras deve ser mantido ao redor de 5,5 e 5,75 para que as atividades metabólicas e crescimento não sofram impedimentos que inviabilizem as células de leveduras.

Descrição

Nos experimentos descritos abaixo na (**Tabela 15**), ácido lático foi adicionado na faixa de 0,0 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹ no início das fermentações contendo 20% (p.v⁻¹) de sacarose e com o reajuste do pH inicial para 4,5 após a inoculação com a levedura 63M (**item 3.6 de Materiais e Métodos**). As variações nos parâmetros medidos e calculados em função do tempo (período de até 6h) de fermentação, estão descritas na **Figura 22 e Tabela 15**.

Efeito do reajuste de pH sobre os parâmetros cinéticos de fermentação em presença de ácido lático adicionado

O açúcar tanto da fermentação-controle (sem ácido lático) quanto das fermentações contendo ácido lático de ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) adicionado foram consumidos totalmente em 4h de fermentação como mostrado na **Tabela 15** e **Figura 55 (parte A, Anexo B)**.

Os valores de pH durante as fermentações em batelada simples com reajuste de pH e em presença de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido lático não apresentaram grandes variações quando o pH inicial foi ajustado a 4,5 em presença de ácido lático. Isto indicou uma manutenção do pH inicial da fermentação em presença de ácido lático ou efeito tamponante do mesmo como mostrado na **Tabela 15** e **Figura 53 (parte B, Anexo B)**.

As viabilidades finais da levedura 63M observadas nas fermentações em presença do ácido lático adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foram semelhantes à viabilidade obtida na fermentação controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 15** e **Figura 53 (parte A, Anexo B)**.

As biomassas finais (X_f) obtidas nas fermentações contendo ácido lático adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$; $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foram menores do que a biomassa observada na fermentação-controle ($p < 0,050$ nos três casos) como mostrado na **Tabela 15** e **Figura 56 (parte A, Anexo B)**.

O etano final produzido (P_f) observado nas fermentações contendo ácido lático adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foram menores do que o etanol observado na fermentação-controle ($p < 0,050$ em todos os casos) como mostrado na **Tabela 15** e **Figura 54 (parte A, Anexo B)**.

A produção de etanol em relação à biomassa ($P_{x(\max)}$) da fermentação contendo $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido lático adicionado foi maior que a produção obtida no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 15**, **Figura 22 (parte A)** e **Figura 57 parte A, Anexo B)**. Além disto, os consumos de sacarose em relação a biomassa ($S_{x(\max)}$) observados nas fermentações contendo $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ foram maiores do que a do experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 15**, **Figura 55 (parte C, Anexo B)** e **Figura 57 (parte D, Anexo B)**.

As produtividades máximas ($r_{P(max)}$) observadas nas fermentações contendo ácido láctico adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foram semelhantes a produtividade observada na fermentação-controle ($p>0,050$ em todos os casos) como mostrado na **Tabela 15 e Figura 54 (parte B, Anexo B)**. No entanto, as velocidades máximas (r_x) de crescimento obtidas nas fermentações contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico foram maiores do que a mesma velocidade observada no experimento-controle ($p<0,050$ em todos os casos) como mostrado na **Tabela 15 e Figura 56 (parte B, Anexo B)**. Além disto, as velocidades máximas de consumo de açúcar ($r_{S(max)}$) observadas nas fermentações em presença de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram maiores do que a velocidade observada no experimento-controle ($p>0,050$ nos três casos) como mostrado na **Tabela 15 e Figura 55 (parte B, Anexo B)**.

Os fatores de conversão de açúcar em etanol ($Y_{P/S}$) das fermentações contendo ácido láctico não apresentaram diferenças significativas ($p>0,050$ em todos os casos) como mostrado na **Tabela 14**.

As velocidades máximas específicas de etanol ($\mu_{P(max)}$) observadas nas fermentações contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes a velocidade obtida no experimento-controle ($p>0,050$ para todos os casos) como mostrado na **Tabela 15, Figura 22 (parte B) e Figura 57 (parte B, Anexo B)**. No entanto, as velocidades específicas máximas de consumo de sacarose ($\mu_{S(max)}$) foram dependentes da concentração de ácido láctico e foram maiores do que a mesma velocidade observada no experimento-controle ($p<0,050$ para todos os casos) como mostrado na **Tabela 15 e Figura 55 (parte D, Anexo B)**. Além disto, a velocidade específica de crescimento também foi praticamente constante em todos os casos como mostrado na **Figura 22 (parte C)**.

Comparando os processos de batelada simples com e sem o reajuste do pH inicial a 4,5 e em presença de ácido láctico pela análise de variância (ANOVA), a maioria dos parâmetros medidos e calculados foi semelhante. No entanto, o reajuste do pH inicial foi essencial para o processo de batelada simples. As viabilidades finais obtidas no processo de batelada simples com o reajuste de pH foram maiores que as viabilidades finais obtidas na batelada simples sem o reajuste do pH ($p=0,002<0,050$). Além disto, tanto a produtividade ($p=0,005$) quanto a velocidade máxima específica de etanol ($p=0,005$) obtidas na batelada simples com o reajuste

do pH foram maiores os mesmos parâmetros obtidos em batelada simples sem o reajuste do pH ($p < 0,050$ para ambas).

Tabela 15- Efeito do reajuste do pH inicial 4,5 sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada simples a 34 °C contendo do ácido láctico adicionado (0,0 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹).

Parâmetros cinéticos ^{1,2}	Concentração de ácido láctico ³ (g.L ⁻¹)				
	0,0	0,2	0,5	0,8	1,0
Tempo_{final} (h)	4	4	4	4	4
pH_{inicial}	4,46	4,45	4,42	4,47	4,52
pH_{final}	3,98	4,03	4,21	4,25	4,25
Viabilidade_{inicial} (%)	<u>97,8±0,7</u>	<u>96,1±1,0</u>	<u>97,9±1,1</u>	<u>97,7±1,3</u>	<u>94,8±0,7</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,101)	(0,949)	(0,750)	(0,902)
Viabilidade_{final} (%)	98,6±0	<u>95,5±0,2</u>	<u>97,5±0,1</u>	<u>96,3±0,4</u>	<u>92,6±1,0</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,539)	(0,474)	(0,621)	(0,700)
Biomassa_{final} (X_f, g.L⁻¹)	49,3±0,6^a	42,6±0,4 ^b	37,4±1,1 ^b	39,7±2,8^a	41,0±0,2 ^b
p (Teste t)	-	(0,005)	(0,049)	(0,142)	(0,002)
[Etanol]_{final} (P, g.L⁻¹)	98,4±0,1^a	84,4±1,5 ^b	84,4±0,6 ^b	81,0±2,1 ^b	72,8±1,0
p (Teste t)	-	(0,020)	(0,010)	(0,004)	(0,009)
[ART]_{final} (g.L⁻¹)	0,9±0,1	0,5±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1
P_{x(max)} (g_{etanol}.g_{células}⁻¹)	2,03±0,01 ^a	1,84±0,03 ^a	2,26±0,04^b	2,04±0,09 ^a	2,01±0,15 ^a
p (Teste t)	-	(0,003)	(0,007)	(0,118)	(0,096)
S_{x(max)} (g_{açúcar}.g_{células}⁻¹)	1,95±0,02 ^a	1,93±0,08 ^a	2,23±0,26^b	1,76±0,08 ^a	2,70±0,07^b
p (Teste t)	-	(0,256)	(0,015)	(0,004)	(0,021)
r_{P(max)} (g.L⁻¹.h⁻¹)	31,8±4,3 ^a	28,0±2,8 ^a	26,6±0,3 ^a	27,1±1,3 ^a	25,3±1,4 ^a
p (Teste t)	-	(0,540)	(0,444)	(0,490)	(0,389)
r_{X(max)} (g.L⁻¹.h⁻¹)	3,00±0,05^a	2,95±0,07^a	2,45±0,03 ^b	1,40±0,03 ^b	3,25±0,05^a
p (Teste t)	-	(0,623)	(0,013)	(0,002)	(0,079)
r_{S(max)} (g.L⁻¹.h⁻¹)	24,2±1,3 ^a	60,0±3,6^b	49,2±2,5 ^a	74,4±4,6^b	71,2±6,5^b
p (Teste t)	-	(0,068)	(0,013)	(0,061)	(0,089)
Y_{P/S} (g_{etanol}.g_{açúcar}⁻¹)	0,49±0,01 ^a	0,43±0,03 ^a	0,42±0,08 ^a	0,41±0,04 ^a	0,37±0,05 ^a
p (Teste t)	-	(0,268)	(0,541)	(0,274)	(0,260)
μ_{P(max)} (h⁻¹)	0,71±0,11 ^a	0,67±0,10 ^a	0,70±0,04 ^a	0,64±0,06 ^a	0,62±0,04 ^a
p (Teste t)	-	(0,815)	(0,964)	(0,654)	(0,545)
μ_{S(max)} (h⁻¹)	0,53±0,08 ^a	1,43±0,09^b	1,29±0,07^b	1,75±0,09^b	1,74±0,13^b
p (Teste t)	-	(0,009)	(0,009)	(0,005)	(0,011)

¹ Médias sublinhadas não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste do χ^2 ($\alpha=0,05$);

² Médias indicadas pela mesma letra não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste t ($\alpha=0,05$);

³ Concentração de ácido láctico adicionado no início da fermentação em relação ao volume final do meio. P_{x(max)}: produção máxima de etanol em relação a biomassa; S_{x(max)}: consumo máximo de açúcar em relação a biomassa; r_{P(max)}: produtividade máxima; r_{X(max)}: velocidade máxima de crescimento; r_{S(max)}: velocidade máxima de consumo de açúcar; Y_{P/S}: fator de conversão de açúcar em etanol; μ_{P(max)}: velocidade máxima específica de produção de etanol; μ_{S(max)}: velocidade máxima específica de consumo de açúcar.

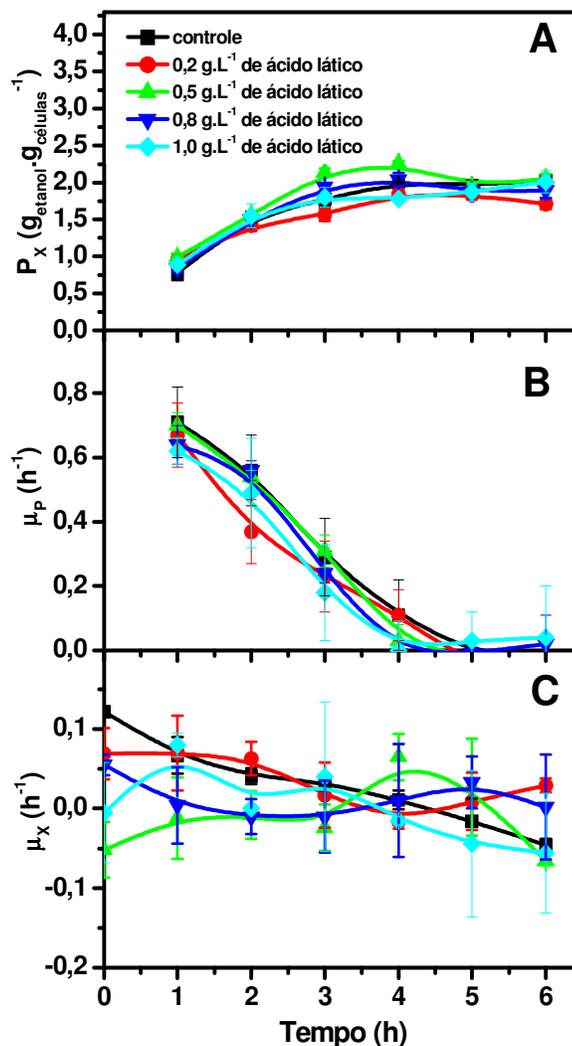


Figura 22- Efeito do ácido láctico adicionado (0,2 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹) sobre a produção de etanol em relação a biomassa (A), a velocidade específica de produção de etanol (B) e a velocidade específica de crescimento (C) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial. As fermentações foram realizadas sem o reajuste do pH inicial (após a inoculação) e a 34 °C.

4.2.1.2 DISCUSSÃO

No processo de batelada simples em presença de ácido láctico, o reajuste do pH inicial do meio logo após a inoculação causou maior retenção da viabilidade final da levedura 63M, aumentos na velocidade máxima de consumo de açúcar (r_s), o consumo de sacarose em relação a biomassa ($S_{x(max)}$) e a velocidade máxima específica de consumo de açúcar ($\mu_{S(max)}$). Por outro lado, o valor máximo da

produção de etanol em relação a biomassa $P_{X(\max)}$ foi grandemente reduzido, porém o este mesmo valor obtido com $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido lático foi maior que o do experimento-controle. A literatura também cita que o reajuste do pH inicial causa um aumento da produtividade máxima, da velocidade máxima de crescimento e da velocidade específica de produção de etanol. STRATFORD (1998) verificou que o efeito do ácido lático sobre as células de levedura está relacionado com o valor do pKa ($\text{pKa}=3,86$), sendo a forma não ionizada do ácido lático é predominante em pH abaixo de 3,86 e sua forma não ionizada é predominante em pH abaixo de pH 4,5.

No presente trabalho, o pH se manteve constante durante a fermentação em todos os casos indicando uma tamponagem do meio pela presença de concentrações de ácido lático menores ou iguais $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ quando o pH inicial foi reajustado a 4,5. THOMAS *et al.* (2002) estudaram o efeito tamponante de aditivos e ácidos fracos sobre a inibição do crescimento da levedura em batelada simples contendo meio sintético. Estes autores concluíram que a presença de ácido lático (548 mM) ou ácido acético (167 mM) foram responsáveis pela manutenção do pH do meio que foi inicialmente ajustado para 4,5. Outros aditivos como extrato de levedura, farinha de milho ou aminoácidos não tamponaram o meio, e isto fez com que o pH inicial do meio sintético caísse de 2,3 a 2,7. Assim, materiais complexos contendo agentes seqüestrantes de prótons não foram tão eficientes quanto o ácido lático na tamponagem do meio.

4.2.2 FERMENTAÇÕES EM BATELADA COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA DE SACAROSE NAS PRIMEIRAS HORAS

Justificativas

É bem conhecido que os parâmetros cinéticos dependem do tipo de processo e de suas condições. Além disto, algumas destilarias utilizam o processo de batelada com alimentação contínua exponencial nos quais os valores da vazão de (F), constante de tempo (k) e tempo de enchimento da dorna são críticos: $F=F_0 \cdot e^{kt}$.

No presente trabalho, utilizou-se um tempo de enchimento do reator (até o seu volume de trabalho) de 2h (tempo de enchimento do reator) seguido por mais 4h para consumo do açúcar. Assim, o processo pode ser dividido em duas partes, ou

seja, duas horas de batelada com alimentação contínua ($0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) seguida por 4h de batelada simples. O nosso volume de trabalho foi muito pequeno e não dispúnhamos de bombas peristálticas com vazão muito reduzida. Apesar disto, esta foi uma estratégia que visou reduzir a quantidade de açúcar disponível no meio durante o processo aliviando os efeitos da pressão osmótica.

Descrição

Os experimentos foram realizados utilizando-se apenas duas concentrações de ácido láctico ($0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) que foram adicionadas nos mini-reatores alimentados com solução de sacarose concentrada de $800 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (25 mL) numa vazão de $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ por 2h e com o reajuste do pH a 4,5 após a inoculação a temperatura de $34 \text{ }^\circ\text{C}$ (**item 3.7 de Materiais e Métodos**). As variações nos parâmetros cinéticos de fermentação em função do tempo (período de até 6h) em processo de batelada simples estão descritas na **Figura 23 e Tabela 16**.

Efeito do uso de uma estratégia de alimentação contínua seguida por batelada simples sobre os parâmetros cinéticos de fermentação em presença de ácido láctico adicionado

O açúcar foi consumido mais rapidamente (3 horas após o término da alimentação) no reator contendo $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado do que na fermentação-controle (4h após o término da alimentação) e naquela realizada em presença de $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado (4h após o término da alimentação) como mostrado na **Tabela 16 e Figura 61 (parte A, Anexo B)**. A ativação da fermentação por $0,2 \text{ g/l}$ de ácido láctico adicionado continuou a ocorrer

Os valores de pH final observados nas fermentações tanto em ausência e quanto em presença de ácido láctico sofreram poucas variações como mostrado na **Tabela 16 e a Figura 58 (parte B, Anexo B)**.

As viabilidades iniciais obtidas nas fermentações tanto em ausência quanto em presença do ácido láctico adicionado ($0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) não perdas significativas ($p>0,050$ em ambos os casos) como mostram a **Tabela 16 e a Figura 58 (parte A, Anexo B)** devido ao pouco tempo de exposição ao ácido. No entanto, as viabilidades finais observadas nas fermentações em presença do ácido láctico adicionado

($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foram menores do que a viabilidade observada no experimento-controle ($p < 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 16** e **Figura 58 (parte A, Anexo B)**. Assim, a presente estratégia não diminuiu os efeitos do ácido sobre a viabilidade final.

Considerando-se o crescimento, observou-se que esta estratégia levou a um acúmulo de biomassa no experimento controle sem adição de ácido láctico (29,1%). Além disto, as biomassas finais obtidas (X_f) das fermentações em presença de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes à biomassa observada no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 16** e **Figura 60 (parte A, Anexo B)**.

Considerando-se a produção de etanol, não houve diferenças significativas entre o etanol final produzido nas fermentações contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado com o etanol final produzido no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostra a **Tabela 16** e a **Figura 59 (parte A, Anexo B)**.

As produções máximas de etanol em relação a biomassa ($P_{x(\max)}$) observadas nas fermentações contendo ácido láctico adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foram semelhantes a produção observada no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 16** e **Figura 23 (parte A)**. No entanto, apenas o consumo máximo de açúcar em relação a biomassa ($S_{x(\max)}$) obtido na fermentação contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foi menor do que o consumo do experimento-controle ($p < 0,050$) indicando uma diminuição na conversão de sacarose em biomassa mostrado na **Tabela 16** e **Figura 61 (parte C, Anexo B)**.

Quanto a produtividade (r_p), apenas a produtividade máxima obtida na fermentação contendo $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foi menor do que a produtividade observada no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 16** e a **Figura 59 (parte B, Anexo B)**. No entanto, tanto as velocidades máximas de crescimento ($r_{X(\max)}$) quanto as velocidades máximas de consumo de açúcar ($r_{S(\max)}$) obtidas das fermentações em presença de ácido láctico adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foram menores que as mesmas velocidades observadas no experimento-controle ($p < 0,050$ em todos os casos) como mostrado na **Tabela 16** e

Figura 61 (parte B, Anexo B) sugerindo um efeito negativo do ácido lático sobre o crescimento.

Os rendimentos em etanol ($Y_{P/S}$) nas fermentações em presença de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido lático adicionado foram semelhantes ao rendimento observado no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 16**.

Não houve diferenças significativas entre as velocidades máximas específicas de produção de etanol ($r_{P(\max)}$) obtidas nas fermentações em presença de ácido lático adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) com as velocidades observadas no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 16** e **Figura 22 (parte B)** como esperado pelos dados descritos acima. Apesar de menor que no experimento controle, a velocidade específica de crescimento (r_X) foi praticamente constante durante a fermentação em todos os casos (**parte C da Figura 23**). No entanto, apenas a velocidade máxima específica de consumo de açúcar ($r_{S(\max)}$) observada na fermentação em presença de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido lático adicionado foi menor que a velocidade máxima específica observada no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 16** e **Figura 61 (parte B, Anexo B)** o aumento em etanol produzido a custa de diminuição da biomassa.

Comparando os processos de batelada simples (**Tabela 15**) e com o processo de batelada com alimentação alimentada de forma contínua (**Tabela 16**) por curto tempo através da análise de variância (ANOVA), observou-se que a levedura 63M consumiu açúcar mais rapidamente sem prejudicar a produção de etanol (P) em processo de batelada simples e apresentou menor perda em viabilidade com menor produção de biomassa. As viabilidades finais obtidas com esta levedura no processo de batelada simples foram maiores que as viabilidades finais obtidas na batelada alimentada de forma contínua por curto tempo ($p = 0,000 < 0,050$). Além disto, tanto o consumo máximo de açúcar em relação à biomassa ($S_{X(\max)}$, $p = 0,005$) quanto as velocidades máximas de consumo de açúcar ($r_{S(\max)}$, $p = 0,032$), incluindo a velocidade específica ($\mu_{S(\max)}$, $p = 0,010$), foram maiores que as mesmas obtidas no processo de batelada que foi alimentado de forma contínua. No entanto, as biomassas finais (X_f) obtidas na batelada com alimentação contínua foram maiores que as biomassas finais obtidas na batelada simples ($p = 0,002 < 0,050$). Esta foi a grande vantagem deste tipo de processo uma vez que a renovação das células é necessária em processos de bateladas repetidas.

Tabela 16- Efeito da concentração do ácido láctico sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada com alimentação contínua (0,2 mL.min⁻¹ por 2h) com o reajuste de pH inicial para 4,5.

Parâmetros cinéticos ^{1,2}	Concentração de ácido láctico ³ (g.L ⁻¹)		
	0,0	0,2	1,0
Tempo _{final} (h)	6	5	6
pH _{inicial}	4,54	4,44	4,45
pH _{final}	3,70	3,30	3,90
Viabilidade _{inicial} (%)	<u>96,6±0,5</u>	<u>90,6±0,8</u>	<u>85,6±2,2</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,369)	(0,087)
Viabilidade _{final} (%)	82,3±3,6	67,8±0,7	60,9±4,4
p (Teste χ^2)	-	(0,011)	(0,000)
Biomassa _{final} (X _f , g.L ⁻¹)	51,0±1,9 ^a	44,5±4,7 ^a	46,0±1,5 ^a
p (Teste t)	-	(0,206)	(0,098)
[Etanol] _{final} (P, g.L ⁻¹)	96,0±1,3 ^a	89,4±4,5 ^a	83,7±1,4 ^a
p (Teste t)	-	(0,672)	(0,436)
[ART] _{final} (g.L ⁻¹)	1,4±0,1	1,3±0,1	1,9±0,1
P _{x(máx)} (g _{etanol} .g _{células} ⁻¹)	1,96±0,05 ^a	2,01±0,05 ^a	2,00±0,05 ^a
p (Teste t)	-	(0,529)	(0,652)
S _{x(máx)} (g _{açúcar} .g _{células} ⁻¹)	1,44±0,10^a	0,72±0,03 ^b	1,22±0,07^a
p (Teste t)	-	(0,022)	(0,231)
r _{P(max)} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	25,7±0,6^a	20,4±1,6^a	19,8±0,4 ^b
p (Teste t)	-	(0,088)	(0,014)
r _{X(max)} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	4,95±0,06^a	1,70±0,02 ^b	1,35±0,03 ^b
p (Teste t)	-	(0,000)	(0,000)
r _{S(max)} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	33,0±0,7^a	16,8±0,8 ^b	27,2±0,3 ^b
p (Teste t)	-	(0,004)	(0,016)
Y _{P/S} (g _{etanol} .g _{açúcar} ⁻¹)	0,48±0,05 ^a	0,45±0,05 ^a	0,42±0,03 ^a
p (Teste t)	-	(0,689)	(0,396)
μ _{P(máx)} (h ⁻¹)	0,55±0,03 ^a	0,42±0,04 ^a	0,44±0,02 ^a
p (Teste t)	-	(0,138)	(0,104)
μ _{S(máx)} (h ⁻¹)	0,68±0,03^a	0,38±0,07 ^b	0,60±0,02^a
p (Teste t)	-	(0,044)	(0,141)

¹ Médias sublinhadas não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste do χ^2 ($\alpha=0,05$);

² Médias indicadas pela mesma letra não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste t ($\alpha=0,05$);

³ Concentração de ácido láctico adicionado no início da fermentação em relação ao volume final do meio. P_{X(max)}: produção máxima de etanol em relação a biomassa; S_{X(max)}: consumo máximo de açúcar em relação a biomassa; r_{P(max)}: produtividade máxima; r_{X(max)}: velocidade máxima de crescimento; r_{S(max)}: velocidade máxima de consumo de açúcar; Y_{P/S}: fator de conversão de açúcar em etanol; μ_{P(max)}: velocidade máxima específica de produção de etanol; μ_{S(max)}: velocidade máxima específica de consumo de açúcar.

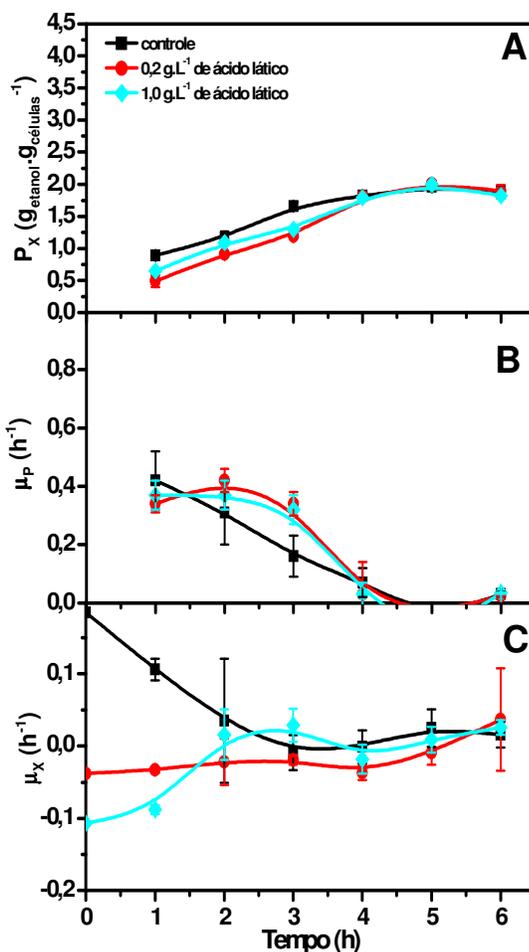


Figura 23- Efeito da adição de duas concentrações de ácido láctico (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) sobre a produção de etanol em relação a biomassa (A), a velocidade específica de produção de etanol (B) e a velocidade específica de crescimento (C) da levedura 63M em função do tempo em batelada com alimentação contínua de sacarose 800 g.L⁻¹ (25 mL) numa vazão de 0,2 mL.min⁻¹ por 2h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998). As fermentações foram realizadas com o reajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

4.2.2.1 DISCUSSÃO

Em fermentações em batelada alimentada de forma contínua e com reajuste de pH inicial, a presença de ácido láctico adicionado (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) causou perdas na viabilidade final da levedura 63M. Estas perdas em viabilidade ocorreram devido à redução de açúcar, no início do processo de batelada com alimentação contínua, o qual foi necessário para proteger as células em presença do ácido láctico adicionado. No entanto, a produção de etanol (P) e a produção de biomassa (X_f)

não foram afetadas pela presença deste ácido em batelada alimentada. Além disto, a presença de ácido láctico ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) causou a redução da velocidade máxima de consumo de açúcar ($r_{S(\max)}$) e na velocidade de crescimento (r_X). Por outro lado, a produtividade máxima ($r_{P(\max)}$) foi maior na fermentação em presença de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ que em presença de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado.

Comparando o processo de batelada simples com o processo de batelada com alimentação contínua, verificou-se que o açúcar foi consumido mais rapidamente em batelada simples, pois o consumo de sacarose em relação à biomassa (S_X), a velocidade de consumo de açúcar (r_S), incluindo a específica (μ_S) foram maiores. Usando cultura anaeróbica em quimiostato, THOMSSOM e LARSSON (2006) estudaram o efeito do ácido láctico sobre a produção de etanol e observaram que a presença deste ácido pode ser benéfica a produção de etanol dependendo da concentração adicionada (90 mM) e do pH do meio o qual foi mantido em seu valor ótimo, ou seja, a 3,25.

Como as biomassas finais obtidas nas bateladas de alimentação contínua foram maiores que as biomassas finais obtidas na batelada simples, esta foi a grande vantagem deste tipo de processo, uma vez que a renovação das células é necessária em processos de bateladas repetidas.

4.2.3 FERMENTAÇÕES EM BATELADAS ALIMENTADAS POR PULSOS DE VOLUMES DECRESCENTES

Justificativa e descrição

Em experimentos anteriores com o reajuste de pH, reduções na produção de etanol foram observadas em culturas de bateladas simples (**item 4.2.1-B de RESULTADOS E DISCUSSÃO**) enquanto grandes perdas em viabilidade foram observadas nas fermentações com alimentação contínua (**item 4.2.2 de RESULTADOS E DISCUSSÃO**). Diante disto, decidiu-se estudar a produção de etanol pela levedura 63M em processo de batelada alimentada por três pulsos decrescentes de sacarose (pulsos de 10 mL, 8 mL e 7 mL) nas primeiras duas horas de fermentação (**item 3.8 de MATERIAIS e MÉTODOS**). A estratégia dos pulsos decrescentes foi escolhida pelo fato de termos observado no planejamento fatorial (**item 4.1**) que a elevação da concentração de sacarose minimiza as perdas de

viabilidade em presença de ácido láctico que ocorreram no processo de batelada com alimentação contínua (**Tabela 15**). Assim, a adição de todo ácido láctico logo após o início da alimentação deve exigir pulsos de concentração maior de sacarose nos primeiros pulsos de alimentação. Nos experimentos descritos abaixo, o pH inicial foi reajustado para 4,5, apenas após o primeiro pulso de solução de sacarose. A quantidade de sacarose total adicionada ao meio foi de 20% (p.v⁻¹ em relação ao volume final de meio) e em dois tipos de experimentos quanto a quantidade de ácido láctico adicionada (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) no início da fermentação. As variações nos parâmetros cinéticos de fermentação em função do tempo (período de até 6h) em processo de batelada simples estão descritas na **Figura 24 e Tabela 17**.

Efeito das concentrações de ácido láctico adicionado sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos decrescentes e com o reajuste de pH inicial para 4,5

O açúcar foi totalmente consumido de forma mais rápida (5h) no experimento contendo 0,2 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado do que nos experimentos controle e no experimento contendo 1,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado como mostrado na **Tabela 17 e na Figura 65 (parte A, Anexo B)**.

Os valores de pH no final da fermentação variaram seguinte ordem: fermentação contendo 1,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado > 0,2 g.L⁻¹ de ácido láctico > na fermentação-controle sem ácido láctico como mostrado na **Tabela 17 e Figura 62 (parte B, Anexo B)**.

As viabilidades iniciais e finais obtidas nas fermentações tanto em ausência quanto em presença do ácido láctico adicionado (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) não apresentaram variações significativas (p>0,050 em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 17 e Figura 62 (parte A, Anexo B)**.

As produções de biomassa acumuladas no final das fermentações em presença de 0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foram semelhantes à biomassa observada no experimento-controle (p>0,050 em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 17 e Figura 64 (parte A, Anexo B)**. No entanto, apenas a biomassa inicial do experimento contendo 0,2 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foi

menor que a biomassa do experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 17 e Figura 64 (parte A, Anexo B)**.

O etanol final produzido (P) diminuiu com a concentração de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado ($p < 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 17 e Figura 63 (parte A, Anexo B)**.

A produção máxima de etanol pelas células ($P_{x(\text{máx})}$) em fermentação contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foi menor que a produção obtida no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 17 e parte A da Figura 24**). No entanto, o consumo específico de sacarose ($S_{x(\text{máx})}$) foi maior do que a do experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 17 e Figura 65 (parte C, Anexo B)**.

As produtividades máximas de etanol das fermentações em presença de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes ao rendimento observado no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) **Tabela 17 e Figura 63 (parte B, Anexo B)**. No entanto, apenas a velocidade máxima de crescimento da fermentação contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foi menor que a velocidade do experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 17 e Figura 64 (parte B, Anexo B)**. Além disto, as velocidades máximas de consumo de açúcar das fermentações contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram mais rápidas do que na fermentação-controle quanto ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 17 e Figura 65 (parte B, Anexo B)**.

Os rendimentos em etanol das fermentações em presença de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes ao rendimento observado no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos, **Tabela 17**).

A velocidade máxima específica de produção de etanol das fermentações em presença de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes ao rendimento observado no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 17 e parte B da Figura 24**). Além disto, a velocidade específica de crescimento também foi praticamente constante durante a fermentação em todos os casos (**parte C da Figura 24**). No entanto, a velocidade máxima específica de consumo de açúcar das fermentações contendo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado também foram maiores do que a velocidade da fermentação-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 17 e Figura 65 (parte D, Anexo B)**.

Tabela 17- Efeito das concentrações de ácido láctico adicionado sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos decrescentes e com o reajuste de pH inicial para 4,5 a 34 °C.

Parâmetros cinéticos ^{1,2}	Concentração de ácido láctico ³ (g.L ⁻¹)		
	0,0	0,2	1,0
Tempo_{final} (h)	6	5	6
pH_{inicial}	4,49	4,53	4,53
pH_{final}	3,41	3,45	4,24
Viabilidade_{inicial} (%)	<u>98,3±0,1</u>	<u>96,6±0,7</u>	<u>99,8±0,3</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,795)	(0,827)
Viabilidade_{final} (%)	<u>95,4±1,1</u>	<u>95,4±0,5</u>	<u>94,2±1,5</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,957)	(0,748)
Biomassa_{final} (X_f, g.L⁻¹)	43,3±0,2 ^a	43,1±0,7 ^a	40,6±0,1 ^a
p (Teste t)	-	(0,801)	(0,142)
[Etanol]_{final} (P, g.L⁻¹)	99,0±0,1^a	89,3±0,7 ^b	85,1±0,7 ^b
p (Teste t)	-	(0,030)	(0,023)
[ART]_{final} (g.L⁻¹)	1,1±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1
P_{x(max)} (g_{etanol}·g_{células}⁻¹)	2,50±0,02^a	2,07±0,02 ^b	2,32±0,21^a
p (Teste t)	-	(0,005)	(0,545)
S_{x(max)} (g_{açúcar}·g_{células}⁻¹)	1,86±0,05 ^a	2,31±0,05^b	2,13±0,09 ^a
p (Teste t)	-	(0,024)	(0,125)
r_{P(max)} (g.L⁻¹·h⁻¹)	28,0±0,3 ^a	26,8±0,3 ^a	22,5±1,9 ^a
p (Teste t)	-	(0,580)	(0,104)
r_{X(max)} (g.L⁻¹·h⁻¹)	1,30±0,01^a	1,10±0,01 ^a	1,40±0,04^a
p (Teste t)	-	(0,039)	(0,160)
r_{S(max)} (g.L⁻¹·h⁻¹)	28,9±1,5 ^a	34,8±0,1^b	41,4±0,7^b
p (Teste t)	-	(0,001)	(0,003)
Y_{P/S} (g_{etanol}·g_{açúcar}⁻¹)	0,50±0,10 ^a	0,45±0,01 ^a	0,49±0,03 ^a
p (Teste t)	-	(0,668)	(0,580)
μ_{P(max)} (h⁻¹)	0,59±0,04 ^a	0,57±0,06 ^a	0,49±0,06 ^a
p (Teste t)	-	(0,873)	(0,298)
μ_{S(max)} (h⁻¹)	0,67±0,02 ^a	0,77±0,02^b	0,99±0,03^b
p (Teste t)	-	(0,035)	(0,010)

¹ Médias sublinhadas não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste do χ^2 ($\alpha=0,05$);

² Médias indicadas pela mesma letra não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste t ($\alpha=0,05$); ³ Concentração de ácido láctico adicionado no início da fermentação em relação ao volume final do meio. P_{x(max)}: produção máxima de etanol em relação a biomassa; S_{x(max)}: consumo máximo de açúcar em relação a biomassa; r_{P(max)}: produtividade máxima; r_{X(max)}: velocidade máxima de crescimento; r_{S(max)}: velocidade máxima de consumo de açúcar; Y_{P/S}: fator de conversão de açúcar em etanol; μ_{P(max)}: velocidade máxima específica de produção de etanol; μ_{S(max)}: velocidade máxima específica de consumo de açúcar.

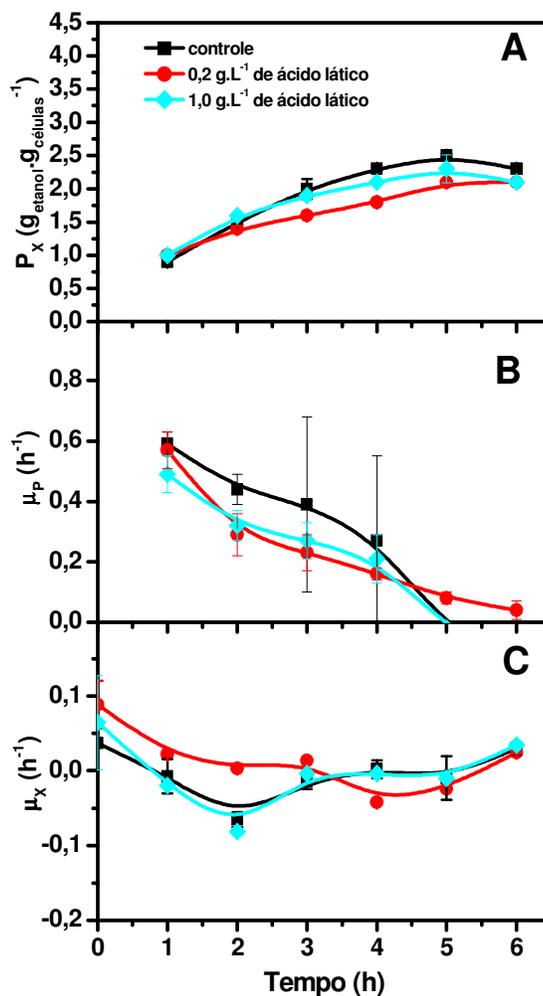


Figura 24- Efeito das concentrações de ácido láctico (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) sobre a produção de etanol em relação a biomassa (A), a velocidade específica de produção de etanol (B) e a velocidade específica de crescimento (C) da levedura 63M em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

Os processos de batelada simples e o processo de batelada alimentada por pulsos apresentaram o mesmo comportamento em presença de ácido láctico quando comparados pela análise de variância (ANOVA). Todos os parâmetros medidos e calculados foram significativamente semelhantes ($p > 0,050$ para todos os parâmetros).

4.2.3.1 DISCUSSÃO

O processo de batelada alimentada por pulsos em presença de ácido láctico adicionado causou reduções significativas no etanol produzido (P) com o ácido láctico adicionado (99,9 g.L⁻¹ sem adição de ácido, reduzido para 85,1-89,3 g.L⁻¹ contendo 0,2 a 1,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado), devido a inibição pelo ácido, porém aumentos no consumo de açúcar em relação a biomassa (S_x), na velocidade de consumo de açúcar (r_s) e na velocidade específica de consumo de açúcar (μ_s) foram obtidos, como observado nos dois processos anteriores (**Tabelas 15 e 16**). A viabilidade não foi alterada com a concentração de ácido láctico, bem como a biomassa (X_f). No entanto, nenhuma diferença foi observada entre as bateladas simples (**Tabelas 15**) e alimentada por pulsos (**Tabelas 17**) em presença de ácido láctico. A vantagem deste processo (**Tabelas 17**) em relação ao contínuo (**Tabelas 16**) foi a manutenção da viabilidade em presença de ácido láctico, indicando um efeito letal deste ácido e não apenas um efeito de inibição do crescimento. A biomassa acumulada na batelada alimentada mostrou um aumento significativo apenas em presença de ácido láctico 0,2 g.L⁻¹ como mostram os valores de S_{X(max)}. Pelo exposto, as formas de alimentação usadas na indústria parecem colaborar para o aumento do efeito inibitório do ácido láctico.

4.3 ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAR OS EFEITOS DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁCTICO A 34 °C

4.3.1 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES ALTAS (> 1,0 g.L⁻¹) DE ÁCIDO LÁCTICO ADICIONADO SOBRE CULTURAS EM BATELADA SIMPLES

Justificativa e descrição

Como o processo em batelada simples fornece dados semelhantes aos obtidos em batelada alimentada por pulsos, decidimos estudar os efeitos de concentrações de ácido láctico maior que 1,0 g.L⁻¹ em batelada simples. Decidiu-se então estudar o cultivo em batelada simples e na presença de concentrações mais altas de ácido láctico adicionado (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) a 34 °C. As variações nos parâmetros

cinéticos de fermentação em função do tempo (período de até 6h) em processo de batelada simples estão descritas na **Figura 25** e **Tabela 18**.

Efeito das concentrações altas de ácido láctico adicionado (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada simples com o reajuste de pH inicial para 4,5

O açúcar foi consumido mais rapidamente (4h) na fermentação-controle do que nas fermentações em presença de 3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado (5h) como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 69 (parte A, Anexo C)**.

Os valores de pH no final das fermentações contendo ácido láctico adicionado (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) não variaram como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 66 (parte B, Anexo C)**.

As viabilidades iniciais e finais obtidas nas fermentações tanto em ausência quanto em presença do ácido láctico adicionado (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) não apresentaram variações significativas ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 66 (parte A, Anexo C)**.

As produções de biomassa (X_f) obtidas no final das fermentações em presença de 3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foram menores que a biomassa observada no experimento-controle ($p < 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 68 (parte A, Anexo C)**.

O etanol final produzido (P) no final da fermentação contendo 4,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado diminuiu em relação ao experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 66 (parte B, Anexo C)**.

A produção de etanol em relação biomassa ($P_{x(max)}$) da fermentações contendo 3,0 a 4,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foram maiores que a produtividade do experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 25 (parte A)**. No entanto, o consumo de sacarose em relação a biomassa ($S_{x(max)}$) da fermentação contendo 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foi maior do que a do experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 17** e **Figura 69 (parte C, Anexo C)**.

As produtividades máximas de etanol ($r_{P(max)}$) das fermentações em presença de 3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foram semelhantes a produtividade

observada no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 67 (parte B, Anexo C)**. No entanto, as velocidades máximas de crescimento (r_x) das fermentações em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram maiores que a mesma velocidade obtida no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 68 (parte B, Anexo C)**. Além disto, as velocidades máximas de consumo de açúcar ($r_{S(\max)}$) das fermentações contendo $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram mais rápidas do que a mesma velocidade observada na fermentação-controle quanto ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 69 (parte B, Anexo C)**.

Os rendimentos em etanol ($Y_{P/S}$) das fermentações em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes ao rendimento observado no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos, como mostrado na **Tabela 18**).

A velocidade máxima específica de produção de etanol ($\mu_{P(\max)}$) das fermentações em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes a mesma velocidade observada no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 25 (parte B)**. Além disto, a velocidade específica de crescimento (μ_x) também foi praticamente constante em todos os casos (**Figura 25, parte C**). No entanto, as velocidades máximas específicas de consumo de açúcar ($\mu_{S(\max)}$) das fermentações contendo $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram mais rápidas do que a velocidade da fermentação-controle ($p < 0,050$ como mostrado na **Tabela 18** e **Figura 69 (parte D, Anexo C)**).

4.3.1.1 DISCUSSÃO

Em processo de batelada simples, a presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico não causou perdas significativas na viabilidade da levedura 63M e estimulou a produção de etanol (P), a produção de biomassa (X_t) e produção de etanol em relação ao número de células. Esta concentração foi uma concentração ótima de ácido láctico adicionado. Por outro lado, tanto a velocidade máxima de consumo de açúcar quanto a velocidade máxima específica de consumo de açúcar foram menores quando comparados com experimentos contendo concentrações baixas de ácido láctico (0 a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$). Além disto, o etanol produzido (P) e a produção de etanol em

relação ao número de células (P_x) foram maiores e batelada contendo altas concentrações de ácido láctico. A literatura reporta alguns trabalhos com altas concentrações de ácido láctico. Na fermentação de 'sake', concentrações de ácido láctico tão altas quanto até 20 g.L⁻¹ a 28 g.L⁻¹ (INOUE *et al.*, 1962) e até 40 g.L⁻¹ em meio sintético (MAIORELLA *et al.*, 1983) foram descritas.

Tabela 18- Efeito das concentrações altas de ácido láctico adicionado (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada simples com o reajuste de pH inicial para 4,5 a 34 °C.

Parâmetros cinéticos ^{1,2}	Concentração de ácido láctico ³ (g.L ⁻¹)		
	0,0	3,0	4,0
Tempo _{final} (h)	4	5	5
pH _{inicial}	4,46	4,51	4,52
pH _{final}	3,98	4,45	4,54
Viabilidade _{inicial} (%)	<u>97,8±0,7</u>	<u>93,4±0,1</u>	<u>93,7±1,9</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,795)	(0,827)
Viabilidade _{final} (%)	<u>98,6±0</u>	<u>89,1±2,1</u>	<u>88,3±2,8</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,957)	(0,748)
Biomassa _{final} (X _f , g.L ⁻¹)	49,3±0,6^a	43,6±0,5 ^b	40,4±0,7 ^b
p (Teste t)	-	(0,009)	(0,005)
[Etanol] _{final} (P, g.L ⁻¹)	98,4±0,1^a	102,4±1,7^b	94,0±0,8 ^a
p (Teste t)	-	(0,082)	(0,025)
[ART] _{final} (g.L ⁻¹)	0,9±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1
P _{x(max)} (g _{etanol} ·g _{células} ⁻¹)	2,03±0,01 ^a	2,36±0,02^b	2,35±0,03^b
p (Teste t)	-	(0,005)	(0,009)
S _{x(max)} (g _{açúcar} ·g _{células} ⁻¹)	1,95±0,02 ^a	2,70±0,07^b	1,89±0,07 ^a
p (Teste t)	-	(0,010)	(0,441)
r _{P(max)} (g.L ⁻¹ ·h ⁻¹)	31,8±4,3 ^a	26,8±1,4 ^a	24,2±4,3 ^a
p (Teste t)	-	(0,552)	(0,239)
r _{X(max)} (g.L ⁻¹ ·h ⁻¹)	3,00±0,05^a	2,30±0,08 ^b	1,05±0,07 ^b
p (Teste t)	-	(0,019)	(0,002)
r _{S(max)} (g.L ⁻¹ ·h ⁻¹)	24,2±1,3 ^a	48,5±1,7^b	51,0±2,6^b
p (Teste t)	-	(0,008)	(0,011)
Y _{P/S} (g _{etanol} ·g _{açúcar} ⁻¹)	0,49±0,01 ^a	0,51±0,03 ^a	0,48±0,01 ^a
p (Teste t)	-	(0,558)	(0,359)
μ _{P(max)} (h ⁻¹)	0,71±0,11 ^a	0,67±0,08 ^a	0,57±0,09 ^a
p (Teste t)	-	(0,837)	(0,423)
μ _{S(max)} (h ⁻¹)	0,53±0,08 ^a	1,14±0,05^b	1,23±0,07^b
p (Teste t)	-	(0,021)	(0,021)

¹ Médias sublinhadas não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste do χ^2 ($\alpha=0,05$);

² Médias indicadas pela mesma letra não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste t ($\alpha=0,05$);

³ Concentração de ácido láctico adicionado no início da fermentação em relação ao volume final do meio. P_{x(max)}: produção máxima de etanol em relação a biomassa; S_{x(max)}: consumo máximo de açúcar em relação a biomassa; r_{P(max)}: produtividade máxima; r_{X(max)}: velocidade máxima de crescimento; r_{S(max)}: velocidade máxima de consumo de açúcar; Y_{P/S}: fator de conversão de açúcar em etanol; μ_{P(max)}: velocidade máxima específica de produção de etanol; μ_{S(max)}: velocidade máxima específica de consumo de açúcar.

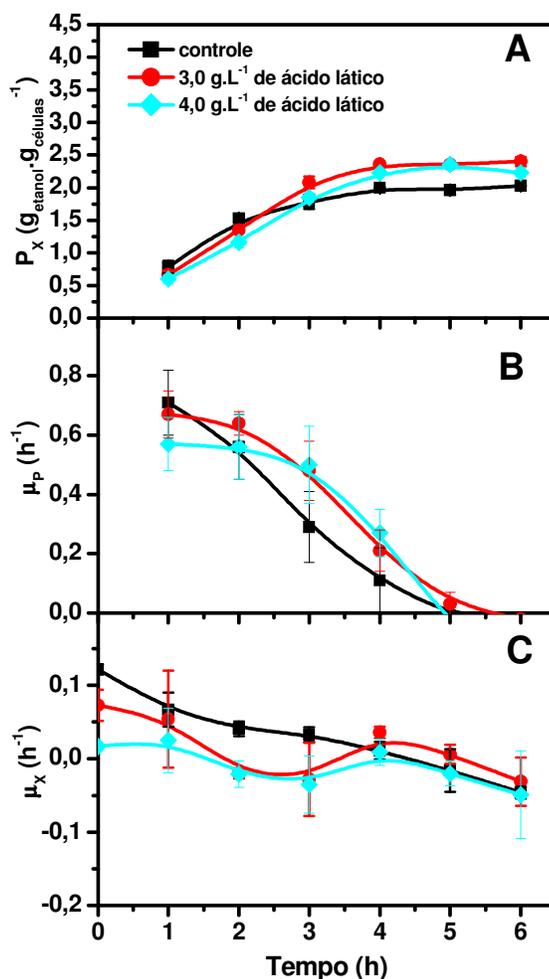


Figura 25- Efeito das concentrações altas de ácido láctico adicionado (3,0 g.L⁻¹ a 4,0 g.L⁻¹) sobre a produção de etanol em células (A), a velocidade específica de produção de etanol (B) e a velocidade específica de crescimento (C) da levedura 63M em função do tempo em batelada simples em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o reajuste do pH inicial para 4,5 (após a inoculação) e a 34 °C.

4.3.2 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES ELEVADAS DE ÁCIDO LÁCTICO (> 1,0 g.L⁻¹) SOBRE CULTURAS DE BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS DE VOLUMES DECRESCENTES

Justificativa

Estudar os efeitos de altas concentrações adicionadas de ácido láctico aos meios em culturas de batelada alimentada por pulsos decrescentes.

Descrição

Nos experimentos anteriores, os melhores processos de produção de etanol pela levedura 63M em presença de baixas concentrações de ácido láctico ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foram tanto o cultivo em batelada alimentada por pulsos quanto o cultivo em batelada simples (ver **item 4.2.2** descrito acima). Diante disto, decidiu-se adicionar concentrações mais altas de ácido láctico ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$, $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$) nas fermentações em batelada alimentada por três pulsos decrescentes (10 mL, 8 mL e 7 mL adicionados em cada hora a partir do instante zero) de solução sacarose 800 g.L^{-1} num intervalo de 2h (ver **item 3.8 de Materiais e Métodos**). As variações em parâmetros cinéticos de fermentação em função do tempo total de fermentação (período de até 6h) em processo de batelada alimentada por pulsos estão descritas na **Figura 22 e Tabela 19**.

Efeito das concentrações altas de ácido láctico adicionado ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$ a $4,0 \text{ g.L}^{-1}$) sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos com o reajuste de pH inicial para 4,5

O açúcar foi totalmente consumido em 6h de fermentação tanto em ausência quanto em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ a $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado como mostrado na **Tabela 19 e Figura 73 (parte A, Anexo C)**.

Os valores de pH no final das fermentações contendo ácido láctico adicionado ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$ a $4,0 \text{ g.L}^{-1}$) não variaram com a concentração do ácido como mostrado na **Tabela 19 e Figura 70 (parte B, Anexo C)**.

As viabilidades iniciais obtidas nas fermentações tanto em ausência quanto em presença do ácido láctico adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) não mostram variações significativas ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 19 e Figura 70 (parte A, Anexo C)**. No entanto, apenas a viabilidade obtida em fermentação contendo $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado diminuiu em relação ao experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 19 e Figura 70 (parte A, Anexo C)**.

As produções de biomassa obtidas no final (X_f) das fermentações em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes a biomassa

observada no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 19** e **parte A da Figura 72 do Anexo C**.

O etanol final produzido (P_f) no final das fermentações contendo $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foi menor do que o etanol do experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 19** e **Figura 71 (parte A, Anexo C)**.

As produções de etanol em células ($P_{x(\max)}$) das fermentações contendo $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico foram menores que a produtividade do experimento-controle ($p < 0,050$, **Tabela 19** e **Figura 26, parte A**). No entanto, o consumo máximo sacarose em células ($S_{x(\max)}$) das fermentações contendo $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico foram maiores que o consumo do experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 19** e **Figura 73 (parte D, Anexo C)**.

As produtividades máximas de etanol ($r_{P(\max)}$) das fermentações em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ a $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes a produtividade observada no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 19** e **Figura 71 (parte B, Anexo C)**. No entanto, as velocidades máximas de crescimento das fermentações em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ a $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram mais lentas que a velocidade do experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 19** e **Figura 72 (parte B, Anexo C)**. Embora, as velocidades máximas de consumo de açúcar das fermentações contendo $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram maiores do que a velocidade observada na fermentação-controle quanto ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 19** e **Figura 73 (parte B, Anexo B)**.

Os rendimentos em etanol ($Y_{P/S}$) das fermentações em presença de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes ao rendimento observado no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos, **Tabela 19**).

A velocidade máxima específica de produção de etanol ($r_{P(\max)}$) das fermentações em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foram semelhantes ao rendimento observado no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 19, Figura 26 (parte B)** e **Figura 70 (parte A, Anexo C)**. Além disto, a velocidade específica de crescimento (r_X) também foi praticamente constante em todos os casos (**parte C da Figura 26**). No entanto, as velocidades máximas específicas de consumo de açúcar ($r_{S(\max)}$) da fermentação contendo $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado foi mais rápidas do que a velocidade

da fermentação-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 19** e **Figura 73 (parte D, Anexo C)**.

Em presença de altas concentrações de ácido láctico, os processos de batelada simples e o processo de batelada alimentada por pulsos foram semelhantes quando comparados pela análise de variância (ANOVA, $p > 0,050$ para todos os parâmetros medidos e calculados).

Tabela 19- Efeito das concentrações altas de ácido láctico adicionado ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$ a $4,0 \text{ g.L}^{-1}$) sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos com o reajuste de pH inicial para 4,5 a $34 \text{ }^\circ\text{C}$.

Parâmetros cinéticos ^{1,2}	Concentração de ácido láctico ³ (g.L^{-1})			
	0,0	2,0	3,0	4,0
Tempo_{final} (h)	6	6	6	6
pH_{inicial}	4,49	4,51	4,53	4,52
pH_{final}	3,41	4,33	4,46	4,56
Viabilidade_{inicial} (%)	<u>98,3±0,1</u>	<u>92,7±1,3</u>	<u>98,4±0,1</u>	<u>97,5±1,9</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,407)	(0,980)	(0,905)
Viabilidade_{final} (%)	<u>95,4±1,1</u>	<u>86,3±3,6</u>	<u>87,0±0,6</u>	79,9±3,0
p (Teste χ^2)	-	(0,137)	(0,200)	(0,014)
Biomassa_{final} (X_f, g.L^{-1})	43,3±0,2 ^a	39,7±0,5 ^a	42,1±1,4 ^a	39,7±1,5 ^a
p (Teste t)	-	(0,010)	(0,465)	(0,180)
[Etanol]_{final} (P, g.L^{-1})	<u>99,0±0,1</u> ^a	<u>86,3±3,6</u> ^a	87,0±0,6 ^b	79,9±3,0 ^b
p (Teste t)	-	(0,058)	(0,005)	(0,012)
[ART]_{final} (g.L^{-1})	1,1±0,1	0,8±0,1	1,2±0,1	1,1±0,1
P_{x(max)} ($\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1}$)	<u>2,50±0,02</u> ^a	2,33±0,02 ^b	2,31±0,02 ^b	2,34±0,04 ^a
p (Teste t)	-	(0,031)	(0,017)	(0,067)
S_{x(max)} ($\text{g}_{\text{açúcar}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1}$)	1,86±0,05 ^a	<u>2,10±0,01</u> ^b	<u>2,14±0,03</u> ^b	1,58±0,02 ^a
p (Teste t)	-	(0,015)	(0,042)	(0,042)
r_{P(max)} ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	28,0±0,3 ^a	28,5±3,8 ^a	25,8±1,4 ^a	26,9±1,6 ^a
p (Teste t)	-	(0,917)	(0,263)	(0,591)
r_{X(max)} ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	<u>1,30±0,01</u> ^a	0,00±0,04 ^b	0,70±0,04 ^b	0,00±0,04 ^b
p (Teste t)	-	(0,001)	(0,004)	(0,001)
r_{S(max)} ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	28,9±1,5 ^a	<u>36,6±0,1</u> ^b	<u>72,9±1,0</u> ^b	<u>31,8±0,1</u> ^b
p (Teste t)	-	(0,001)	(0,000)	(0,004)
Y_{P/S} ($\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{açúcar}}^{-1}$)	0,50±0,10 ^a	0,43±0,03 ^a	0,46±0,05 ^a	0,47±0,02 ^a
p (Teste t)	-	(0,588)	(0,790)	(0,775)
μ_{P(max)} (h^{-1})	0,59±0,04 ^a	0,59±0,09 ^a	0,54±0,04 ^a	0,53±0,06 ^a
p (Teste t)	-	(0,998)	(0,509)	(0,542)
μ_{S(max)} (h^{-1})	0,67±0,02 ^a	<u>0,85±0,03</u> ^b	<u>1,58±0,03</u> ^b	<u>0,70±0,01</u> ^b
p (Teste t)	-	(0,039)	(0,001)	(0,004)

¹ Médias sublinhadas não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste do χ^2 ($\alpha=0,05$);

² Médias indicadas pela mesma letra não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste t ($\alpha=0,05$);

³ Concentração de ácido láctico adicionado no início da fermentação em relação ao volume final do meio. P_{X(max)}: produção máxima de etanol em relação a biomassa; S_{X(max)}: consumo máximo de açúcar em relação a biomassa; r_{P(max)}: produtividade máxima; r_{X(max)}: velocidade máxima de crescimento; r_{S(max)}: velocidade máxima de consumo de açúcar; Y_{P/S}: fator de conversão de açúcar em etanol; μ_{P(max)}: velocidade máxima específica de produção de etanol; μ_{S(max)}: velocidade máxima específica de consumo de açúcar.

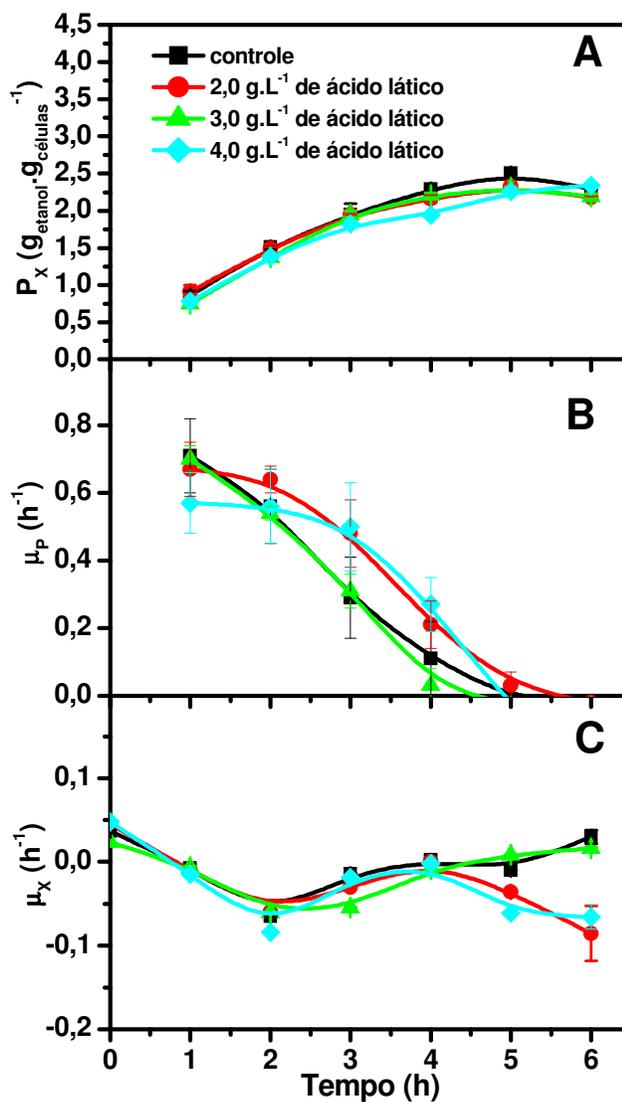


Figura 26- Efeito das concentrações altas de ácido láctico adicionado (2,0 g.L⁻¹ a 4,0 g.L⁻¹) sobre a produção de etanol em células (A), a velocidade específica de produção de etanol (B) e a velocidade específica de crescimento (C) da levedura 63M em função do tempo em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) a 34 °C e com o reajuste do pH inicial para 4,5 (após a inoculação).

4.3.2.1 DISCUSSÃO

A presença de ácido láctico (2,0 g.L⁻¹ a 4,0 g.L⁻¹) no processo de batelada alimentada por pulsos causou reduções no etanol produzido (P), na produção de etanol em relação a biomassa ($P_{X(\max)}$) e na velocidade de crescimento (r_x) enquanto que o consumo de sacarose em relação a biomassa ($S_{X(\max)}$), a velocidade

de consumo de açúcar ($r_{S(max)}$) aumentaram. Comparando-se o presente processo com o mesmo processo conduzido em presença de baixas concentrações de ácido láctico (0 g.L^{-1} a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$), verificou-se que os resultados foram semelhantes nos dois casos, exceto quanto a velocidade máxima de crescimento ($r_{X(max)}$) que foi praticamente nula em altas concentrações de láctico.

4.3.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE EM CULTURAS DE BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS EM PRESENÇA DE ÁCIDO LÁCTICO ADICIONADO ($> 1,0 \text{ g.L}^{-1}$)

Justificativa

O processo de fermentação em batelada alimentada por três pulsos decrescentes de sacarose em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico foi o processo escolhido, pois a produtividade de etanol pela levedura 63M não variou muito em presença de $2,0$ a $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico e mostrou alta retenção de viabilidade (**Tabela 17**). Diante disto, decidiu-se reduzir os efeitos da concentração alta de ácido láctico adicionado, diminuindo a concentração total da solução de sacarose adicionada ao meio de fermentação.

Descrição

Os três pulsos decrescentes (10 mL , 8 mL e 7 mL adicionados em cada hora a partir do instante zero) num intervalo de 2h foram mantidos, mas variou-se a concentração da solução de sacarose de 800 g.L^{-1} para 720 g.L^{-1} e 600 g.L^{-1} . Com isto, as concentrações de sacarose total usadas na alimentação foram, respectivamente, 20% , 18% e 15% em p.v^{-1} (ver **item 3.8 de Materiais e Métodos**). As variações nos parâmetros de fermentação (viabilidade celular, produção de etanol, consumo de sacarose, produção de biomassa e valores de pH) em função do tempo (período de até 6h) no processo de batelada alimentada por pulsos, estão descritas a seguir (**Figura 27 e Tabela 20**). O experimento-controle se refere ao experimento sem adição de ácido láctico e contendo 200 g.L^{-1} de sacarose. Assim

estudou-se o efeito da diminuição da concentração de sacarose em meio contendo 3,0 g.L⁻¹ de ácido adicionado.

Efeito da concentração de sacarose sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos em meio sintético e com 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado e com o reajuste de pH inicial para 4,5

O açúcar foi consumido proporcionalmente com a concentração de sacarose inicial (15% e 20%) nas fermentações em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado como mostrado na **Tabela 20 e Figura 77 (parte A, Anexo C)**. Os valores de pH no final das fermentações contendo 15% e 20% de sacarose e 3,0 g.L⁻¹ ácido láctico adicionado não variaram durante a fermentação como mostrado na **Tabela 20 e Figura 74 (parte B, Anexo C)**.

As viabilidades iniciais e finais, logo após a adição do primeiro pulso, obtidas nas fermentações contendo 15% e 20% de sacarose e 3,0 g.L⁻¹ ácido láctico adicionado não apresentaram variações significativas ($p > 0,050$ em ambos os casos), apesar de todo ácido láctico já estar presente no fermentador no início do processo como mostrado na **Tabela 20 e Figura 74 (parte A, Anexo C)**.

Os acúmulos de biomassa obtidos no final das fermentações contendo 15% e 20% de sacarose e 3,0 g.L⁻¹ ácido láctico adicionado foram semelhantes às biomassas observadas no experimento-controle contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose ($p > 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 20 e Figura 76 (parte A, Anexo C)**.

O etanol final produzido (P_f) nas fermentações contendo 15% e 20% de sacarose e 3,0 g.L⁻¹ ácido láctico adicionado foram menores que o etanol produzidos nos experimentos-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 20 e Figura 75 (parte A, Anexo C)** contendo 20% de sacarose mas sem ácido láctico, como esperado pela diminuição na concentração do açúcar. Como os rendimentos ($Y_{P/S}$) foram iguais entre experimentos contendo ácido láctico (**Tabela 20**), supõem-se que a adição do ácido não interferiu na produção de etanol.

As produção de etanol em relação à biomassa ($P_{x(max)}$) em fermentações contendo 15% e 20% de sacarose e 3,0 g.L⁻¹ ácido láctico adicionado foram menores

que a produção obtida no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 20** e **Figura 27 (parte C)**. Além disto, o consumo de sacarose em relação à biomassa ($S_{x(max)}$) em fermentações contendo 15% e 20% de sacarose e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ácido láctico adicionado também foram menores que o mesmo consumo do experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 20** e **Figura 77 (parte C, Anexo C)**.

As produtividades máximas de etanol ($r_{P(max)}$) em fermentações contendo de 15% de sacarose e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ácido láctico adicionado foram menores do que à produtividade no experimento-controle ($p > 0,050$) como mostrado na **Tabela 20** e **Figura 75 (parte B, Anexo C)** o qual contém maior quantidade de açúcar. No entanto, as velocidades máximas de crescimento (r_x) das fermentações contendo 15% a 18% de sacarose e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ácido láctico adicionado foram maiores que a mesma velocidade do experimento-controle ($p < 0,050$, **Tabela 20** e **Figura 76, parte B, Anexo C**) enquanto que a velocidade máxima de crescimento (r_x) na fermentação contendo 20% de sacarose adicionado foi menor ($p < 0,050$, **Tabela 20** e **Figura 27, parte C**). A velocidade máxima de consumo de açúcar ($r_{S(max)}$) na fermentação contendo de 15% de sacarose e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ácido láctico adicionado também foi menor do que a velocidade observada na fermentação-controle ($p < 0,050$, **Tabela 20** e **Figura 69, parte B, Anexo C**) enquanto a velocidade máxima de consumo de açúcar ($r_{S(max)}$) em meio contendo de 20% de sacarose e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ácido láctico adicionado (em relação ao volume final de meio) foi maior do que a velocidade observada na fermentação-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 20** e **Figura 77, parte B, Anexo C**.

Os rendimentos em etanol ($Y_{P/S}$) das fermentações 15% a 20% de sacarose e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ácido láctico adicionado foram semelhantes ao rendimento observado no experimento-controle ($p > 0,050$ em ambos os casos, **Tabela 20**).

A velocidade máxima específica de produção de etanol da fermentação contendo de 15% de sacarose e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ácido láctico adicionado foi menor do que a velocidade observada na fermentação-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 20** e **Figura 27 (parte B)**. Além disto, a velocidade máxima específica de consumo de açúcar ($\mu_{S(max)}$) na fermentação contendo 15% de sacarose e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ácido láctico adicionado foi menor do que a velocidade observada na fermentação-controle ($p < 0,050$, **Tabela 20** e **Figura 77, parte D, Anexo C**) enquanto que a velocidade

máxima de consumo de açúcar ($\mu_{S(\text{máx})}$) no meio contendo 20% de sacarose e 3,0 g.L⁻¹ ácido láctico adicionado foi maior do que a velocidade observada na fermentação-controle quanto ($p < 0,050$, **Tabela 20**). No entanto, a velocidade específica de crescimento também não variou em todos os casos (**Tabela 20 e Figura 27, parte C**).

Tabela 20- Efeito da concentração de sacarose sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos em meio sintético e com 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado e com o reajuste de pH inicial para 4,5 a 34 °C.

Parâmetros cinéticos ^{1,2}	Concentração total de sacarose ³ (% p.v ⁻¹)			
	20 (sem ác láctico)	15	18	20
Tempo_{final} (h)	6	3	4	6
pH_{inicial}	4,49	4,52	4,53	4,53
pH_{final}	3,41	4,33	4,30	4,46
Viabilidade_{inicial} (%)	<u>98,3±0,1</u>	<u>93,7±0,5</u>	<u>94,9±0,4</u>	<u>98,4±0,1</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,498)	(0,621)	(0,980)
Viabilidade_{final} (%)	<u>95,4±1,1</u>	<u>89,1±1,5</u>	<u>89,2±2,6</u>	<u>87,0±0,6</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,300)	(0,405)	(0,200)
Biomassa_{inicial} (g.L⁻¹)	46,0±0,1 ^a	47,3±1,4 ^a	49,0±0,4 ^a	46,6±1,4 ^a
p (Teste t)	-	(0,413)	(0,058)	(0,673)
Biomassa_{final} (X_f, g.L⁻¹)	43,3±0,2 ^a	42,3±0,5 ^a	42,6±1,4 ^a	42,1±1,4 ^a
p (Teste t)	-	(0,220)	(0,075)	(0,465)
[Etanol]_{final} (P, g.L⁻¹)	99,0±0,1 ^a	61,3±0,2 ^b	78,8±0,4 ^b	87,0±0,6 ^b
p (Teste t)	-	(0,000)	(0,000)	(0,005)
[ART]_{final} (g.L⁻¹)	1,1±0,1	0,8±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1
P_{X(máx)} (g_{etanol}·g_{células}⁻¹)	2,50±0,02 ^a	1,45±0,01 ^b	1,85±0,01 ^b	2,31±0,02 ^b
p (Teste t)	-	(0,012)	(0,002)	(0,017)
S_{X(máx)} (g_{açúcar}·g_{células}⁻¹)	1,86±0,0 ^a	1,09±0,02 ^b	1,27±0,01 ^b	2,14±0,03^b
p (Teste t)	-	(0,019)	(0,031)	(0,042)
r_{P(max)} (g.L⁻¹·h⁻¹)	28,0±0,3 ^a	17,2±0,8 ^b	26,1±4,3 ^a	25,8±1,4 ^a
p (Teste t)	-	(0,006)	(0,737)	(0,263)
r_{X(max)} (g.L⁻¹·h⁻¹)	1,30±0,01 ^a	4,40±0,01 ^b	2,80±0,02^b	0,70±0,04 ^b
p (Teste t)	-	(0,000)	(0,000)	(0,004)
r_{S(max)} (g.L⁻¹·h⁻¹)	28,9±1,5 ^a	25,5±0,1 ^b	28,5±0,2 ^a	72,9±1,0^b
p (Teste t)	-	(0,003)	(0,252)	(0,000)
Y_{P/S} (g_{etanol}·g_{açúcar}⁻¹)	0,50±0,10 ^a	0,29±0,03 ^a	0,38±0,05 ^a	0,46±0,05 ^a
p (Teste t)	-	(0,160)	(0,434)	(0,790)
μ_{P(max)} (h⁻¹)	0,59±0,04 ^a	0,36±0,02 ^b	0,53±0,04 ^a	0,54±0,04 ^a
p (Teste t)	-	(0,039)	(0,651)	(0,509)
μ_{S(max)} (h⁻¹)	0,67±0,02 ^a	0,52±0,01 ^b	0,61±0,03 ^a	1,58±0,03^b
p (Teste t)	-	(0,030)	(0,144)	(0,001)

¹ Médias sublinhadas não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste do χ^2 ($\alpha=0,05$);

² Médias indicadas pela mesma letra não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste t ($\alpha=0,05$);

³ Concentração de ácido láctico adicionado no início da fermentação em relação ao volume final do meio. P_{X(max)}: produção máxima de etanol em relação a biomassa; S_{X(max)}: consumo máximo de açúcar em relação a biomassa; r_{P(max)}: produtividade máxima; r_{X(max)}: velocidade máxima de crescimento; r_{S(max)}: velocidade máxima de consumo de açúcar; Y_{P/S}: fator de conversão de açúcar em etanol; μ_{P(max)}: velocidade máxima específica de produção de etanol; μ_{S(max)}: velocidade máxima específica de consumo de açúcar.

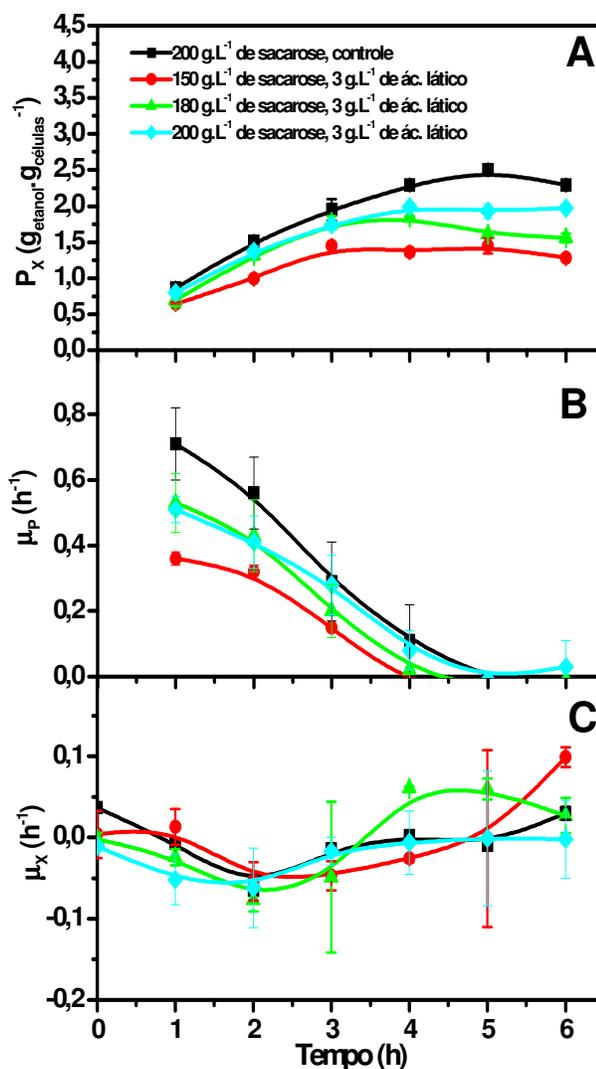


Figura 27- Efeito da concentração de sacarose (15% a 20% em p.v⁻¹) sobre a produção de etanol em células (A), a velocidade específica de produção de etanol (B) e a velocidade específica de crescimento (C) da levedura 63M em função do tempo de fermentações em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de hora em hora em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) e 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado. As fermentações foram realizadas com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) e a 34 °C.

4.3.3.1 DISCUSSÃO

A redução da concentração de açúcar em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado diminuiu as velocidades de produção de etanol (r_P) e consumo de açúcar (r_S) sem alterações nos rendimentos em etanol ($Y_{P/S}$), biomassa (X) e viabilidade final. Por outro lado, houve diminuição na velocidade de produção de etanol (r_P) durante a

fermentação de 15% (p.v⁻¹) de sacarose apesar de não haver diferença entre os rendimentos ($Y_{P/S}$). Esta redução na concentração total de sacarose levou a reduções no etanol produzido em relação a biomassa ($P_{x(\text{máx})}$), na produtividade máxima de etanol ($r_{P(\text{máx})}$), na velocidade máxima de consumo de açúcar ($r_{S(\text{máx})}$), além das velocidades máximas específicas de produção de etanol ($\mu_{P(\text{máx})}$) e consumo de sacarose ($\mu_{S(\text{máx})}$). Em trabalhos anteriores, tanto a queda na utilização de glicose quanto à formação de etanol (redução em 50% em presença de ácido láctico da ordem de 2,5% , p.v⁻¹) foram proporcionais à quantidade de ácido não dissociado (NARENDRANATH *et al.*, 2007).

4.3.4 EFEITO DA QUANTIDADE DE INÓCULO EM CULTURAS EM BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS EM PRESENÇA DE ÁCIDO LÁCTICO ADICIONADO

Justificativa

Apesar do planejamento fatorial ter mostrado a necessidade de aumentar a quantidade do inóculo quando a quantidade de ácido láctico aumenta na fermentação contendo concentrações elevadas de açúcar, decidimos estudar os efeitos da redução do tamanho dos inóculo nos experimentos descrito a seguir.

Descrição

O processo de batelada alimentada por três pulsos decrescentes de sacarose foi o processo de produção de etanol selecionado para estudo (**Tabela 19**). Diante disto, decidiu-se estudar os efeitos da redução da quantidade de inóculo inicial adicionada às fermentações de 4% (p.v⁻¹) para 2% e 3% (p.v⁻¹, em relação ao volume final de meio), em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado e com uma concentração reduzida de sacarose 18% (p.v⁻¹). A sacarose foi reduzida com a intenção de aumentar o acúmulo de biomassa, indispensável para a reutilização sucessiva de células. Os três pulsos decrescentes (10 mL, 8 mL e 7 mL adicionados

a cada hora a partir do instante zero) foram adicionados num intervalo de 2h (ver **item 3.8 de MATERIAIS e MÉTODOS**).

As variações nos parâmetros medidos e calculados das fermentações em função do tempo (período de até 6h) no processo de batelada alimentada por pulsos estão descritas abaixo (**Figura 28 e Tabela 21**):

Efeito da quantidade de inóculo sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos em meio sintético contendo um total de 18% (p.v⁻¹) de sacarose em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado

O açúcar foi consumido mais rapidamente (4h) apenas na fermentação iniciada com 4% (p.v⁻¹) de células e em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado do que no experimento-controle sem ácido láctico (6h, sem ácido láctico) e nas fermentações iniciadas com 2% e 3% (p.v⁻¹) de células como mostrado na **Tabela 21 e Figura 81 (parte A, Anexo C)**.

Os valores de pH no final das fermentações iniciadas com 2% a 4% (p.v⁻¹) de inóculo e em presença de 3,0 g.L⁻¹ ácido láctico adicionado não variaram com o tempo de fermentação como mostrado na **Tabela 21 e Figura 78 (parte B, Anexo C)**.

A viabilidade inicial e a viabilidade final observadas na fermentação iniciada com 2% (p.v⁻¹) de inóculo e 3,0 g.L⁻¹ ácido láctico adicionado foram menores que a viabilidade observada no experimento-controle ($p < 0,050$, **Tabela 21 e Figura 78, parte A, Anexo C**) enquanto que as mesmas variações não foram observadas com quantidades maiores de inóculo.

O etanol final produzido (P) nas fermentações iniciadas com 2% a 4% (p.v⁻¹) de inóculo e em presença de 3,0 g.L de ácido láctico adicionado não sofreu e foi semelhante ao etanol produzido no experimento-controle ($p > 0,050$ em todos os casos) como mostrado na **Tabela 21 e Figura 79 (parte A, Anexo C)**.

Apenas a produção máxima de etanol em relação a biomassa ($P_{x(max)}$) obtida na fermentação iniciada com 2% (p.v⁻¹) de inóculo e em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foi maior do que a produção observada no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 21 e Figura 28 (parte C)**. No entanto,

o consumo máximo de sacarose em relação a biomassa ($S_{x(max)}$) obtida na fermentação iniciada com 2% ($p.v^{-1}$) de células e em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado também foi maior do que o consumo observada no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 21** e **Figura 81 (parte C, Anexo C) Tabela 21)**.

Tabela 21- Efeito da quantidade de inóculo sobre os parâmetros cinéticos de fermentação da levedura 63M em batelada alimentada por pulsos em meio sintético contendo um total de 18% ($p.v^{-1}$) de sacarose em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado a $34 \text{ }^\circ\text{C}$.

Parâmetros cinéticos ^{1,2}	Concentração de inóculo adicionado ³ (% $p.v^{-1}$)			
	4 (cont)	2	3	4
Tempo _{final} (h)	6	6	6	4
pH _{inicial}	4,50	4,50	4,50	4,53
pH _{final}	3,41	4,42	4,26	4,30
Viabilidade _{inicial} (%)	<u>96,5±3,1</u>	83,1±3,3	<u>90,5±0,2</u>	<u>94,9±0,4</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,039)	(0,671)	(0,832)
Viabilidade _{final} (%)	<u>93,5±3,7</u>	69,9±3,6	<u>88,0±3,5</u>	<u>89,2±2,6</u>
p (Teste χ^2)	-	(0,000)	(0,657)	(0,532)
Biomassa _{inicial} (g.L^{-1})	46,8±0,1	24,5±1,2	38,1±5,5	49,0±0,4
Biomassa _{final} (X_f , g.L^{-1})	42,7±1,3	22,0±1,4	34,6±1,4	42,6±1,4
p (Teste t)	-	-	-	-
[Etanol] _{final} (P, g.L^{-1})	85,5±4,0 ^a	67,0±1,6 ^a	75,0±2,9 ^a	73,7±1,3 ^a
p (Teste t)	-	(0,068)	(0,190)	(0,406)
[ART] _{final} (g.L^{-1})	1,5±0,1	1,7±0,1	1,7±0,1	1,8±0,1
$P_{x(max)}$ ($\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1}$)	<u>2,09±0,04</u> ^a	3,05±0,10 ^b	<u>1,61±0,02</u> ^a	<u>1,97±0,03</u> ^a
p (Teste t)	-	(0,039)	(0,285)	(0,746)
$S_{x(max)}$ ($\text{g}_{\text{açúcar}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1}$)	1,55±0,08 ^a	<u>3,89±0,05</u> ^b	1,27±0,01 ^a	1,40±0,01 ^a
p (Teste t)	-	(0,017)	(0,142)	(0,865)
$r_{P(max)}$ ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	<u>19,7±0,8</u> ^a	14,7±0,6 ^b	<u>26,1±4,3</u> ^a	<u>18,8±2,4</u> ^a
p (Teste t)	-	(0,039)	(0,285)	(0,746)
$r_{X(max)}$ ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	0,95±0,03 ^a	0,45±0,04 ^b	<u>2,80±0,02</u> ^b	0,10±0,05 ^b
p (Teste t)	-	(0,010)	(0,000)	(0,005)
$r_{S(max)}$ ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	27,1±0,1 ^a	24,1±1,0 ^a	<u>28,5±0,2</u> ^b	27,2±2,8 ^a
p (Teste t)	-	(0,093)	(0,021)	(0,685)
$Y_{P/S}$ ($\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{açúcar}}^{-1}$)	0,43±0,07 ^a	0,34±0,03 ^a	0,40±0,03 ^a	0,41±0,06 ^a
p (Teste t)	-	(0,336)	(0,662)	(0,803)
$\mu_{P(max)}$ (h^{-1})	0,42±0,02 ^a	<u>0,65±0,05</u> ^b	0,53±0,09 ^a	0,41±0,06 ^a
p (Teste t)	-	(0,046)	(0,367)	(0,871)
$\mu_{S(max)}$ (h^{-1})	0,63±0,01 ^a	<u>1,08±0,06</u> ^b	0,61±0,01 ^a	0,62±0,05 ^a
p (Teste t)	-	(0,017)	(0,142)	(0,853)

¹ Médias sublinhadas não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste do χ^2 ($\alpha=0,05$);

² Médias indicadas pela mesma letra não diferem do experimento controle (sem ácido láctico) pelo teste t ($\alpha=0,05$);

³ Concentração de ácido láctico adicionado no início da fermentação em relação ao volume final do meio. $P_{x(max)}$: produção máxima de etanol em relação a biomassa; $S_{x(max)}$: consumo máximo de açúcar em relação a biomassa; $r_{P(max)}$: produtividade máxima; $r_{X(max)}$: velocidade máxima de crescimento; $r_{S(max)}$: velocidade máxima de consumo de açúcar; $Y_{P/S}$: fator de conversão de açúcar em etanol; $\mu_{P(max)}$: velocidade máxima específica de produção de etanol; $\mu_{S(max)}$: velocidade máxima específica de consumo de açúcar.

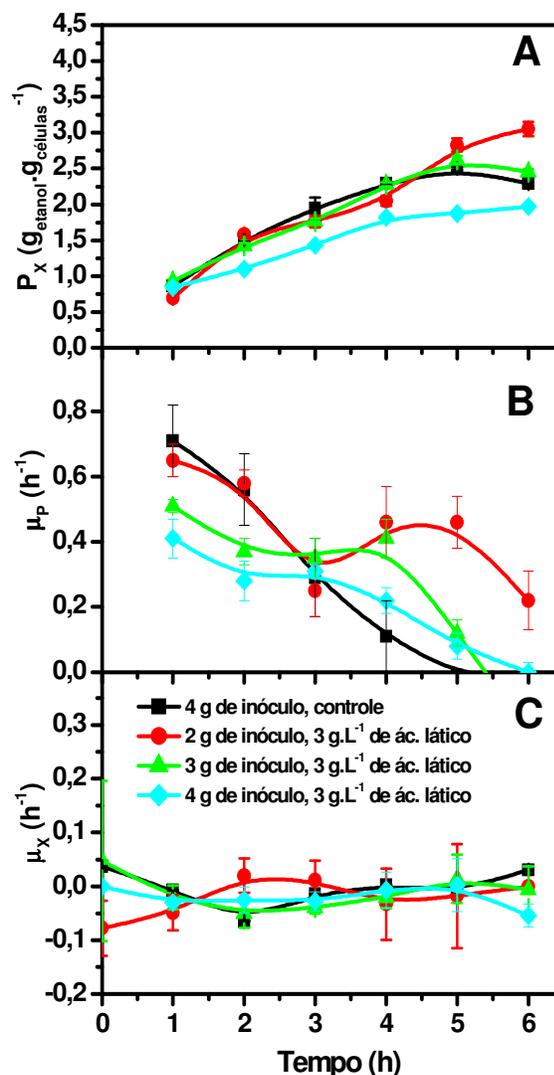


Figura 28- Efeito da concentração de inóculo (2% a 4%, p.v⁻¹ em relação ao volume total de meio) sobre os parâmetros fermentativos da levedura 63M em função do tempo de fermentações em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado. As fermentações foram realizadas com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) e a 34 °C.

Apenas a produtividade máxima de etanol ($r_{P(\max)}$) obtida na fermentação iniciada com 2% (p.v⁻¹) de células e em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foi menor do que a produtividade obtida no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 21** e **Figura 79 (parte B, Anexo C)**. Assim, a produtividade máxima diminuiu com o tamanho do inóculo. As velocidades máximas de crescimento (r_x) obtidas nas fermentações iniciadas com 2% a 4% (p.v⁻¹) de

inóculo e em presença de 3,0 g.L de ácido láctico adicionado foram semelhantes a mesma velocidade obtida no experimento-controle ($p > 0,050$, **Tabela 21 e Figura 80, parte B, Anexo C**). Apenas a velocidade máxima de consumo de açúcar ($r_{S(\max)}$) obtida na fermentação iniciada com 3% ($p.v^{-1}$) de células e em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foi maior do que a velocidade obtida no experimento-controle ($p < 0,050$) como mostrado na **Tabela 21 e Figura 81 (parte B, Anexo C)**.

Os rendimentos em etanol ($Y_{P/S}$) obtidos nas fermentações iniciadas com 2% a 4% ($p.v^{-1}$) de inóculo e em presença de 3,0 g.L de ácido láctico adicionado foram semelhantes o rendimento obtido no experimento-controle ($p > 0,050$ em todas as quantidades de inóculo estudadas, **Tabela 21**).

Tanto a velocidade máxima específica de produção de etanol ($\mu_{P(\max)}$) quanto a velocidade máxima específica de consumo de açúcar ($\mu_{S(\max)}$) obtidas na fermentação iniciada com 2% ($p.v^{-1}$) de células e em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado foram maiores do que as mesmas velocidades observadas no experimento-controle ($p < 0,050$ em ambos os casos) como mostrado na **Tabela 21 e Figura 81 (parte D, Anexo C para μ_S) e Figura 28 (parte B para μ_P)**. No entanto, a velocidade específica de crescimento (μ_X) também foi praticamente constante em todos os casos (**Figura 28, parte C**).

4.3.4.1 DISCUSSÃO

No processo de batelada alimentada por pulsos em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico, as altas densidades de células contribuíram mais efetivamente para a manutenção da viabilidade da levedura 63M. Isto sugere que altas densidades de células são indispensáveis em fermentações na presença de altas concentrações de ácido láctico. A diminuição da quantidade de inóculo inicial de 4% para 2% ($p.v^{-1}$) levou a quedas nos valores de etanol final produzido (P_f) e na produtividade de etanol (r_p), mas aumentou a produção de etanol em relação a biomassa (P_X), as velocidades específicas de produção de etanol (μ_P) e consumo de açúcar (μ_S). Porém, a menor perda em viabilidade foi obtida na fermentação iniciada com 4% ($p.v^{-1}$) inóculo. NGANG *et al.* (1989) mostraram que o efeito tóxico do ácido láctico depende também da pressão osmótica do meio, da concentração de ácidos orgânicos e do número de células de levedura. DORTA *et al.* (2006) observaram

que leveduras perderam até 40% da viabilidade em fermentações em meio semi-sintético em batelada alimentada por pulsos contendo 6 g.L^{-1} de ácido láctico e 200 mg.L^{-1} de sulfito.

4.3.5 EFEITO GRADUAL DA ADIÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO JUNTAMENTE COM A SACAROSE DURANTE A ALIMENTAÇÃO DO REATOR POR PULSOS DE pH AJUSTADO PARA 4,5

Justificativa

Como em destilarias, a acidez láctica do processo depende da adição gradual do mosto durante o enchimento da dorna, decidimos adicionar pulsos contendo sacarose e ácido láctico em vez de adicionar todo o ácido no início da fermentação.

Descrição

Um ciclo de fermentação em batelada alimentada por pulsos de solução de sacarose (180 g.L^{-1} com relação ao volume final no reator) e 40 g.L^{-1} de células (concentração com relação ao final de alimentação) foram realizados a $34 \text{ }^\circ\text{C}$ em duas condições diferentes: **-condição convencional A-** adição de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico simultaneamente com solução de NaOH 3M após a adição do primeiro pulso de sacarose (10 mL) estoque de solução 720 g.L^{-1} ; **-condição B-** adição de três pulsos decrescentes da mistura de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico simultaneamente com solução 720 g.L^{-1} de sacarose neutralizado com NaOH 3M (14 mL, 11 mL e 10 mL).

Viabilidade celular

A **parte A** da **Figura 29** mostra que não houve perdas de viabilidade da levedura 63M tanto na fermentação em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado no início quanto na fermentação quanto com $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado junto com os pulsos de a sacarose.

Produção de etanol

A **parte B** da **Figura 29** mostra que a produção de etanol pela levedura 63M foi maior na fermentação em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado no início da na fermentação do que quando o ácido láctico foi adicionado junto com a sacarose.

Produção de biomassa

A **parte A** da **Figura 30** mostra a produção de biomassa pela levedura 63M não variou durante a fermentação em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado no início da fermentação. No entanto, perdas em biomassa ocorreram quando o ácido láctico foi adicionado junto com os pulsos de sacarose.

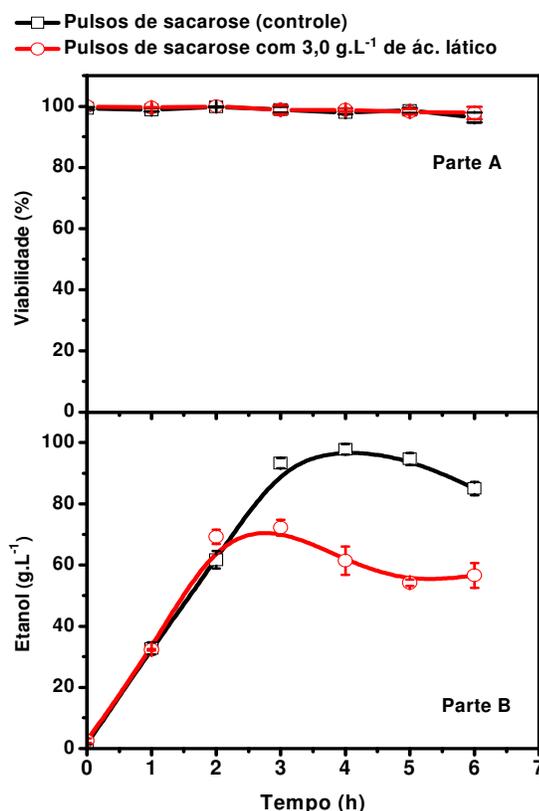


Figura 29- Efeito da adição de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ (em relação ao volume total de meio) de ácido láctico no início do processo (-◇-) e nos pulsos junto com a alimentação com sacarose (-x-) sobre a viabilidade (parte A) e o etanol produzido (parte B) da levedura 63M em função do tempo de fermentações em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 720 g.L^{-1} adicionados a cada hora em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998). As fermentações foram realizadas com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) e a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Valores de pH

A **parte B** da **Figura 30** mostra que os valores de pH inicial permaneceram constantes nos dois tipos de adição de ácido lático.

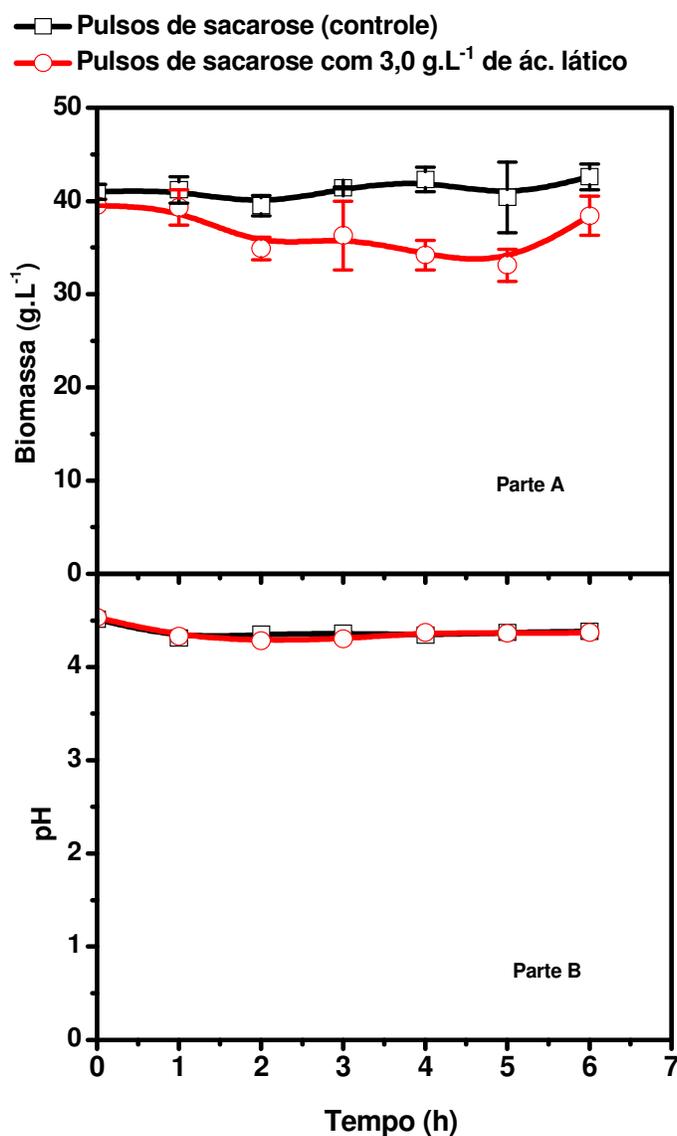


Figura 30- Efeito da adição de 3,0 g.L⁻¹ (em relação ao volume total de meio) de ácido lático no início do processo (-◇-) e nos pulsos junto com a alimentação com sacarose (-x-) sobre a produção de biomassa (parte A) e valores de pH (parte B) da levedura 63M em função do tempo de fermentações em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 720 g.L⁻¹ adicionados a cada hora em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998). As fermentações foram realizadas com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) e a 34 °C.

4.3.5.1 DISCUSSÃO

A estratégia de adicionar o ácido láctico gradualmente junto com os pulsos de sacarose de pH ajustado para 4,5 foi prejudicial ao processo.

4.4 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ENRIQUECIMENTO DE CÉLULAS ENTRE CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO EM PRESENÇA DE ÁCIDO LÁCTICO

Justificativa

O objetivo deste tópico consistiu em estabelecer um meio para reativação do leite de levedura entre um ciclo de fermentação e outro. Um operador único não consegue fazer fermentações sucessivas durante dias sem descanso.

Descrição

Aproveitando as células obtidas no final das fermentações descritas no item anterior (**4.3.5 de Resultados e Discussão**), as quais foram realizadas em duas condições diferentes de adição do ácido láctico. Estes dois tipos de células foram coletados e incubados em quatro meios de enriquecimento diferentes. As variações em viabilidade e biomassa foram medidas no início e no final da estocagem das células de levedura.

A **Tabela 22** mostra que a viabilidade e a biomassa no início e no final de cada período de estocagem de 16 horas sob agitação (125 rpm) a 30 °C. O melhor meio de enriquecimento foi o meio de composição **C** (20 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 100 g.L⁻¹ sacarose e pH 4,0) tanto para a manter viabilidade quanto para a aumentar a biomassa (aumento de 39-45%) usando-se as células coletadas no final dos dois tipos de processo que variaram quanto a forma de adição do ácido láctico. No entanto, a melhor condição para o brotamento foi um outro meio condição **D** (0,4 g.L⁻¹ de lisina, 100 g.L⁻¹ sacarose e pH 4,0).

Tabela 22-Efeito da composição do meio de enriquecimento da levedura 63M^(a) por 16 horas e a ser utilizado como inóculo de ciclos de fermentação a serem realizados em dias consecutivos.

Aditivos usados no meio de enriquecimento	Viabilidade (%)		Brotos (%)	Biomassa (g.L ⁻¹)	
	Inicial	Final	Final	Inicial	Final
Células resultantes da fermentação em meio contendo ác. láctico adicionado inicialmente					
Meio C (EL 20 g.L ⁻¹)	97,1 ± 2,4	95,3 ± 4,0 (-0,3%)	65,4 ± 3,3	16,2 ± 1,6	29,5 ± 0,8 (45%)
Meio D (lisina 0,4 g.L ⁻¹)	96,5 ± 3,8	88,0 ± 2,8 (-18,1%)	77,4 ± 4,0	16,6 ± 1,2	17,0 ± 0,2 (2,2%)
Meio E (peptona 20 g.L ⁻¹)	95,7 ± 1,7	68,1 ± 3,7 (-22,4%)	62,2 ± 4,4	16,3 ± 0,9	20,0 ± 0,5 (18,5%)
Meio F (EL 20 g.L ⁻¹ , lisina 0,4 g.L ⁻¹ , peptona 20 g.L ⁻¹)	96,8 ± 3,6	95,4 ± 0,9 (-1,0%)	47,2 ± 2,9	16,4 ± 0,7	22,0 ± 0,6 (25,5%)
Células resultantes da fermentação em meio alimentado com a mistura de ác. láctico e sacarose					
Meio C (EL 20 g.L ⁻¹)	96,9 ± 1,3	96,6 ± 0,8 (-1,9%)	45,3 ± 2,6	15,3 ± 1,9	25,0 ± 0,9 (38,6%)
Meio D (lisina 0,4 g.L ⁻¹)	95,8 ± 2,7	81,1 ± 1,7 (-9,7%)	54,4 ± 3,2	17,6 ± 2,8	21,0 ± 0,4 (16,2%)
Meio E (peptona 20 g.L ⁻¹)	96,1 ± 2,2	78,5 ± 2,5 (-40,5%)	77,4 ± 3,0	16,9 ± 1,0	20,7 ± 0,5 (18,6%)
Meio F (EL 20 g.L ⁻¹ , lisina 0,4 g.L ⁻¹ , peptona 20 g.L ⁻¹)	97,2 ± 0,9	96,2 ± 2,5 (-1,5%)	42,0 ± 2,7	16,2 ± 0,5	19,1 ± 0,2 (14,8%)

^(a) Meios contendo 100 g.L⁻¹ de sacarose, 15 g.L⁻¹ de células, pH 4,0, a 30 °C e 125 rpm; EL: extrato de levedura. As variações em biomassa e viabilidade estão em parênteses.

4.4.1 DISCUSSÃO

Foi possível manter o leite de levedura por 16H a 30 °C sendo escolhido para isto o meio contendo 2,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura 10 g.L⁻¹ de sacarose a pH 4,0. Este tipo de estudo é importante para manter o leite de levedura quando ocorre paradas no processo em destilarias.

4.5 CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO EM PRESENÇA DE ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO COM A LEVEDURA 63M

4.5.1 TENTATIVAS DE REALIZAR CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO EM PRESENÇA DE 3,0 g.L⁻¹ DE ÁCIDO LÁTICO ADICIONADO

Justificativas

A intenção foi simular a operação de uma destilaria com reutilização de células em presença de ácido lático.

Descrição

As **Figuras 31 a 35** mostram os efeitos dos ciclos sucessivos de fermentação sobre os parâmetros de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose. Ciclos sucessivos de fermentação realizados com a linhagem 63M em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L⁻¹ de sacarose e uma quantidade de inóculo de 40 g.L⁻¹ em presença de 3,0 g.L⁻¹ (em relação ao volume final de meio) de ácido lático foram realizados a 34 °C. Tanto no segundo quanto no terceiro ciclo de fermentação, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura foi adicionado no meio de fermentação (meio controle e experimento contendo 3,0 g.L⁻¹ de ácido lático) por causa das grandes perdas em biomassa no final do primeiro ciclo de fermentação que não foi recuperada de forma suficiente durante a reativação.

Viabilidade celular

A **Figura 31** mostra as variações em viabilidade durante três ciclos de fermentação. A viabilidade praticamente não variou no experimento-controle. No entanto, houve pouca perda de viabilidade durante os três ciclos em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido lático.

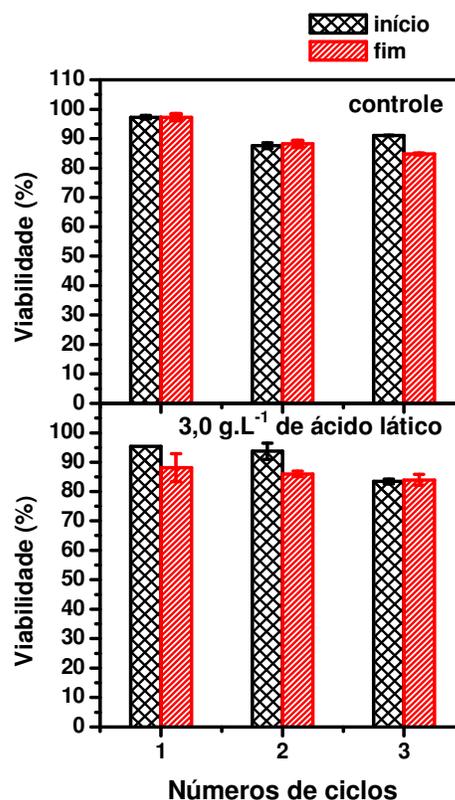


Figura 31 – Efeito da presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico sobre a viabilidade da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose (180 g.L⁻¹ e uma quantidade de células de 40 g.L⁻¹ no final da fermentação a 34 °C). As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

Brotamento

A **Figura 32** mostra as variações no brotamento durante três ciclos de fermentação. O brotamento praticamente não variou no primeiro ciclo do experimento-controle, mas houve redução na porcentagem de brotos no segundo e no terceiro ciclo de fermentação do experimento-controle. No entanto, o brotamento praticamente não variou no primeiro ciclo em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico, sendo que houve aumento de brotamento no segundo ciclo e redução no terceiro, ambos em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico.

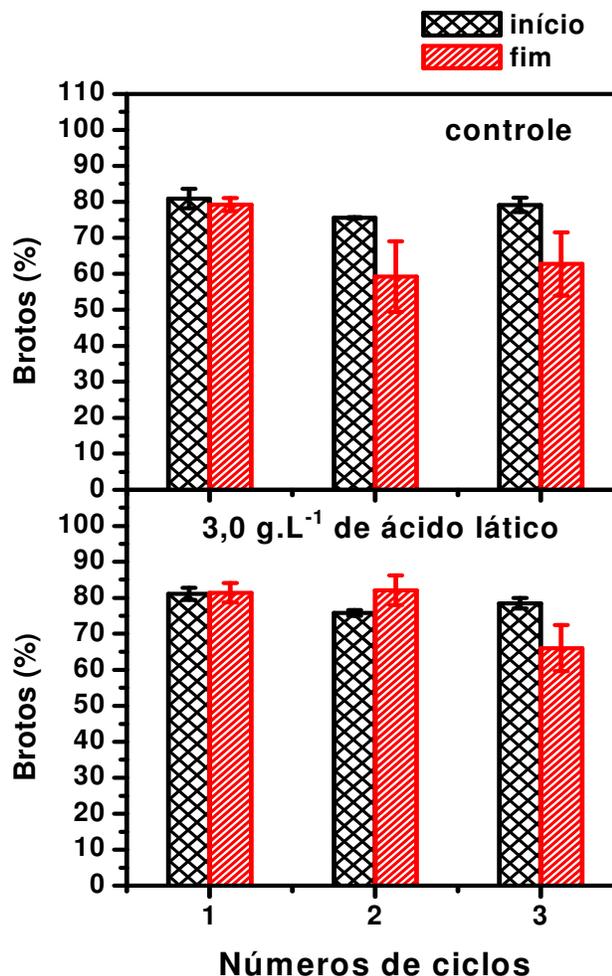


Figura 32– Efeito da presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico sobre o brotamento da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose (180 g.L⁻¹ uma quantidade de células de 40 g.L⁻¹ no final da fermentação a 34°C). As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo de fermentação.

Produção de etanol

A **Figura 33** mostra o etanol produzido durante três ciclos de fermentação. O etanol produzido teve uma leve redução ao longo dos ciclos no experimento-controle. No entanto, etanol produzido teve aumento ao longo dos ciclos em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico para depois decair nos ciclos seguintes.

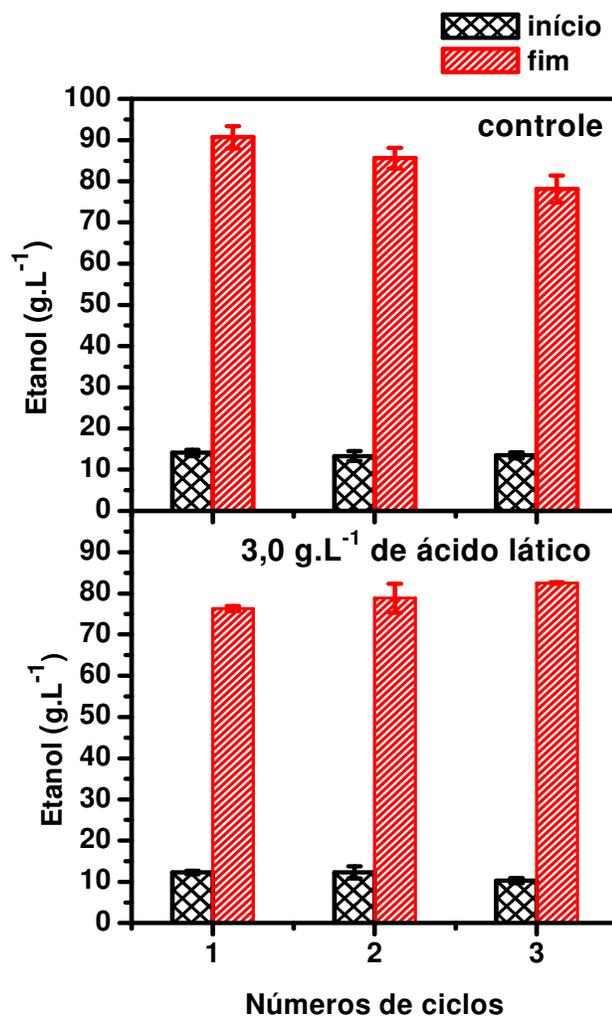


Figura 33– Efeito da presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico a produção de etanol da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose (180 g.L⁻¹ uma quantidade de células de 40 g.L⁻¹ no final da fermentação a 34 °C). As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo de fermentação.

Produção de biomassa

A **Figura 34** mostra a produção de biomassa durante três ciclos de fermentação. Houve um acúmulo de biomassa no primeiro ciclo do experimento-controle, mas houve redução da biomassa no segundo e no terceiro ciclo de fermentação do experimento-controle. No entanto, houve redução da biomassa no primeiro ciclo em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico, sendo que não houve

variação de biomassa no segundo ciclo e redução na biomassa no terceiro, ambos em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico.

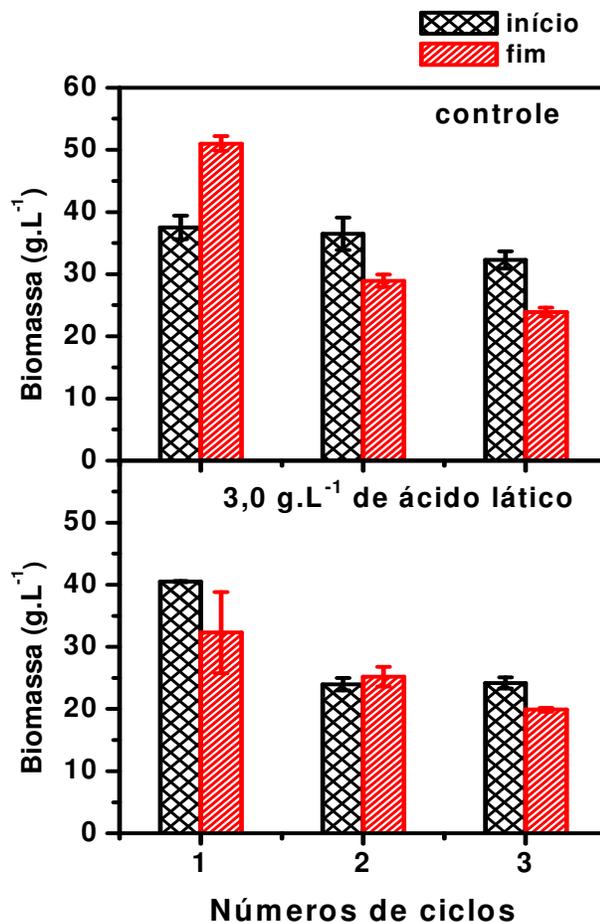


Figura 34– Efeito da presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico a produção de biomassa da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose (180 g.L^{-1} uma quantidade de células de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$). As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo de fermentação.

Valores de pH

A **Figura 35** mostra as variações nos valores de pH durante três ciclos de fermentação. Os valores do pH inicial de 4,5 foram reduzidos no final das fermentações do experimento-controle. No entanto, os valores do pH inicial de 4,5

foram mantidos ao longo dos ciclos de fermentação em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico.

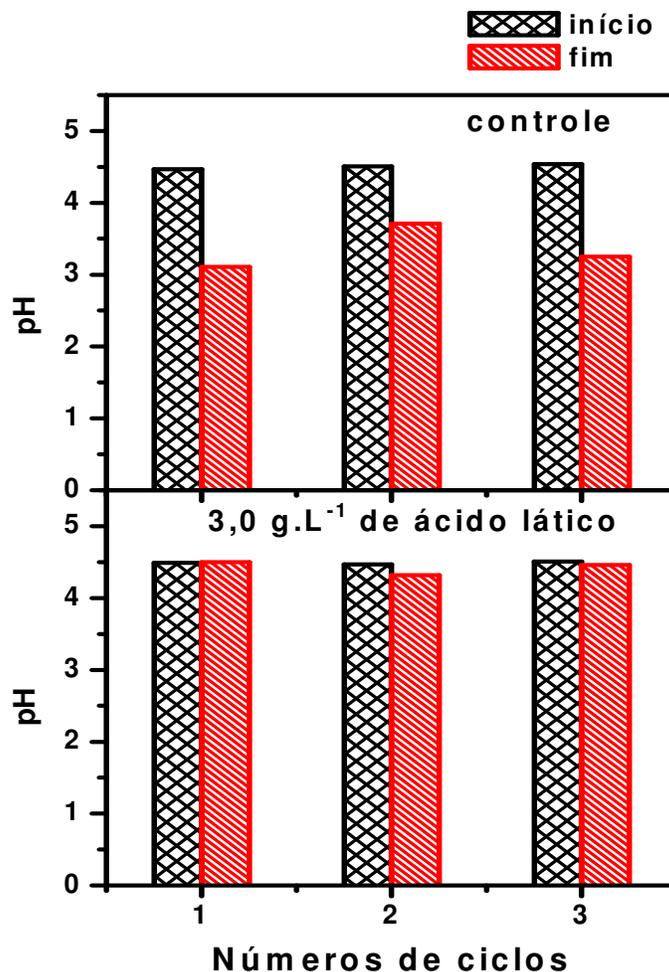


Figura 35– Efeito da presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico as variações de pH na fermentação da levedura 63M em ciclos sucessivos com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose (180 g.L^{-1} e uma quantidade de células de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$). As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo de fermentação.

4.5.2 CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO JUNTAMENTE COM OS PULSOS DE SACAROSE, PORÉM SEM AJUSTE DO pH DAS SOLUÇÕES DOS PULSOS

Justificativa

Esta nova estratégia de ajuste do pH teve por objetivo poder prolongar os ciclos de fermentação com menores perdas, sobretudo em biomassa

Descrição

Ciclos sucessivos de fermentação realizados com a linhagem 63M em batelada alimentada por pulsos decrescentes de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico e uma quantidade de inóculo de 40 g.L^{-1} em (em relação ao volume final de meio) foram realizados com a linhagem 63M a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. Uma quantidade de 10 g.L^{-1} de extrato de levedura foi adicionado ao meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998). As **Figuras 36 a 45** mostram os efeitos dos ciclos sucessivos de fermentação sobre os parâmetros de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de sacarose.

Viabilidade celular

A **Figura 36** mostra as variações nas viabilidades da levedura 63M no início e no final de oito ciclos de fermentação em presença e em ausência de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado nos pulsos de sacarose. A viabilidade diminuiu em nos primeiros ciclos de fermentação (até o 3º ciclo) tanto no experimento-controle quanto em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado. Após o terceiro ciclo, a viabilidade da levedura 63M permaneceu estável em ambos os casos.

Brotamento

A **Figura 37** mostra as variações no brotamento da levedura 63M no início e no final de oito ciclos de fermentação. O brotamento da levedura 63M aumentou

tanto no experimento-controle quanto em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado.

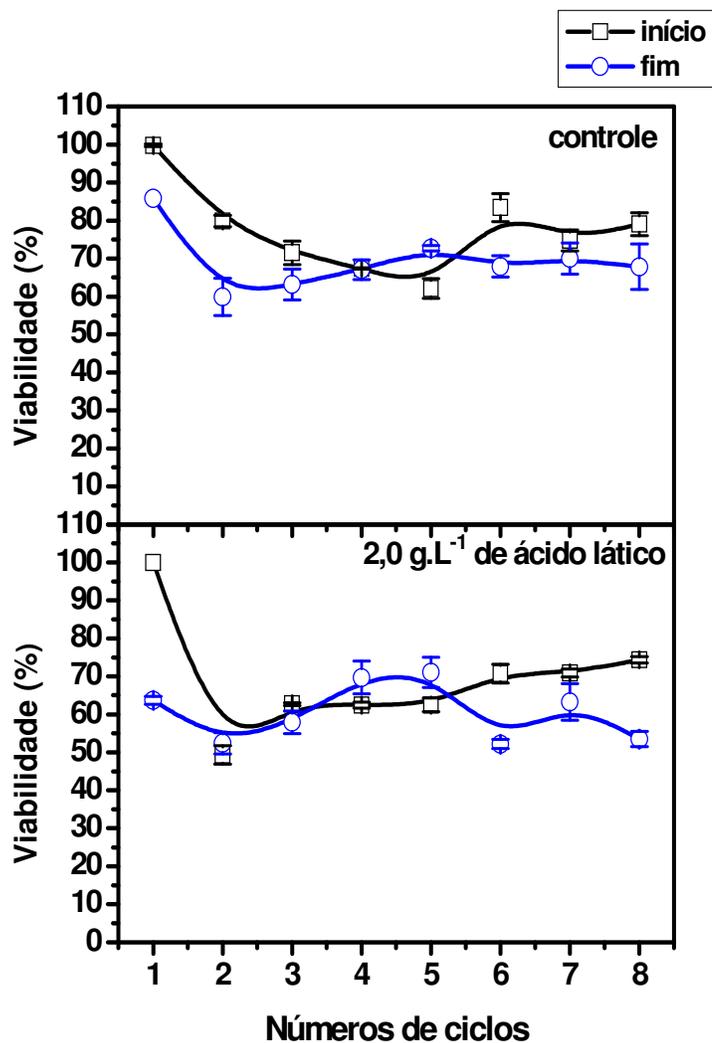


Figura 36– Variações na viabilidade da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples por 3 h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

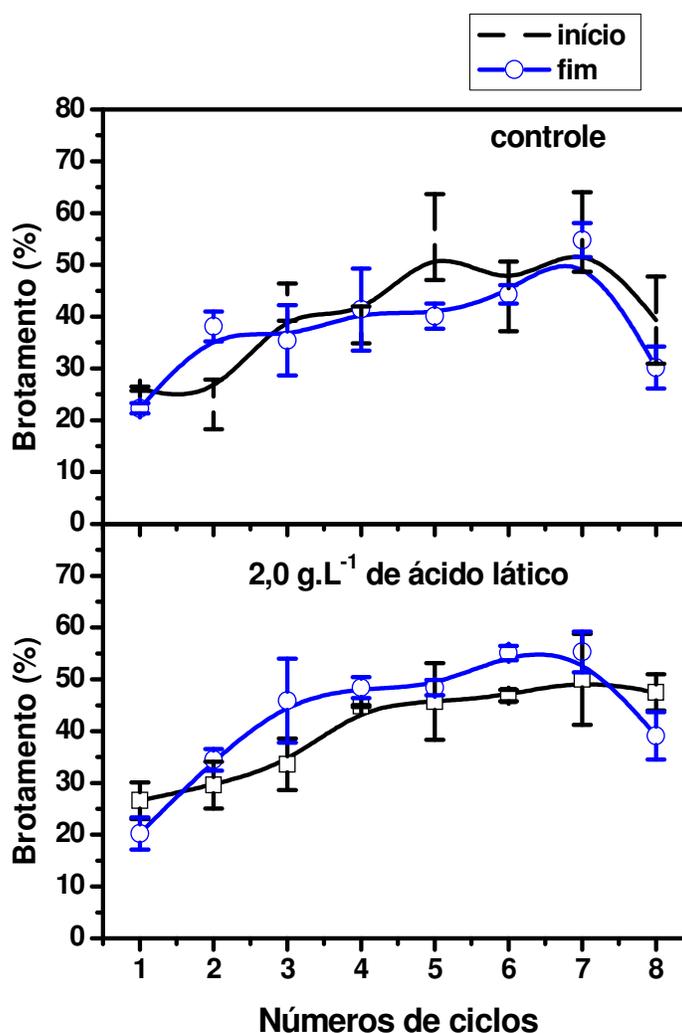


Figura 37– Variações no brotamento da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L⁻¹ de sacarose e 2,0 g.L⁻¹ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples. A quantidade de células foi de 40 g.L⁻¹ no final da fermentação a 34 °C. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

Produção de etanol

A **Figura 38** mostra o etanol produzido pela levedura 63M durante oito ciclos de fermentação em presença e em ausência de ácido láctico adicionados por pulsos. O etanol produzido teve uma leve redução ao longo dos ciclos no experimento-

controle. No entanto, etanol produzido teve aumento ao longo dos ciclos em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico para depois decair nos ciclos seguintes.

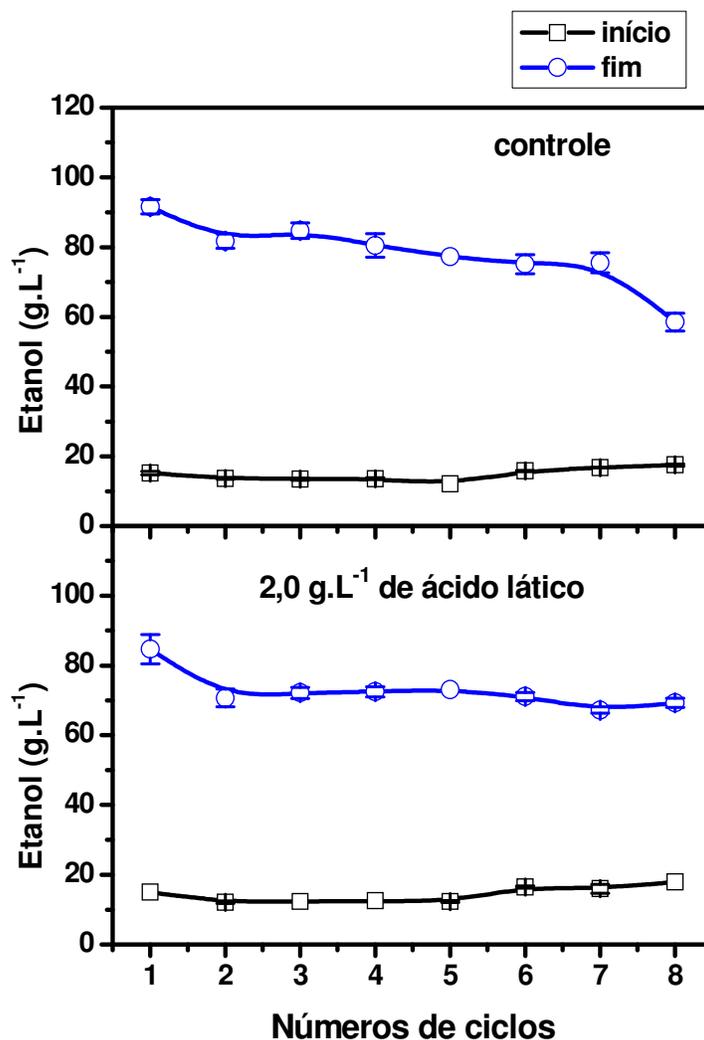


Figura 38– Variações no etanol produzido pela levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples por 3 h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

Consumo de açúcar

A **Figura 39** mostra que o açúcar do meio foi consumido totalmente após (4h) nas fermentações 15 a 18% (p.v⁻¹) de sacarose em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado. No entanto, a sacarose foi consumida após (5h) nas fermentações

contendo 20% (p.v⁻¹) de sacarose tanto na fermentação-controle (sem a adição de ácido láctico) quanto na fermentação em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado.

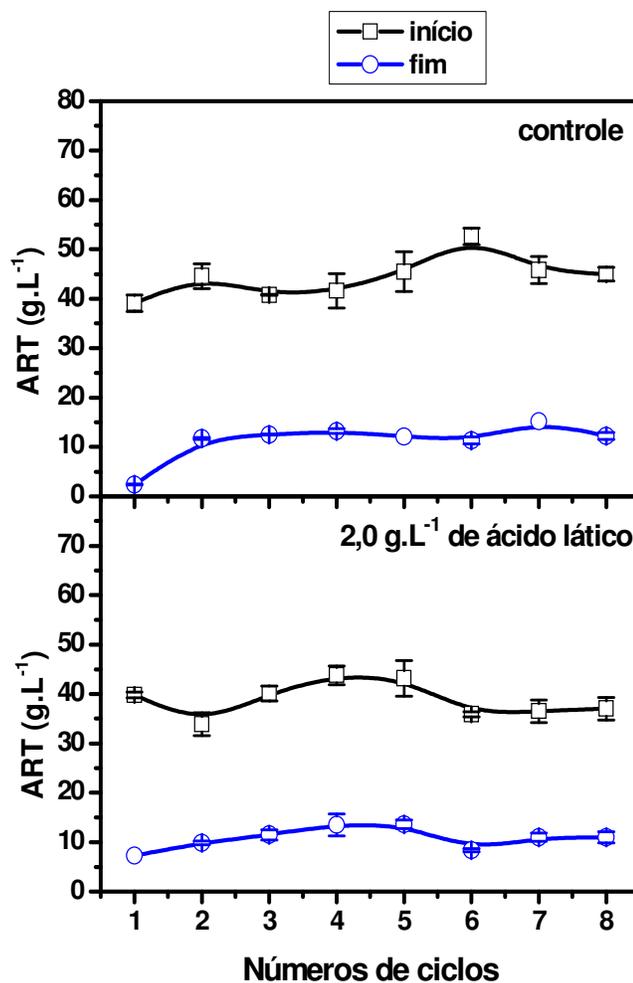


Figura 39– Variações no açúcar consumido pela levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L⁻¹ de sacarose e 2,0 g.L⁻¹ de ácido láctico (por 2h), seguida por batelada simples por 3h. A quantidade de células foi de 40 g.L⁻¹ no final da fermentação a 34 °C. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

Produção de biomassa

A **Figura 40** mostra a produção de biomassa pela levedura 63M durante oito ciclos de fermentação em presença e em ausência de ácido láctico adicionados por pulsos decrescentes. Houve perdas de biomassa durante os ciclos sucessivos de

fermentação tanto no experimento-controle quanto em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado.

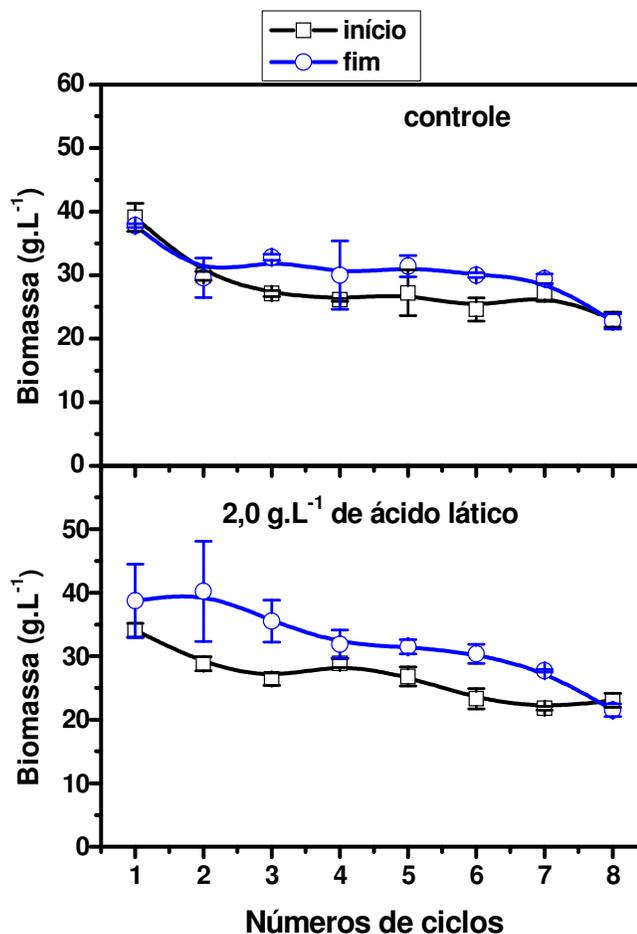


Figura 40– Variações na biomassa produzida pela levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2h), seguida por batelada simples por 3h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

Valores de pH

A **Figura 41** mostra as variações nos valores de pH da fermentação da levedura 63M durante oito ciclos de fermentação em presença e em ausência de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionados por pulsos. Os valores do pH inicial de 4,5 tiveram

pequenas reduções no final de cada ciclo sucessivo de fermentação do experimento-controle. No entanto, os valores do pH inicial de 4,5 foram mantidos constantes ao longo dos ciclos sucessivos de fermentação de fermentação em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionados por pulsos.

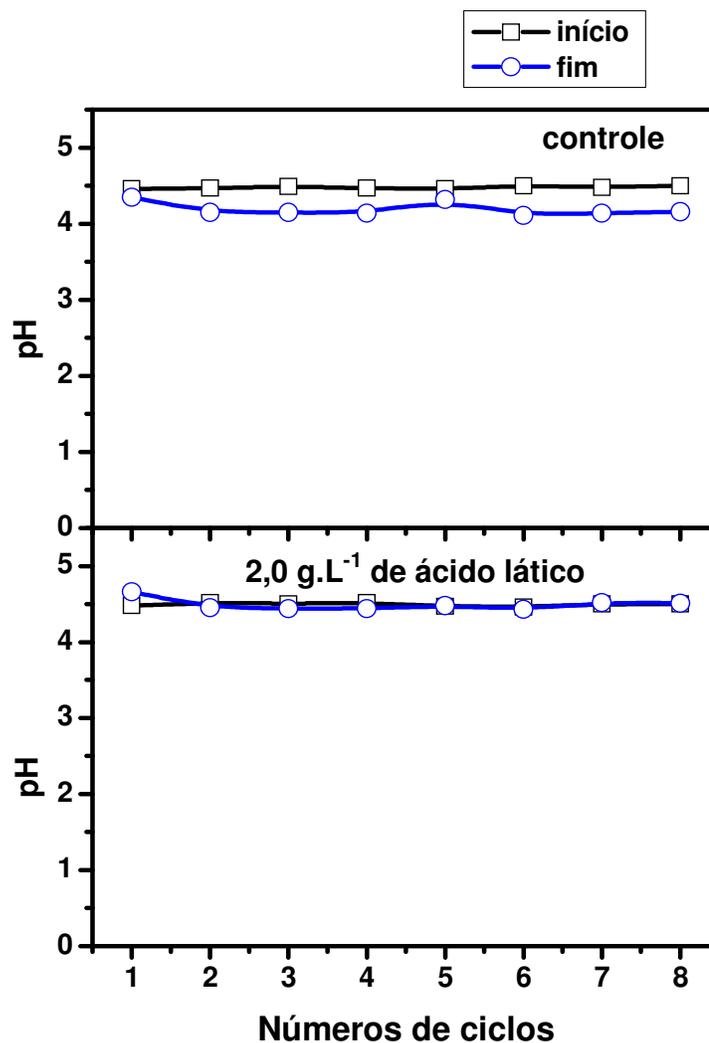


Figura 41– Variações nos valores de pH produzido pela levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples por 3h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

Proteína total

A **Figura 42** mostra as variações na proteína total intracelular da levedura 63M durante oito ciclos de fermentação em presença e em ausência de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionados por pulsos. A proteína total diminuiu ao longo do início dos ciclos de fermentação tanto em ausência quanto em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico. No entanto, a proteína total aumentou no final de cada ciclo de fermentação em ambos os casos.

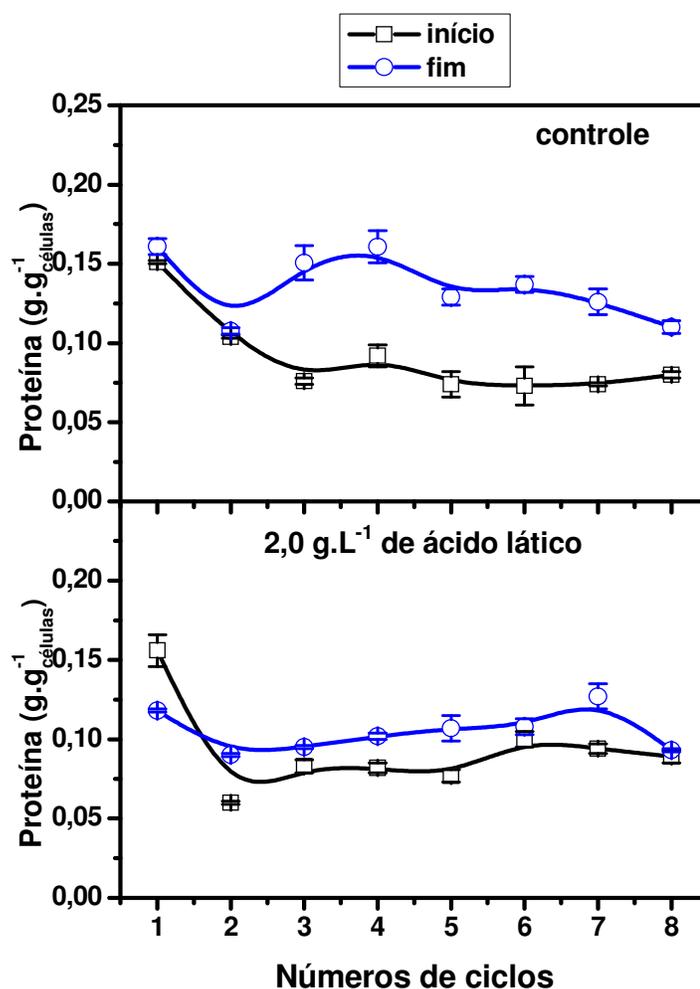


Figura 42– Variações na proteína total intracelular da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2h), seguida por batelada simples por 3 h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

Glicerol intracelular

A **Figura 43** mostra as variações no glicerol intracelular da levedura 63M durante oito ciclos de fermentação em presença e em ausência de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionados por pulsos. O glicerol teve um pequeno aumento ao longo do início e do final dos ciclos de fermentação tanto em ausência quanto em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico. No entanto, glicerol diminuiu no final de cada ciclo de fermentação em ambos os casos.

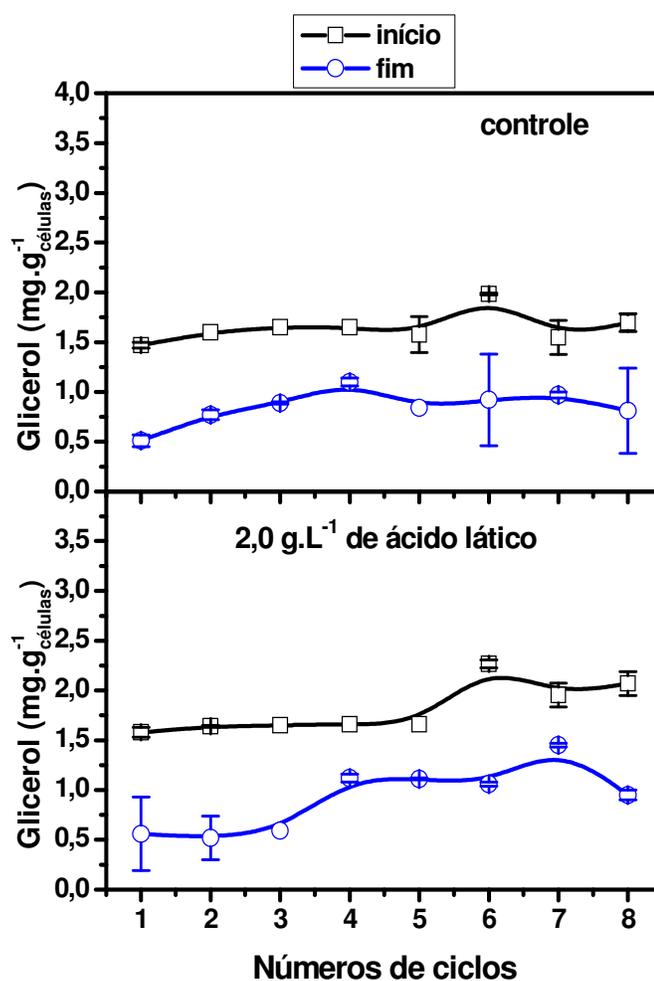


Figura 43– Variações no glicerol intracelular da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2h), seguida por batelada simples por 3h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

Trealose intracelular

A **Figura 44** mostra as variações no trealose intracelular da levedura 63M durante oito ciclos de fermentação em presença e em ausência de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionados por pulsos. A trealose foi praticamente nula ao longo do no início dos ciclos sucessivos de fermentação tanto em ausência quanto em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico. No entanto, a trealose foi produzida no final de cada ciclo de fermentação em ambos os casos.

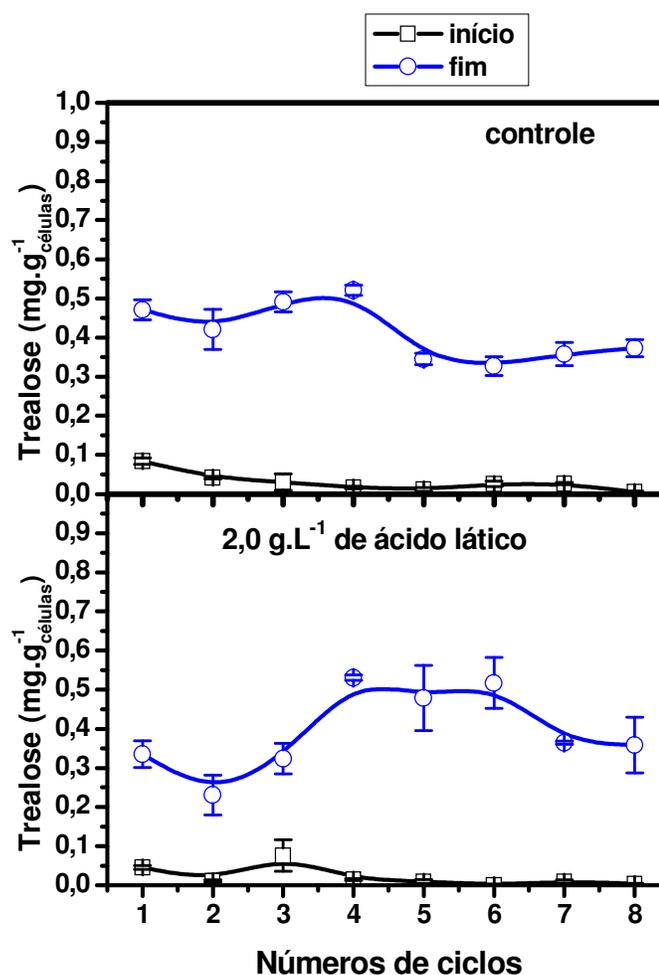


Figura 44– Variações na trealose intracelular da levedura 63M em ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2 h), seguida por batelada simples por 3 h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

Acidez total

A **Figura 45** mostra as variações na acidez total dos meios de culturas fermentados pela levedura 63M em presença e em ausência de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionados por pulsos no início e no final de oito ciclos de fermentação. A acidez total praticamente não variou no início e no final dos ciclos sucessivos de fermentação do experimento-controle. No entanto, um aumento na acidez no final de cada ciclo sucessivo foi observado no experimento contendo $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico.

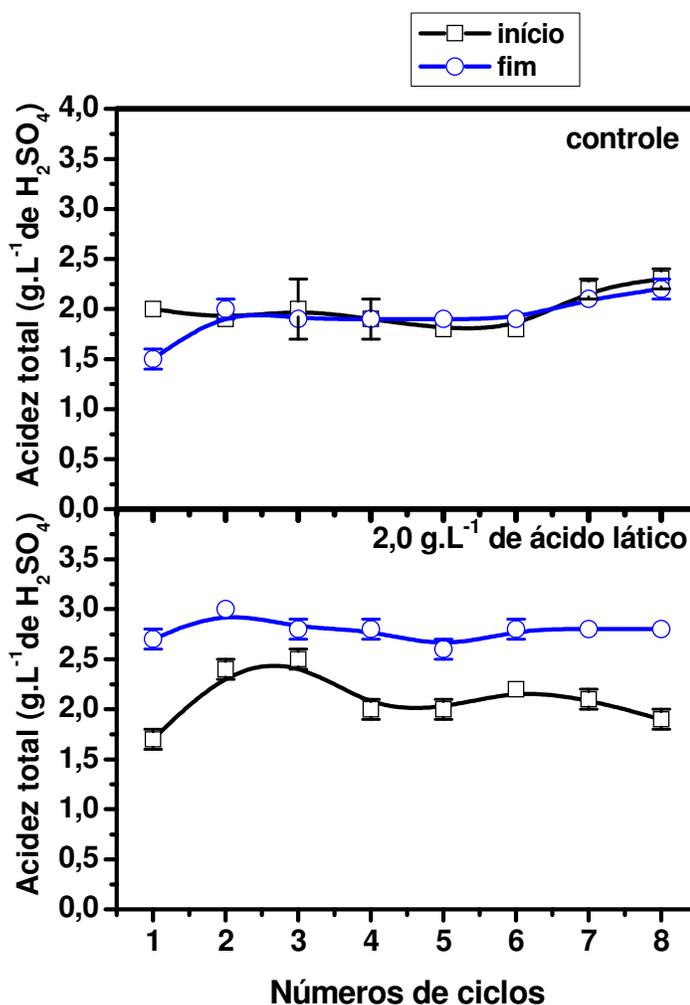


Figura 45– Variações na acidez total dos meios de cultura fermentado pela levedura 63M em ciclos sucessivos com reutilização de células em batelada alimentada por pulsos de 180 g.L^{-1} de sacarose e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico (por 2h), seguida por batelada simples por 3h. A quantidade de células foi de 40 g.L^{-1} no final da fermentação a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As barras pretas indicam valores obtidos no início dos ciclos de fermentação e as barras vermelhas indicam valores no final de cada ciclo.

4.5.2.1 DISCUSSÃO

Em processo de batelada alimentada por pulsos de sacarose (total de 180 g.L^{-1}) e ácido láctico (total de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$) durante 8 ciclos sucessivos de fermentação, a levedura 63M passou por um processo de adaptação até o terceiro ciclo, mesmo no experimento-controle. Este fato é indicado pelas quedas nos valores de viabilidade nos primeiros três ciclos e, depois, uma estabilização da viabilidade foi observada até o oitavo ciclo. Por outro lado, a biomassa foi diminuindo ao longo dos ciclos enquanto que o brotamento aumentou com o aumento dos ciclos tanto em presença quanto em ausência dos pulsos de ácido láctico, mas estes aumentos não foram suficientes para manter a viabilidade e a biomassa. O etanol final produzido (P) e os valores de pH finais permaneceram constantes ao longo dos ciclos sucessivos. No entanto, o açúcar residual foi acumulando-se no final dos ciclos de fermentação tanto em ausência quanto em presença de ácido láctico nos pulsos. Outros fatos interessantes foram a redução na proteína intracelular final e o aumento da acidez total durante os ciclos sucessivos de fermentação em presença de ácido láctico enquanto que a produção de glicerol e a produção de trealose foram semelhantes ao longo dos ciclos sucessivos de fermentação tanto em presença quanto em ausência de pulsos de ácido láctico adicionado. A literatura descreve poucos trabalhos relacionados com o efeito do ácido láctico adicionado sobre a produção de etanol em ciclos sucessivos de células. DORTA *et al.* (2006) estudaram os efeitos do etanol, ácido láctico, sulfito e valores de pH durante sete ciclos de fermentação de meio semi-sintético em batelada alimentada por pulsos, porém esta publicação não fornece detalhes sobre a adição do ácido láctico. A presença de etanol (9,5%), ácido láctico (6 g.L^{-1}), sulfito (200 mg.L^{-1}) causou pequenas reduções em viabilidade e no brotamento das leveduras PE-2 e M-26. No entanto, a presença destes fatores de estresse causou o aumento na produção dos ácidos orgânicos fracos totais para ambas as leveduras. Além disso, a produção de trealose diminuiu enquanto que a proteína residual aumentou para ambas as leveduras. YOKOYA (1995) reportou que os valores da acidez total estão na faixa de 2,5 e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ (em relação ao ácido sulfúrico) no vinho e estes valores nunca devem ultrapassar $5,0 \text{ g.L}^{-1}$. No presente trabalho, a acidez total no final dos ciclos de fermentação da

fermentação não ultrapassaram $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ (em relação ao ácido sulfúrico) em presença de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico adicionado por pulsos.

5 CONCLUSÕES

Os dados obtidos e discutidos acima permitiram as seguintes conclusões:

A- A análise de superfície de resposta, aplicada aos experimentos realizados em batelada simples contendo meio sintético, sem ajuste de pH e inoculados com a levedura 63M mostraram que as melhores condições de fermentação em batelada simples a 34 °C seriam as seguintes: inóculo de 40 g.L⁻¹ de densidade de células (ou 4%, p.v⁻¹), 200 g.L⁻¹ (20%, p.v⁻¹) de sacarose e tolerância de até 0,65 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado em meio. O tempo de fermentação foi de 4h.

B- A transferência das condições ótimas encontradas pela metodologia de superfície de resposta para a batelada simples para outros processos (alimentação contínua e pulsos) mostraram a necessidade de reajustes das condições do processo escolhido quanto aos valores do pH inicial do meio, limite de concentração de ácido láctico no processo, concentração de sacarose e a quantidade do inóculo. Com isto foi possível desenhar estratégias que permitiram aumentar a tolerância da levedura a concentrações de ácido láctico adicionado acima de 1,0 g.L⁻¹ sem perdas em significativas em parâmetros de fermentação.

C- Comparação dos processos- bateladas simples e alimentadas por pulsos foram ensaiadas mostrando resultados semelhantes em relação a tolerância a concentrações de ácido láctico adicionado. O processo em batelada alimentada de forma contínua levou a maiores perdas em viabilidade na faixa de ácido láctico adicionado de 0 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹.

D- A levedura (linhagem 63M) foi capaz de fermentar 20% (p.v⁻¹) de sacarose adicionada na presença de 3,0 g.L⁻¹ a 4,0 g.L⁻¹ de ácido láctico adicionado sem grandes variações nos parâmetros da fermentação em relação ao experimento controle (sem adição do ácido láctico).

E- A acidez total aumentou em presença de ácido láctico durante os ciclos de fermentação. No entanto, glicerol, trealose e proteína total intracelulares não foram

indicativos do estresse causados pela presença de ácido láctico durante os ciclos sucessivos de fermentação.

F- O ácido láctico não parece ser um vilão devastador da fermentação alcoólica desde que as condições do processo sejam devidamente controladas. De uma maneira geral, a presença deste ácido causou aumentos no consumo de açúcar. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode excretar ou consumir ácido láctico dependendo do pH (CÁSSIO *et al.*, 1987).

REFERÊNCIAS*

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. **Biotechnol. Lett.**, v. 26, p.1313-1316, 2004.

ALMEIDA, J. R. **Álcool e destilaria**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1940. 333 p. Mimeografado. Nathanael dos Santos.

ATTFIELD, P. V. *et al.* Heterogeneity of stress gene expression and stress resistance among individual cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 40, n. 4, p. 1000-1008, 2001.

ATTFIELD, P. V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nat. Biotechnol.**, v. 15, 1997.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos**. 2 ed. Campinas: Editora Unicamp, 2003.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/ or acid toxicity? **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 362-368, 2004.

BAYROCK, D. P.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Control of Lactobacillus contaminants in continuous fuel ethanol fermentation by constant or pulsed addition of penicillin G. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 468-502, 2003.

BOLETIM TÉCNICO COPERSUCAR. Controle microbiológico da usina de açúcar e álcool, v. 22, p. 2-17, 1989.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 50, p. 1-17, 1999.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BURKERT, F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. **Bioresource Technol.**, v. 91, p. 77-84, 2004.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística**. São Paulo: Artmed editora. 2003.

CARRASCO, P.; QUEROL, A.; OLMO, M. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Arch. Microbiol.**, v. 175, p. 450-457, 2001.

CASAL, M.; CARDOSO, H.; LEÃO, C. Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 142, p. 1385-1390, 1996.

CÁSSIO, F.; LEÃO, C.; VAN-UDEN, N. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 509-513, 1987.

ÇAYLAK, B.; SUKAN, V. Comparison of different production processes for bioethanol. **Turk. J. Chem.**, v. 22, n. 4, p. 351-359, 1998.

CHANDRASENA, G.; WALKER, G.M.; STAINES, H. J. Use of response surfaces to investigate metal ion interactions in yeast fermentations. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 55, n. 1, p. 24-29, 1997.

CHI, Z.; ARNEBORG, N. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, n. 6, p. 1047-1052, 1999.

COT, M.; LORET, M. O.; FRANÇOIS, J.; BENBADIS, L. Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, n. 1, p. 22-32, 2007.

DAMIANO, D.; WANG, S. S. Improvements in ethanol concentration and fermenter ethanol productivity in yeast fermentations using whole soy flour in batch, and continuous recycle systems. **Biotechnol. Lett.**, v. 7, n. 7, p. 135-140, 1985.

DEOLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 10-14, 2001.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; DE-ABREU-NETO, M. S. NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World J. Microbiol. Biotechnol.**, n. 22, p. 177-182, 2006.

DUFF, R. J.; DEFEO, J. A.; ROBINSON, R. A. Sem título. In: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY NATIONAL MEETINGS, 166th, Chicago. **Abstracts...** Chicago: American Chemical Society, 1973. p. 28. 1973.

FRANÇOIS, J.; ERASO, P.; GANCEDO, C. Changes in the concentration of cAMP, fructose 2,6-biphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 164, p. 551-559, 1987.

GALLI, Z. F. FERMENTAÇÃO DO MEL FINAL DAS USINAS DE AÇÚCAR. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 2., 1961, Piracicaba. Piracicaba: Instituto Zimotécnico, 1961, v. 2, p. 297-304.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica- Revisão. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.9, p.35-40, 1991.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The yeasts**. 2 ed. United Kingston: Academic Press, 1989, v. 3, p. 205-259.

GELI, M. L.; RIEZMAN, H. Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. **J. Cell Sci.**, v. 111, p. 1031-1037, 1998.

GRAVES, T.; NERENDRANATH, N.V.; DAWSON, K.; POWER, R. Interaction effects of lactic and acetic acid at different temperatures on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 73, n. 5, p. 1190-1196, 2007.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N. V.; DAWSON, K.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2006.

GROOT, W. J.; WALDRAM, R. H.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. The effect of repeated temperature shock on baker's yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37, n. 3, p. 396-398, 1992.

HAALAND, P. D. Statistical problem solving. In: Halland, P. D. (Ed.). **Experimental Desing in Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Incorporation, 1989. p. 1-18.

HOLYOAK, C. D.; STRATFORD, M.; MCMULLIN, Z. *et al.* Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3158-3164, 1996.

HYNES, S.H.; KJARSGAARD, D. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W.M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, n. 4, p. 284-291, 1997.

IMAI, T.; OHNO, T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 10, p. 3604-3608, 1995.

INGRAM, I. O.; BUTTKE, T. M. Effects of alcohol on micro-organisms **Adv. Microb. Physiol.**, v. 25, p. 253-300, 1984.

INOUE, T.; TAKAOKA, Y.; HATA, S. Studies on saké yeasts: on the tolerance of yeast to lactic acid. **J. Ferment. Technol.**, v. 40, p. 1401-1420, 1962.

KIM, H. M.; KIM, J. G.; CHO, J. D., *et al.*, Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **Bioresource Technol.**, v. 96, n. 10, p. 1175-1182, 2005.

KIM, J.; ALIZADEH, P.; HARDING, T.; HEFNER-GRAVINK, A.; KLIONSKY, D. J. Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1563-1569, 1996.

LALUCE, C.; SOUZA, C. S.; ABUD, C. L.; GATTAS, E. A. L.; WALKER, G. M. Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast cell recycling at elevated temperatures. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, v. 29, n. 3, p. 140-144, 2002.

LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid-determination of yeast viability. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 11, n. 3, p. 641-649, 1981.

LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **J. Bacteriol.**, v. 143, p.1384-1394, 1980.

LUCERO, P.; PEÑALVER, E.; MORENO, E. *et al.* Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 10, p. 4456-4461, 2000.

LUCERO, P.; PEÑALVER, E.; MORENO, E. *et al.* Moderate concentrations of ethanol inhibit endocytosis of the yeast trehalose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3831-3836, 1997.

MADSHUS, I. H. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. **Biochem. J.** v. 250, n. 1, p. 1-8, 1988.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 25, p. 103-121, 1983.

MAKANJOULA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D. G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory scale yeast fermentation. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 14, p. 351-357, 1992.

MAYEUX, P. A. **Some studies on the microbial flora of sugar cane**. Master Thesis - Louisiana State University, Louisiana, 1960.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORIMURA, S.; LING, Z.Y.; KIDA, K. Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt-tolerant. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 83, n. 3, p. 271-274, 1997.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 4158-4163, 1997.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acid acetic and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 171-177, 2001.

NGANG, J. J. E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 125-128, 1989.

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N. Q. *et al.* Main and interaction effects of acetic acid, furfuran and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 63, p. 46-55, 1999.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 184, p.69-72, 2000.

PARROU, J.-L. *et al.* Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 15, p. 191-203, 1999.

PATEL, M. A.; OU, M. S.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. Simultaneous saccharification and co-fermentation of crystalline cellulose and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to lactate by a thermotolerant acidophilic *Bacillus sp.* **Biotechnol. Progr.**, v. 21, n. 5, p. 1453-1460, 2005.

PERES, M. F. S.; SOUSA, S. R.; LALUCE, C. Obtaining strains of *Saccharomyces* tolerant to high temperatures and ethanol. In: SPENCER, J. F. T.; RAGOUT DE SPENCER, A. L. (Ed.). **Methods in Biotechnology: Food Microbiology Protocols**. Totowa: Humana Press, 2001. v. 14, p. 355-367.

PERES, M. F. S.; TININIS, C. R. C. S.; SOUZA, C. S.; WALKER, G. M.; LALUCE, C. Physiological responses of pressed baker's yeast cells pre-treated with citric, malic and succinic acids. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21 p. 537–543, 2005.

RATNAM, B. V. V.; SUBBA RAO, S.; DAMODAR RAO, M.; AYYANNA, C. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of ethanol from palmyra jaggery using response surface methodology, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.21, n. 4, p. 399-404, 2005.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathways of wine yeasts and lactic acid bacteria. In: RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. (Ed.). **Handbook of enology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2001, v. 1, p. 51-74, p. 107-128.

RICCI, M.; MARTÍN, S.; BONECHI, C.; TRABALZINI, L.; SANTUCCI, A.; ROSSI, C. Inhibition effects of ethanol on the kinetics of glucose metabolism by *S. cerevisiae*: NMR and modeling study. **Chem. Phys. Lett.**, v.387, p. 377-382, 2004.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, n. 4, p. 422-430, 1999.

RIVERA, E. A. C.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; MAUGIERI, F.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL-FILHO, R. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochem.**, v. 41, p. 1682-1687, 2006.

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. In: GUTHRIE, G.; FINK, G. R. (Ed.). **Methods Enzymol.** New York: Academic Press, 1991, v. 194, p. 21-37.

SILVA, M. H. Controle da inversão no caldo de cana. **Sugar Azucar**, p. 41, 1974.

SINGER, M.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro. **Mol. Cell**, v. 1, p. 639-648, 1998.

STRATFORD, M.; ANSLOW, P. A. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 27, n. 4, p. 203-206, 1998.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1616–1623, 2002.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi continuous alcoholic fermentation of corn mash. **J. Appl. Microbiol.**, v. 90, n. 3, p. 819-828, 2001.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Initiation of anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* by amino acids or nucleic acid bases: ergosterol and unsaturated fatty acids cannot replace oxygen in minimal media. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, v. 21, n. 4-5, p. 247-253, 1998.

THOMSSON, E.; LARSSON, C. The effect of lactic acid on anaerobic carbon or nitrogen limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 71, n. 4, p. 533-542, 2006.

TRABALZINI, L.; PAFFETTI, A.; SCALONI, A. *et al.* Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.**, v. 370, p. 35-46, 2003.

UMA MAHESWAR RAO, J. L.; SATYANARAYANA, T. Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technol.**, v. 98, p. 345-352, 2007.

VAN DER REST, M. E. *et al.* The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 239-241, 1995.

VARELA, J. C. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* *HSP12* gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, p. 6232-6245, 1995.

VOLLAND, C. *et al.* Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 9833-9841, 1994.

WALKER M. W. Yeast Growth. In: WALKER M. W. (Ed.). **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. p. 101-202.

YOKOYA, F. **Fabricação de Aguardente de Cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1995.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, n. 1-2, p. 17-34, 2001.

ZOLMAN, N. **Biostatistics: experimental design and statistical inference**. New York: Oxford University Press, 1993.

ANEXO A

GRÁFICOS RELATIVOS À ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

1- PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL: GRÁFICOS DE PROBABILIDADE NORMAL DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES (ÁCIDO LÁTICO, INÓCULO E SACAROSE).

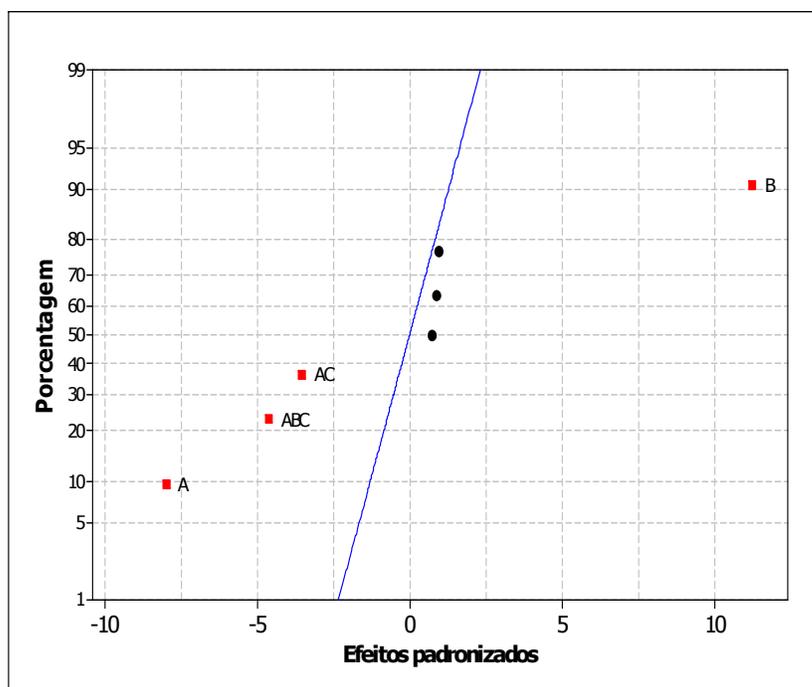


Figura 46- Gráfico da probabilidade normal do planejamento fatorial 2^3 para os efeitos das variáveis independentes sobre o etanol produzido pela levedura 63M após 4h de fermentação em meio sintético para $\alpha=0,05$; **A**= ácido lático adicionado, **B**= quantidade de inóculo e **C**= concentração de sacarose; ■=efeitos significantes e ●= efeitos não significantes.

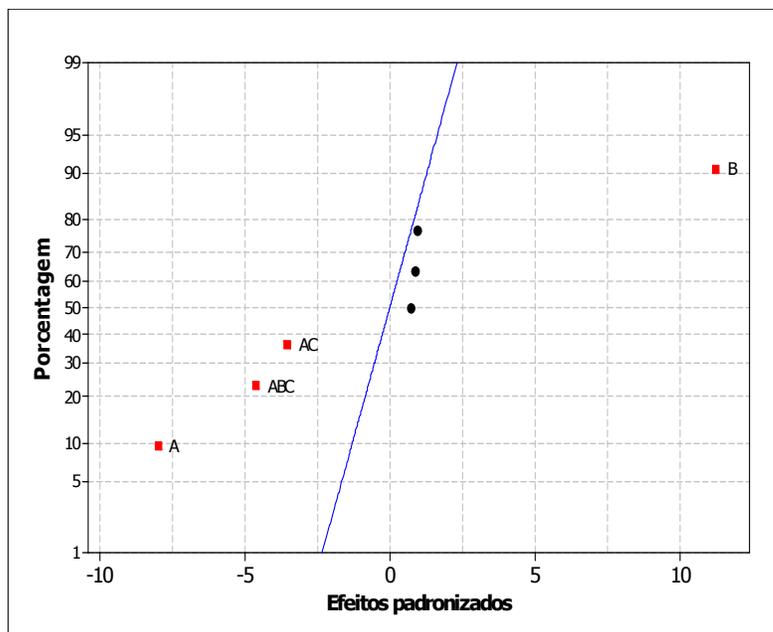


Figura 47- Gráfico da probabilidade normal do planejamento fatorial 2^3 para os efeitos das variáveis independentes sobre a viabilidade da levedura 63M após 4h de fermentação em meio sintético para $\alpha=0,05$; **A**= ácido lático adicionado, **B**= quantidade de inóculo e **C**= concentração de sacarose; ■=efeitos significativos e ●= efeitos não significativos.

2 SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL: ANÁLISE DE VARIÂNCIA E COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA O ETANOL E A VIABILIDADE

Tabela 23- Análise de variância do modelo para a produção de etanol pela levedura 63M em meio sintético após 4h a 34 °C.

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Soma dos quadrados ajustada	Média dos quadrados ajustada	F	p- valor
Regressão	9	1749,19	1749,19	194,354	35,84	0,000
Linear	3	916,84	916,84	15,151	2,79	0,095
Quadrática	3	643,54	643,54	214,513	39,55	0,000
Interação	3	188,81	188,81	62,938	11,60	0,001
Erro residual	10	54,23	54,23	5,423	-	-
Falta de ajuste	5	49,29	49,29	9,859	9,98	0,012
Erro puro	5	4,94	4,94	0,988	-	-
Total	19	1803,42	-	-	-	-

GL= graus de liberdade; F=teste de F (Fisher); p= valor absoluto do teste F (Fisher).

Tabela 24- Coeficientes de regressão estimados para a produção de etanol pela levedura 63M em meio sintético após 4h a 34 °C.

Termos	Coefficientes	Erro padrão	T	p- valor
Constante	-173,808	100,346	-1,732	0,114
Ácido láctico	1,703	35,572	0,048	0,963
Inóculo	7,962	4,989	1,596	0,142
Sacarose	1,057	0,383	2,759	0,020
Ácido láctico * ácido láctico	-11,708	6,865	-1,706	0,119
Inóculo * Inóculo	-0,207	0,068	-3,033	0,013
Sacarose * sacarose	-0,007	0,001	-10,700	0,000
Ácido láctico* Inóculo	1,375	0,915	1,502	0,164
Ácido láctico * Sacarose	-0,285	0,091	-3,112	0,011
Inóculo * Sacarose	0,044	0,009	4,782	0,001

T=teste T; p= valor absoluto do teste T.

Tabela 25- Análise de variância para o modelo de viabilidade da levedura 63M fermentada em meio sintético por 4h a 34 °C.

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Soma dos quadrados ajustada	Média dos quadrados ajustada	F	p- valor
Regressão	9	1065,57	1065,57	118,40	6,05	0,005
Linear	3	563,50	328,37	109,46	5,60	0,016
Quadrática	3	182,60	182,60	60,87	3,11	0,075
Interação	3	319,47	319,47	106,49	5,45	0,018
Erro residual	10	195,55	195,55	19,55		
Falta de ajuste	5	145,25	145,25	29,05	2,89	0,135
Erro puro	5	50,29	50,29	10,06		
Total	19	1261,12				

GL= grau de liberdade; F=teste de F (Fisher); p= valor absoluto do teste F (Fisher).

Tabela 26- Coeficientes de regressão estimados para viabilidade da levedura 63M fermentada em meio sintético por 4h a 34 °C.

Termos	Coefficientes	Erro padrão	T	p- valor
Constante	620,373	190,541	3,256	0,009
Ácido láctico	160,028	67,546	2,369	0,039
Inóculo	-27,046	9,474	-2,855	0,017
Sacarose	-1,387	0,728	-1,907	0,086
Ácido láctico * ácido láctico	19,481	13,035	1,495	0,166
Inóculo * Inóculo	0,340	0,129	2,626	0,025
Sacarose * sacarose	0,002	0,001	1,306	0,221
Ácido láctico* Inóculo	-3,514	1,737	-2,023	0,071
Ácido láctico * Sacarose	-0,518	0,174	-2,982	0,014
Inóculo * Sacarose	0,032	0,017	1,831	0,097

T= teste T; p= valor absoluto do teste T.

Tabela 27- Análise de variância para o modelo de viabilidade da levedura 63M fermentada em meio sintético por 4h a 34 °C.

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Soma dos quadrados ajustada	Média dos quadrados ajustada	F	p-valor
Regressão	9	1065,57	1065,57	118,40	6,05	0,005
Linear	3	563,50	328,37	109,46	5,60	0,016
Quadrática	3	182,60	182,60	60,87	3,11	0,075
Interação	3	319,47	319,47	106,49	5,45	0,018
Erro residual	10	195,55	195,55	19,55		
Falta de ajuste	5	145,25	145,25	29,05	2,89	0,135
Erro puro	5	50,29	50,29	10,06		
Total	19	1261,12				

GL= graus de liberdade; **F=**teste de F (Fisher); **p=** valor absoluto do teste F (Fisher).

ANEXO B

FERMENTAÇÕES EM MINI REATORES COM BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁTICO

1- Batelada simples sem reajuste do pH inicial

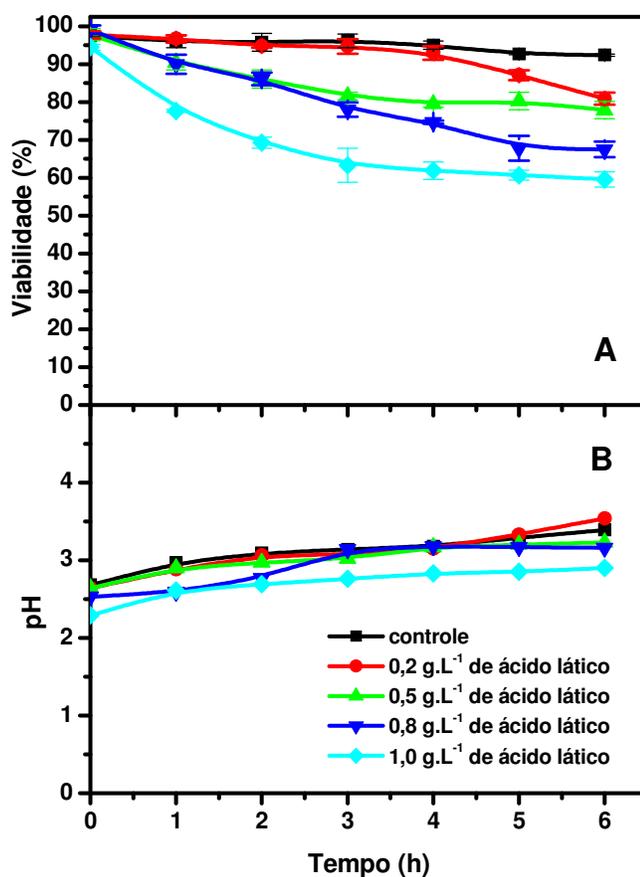


Figura 48- Efeito do ácido lático adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) sobre a viabilidade (A) e o pH (B) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L^{-1} de sacarose inicial. As fermentações foram realizadas sem o reajuste do pH inicial (após a inoculação) e a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

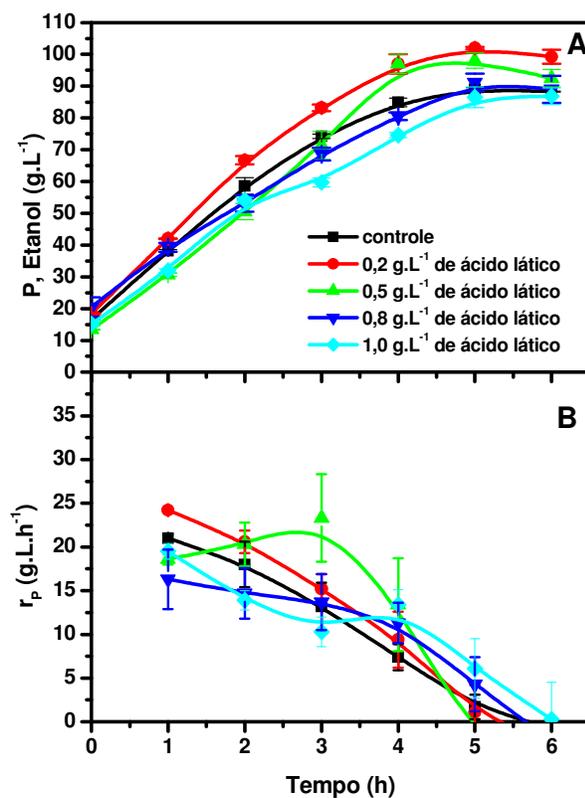


Figura 49- Efeito do ácido láctico adicionado ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) sobre o etanol produzido (A), a produtividade (B) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L^{-1} de sacarose inicial. As fermentações foram realizadas sem o reajuste do pH inicial (após a inoculação) e a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

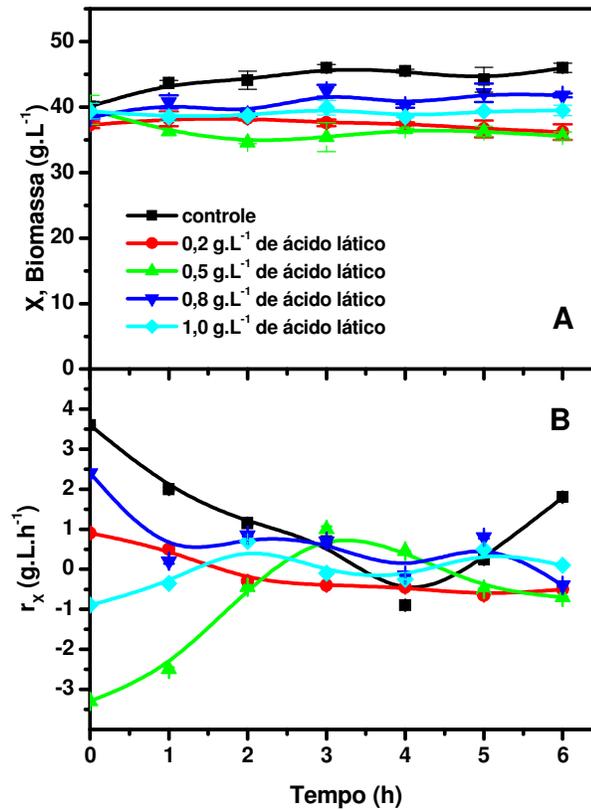


Figura 50- Efeito do reajuste do pH inicial a 4,5 sobre a biomassa produzida (A), a velocidade de crescimento de biomassa (B) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial e ácido láctico adicionado (0,0 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹). As fermentações foram realizadas a 34 °C.

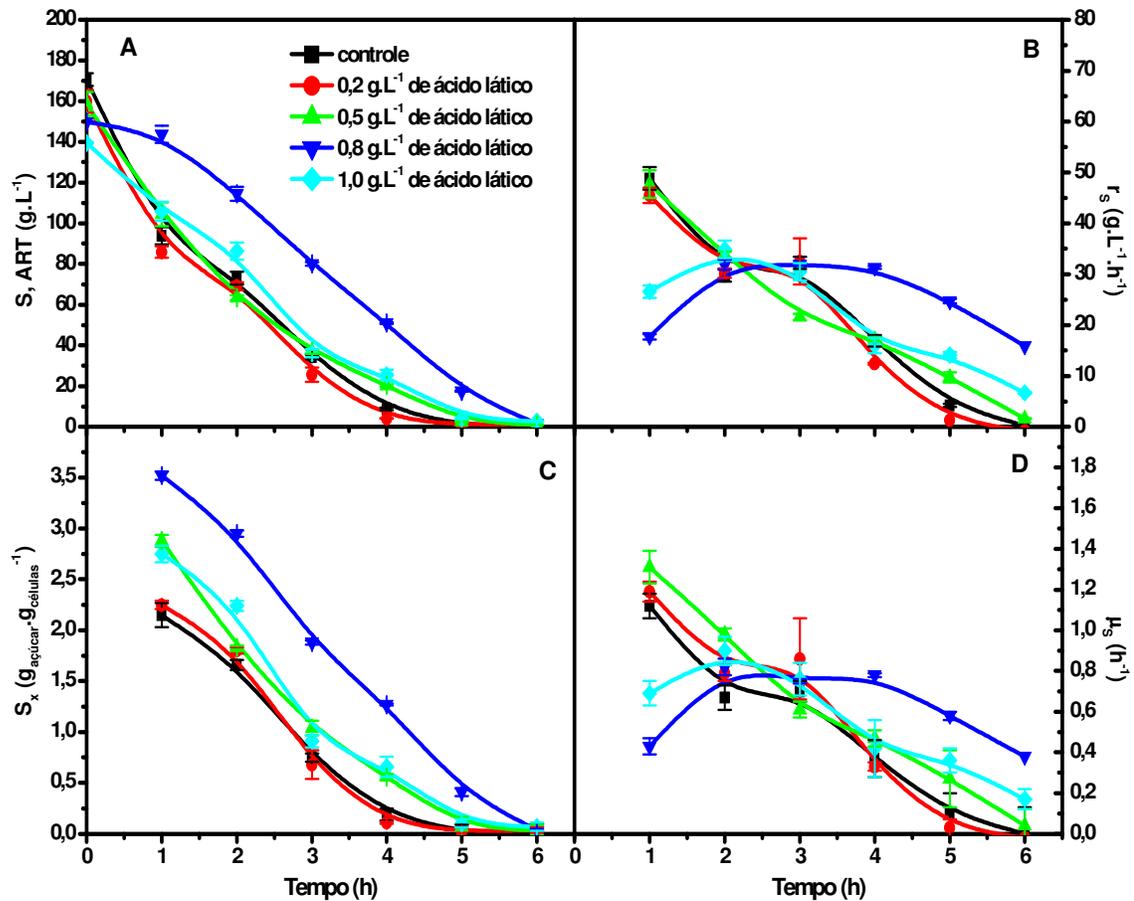


Figura 51- Efeito do ácido láctico adicionado (0,0 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹) sobre o açúcar (A), a velocidade de consumo de açúcar (B), consumo específico de açúcar (C) e a velocidade específica de consumo de açúcar (D) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial. As fermentações foram realizadas sem o reajuste do pH inicial (após a inoculação) e a 34 °C.

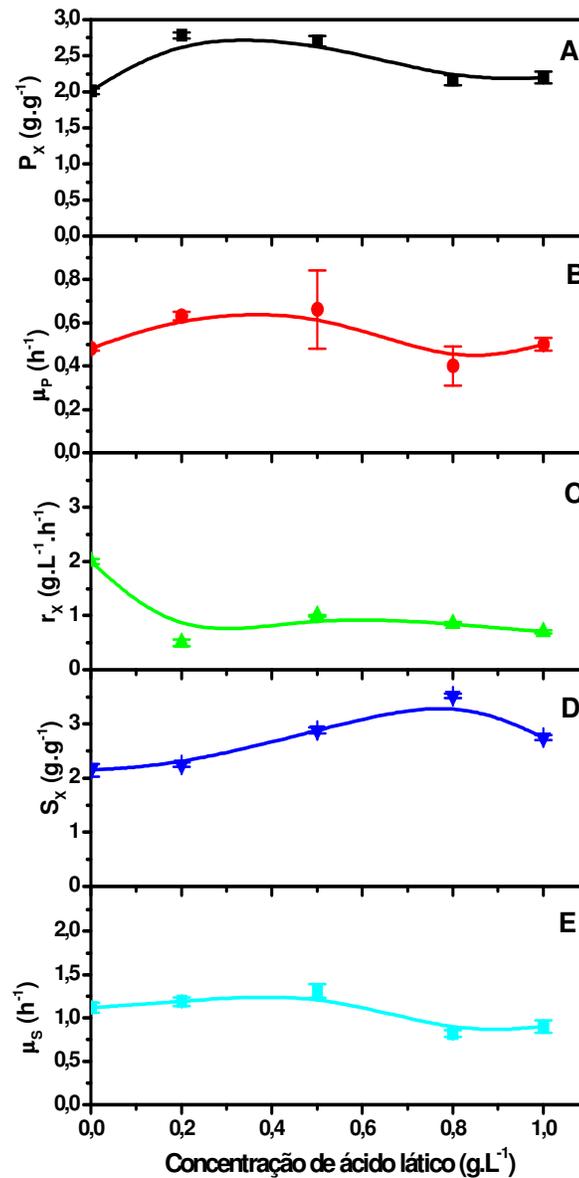


Figura 52- Efeito do ácido láctico adicionado (0,0 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹) sobre os parâmetros cinéticos de fermentação: produção específica de etanol (A), velocidade específica de produção de etanol (B), velocidade específica de crescimento (C), consumo específico de açúcar (D) e velocidade específica de consumo de açúcar (E) da levedura 63M em batelada simples sem o reajuste de pH inicial a 34 °C.

2- Batelada simples com reajuste de pH

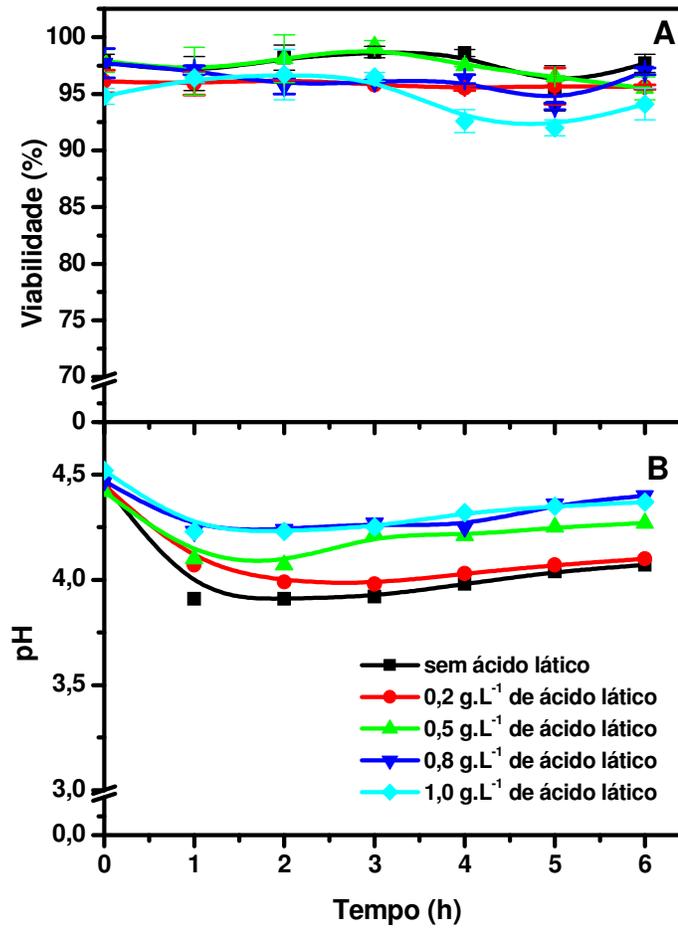


Figura 53- Efeito do reajuste do pH inicial a 4,5 sobre a viabilidade levedura 63M (A) e pH das fermentações (B) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial e ácido láctico adicionado (0,0 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹). As fermentações foram realizadas a 34 °C.

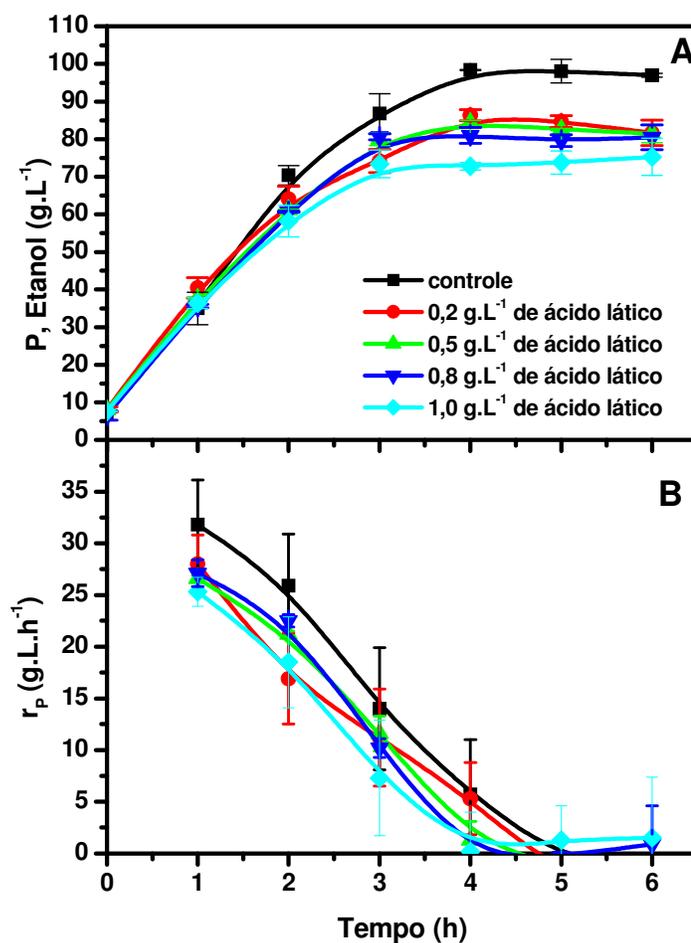


Figura 54- Efeito do reajuste do pH inicial a 4,5 sobre o etanol produzido (A) e a produtividade (B) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial e ácido láctico adicionado (0,0 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹). As fermentações foram realizadas a 34 °C.

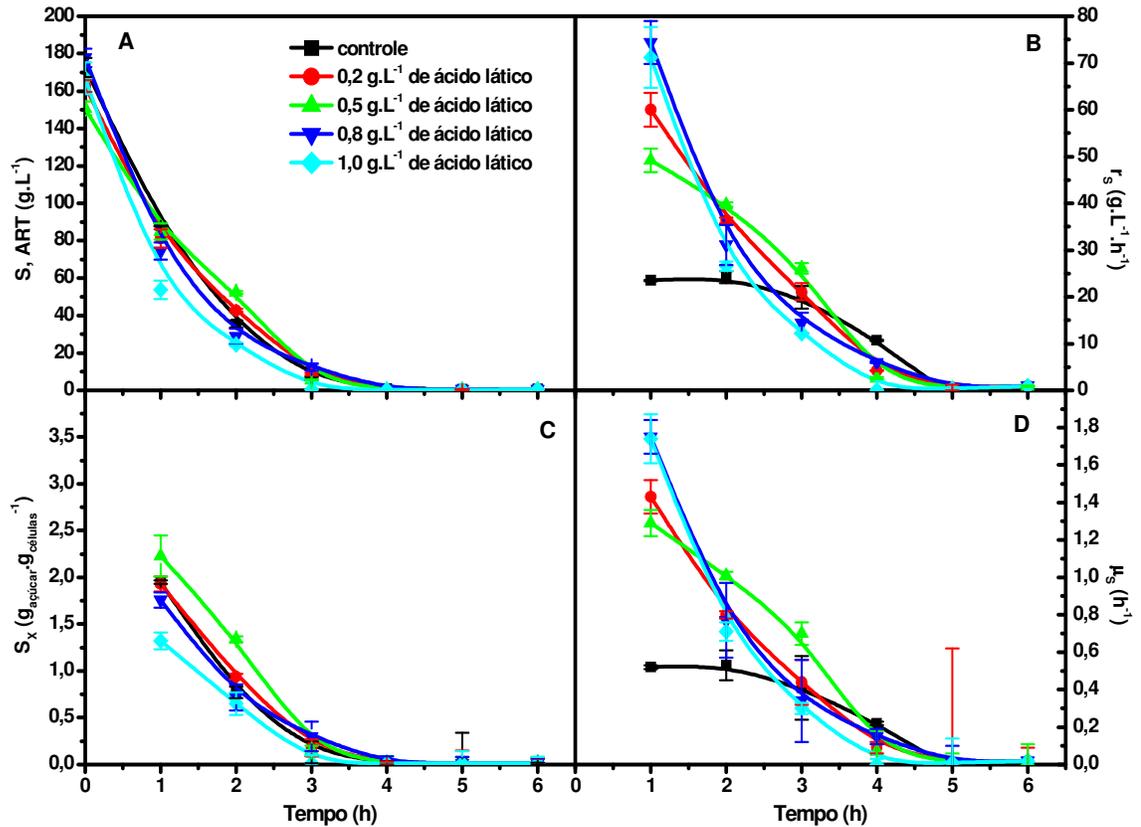


Figura 55- Efeito do reajuste do pH inicial a 4,5 sobre o açúcar (A), a velocidade de consumo de açúcar (B), consumo específico de açúcar (C) e a velocidade específica de consumo de açúcar (D) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial e ácido láctico adicionado (0,0 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹). As fermentações foram realizadas a 34 °C.

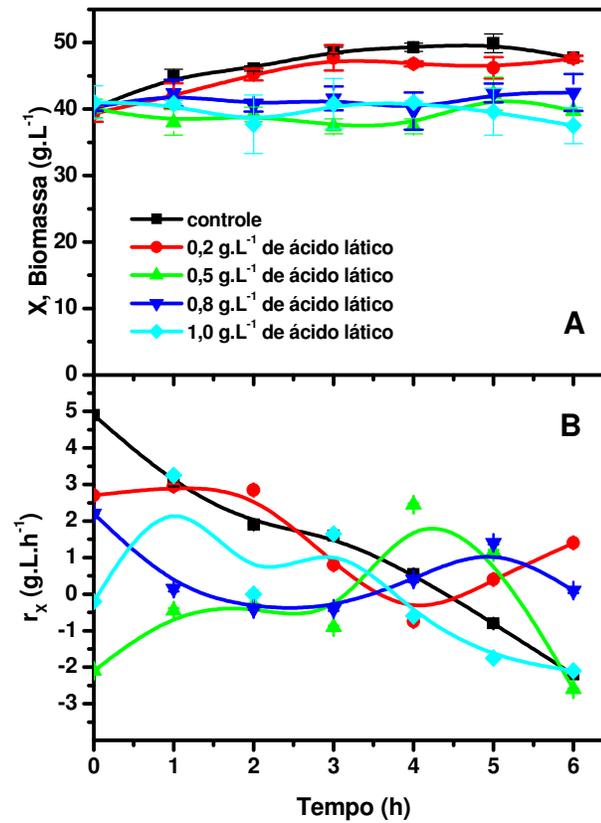


Figura 56- Efeito do reajuste do pH inicial a 4,5 sobre a biomassa (A) e a velocidade de crescimento da levedura 63M (B) em função do tempo em batelada simples com meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose inicial e ácido láctico adicionado (0,0 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹). As fermentações foram realizadas a 34 °C.

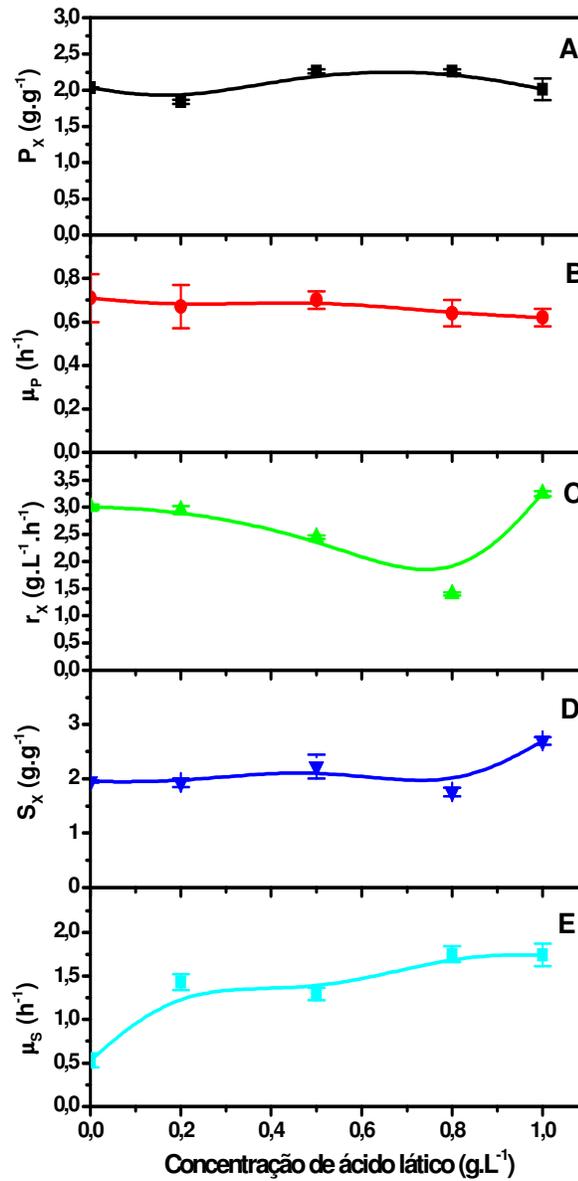


Figura 57- Efeito do reajuste do pH inicial a 4,5 sobre os parâmetros cinéticos de fermentação: produção específica de etanol (A), velocidade específica de produção de etanol (B), velocidade específica de crescimento (C), consumo específico de açúcar (D) e velocidade específica de consumo de açúcar (E) da levedura 63M em batelada simples com o reajuste de pH inicial a 34 °C.

3-BATELADA COM ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA

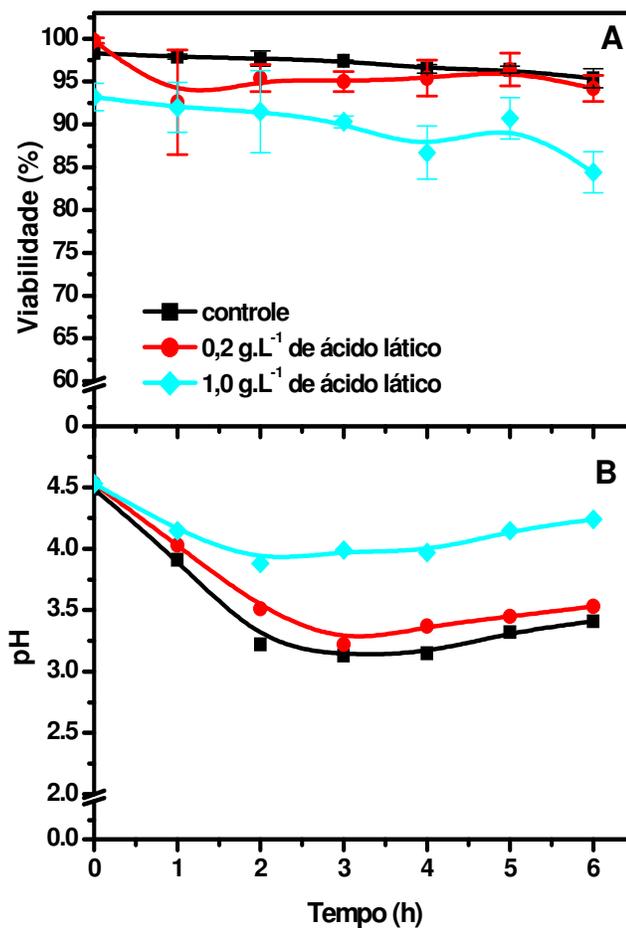


Figura 58- Efeito das concentrações de ácido láctico (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) a viabilidade levedura 63M (A) e pH das fermentações (B) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

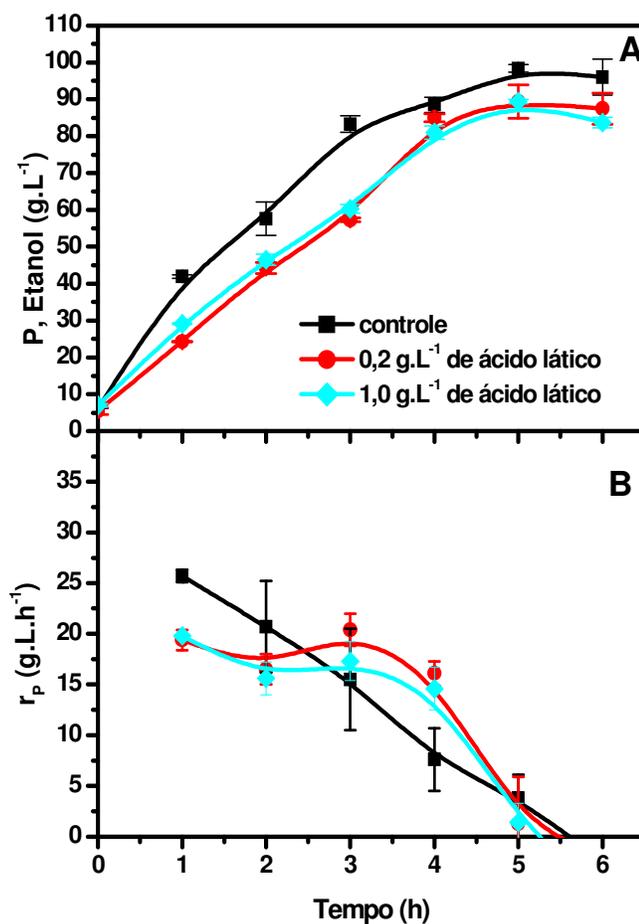


Figura 59- Efeito das concentrações de ácido lático (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) sobre o etanol produzido (A) e a produtividade (B) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

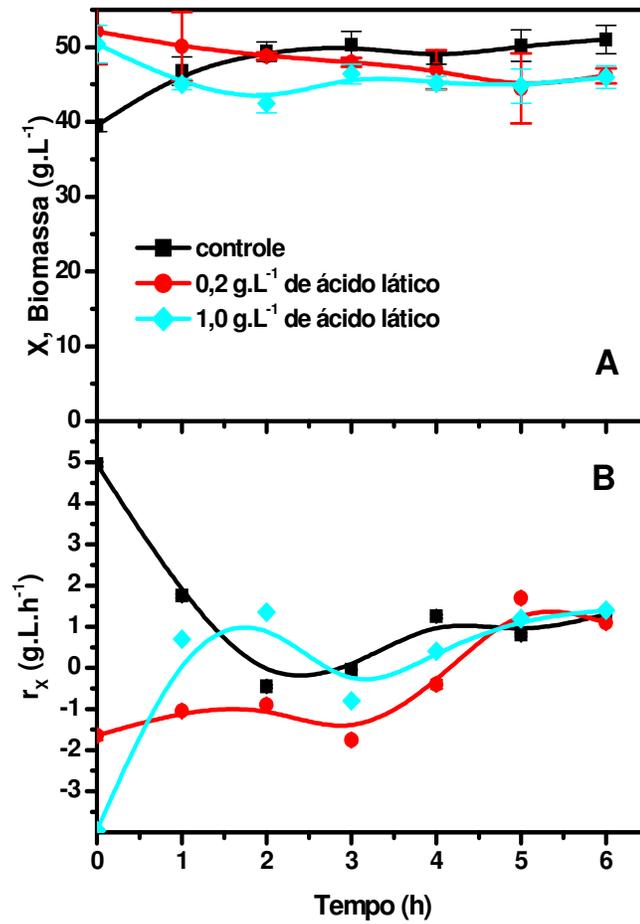


Figura 60- Efeito das concentrações de ácido láctico ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) sobre a biomassa (A) e a velocidade de crescimento (B) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L^{-1} de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

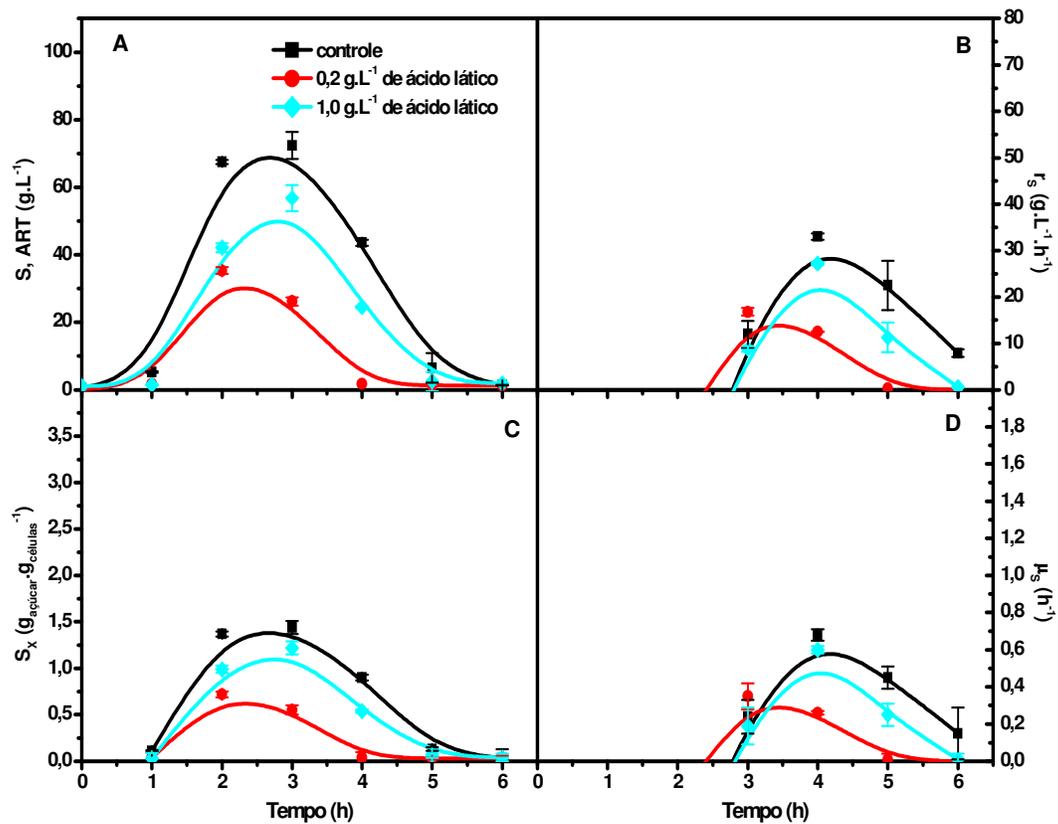


Figura 61- Efeito das concentrações de ácido láctico ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) sobre o açúcar (A), a velocidade de consumo de açúcar (B), consumo específico de açúcar (C) e a velocidade específica de consumo de açúcar (D) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L^{-1} de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4-BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS

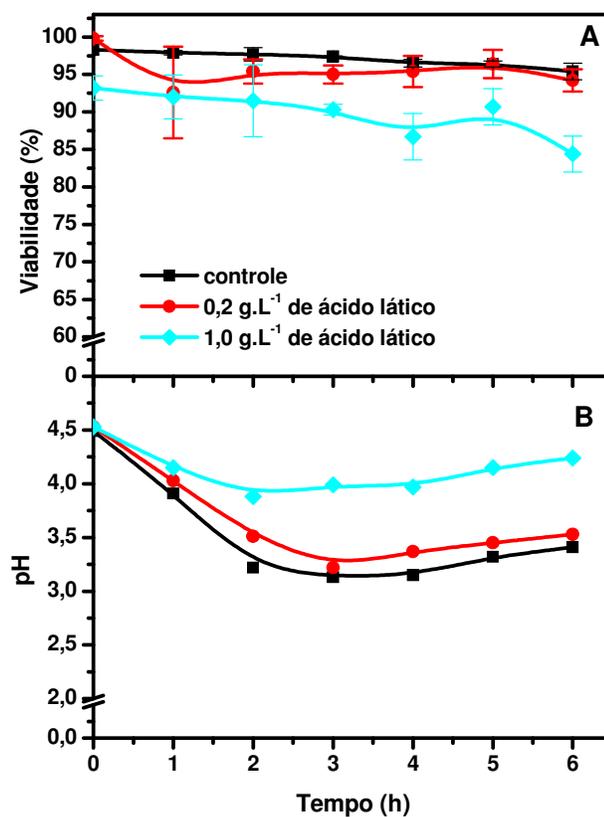


Figura 62- Efeito das concentrações de ácido láctico (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) a viabilidade levedura 63M (A) e pH das fermentações (B) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

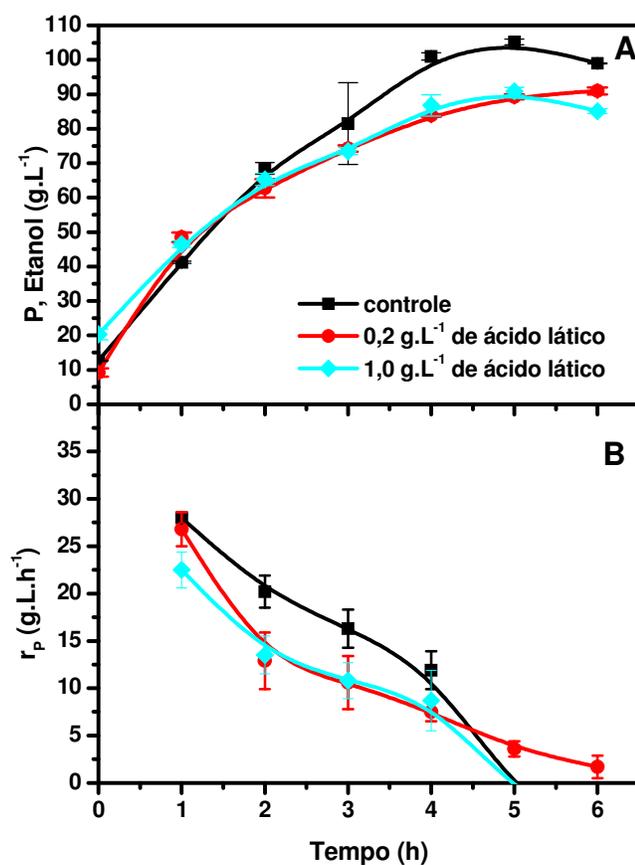


Figura 63- Efeito das concentrações de ácido láctico ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) sobre o etanol produzido (A) e a produtividade (B) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L^{-1} de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

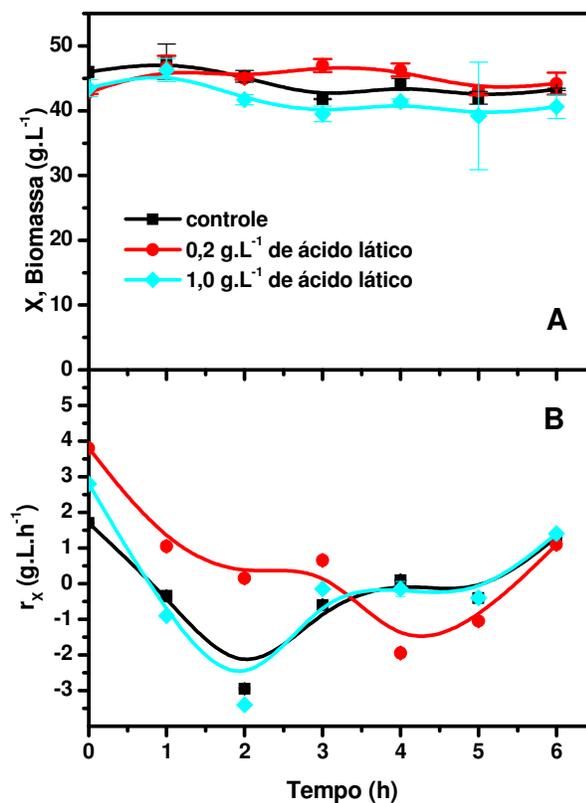


Figura 64- Efeito das concentrações de ácido láctico ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) sobre a biomassa (A) e a velocidade de crescimento (B) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L^{-1} de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a $34 \text{ }^\circ\text{C}$.

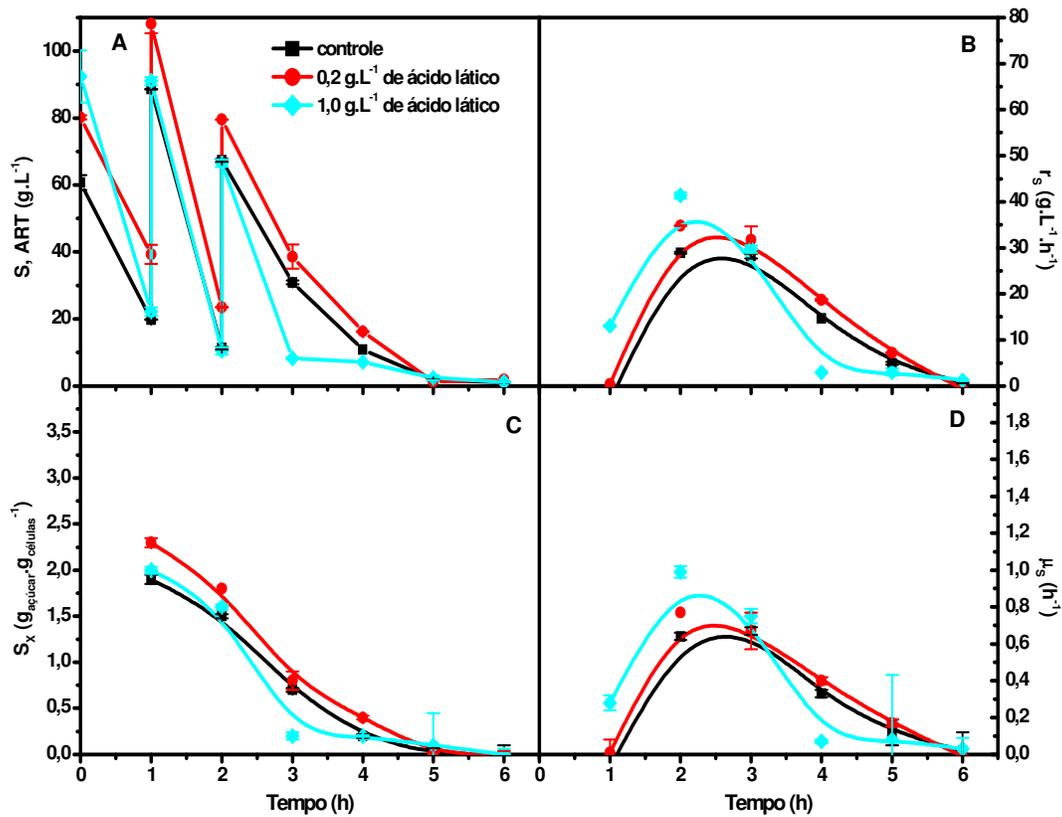


Figura 65- Efeito das concentrações de ácido láctico (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) sobre o açúcar (A), a velocidade de consumo de açúcar (B), consumo específico de açúcar (C) e a velocidade específica de consumo de açúcar (D) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

ANEXO C-

FERMENTAÇÕES EM MINI-REACTORES COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LÁTICO

1- BATELADA SIMPLES COM REAJUSTE DE pH

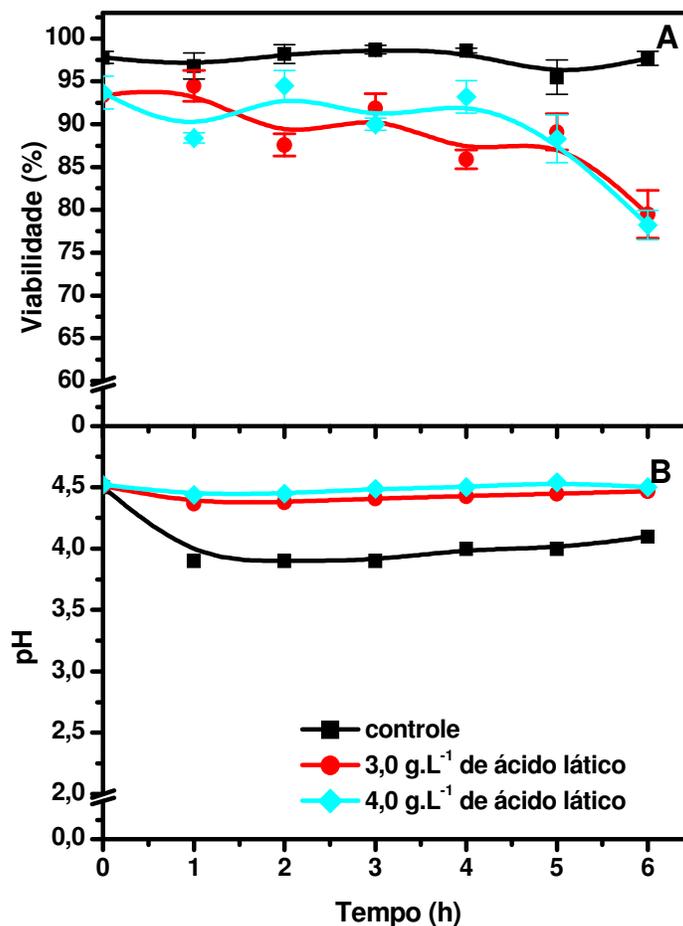


Figura 66- Efeito de altas concentrações de ácido láctico (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) sobre a viabilidade levedura 63M (A) e pH das fermentações (B) em função do tempo em batelada simples em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o reajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

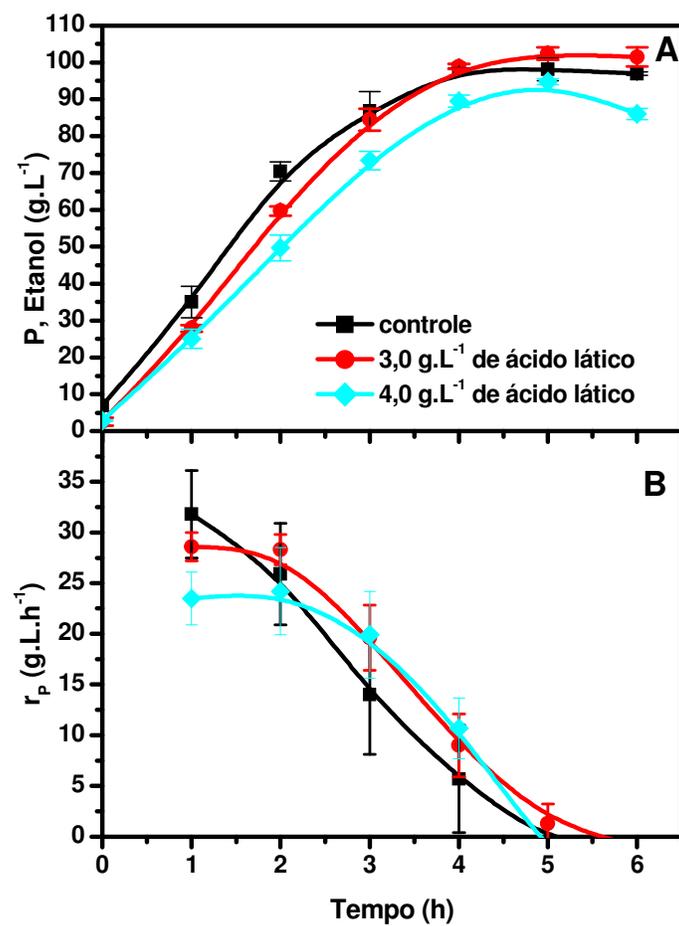


Figura 67- Efeito das concentrações de ácido láctico (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) sobre o etanol produzido (A) e a produtividade (B) em função do tempo em batelada simples em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o reajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

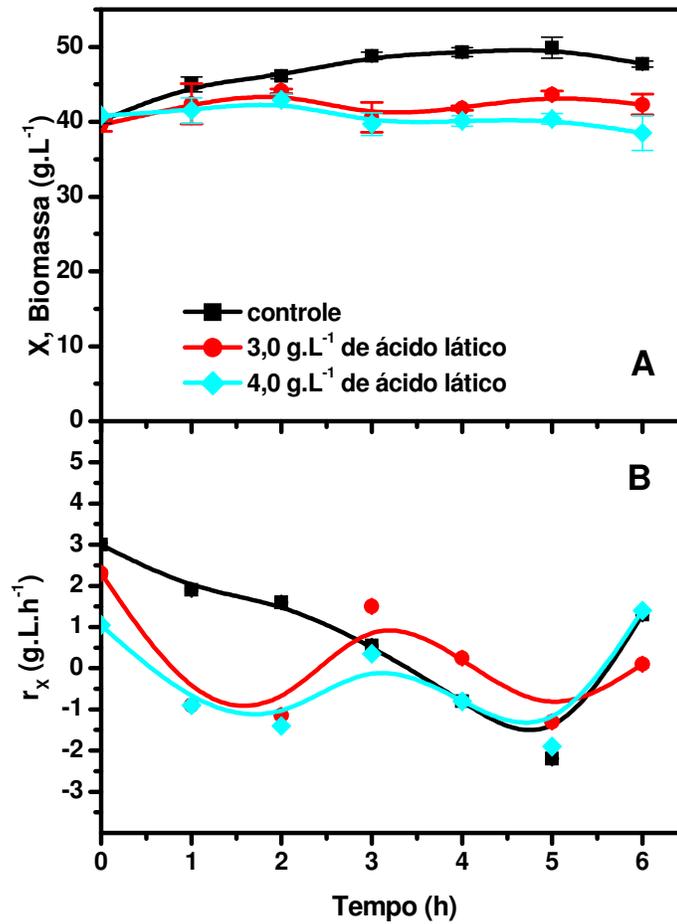


Figura 68- Efeito das concentrações de ácido láctico (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) sobre a biomassa (A) e a velocidade de crescimento (B) em função do tempo em batelada simples em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

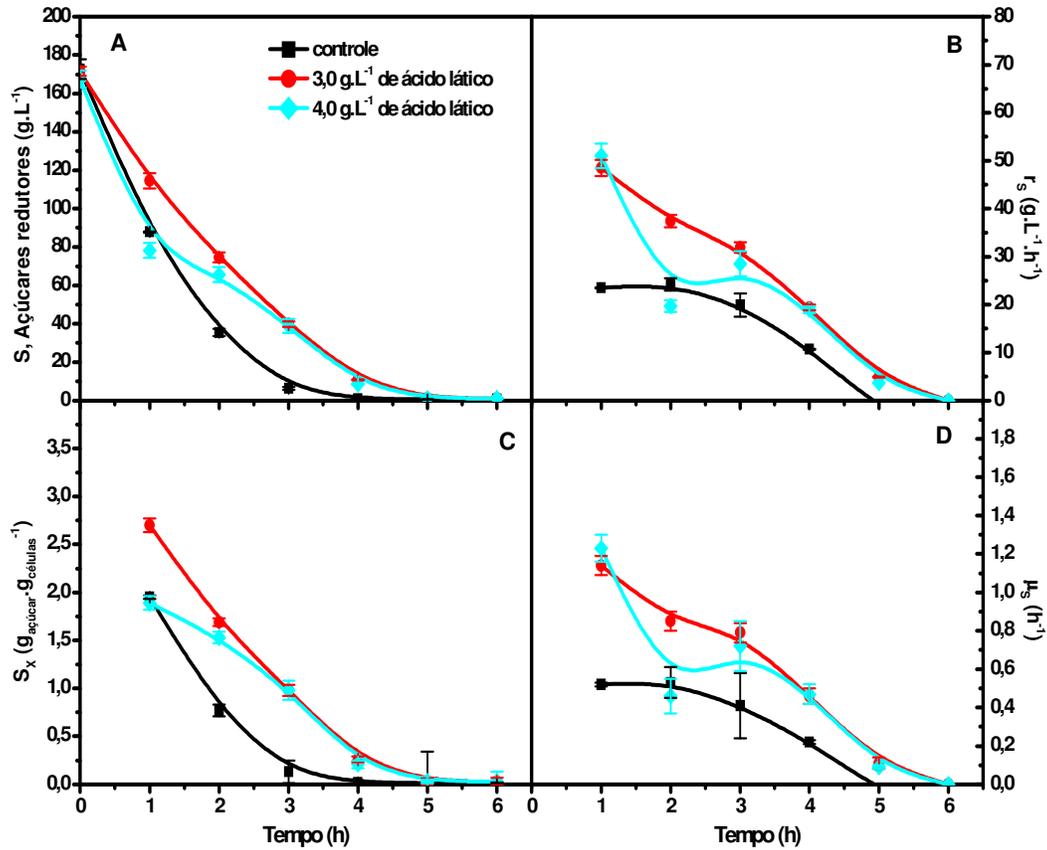


Figura 69- Efeito das concentrações de ácido láctico ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) sobre o açúcar (A), a velocidade de consumo de açúcar (B), consumo específico de açúcar (C) e a velocidade específica de consumo de açúcar (D) em função do tempo em batelada simples em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a $34 \text{ }^\circ\text{C}$.

2-BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS

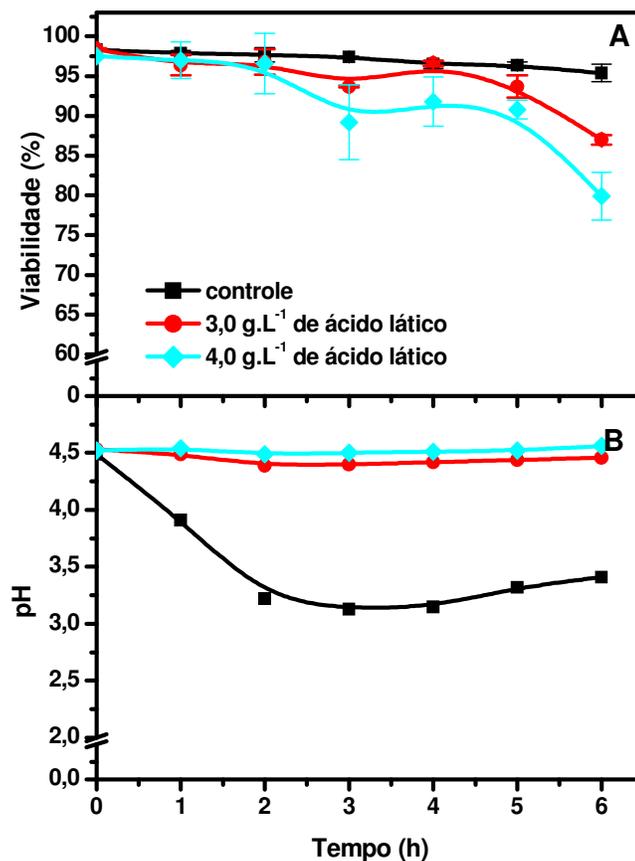


Figura 70- Efeito de altas concentrações de ácido láctico (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) sobre a viabilidade levedura 63M (A) e pH das fermentações (B) em função do tempo em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ por 2h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o reajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

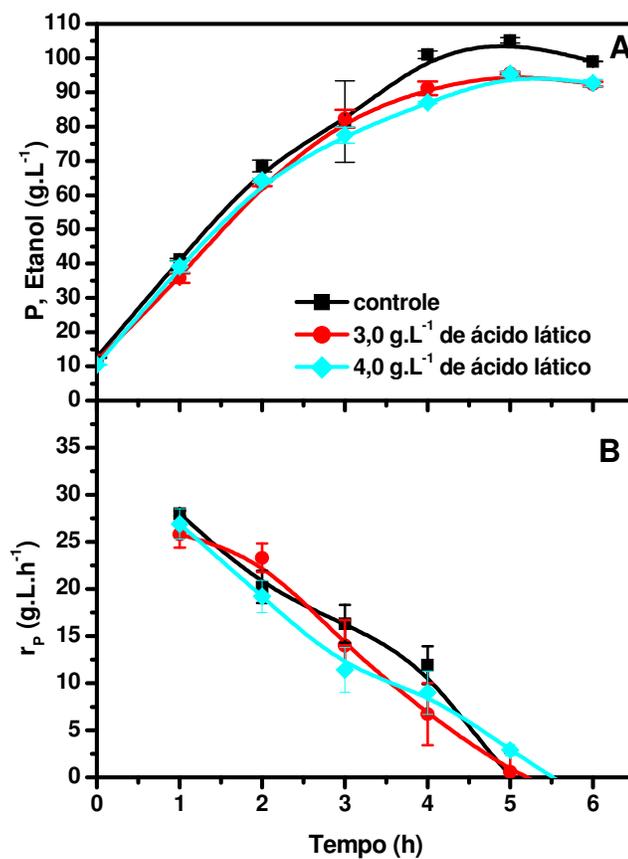


Figura 71- Efeito das concentrações de ácido lático (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) sobre o etanol produzido (A) e a produtividade (B) em função do tempo em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ por 2h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o reajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

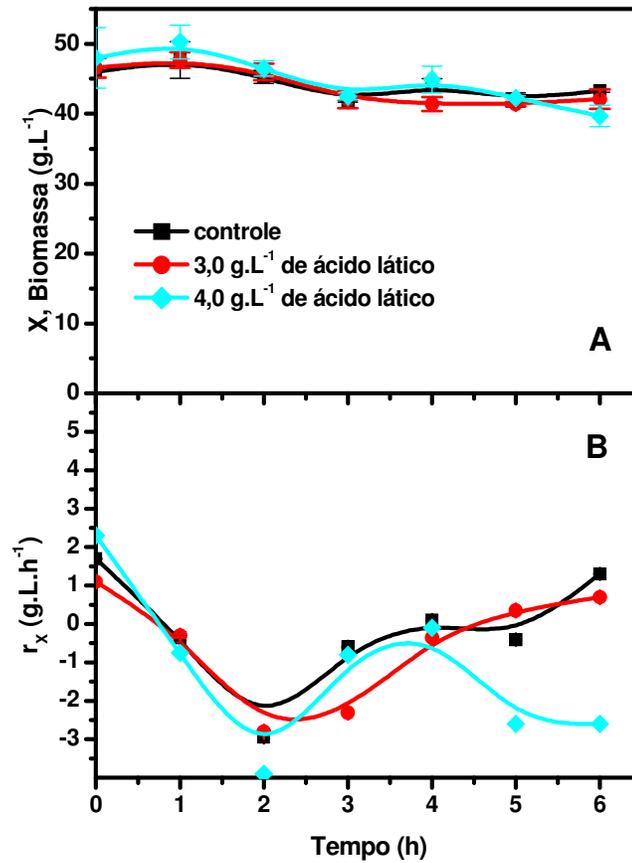


Figura 72- Efeito das concentrações de ácido láctico (3,0 g.L⁻¹ e 4,0 g.L⁻¹) sobre a biomassa (A) e a velocidade de crescimento (B) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

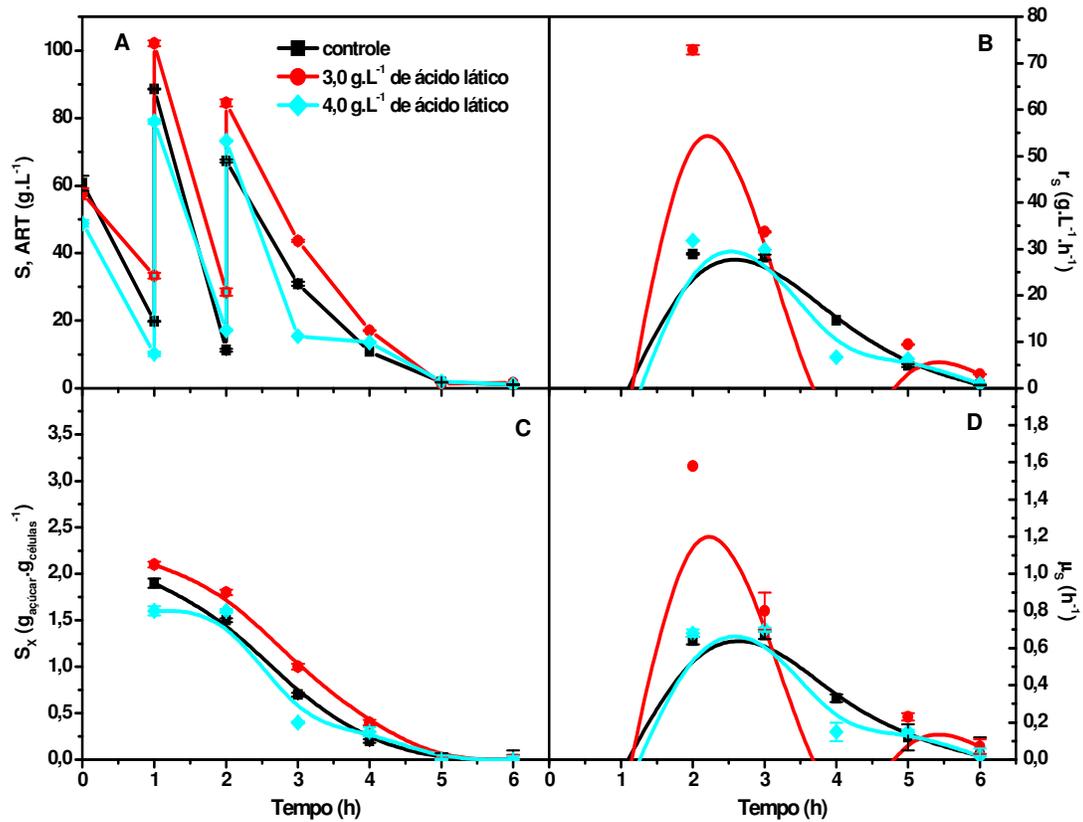


Figura 73- Efeito das concentrações de ácido lático (0,2 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) sobre o açúcar (A), a velocidade de consumo de açúcar (B), consumo específico de açúcar (C) e a velocidade específica de consumo de açúcar (D) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

3-EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE EM BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS

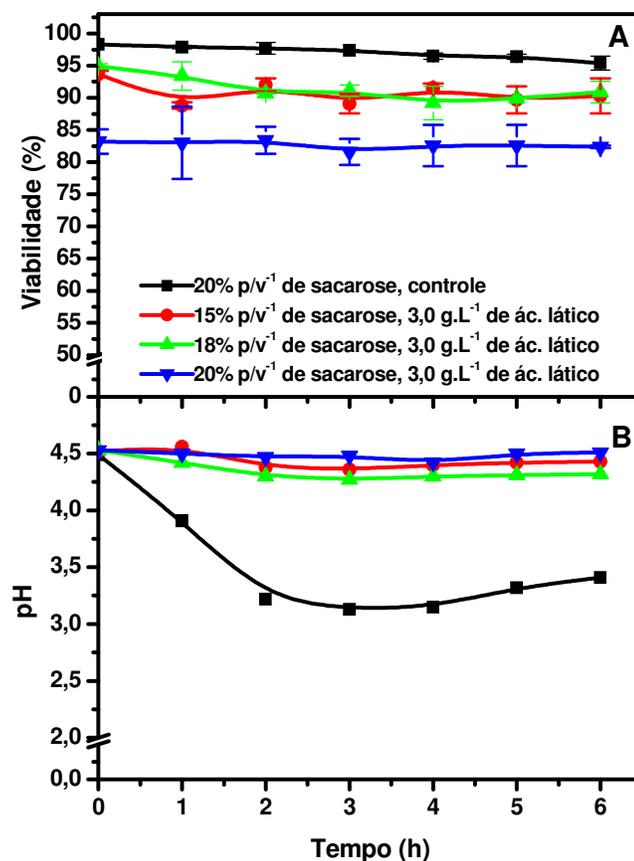


Figura 74- Efeito da concentração de sacarose (15% a 20%, p.v⁻¹) sobre a viabilidade levedura 63M (A) e pH das fermentações (B) em função do tempo em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ por 2h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico, com o reajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

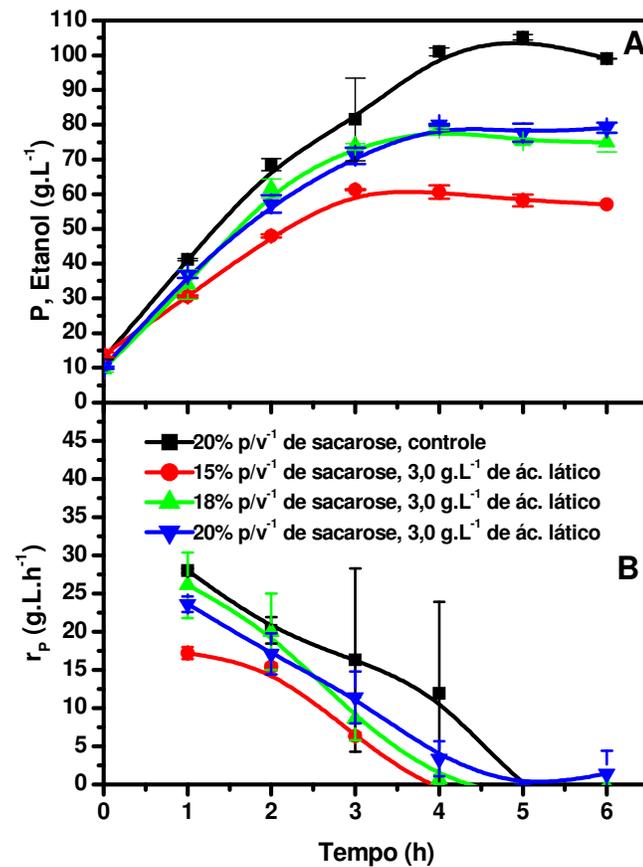


Figura 75- Efeito das da concentração de sacarose (15% a 20%, p.v⁻¹) sobre o etanol produzido (A) e a produtividade (B) em função do tempo em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ por 2h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico, com o reajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

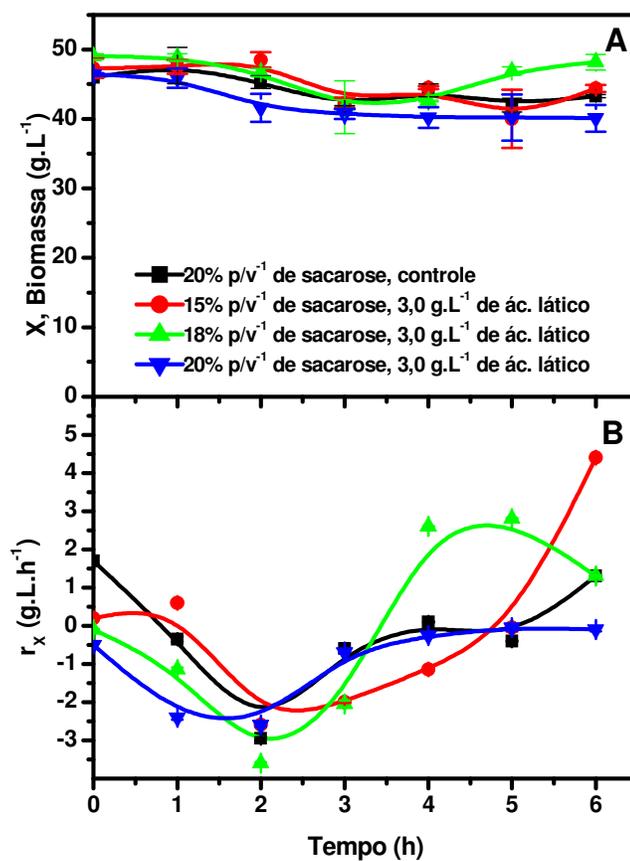


Figura 76- Efeito da concentração de sacarose (15% a 20%, $p.v^{-1}$) sobre a biomassa (A) e a velocidade de crescimento (B) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L^{-1} de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico, com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a $34 \text{ }^\circ\text{C}$.

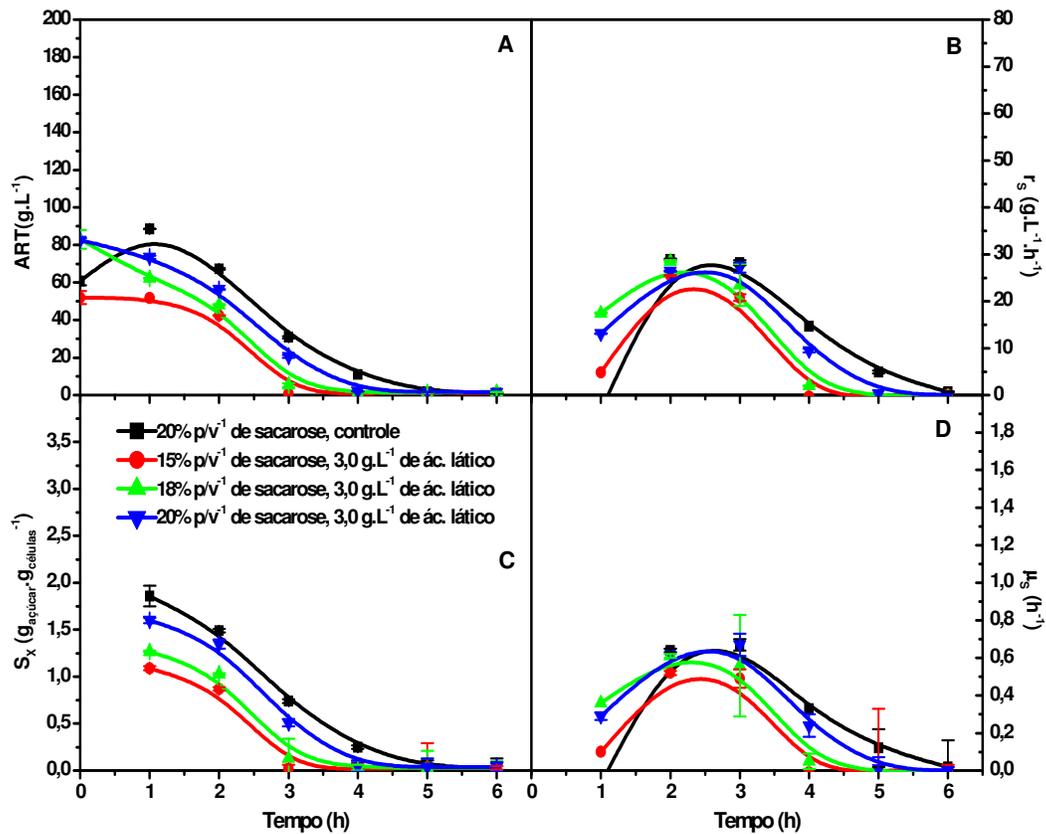


Figura 77- Efeito da concentração de sacarose (15% a 20%, p.v⁻¹) sobre o açúcar (A), a velocidade de consumo de açúcar (B), consumo específico de açúcar (C) e a velocidade específica de consumo de açúcar (D) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico, com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

3- EFEITO DA QUANTIDADE DE INÓCULO EM BATELADA ALIMENTADA POR PULSOS

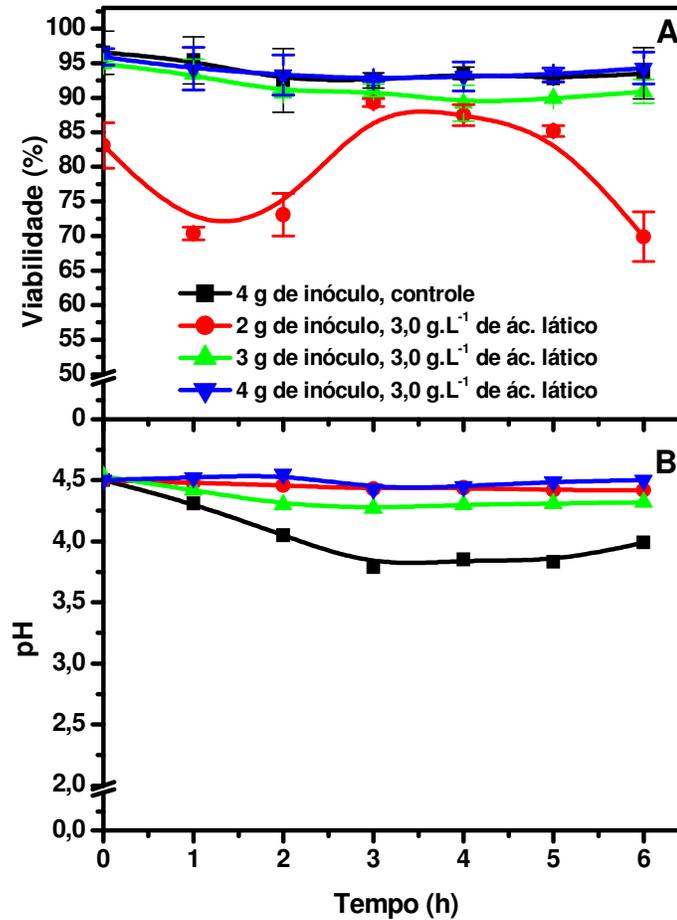


Figura 78- Efeito da quantidade de inóculo (2% a 4%, p.v⁻¹ em relação ao volume final de meio) sobre a viabilidade levedura 63M (A) e pH das fermentações (B) em função do tempo em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ por 2h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico, com o reajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

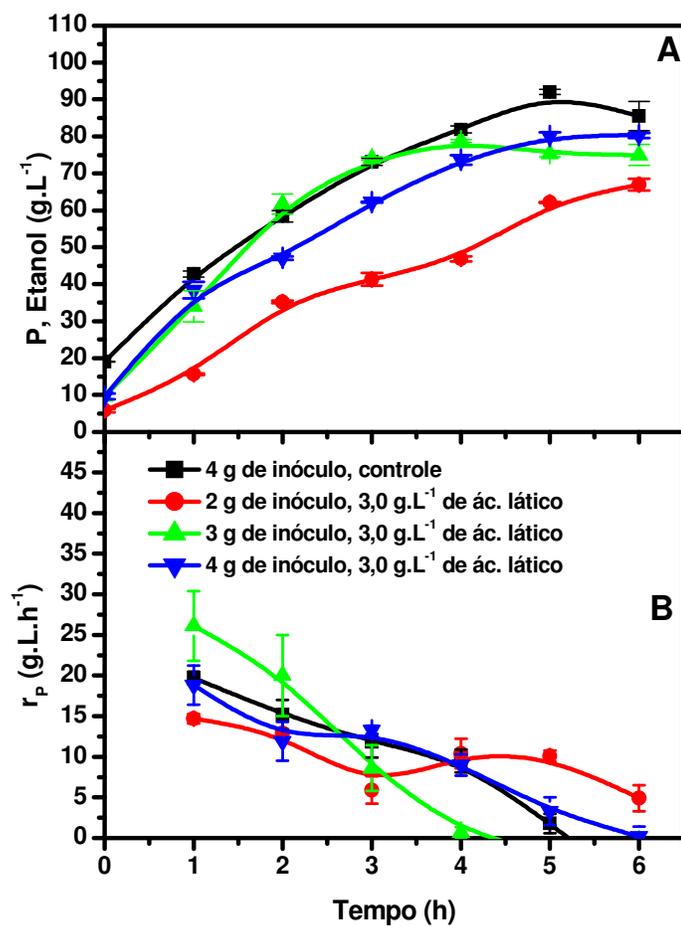


Figura 79- Efeito da quantidade de inóculo (2% a 4%, p.v⁻¹ em relação ao volume final de meio) sobre o etanol produzido (A) e a produtividade (B) em função do tempo em batelada alimentada por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ por 2h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico, com o reajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.

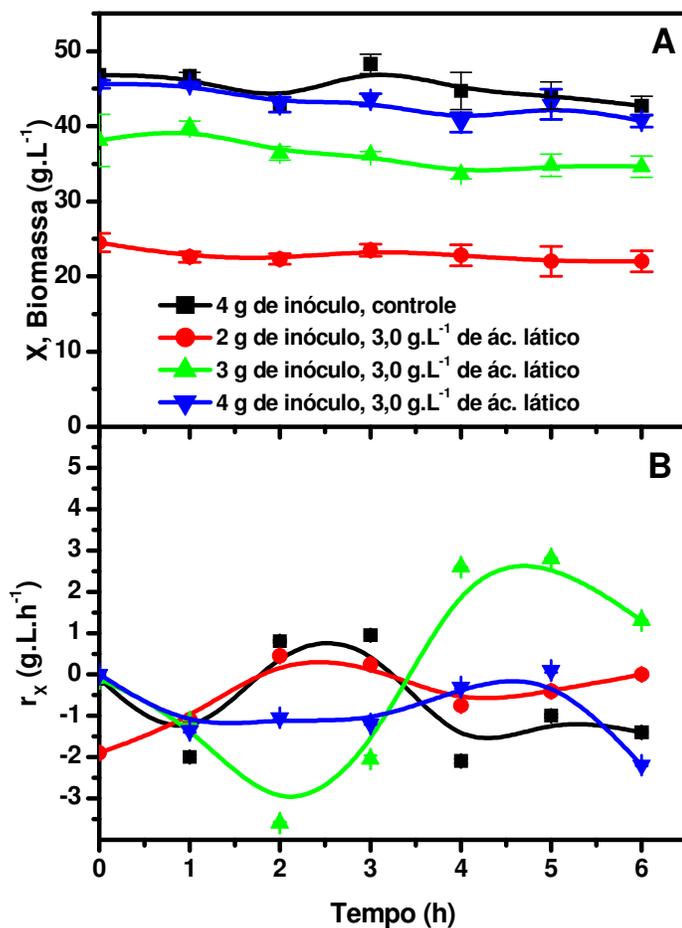


Figura 80- Efeito da quantidade de inóculo (2% a 4%, p.v⁻¹ em relação ao volume final de meio) sobre a biomassa (A) e a velocidade de crescimento (B) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L^{-1} de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) em presença de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico, com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a $34 \text{ }^\circ\text{C}$.

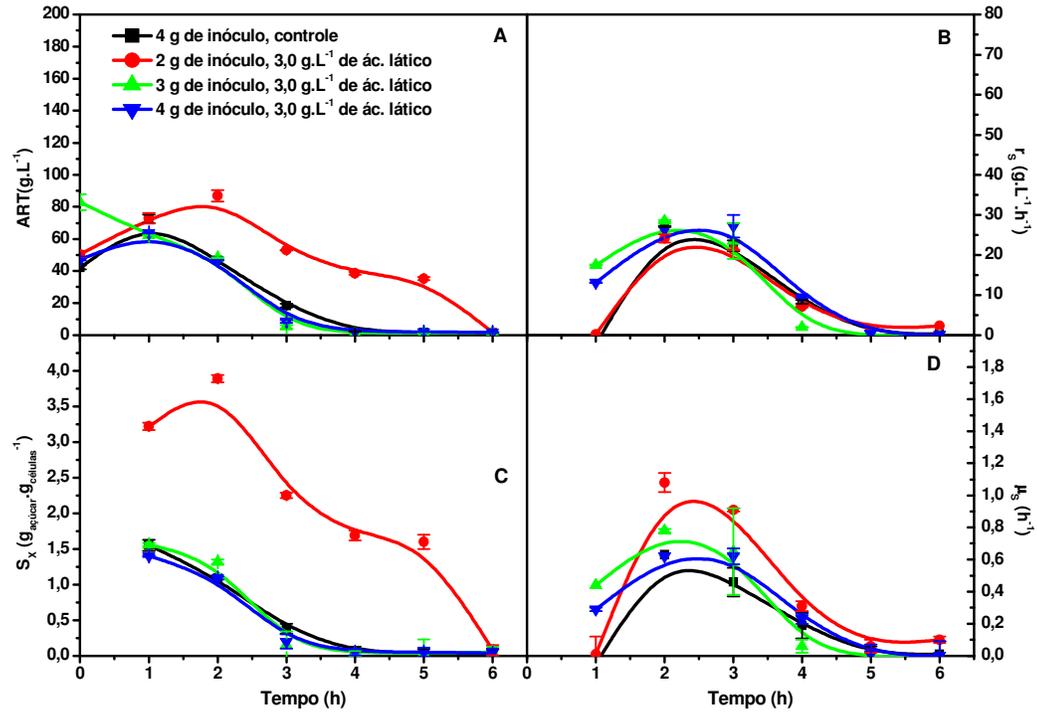


Figura 81- Efeito da quantidade de inóculo (2% a 4%, p.v⁻¹ em relação ao volume final de meio) sobre o açúcar (A), a velocidade de consumo de açúcar (B), consumo específico de açúcar (C) e a velocidade específica de consumo de açúcar (D) em função do tempo em batelada com alimentação por 3 pulsos decrescentes de sacarose 800 g.L⁻¹ de h em h em meio sintético (THOMAS *et al.*, 1998) em presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido láctico, com o ajuste do pH inicial (após a inoculação) para 4,5 e a 34 °C.