UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

INFLUÊNCIA CONJUNTA DO pH, TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE SULFITO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE MOSTOS DE SACAROSE

Uberlândia
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose

Flávia Silvério Amaral

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

Uberlândia - MG
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A485i Amaral, Flávia Silvério, 1983-
Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose / Flávia Silvério Amaral. - 2009.

92 f. : il.

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro.
Co-orientadora: Vicelma Luiz Cardoso.

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

1. Fermentação - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Júlio. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 663.15

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 27/02/2009.

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Orientador (PPG-EQ/UFU)

_____

Profª. Drª. Vicelma Luiz Cardoso
Co-Orientadora (PPG-EQ/UFU)

_____

Profª. Drª. Miriam Maria de Resende
(PPG-EQ/UFU)

_____

Prof. Dr. Jonas Contiero
(UNESP/Rio Claro - SP)

AGRADECIMENTOS

A passagem por mais esta etapa da vida chega ao fim com grande satisfação e sentimento de completo agradecimento. Posso dizer que passei por uma trajetória de muito crescimento pessoal e durante esta jornada contei com o apoio e colaboração de pessoas muito importantes e especiais a quem serei para sempre grata.

Agradeço a Deus e à minha proteção espiritual sempre presente, protegendo, inspirando, ensinando, fortificando, dando sentido à existência.

Aos meus pais, pessoas iluminadas e incondicionalmente ao meu lado. Além dos valores passados durante toda minha vida, do exemplo de humildade, de honestidade, da referência do que é ser bom, nesta etapa confirmaram com ainda mais força que estão e estarão sempre apoiando, me segurando, me reerguendo...

Ao meu irmão por todo o cuidado e preocupação. Por toda ajuda dada durante as etapas do mestrado.

Ao meu namorado, sempre presente, pelo apoio, pelo companheirismo, pela alegria, pela estrutura... Por continuar me surpreendendo e demonstrando tanta dedicação e disposição em estar junto incondicionalmente.

Ao Professor Eloízio, sempre se mostrando como um pai, pessoa que sempre admirei e com quem muito pude aprender. Agradeço por tudo, pela orientação, pelo incentivo, pela confiança, pela paciência, pelo cuidado, pelo carinho.

À Professora Vicelma, de quem obtive, o tempo todo, muito estímulo, incentivo e confiança. Pela força, paciência e pela disponibilidade de ajuda sempre demonstrada a mim.

À Professora Carla por confiar e possibilitar o cumprimento definitivo desta etapa. Pela demonstração de carinho e humanidade.

À Professora Miriam por toda a atenção e pela constante ajuda em todas as etapas do mestrado. Pelo socorro em vários episódios da parte experimental.

Ao Professor Ubirajara pelo incentivo, pelo exemplo e pela disponibilidade de sempre.

Aos demais professores da banca examinadora pela participação e sugestões.

Ao Professor Cláudio pela grande ajuda no tratamento estatístico dos meus dados.

À Professora Yaico do Instituto de Química pela atenção e pela ajuda na compreensão da teoria que diz respeito aos ácidos polipróticos e suas bases conjugadas, teoria importante para o andamento do trabalho.

À Patrícia Carolina, amiga a quem tenho profunda admiração, pela constante ajuda em todas as etapas do mestrado. Pelas dicas relacionadas à parte experimental, pelos conhecimentos passados durante todo o tempo, pela ajuda na cinética abordada no trabalho e por toda atenção e preocupação demonstrada sempre com tanto carinho.

À Sandra, amiga de ajuda essencial para o andamento de quase todos os alunos do núcleo (NUCBIO). Sempre disposta a ajudar, capaz de até se prejudicar para passar um pouco da grande bagagem de conhecimento que me impressiona. Pelos conselhos em relação à parte experimental, ao tratamento estatístico, à forma de abordagem, e pela atenção de sempre.

Ao Rafael, colega de mestrado sempre de bom humor, pela ajuda desde as matérias obrigatórias e no tratamento estatístico do trabalho.

Ao Jonas, menino de ouro, pela imensa ajuda na parte experimental. Pela disposição sempre presente, pela preocupação e proteção que sempre demonstrou e pela seriedade dada ao trabalho.

À Hávala, pela amizade e pela grande ajuda na parte experimental, por tornar o clima mais leve, mais divertido, mais prazeroso. Por todo interesse demonstrado desde o início do trabalho.

À Larissa, pela ajuda na parte experimental, constantemente disposta e atenciosa.

Às grandes amigas do mestrado Maurielem, Carla, Christiane, Janaína, Thálita, Paula, pela alegria, pelo incentivo, pelo apoio, pela diversão, pelo aprendizado.

À Thálita e à Elisângela pela grande disposição e ajuda principalmente em relação à ilustração feita do fermentador utilizado.

Ao Fran Sérgio, pela atenção e ajuda no referente à cinética trabalhada.

Aos alunos da graduação, Hamilton, Arinan, Arthur, Amarildo, que apesar da não ligação direta ao trabalho, fizeram companhia em dias de experimentação em que ficava sozinha. À Luana, Rafael, Edelise e Carlos Alberto, pela força e amizade.

Ao Gustavo, colega de graduação, pelo "*help*" no inglês.

A todos os professores e funcionários da FEQUI/UFU pela participação da minha formação profissional.

À Empresa Mauri Brasil Ind. Com. e Imp. Ltda, pelo fornecimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y940.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....i
LISTA DE FIGURAS iii
NOMENCLATURA.....v
RESUMO vi
"ABSTRACT" vii

1 – INTRODUÇÃO.....1

2 – REVISÃO DA LITERATURA.....5
2.1 – Processos Fermentativos.....5
2.1.1 – Processo em Batelada.....5
2.1.2 – Processo em Batelada Alimentada.....5
2.1.3 – Processo Contínuo.....6
2.2 – O agente da fermentação alcoólica.....6
2.3 – Fatores que afetam a fermentação alcoólica.....9
2.3.1 – Temperatura do meio fermentativo.....9
2.3.2 – pH do meio.....10
2.3.3 – Presença de sulfito no meio.....11
2.4 – Moléculas protetoras contra estresses à levedura.....13
2.4.1 – Trealose.....13
2.4.2 – Glicerol.....16
2.5 – Bioquímica da fermentação alcoólica.....18
2.6 – Subprodutos da fermentação alcoólica.....21
2.6.1 – Glicerol.....22
2.6.2 – Ácidos Orgânicos.....23
2.6.3 – Álcoois Superiores (Óleo Fúsel).....24
2.7 – Estudo Cinético da fermentação alcoólica.....25
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....31
3.1 – Materiais.....31
3.2 – Métodos.....32
3.2.1 – Metodologia experimental.....32
3.2.2 – Metodologia analítica.....32

3.3 – Cálculos relacionados às fermentações.....34
3.3.1 – Rendimento g_{etanol} por $g_{sacarose}$.....34
3.3.2 – Rendimento $g_{glicerol}$ por $g_{sacarose}$.....35
3.3.3 – Produtividade etanólica.....35
3.4 – Testes Preliminares.....35
3.5 – Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito.....36
3.6 – Influência do sulfito na fermentação alcoólica.....37
3.7 – Estudo cinético da fermentação alcoólica.....37
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....39
4.1 – Testes Preliminares.....39
4.2 – Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito.....39
4.2.1 – Viabilidade Celular.....40
4.2.2 – Quantidade final de trealose.....46
4.2.3 – Rendimento e produtividade de etanol.....51
4.2.4 – Rendimento de glicerol.....61
4.2.5 – Avaliação da reprodutibilidade do ponto otimizado.....67
4.3 – Efeito do sulfito na fermentação alcoólica.....68
4.4 – Estudo cinético da fermentação alcoólica.....73
5 – CONCLUSÕES.....75
6 – SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....76
7 – **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....77

APÊNDICES
APÊNDICE A – DADOS EXPERIMENTAIS 84
APÊNDICE B – CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Comparativo entre consumo de combustíveis no mercado interno brasileiro.....1
Figura 1.2 – Competitividade do Brasil – custo de produção do etanol.....3
Figura 2.1 – Fórmula estrutural da trealose.....14
Figura 2.2 – Estrutura do glicerol.....16
Figura 2.3 – Formação de Glicerol (glicose-6-fosfato a glicerol).....17
Figura 2.4 – Seqüência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae*.....20
Figura 2.5 – Metabolismo central da produção de etanol e de glicerol a partir da glicose.....21
Figura 2.6 – Formação de Glicerol (fosfodiidroxiacetona a glicerol).....23
Figura 2.6 – Formação de Succinato.....23
Figura 2.7 – Interrelação metabólica de aminoácidos, ácidos cetônicos, alcoóis superiores e ésteres formados durante a fermentação.....31
Figura 4.1 – Valores experimentais versus previstos pelo modelo para a viabilidade celular.....43
Figura 4.2 – Distribuição dos resíduos em torno da reta para a resposta viabilidade celular.....43
Figura 4.3 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para viabilidade em função da temperatura e do pH (a) e (b), da temperatura e da concentração de sulfito (c) e (d) e do pH e concentração de sulfito (e) e (f).....44
Figura 4.4 – Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a quantidade final de trealose em gramas por 100g de biomassa seca.....48
Figura 4.5 – Distribuição dos resíduos em torno da reta para a resposta teor de trealose final.....48
Figura 4.6 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para o teor de trealose (%) em função da temperatura e do pH (a) e (b), da temperatura e da concentração de sulfito (c) e (d) e do pH e concentração de sulfito (e) e (f).....49
Figura 4.7 – Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$.....54
Figura 4.8 – Distribuição dos resíduos em torno da reta para a resposta rendimento de etanol em relação à sacarose.....54

Figura 4.9 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para o rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$ em função da temperatura e do pH (a) e (b), da temperatura e da concentração de sulfito (c) e (d) e do pH e concentração de sulfito (e) e (f).....55
Figura 4.10 – Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta produtividade de etanol.....59
Figura 4.11 – Distribuição dos resíduos em torno da reta para a resposta produtividade de etanol.....60
Figura 4.12 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta produtividade de etanol (g/L.h) em função da temperatura e do pH (a) e (b), da temperatura e da concentração de sulfito (c) e (d) e do pH e concentração de sulfito (e) e (f).....60
Figura 4.13 – Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$.....64
Figura 4.14 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$.....64
Figura 4.15 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ em função da temperatura e do pH (a) e (b), da temperatura e da concentração de sulfito (c) e (d) e do pH e concentração de sulfito (e) e (f).....65
Figura 4.16 – Experimento de validação para o Planejamento Composto Central realizado.....68
Figura 4.17 – Distribuição dos íons relacionados ao sulfito em solução como função do pH.....70
Figura 4.18 – Fermentações alcoólicas na condição de pH igual a 4, temperatura de 32,5ºC e concentrações de sulfito de 0 mg/L (a), 345 mg/L (b) e 690 mg/L (c).....72
Figura B.1 – Curva de calibração relativa à sacarose.....90
Figura B.2 – Curva de calibração relativa ao etanol.....90
Figura B.3 – Curva de calibração relativa à célula.....90
Figura B.4 – Curva de calibração relativa à trealose.....91
Figura B.5 – Curva de calibração relativa ao glicerol.....91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Comparativo de fatores médios de emissão de CO_2 por veículos leves.....2
Tabela 2.1 – Composição molecular de levedura comercial.....7
Tabela 2.2 – Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada.....8
Tabela 2.3 – Modelos matemáticos propostos para a fermentação alcoólica.....27
Tabela 2.4 – Parâmetros cinéticos dos modelos apresentados na Tabela 2.3.....30
Tabela 3.1 – Valores utilizados no PCC para três variáveis independentes.....36
Tabela 3.2 – Matriz do PCC com valores codificados e originais das variáveis de estudo.....37
Tabela 4.1 – Valores utilizados no PCC para três variáveis após 12 horas de fermentação.....40
Tabela 4.2 – Coeficientes de regressão para a resposta viabilidade celular.....41
Tabela 4.3 – ANOVA para a resposta viabilidade celular.....42
Tabela 4.4 – Coeficientes de regressão para a resposta trealose ($g/100g_{biomassa}$).....46
Tabela 4.5 – ANOVA para a resposta trealose.....47
Tabela 4.6 – Coeficientes de regressão para a resposta rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$.....52
Tabela 4.7 – ANOVA para a resposta rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$.....53
Tabela 4.8 – Coeficientes de regressão para a resposta produtividade de etanol (g/L.h).....57
Tabela 4.9 – ANOVA para a resposta produtividade em etanol.....59
Tabela 4.10 – Coeficientes de regressão para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$.....62
Tabela 4.11 – ANOVA para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$.....63
Tabela 4.12 – Distribuição dos íons relacionados ao sulfito em solução como função do pH.....69
Tabela 4.13 – Valores dos parâmetros cinéticos na forma dimensional, condições iniciais e dados experimentais dos rendimentos para a estimação dos parâmetros.....75
Tabela A.1 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 5,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= 0, X2= +1,353, X3= 0).....84
Tabela A.2 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 25ºC, pH = 5 e Bt = 45 mg/L (X1= -1, X2= +1, X3= -1).....84
Tabela A.3 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 25ºC, pH = 2 e Bt = 45 mg/L (X1= -1, X2= -1, X3= -1).....84
Tabela A.4 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 3,5 e Bt = 345 mg/L (X1= 0, X2= 0, X3= +1,353).....85

Tabela A.5 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 45ºC, pH = 5 e Bt = 300 mg/L (X1= +1, X2= +1, X3= +1).....85
Tabela A.6 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 3,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= 0, X2= 0, X3= 0).....85
Tabela A.7 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 3,5 e Bt = 0 mg/L (X1= 0, X2= 0, X3= -1,353).....86
Tabela A.8 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 25ºC, pH = 2 e Bt = 300 mg/L (X1= -1, X2= -1, X3= +1).....86
Tabela A.9 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 48,5ºC, pH = 3,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= +1,353, X2= 0, X3= 0).....86
Tabela A.10 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 21,5ºC, pH = 3,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= -1,353, X2= 0, X3= 0).....87
Tabela A.11 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 3,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= 0, X2= 0, X3= 0).....87
Tabela A.12 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 45ºC, pH = 5 e Bt = 45 mg/L (X1= +1, X2= +1, X3= -1).....87
Tabela A.13 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 1,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= 0, X2= -1,353, X3= 0).....88
Tabela A.14 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 25ºC, pH = 5 e Bt = 300 mg/L (X1= -1, X2= +1, X3= +1).....88
Tabela A.15 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 25ºC, pH = 5 e Bt = 300 mg/L (X1= +1, X2= -1, X3= +1).....88
Tabela A.16 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 3,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= 0, X2= 0, X3= 0).....89
Tabela A.17 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 45ºC, pH = 2 e Bt = 300 mg/L (X1= +1, X2= -1, X3= -1).....89

NOMENCLATURA

Bt = bissulfito total – concentração de sulfito (mg/L)

C_{et12} = concentração de etanol ao final de 12h de fermentação (g/L)

CMI = Concentração Mínima Inibitória (mg/ml)

C_{sac0} = concentração de sacarose inicial (g/L)

C_{sac12} = concentração de sacarose ao final de 12h de fermentação (g/L)

K_i = Constante de inibição do crescimento celular pelo substrato (g/L)

K_S = Constante de saturação para o crescimento celular (adimensional)

P = Concentração de produto (adimensional)

P_{et} = Produtividade do etanol (g/Lh)

P_{max} = Concentração de produto na qual cessa o crescimento microbiano (g/L)

S = Concentração de substrato (adimensional)

T = temperatura (°C)

t = tempo de fermentação (h)

V = viabilidade (adimensional)

X1 = variável codificada do PCC referente à temperatura (adimensional)

X2 = variável codificada do PCC referente ao pH (adimensional)

X3 = variável codificada do PCC referente à concentração de sulfito (adimensional)

$Y_{G/S}$ = rendimento de glicerol com relação à sacarose ($g_{glicerol}/g_{sacarose}$)

$Y_{P/S}$ = rendimento de etanol com relação à sacarose ($g_{etanol}/g_{sacarose}$)

$Y_{X/S}$ = rendimento de célula com relação à sacarose ($g_{célula}/g_{sacarose}$)

μ = taxa específica de crescimento celular (1/h)

μ_{max} = taxa específica máxima de crescimento celular (1/h)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito em condições que englobaram situações de estresse para levedura na fermentação alcoólica, utilizando um planejamento composto central (PCC). Foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y-940, sendo os ensaios conduzidos em um reator de mistura com volume útil de 2L, com controles de temperatura e agitação. As condições definidas pelo PCC foram: temperatura na faixa de 21,5 a 48,5°C; pH de 1,5 a 5,5 e a concentração de sulfito de 0 a 345 mg/L. As fermentações foram acompanhadas ao longo do tempo pelas medidas de concentrações de sacarose, etanol, glicerol e células e, ao final de 12h, foram determinadas, também, a viabilidade celular e a concentração de trealose, sendo analisadas como respostas a viabilidade celular, a quantidade final de trealose intracelular, o rendimento e produtividade de etanol e rendimento em glicerol. As faixas das variáveis que maximizaram a viabilidade celular foi temperatura de 21,5 a 31ºC, de pH de 3,2 a 4,3, e concentração de sulfito de 0 a 45 mg/L. Para a quantidade final de trealose, o intervalo da temperatura que maximizou a resposta foi de 23,5 a 38ºC, o pH, de 3,5 a 4,6 e a concentração de sulfito, de 0 até 90mg/L. Para atingir o máximo rendimento em etanol (g/g) a faixa de temperatura foi de 32,5 a 39°C, o pH de 3,5 a 4,3 e a concentração de sulfito de 0 a 90mg/L. A máxima produtividade de etanol (g/L.h) foi obtida nas condições de temperatura de 33,5ºC, pH de 3,9 e na ausência de sulfito. As condições para o máximo rendimento de glicerol foram: temperatura de 48,5°C, pH 5,5 e concentração de sulfito 345mg/L. Com o objetivo de se investigar mais detalhadamente o efeito do sulfito na fermentação foram realizados experimentos complementares, adotando-se condições que permitiram avaliar o efeito isolado do sulfito na fermentação e concluiu-se que maiores concentrações de sulfito no meio geram maior rendimento em glicerol e menores produtividade de etanol e viabilidade celular. A cinética da fermentação no ponto definido como ótimo pelas análises das repostas do PCC se ajustou bem ao modelo proposto por Ghose e Thiagy. O parâmetro μ_{max} encontrado foi de $0,15h^{-1}$, K_s de 3,31g/L, K_i de 135,87g/L e o P_m de 84,23g/L.

Palavras-chave: fermentação alcoólica; condições estressantes; cinética da fermentação; influência do sulfito.

ABSTRACT

This work presents as objective to study the simultaneous influence of pH, temperature and sulphite concentration on situations comprising stress situations for the yeast on the alcoholic fermentation by the use of a central composite design (CCD). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* Y-940 was used and the experiments were carried out in a temperature and agitation controlled mixture reactor with a useful volume of 2L. The conditions defined on the CCD were: temperature ranging from 21.5 to 48.5ºC, pH ranging from 1.5 to 5.5 and sulphite concentration ranging from 0 to 345mg/L. The fermentations were accompanied throughout time by sucrose, ethanol, glycerol and cells concentrations and, by the end of 12 hours, cell viability and trehalose concentration were determined as well. From the obtained data, cell viability, the final amount of intracellular trehalose, ethanol yield and productivity and glycerol yield were analyzed as responses. The variables values that maximized the cell viability were temperature ranging from 21.5 to 31ºC, pH ranging from 3.2 to 4.2 and sulphite concentration from 0 to 45mg/L. For the final amount of trehalose, the temperature interval that maximized the response ranged from 23.5 to 38ºC, the pH ranging from 3.5 to 4.6 and the sulphite concentration ranging from 0 to 90mg/L. To achieve the maximum ethanol yield (g/g), the temperature ranged from 32.5 to 39ºC, the pH ranged from 3.5 to 4.3 and the sulphite concentration from 0 to 90 mg/L. The ethanol maximum productivity (g/L.h) was attained in a temperature of 33.5ºC, in a pH of 3.9 and in absence of sulphite. The conditions for a maximum glycerol yield were: 48.5ºC, pH of 5.5 and a sulphite concentration of 345 mg/L. With the objective of investigating the sulphite effect on fermentation with a greater level of detail, additional experiments were conducted by adopting conditions that allowed to evaluate the isolated effect of sulphite on fermentations, allowing to reach the conclusion that greater sulphite concentrations generates a high glycerol yield and lowers ethanol productivity and cell viability. The fermentation kinetic at the point defined as optimal by analyzing the CCD responses was well adjusted to the model proposed by Ghose and Thiagy. The found μ_{max} parameter was 0,15h^{-1}, K_s of 3,31g/L, K_i of 135,87g/L and a P_m of 84,23g/L.

Keywords: ethanol; alcoholic fermentation; stress conditions; fermentation kinetics; influence of sulphite.

1 – INTRODUÇÃO

A indústria sucroalcooleira no Brasil é de grande importância para a economia nacional. O etanol é utilizado como combustível alternativo para automóveis, sendo menos poluente que a gasolina e, além disso, é derivado de uma fonte de energia renovável. Devido ao alto custo da gasolina gerado por conflitos e oscilações econômicas mundiais e pela sua derivação de uma fonte de energia não renovável (o petróleo), a importância do etanol na matriz energética é cada vez maior.

No Brasil, a fermentação alcoólica foi inicialmente utilizada para a produção de aguardente a partir de caldo de cana-de-açúcar, passando mais tarde a ser aplicada na produção de álcool carburante. Na década de 70, devido à guerra do Oriente Médio e a elevação do preço do barril de petróleo, o governo brasileiro, como alternativa, implantou o Pró Álcool (Programa Nacional de Álcool) em 1975. A partir desta data, o Brasil tornou-se o primeiro país do mundo a desenvolver um programa alternativo de substituição da gasolina por outro combustível. A utilização do etanol como combustível carburante mostrou-se uma alternativa adequada a países carentes em reservas petrolíferas e com grandes extensões territoriais adequadas à produção de cana de açúcar.

O que se tem observado, após 2004, é um aumento do consumo de álcool hidratado em detrimento do consumo de gasolina. A Figura 1.1 apresenta uma análise comparativa da variação de consumo de gasolina e etanol no mercado interno brasileiro no período de 2001 a 2007 (AUSTON, 2008).

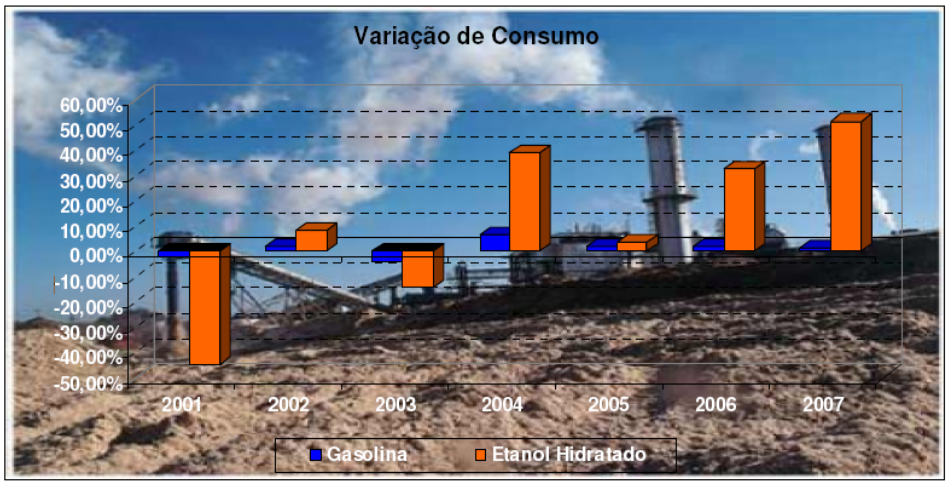


Figura 1.1 – Comparação entre consumo de combustíveis no mercado interno brasileiro (Fonte: ANP)

O cenário mundial atual pode ser caracterizado por altos preços do petróleo e por uma grande preocupação a respeito dos impactos da acumulação de gases de efeito estufa na atmosfera. Tais fatores reforçam a idéia do uso do etanol como combustível alternativo. A Tabela 1.1 apresenta valores médios de emissão de CO_2 por veículos leves novos abastecidos com álcool e gasolina (TEIXEIRA, 2006).

Tabela 1.1 – Valores médios de emissão de CO_2 por veículos leves

Combustível	CO_2(g/L)
gasolina C	2.165
Álcool	1.377
flex gasolina C	2.162
flex álcool	1.382

(Fonte: MMA)

Neste cenário, o etanol brasileiro ainda conta, segundo o diretor-geral do Instituto Ícone de Estudos do Comércio e Negociações Internacionais (Icone), André Nassar, com grande possibilidade de ganhar mais estímulo e espaço no mercado americano com o governo de Barack Obama. Entre os compromissos da campanha de Obama estão a redução das emissões de carbono em 80% até 2050, a diminuição da dependência das importações de petróleo, o desenvolvimento e a implementação de tecnologias de energia limpa. (MATTOS, 2009)

Os EUA têm como meta atingir um consumo anual de 136 bilhões de litros de etanol até 2022, número bem mais expressivo que os apresentados atuais 30 bilhões de litros. Segundo Nassar, se Obama mantiver tais metas de consumo de etanol, pode ser que se considere necessária a complementação do mercado americano com importação e, nesse caso, a expectativa é de redução, para um certo volume de exportação, da tarifa aplicada hoje sobre o etanol brasileiro.

O Brasil conta, assim, com maior potencial de expansão da produção de biocombustíveis atualmente no mundo. O setor conta atualmente com 386 unidades industriais instaladas, com uma produção estimada de etanol para a safra 08/09 de 24 bilhões de litros, com uma média de 65 milhões de litros por unidade (AUSTON, 2008).

O etanol brasileiro se mostra mais vantajoso, também, que o uso do álcool produzido de outras biomassas devido ao seu baixo custo relativo. A maior vantagem do álcool de cana em relação àquele derivado de outras culturas é a não necessidade da queima de combustíveis fósseis para sua produção, o que contribui para redução das emissões de carbono. Além disso,

o álcool de cana brasileiro apresenta menor custo de produção que o obtido de outras matérias-primas. A Figura 1.2 ilustra o custo de produção do etanol no Brasil e em outras regiões do mundo e sua competitividade (TEIXEIRA, 2006).

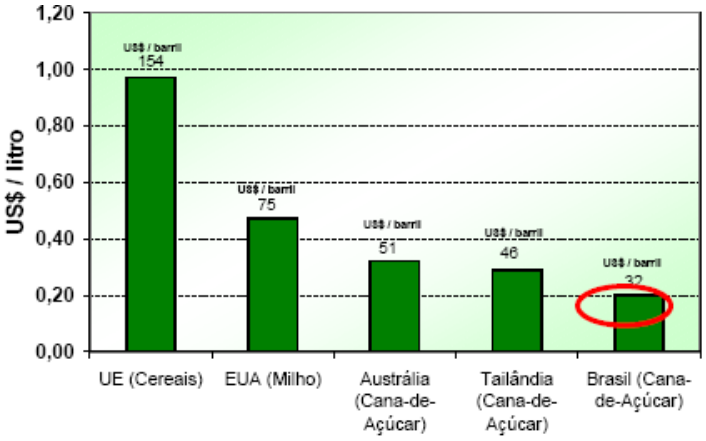


Figura 1.2 – Competitividade do Brasil – custo de produção do etanol (Fonte: DATAGRO).

A produção comercial de álcool no Brasil é feita mediante processo de batelada alimentada ou fermentação contínua. O etanol é produzido a partir da fermentação do açúcar de cana por *Saccharomyces cerevisiae* com reciclo de células. No processo mais amplamente empregado (Melle-Boinot), nas versões batelada alimentada e contínua, diversos fatores limitantes da produtividade já foram diagnosticados. Contaminação bacteriana, floculação da levedura, elevada formação de espuma, açúcares residuais elevados, queda da viabilidade da levedura, crescimento excessivo ou reduzido da levedura, formação de glicerol em excesso, além de outros, se correlacionam com diminuição da eficiência fermentativa (BASSO, 2004).

É de suma importância considerar as condições fisiológicas impostas pelo processo industrial sobre os microrganismos presentes no ambiente da fermentação, para a identificação de agentes físicos, químicos e microbiológicos que estejam exercendo efeitos estressantes ou estimulantes a esses microrganismos (leveduras e bactérias) (BASSO, 2004).

Muito ainda tem que ser feito para a verificação dos efeitos de fatores estressantes às leveduras durante a produção etanólica visando maior otimização do processo. Entre as variáveis que influenciam no metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo de fermentação etanólico pode-se destacar o pH, a temperatura e a concentração de sulfito.

Na literatura, o estudo conjunto destas variáveis no estresse da levedura tem sido pouco explorado. Tal trabalho visou, dessa forma, buscar condições mais adequadas para

aumento da eficiência e do rendimento alcoólico após a compreensão de alguns fatores que interferem no metabolismo das leveduras durante o processo fermentativo.

Baseado no exposto, o presente trabalho apresenta como objetivo geral estudar a influência conjunta de condições de pH, temperatura e concentração de sulfito no estresse da levedura em fermentação alcoólica.

Como objetivos específicos pode-se citar:

- avaliar a influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na produção de etanol, na viabilidade celular e na síntese de glicerol e trealose, aplicando um planejamento experimental;
- realizar um estudo cinético na condição otimizada pelo planejamento experimental.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Processos Fermentativos

Um reator biológico pode ser operado de forma descontínua, semicontínua, descontínua alimentada ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação celular (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Para os processos fermentativos, fala-se em processo em batelada (descontínuo), processo contínuo e processos em batelada alimentada.

2.1.1 – Processo em Batelada

No que se refere à manutenção e assepsia, o processo descontínuo é considerado o mais seguro, pois, ao final de cada batelada, o reator deve ser esterilizado juntamente com um novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo que deve ser submetido a todos os controles necessários para assegurar a presença única do microrganismo responsável pelo processo (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Além do menor risco de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação pela possibilidade de utilização dos fermentadores para a fabricação de diferentes produtos e por permitir uma melhor condição de controle com relação à estabilidade genética do microrganismo (CARVALHO e SATO, 2001). A fermentação em batelada leva a baixos rendimentos e produtividades quando o substrato adicionado de uma só vez, no início da fermentação, exerce efeitos de inibição, repressão ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (CARVALHO e SATO, 2001).

Assim, o processo batelada é sempre utilizado como base para as comparações de eficiências atingidas com relação aos outros processos, mas a sua baixa eficiência estimula o surgimento de formas alternativas (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

2.1.2 – Processo em Batelada Alimentada

Os processos em batelada alimentada são eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive nos de fermentação alcoólica. Em tais processos, especialmente naqueles com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio em fermentação. A batelada alimentada permite o controle da concentração de açúcar minimizando os efeitos de inibição pelo substrato e permitindo a sua adição em momentos propícios durante a fermentação (McNEIL e HARVEY, 1990).

Tais processos possibilitam uma vazão de alimentação constante ou variável com o tempo e a adição de mosto de forma contínua ou intermitente. Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de alimentação dos reatores com meio nutriente, nos processos batelada alimentada é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (CARVALHO e SATO, 2001). É possível também que se trabalhe com altas concentrações de substrato tendo-se um acréscimo em produtividade do etanol e uma diminuição do volume do reator e da quantidade de vinhaça produzida (IMPE VAN et al., 1994; QUEINNEC e DAHHOU, 1994).

2.1.3 – Processo Contínuo

O processo contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua do meio de cultura a uma determinada vazão, sendo o volume de reação mantido constante pela retirada contínua do caldo de fermentação (FACCIOTTI, 2001).

A fermentação contínua é um processo que requer maior conhecimento do comportamento do microrganismo no meio em que ele atua. Fatores como pH, temperatura, concentração de substrato, etanol e biomassa, dentre outros, influenciam na produtividade do sistema exigindo maior controle do processo (ATALA et al., 2000).

Tal processo pode ser mais vantajoso que o de batelada alimentada, pois inclui otimização das condições de processo para uma maior produtividade, período longo de produtividade contínua, maior produtividade volumétrica, redução dos custos laboratoriais uma vez alcançado o estado desejado e redução do tempo de limpeza e sanitização das dornas A maior desvantagem é que as fermentações contínuas são mais suscetíveis à contaminação bacteriana por longos prazos de exposição (CYSEWSKI e WILKIE, 1978).

2.2 – O agente da fermentação alcoólica

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Bactérias, entre as quais a *Zymomonas mobilis*, são tidas como capazes de produzir etanol, mas, economicamente, as leveduras ainda são os agentes largamente utilizados. A levedura da fermentação alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae* que se apresenta, normalmente, na forma unicelular com 2 a 8 micrômetros de diâmetro (LIMA, *et al*., 2001).

A fermentação alcoólica é, portanto, um processo biológico conduzido pela levedura, normalmente *Saccharomyces cerevisiae*, cuja fisiologia e bioquímica tem sido negligenciada em favor de uma visão físico-química e mecânica do processo. Porém, trata-se de um organismo vivo, com múltiplas habilidades metabólicas, podendo alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações no meio, com grande impacto no rendimento do processo (BASSO, 2004).

As leveduras (organismos saprófitas) exigem uma fonte de carbono elaborada – glicose ou outro açúcar – que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio. A Tabela 2.1 ilustra a composição molecular de levedura comercial.

Tabela 2.1. Composição molecular de levedura comercial.

Constituinte	**Levedura (g/100g matéria seca)**
Carbono (C)	45,00 - 47,00
Hidrogênio (H)	6,00 - 6,50
Oxigênio (O)	31,00 - 32,00
Nitrogênio (N)	7,50 - 9,00
Potássio (K)	0,90 - 3,5 0
Fósforo (P)	1,10- 2,00
Enxofre (S)	0,30 - 0,50
Magnésio (Mg)	0,15 - 0,50
Cálcio (Ca)	0,04 - 0,90
Sódio (Na)	0,02 - 0,20
Zinco (Z)	0,004 -0,13
Ferro (Fe)	0,003-0,10
Cobre (Cu)	0,002 -0,12
Manganês (Mn)	0,0004 -0,0035
Cobalto (Co)	0,0005
Molibdênio (Mo)	0,000005 - 0,000009
Cloro (Cl)	0,004 -0,10
Iodo (I)	0,00005 -0,0004
Chumbo (Pb)	0,0001 -0,0007
Arsênio (As)	0,00001

(HARRISON, 1971)

O meio de cultura, além do carbono, hidrogênio e oxigênio deve, igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas (LIMA *et al*., 2001).

As células de leveduras, durante o processo de fermentação alcoólica apresentam necessidades nutricionais e os nutrientes influenciam diretamente a multiplicação e o crescimento celular e também a eficiência da transformação do açúcar em álcool.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza o nitrogênio nas formas amoniacal, (NH_4^+), amídica (uréia) ou amínica (na forma de aminoácidos), não tendo habilidade metabólica para aproveitar o nitrato e com pouquíssima ou nenhuma capacidade de utilizar as proteínas do meio. O fósforo é absorvido na forma de íon $H_2PO_4^-$, forma predominante em pH 4,5, enquanto enxofre pode ser assimilado do sulfato, sulfito ou tiossulfato.

A Tabela 2.2 apresenta as concentrações dos principais nutrientes minerais para uma boa fermentação alcoólica. Tais nutrientes podem já estar presentes no mosto, sendo desnecessárias adições.

Tabela 2.2 – Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica (AMORIM, 2005).

Mineral	**Variação no Mosto (mg/L)**	**Recomendação (mg/L)**
N-assimilável (NH_4^+ R-NH2)	7 - 350	100 – 300
Fósforo (P)	20 - 200	50 – 250
Potássio (K)	300 - 1200	700 – 1300
Magnésio (Mg)	80 - 3900	100 – 200
Enxofre (S)	80 - 3900	Abaixo de 100 – 20
Cálcio (Ca)	150 - 2000	Abaixo de 100 – 20
Zinco (Zn)	0,45 - 9	1 – 5
Cobre (Cu)	0,20 - 8	1 – 5
Manganês (Mn)	2 - 8	1 – 5
Alumínio (Al)	5 - 240	<300 (mosto de caldo)

(AMORIM, 2005)

A transformação de sacarose em etanol e CO_2 por essas leveduras envolve 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático se encontra confinado no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação se processa (LIMA *et al*., 2001).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são microrganismos de alta eficiência fermentativa. Este fato tem permitido a seleção de cepas industriais com características adquiridas que as tornam produtores superiores de etanol mais tolerantes aos produtos da fermentação. Estudos relacionados com a melhoria das características da levedura ou com o processo de produção de etanol têm sido apresentados na literatura com o objetivo de aumentar o rendimento e a produtividade dos processos fermentativos. Estes estudos incluem a utilização de novas cepas de microrganismos, mudanças na composição e concentração de nutrientes do meio de cultura e reciclagem de resíduos (AMORIM, 2005).

2.3 – Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana), afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (LIMA *et al*., 2001).

Durante a fermentação, a levedura pode estar exposta a vários fatores estressantes. Dentre esses fatores, os mais freqüentemente mencionados são os altos teores alcoólicos, a temperatura elevada, a acidez do meio (inclusive no tratamento ácido que ocorre na assepsia do leite de levedura), a presença de sulfito, a contaminação bacteriana e, mais raramente documentada, a contaminação com leveduras não *Saccharomyces* (BASSO, 1991).

É comum que fatores estressantes atinjam em maior grau a viabilidade celular em comparação à produção etanólica. Entretanto, se as fermentações usassem reciclo das células, como numa situação industrial, o impacto sobre o rendimento etanólico poderia ser mais acentuado, já que sua viabilidade é bastante afetada em poucos ciclos (DORTA, 2006).

2.3.1 – Temperatura do meio fermentativo

As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35ºC, mas, não raramente, a temperatura nas destilarias alcança 38ºC. À medida que a temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol (LIMA *et al*., 2001).

O rendimento alcoólico é maior em temperaturas mais baixas (15 a 20°C), porém apresentam uma demora para a obtenção da produção máxima. Quando a temperatura do biorreator é de 25°C a 31°C a taxa inicial de fermentação é maior, mas em temperaturas maiores que 35°C decresce a viabilidade celular (TORIJA *et al*., 2003).

Diferentes temperaturas afetam de forma distinta a atividade metabólica e o crescimento das leveduras. Isso pode ser atribuído não somente à genética das diferentes cepas, mas também à composição do meio de crescimento e a outros parâmetros como pH, agentes químicos, desidratação osmótica, estado nutricional e fase de crescimento (MONACO, 2007).

As linhagens industriais de *S. cerevisiae* são normalmente resistentes a alta temperatura (MONACO, 2007), mas este fator interfere na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol ou meio com baixo pH (SILVA-FILHO *et. al* 2005).

A maioria dos componentes celulares, como proteínas e membrana plasmática, é drasticamente afetada quando as células são expostas a altas temperaturas (BENEY e GERVAIS, 2001). Os danos térmicos para as células de leveduras resultam do rompimento das ligações de hidrogênio e das interações hidrofóbicas, promovendo desnaturação das proteínas e ácidos nucléicos (WALKER, 1994).

Assim, apesar de existirem meios fisiológicos para regulação da temperatura interna da levedura, um aumento do estresse celular acontece, promovendo rápido declínio da viabilidade do microrganismo (WALKER, 1994).

2.3.2 – pH do meio

As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo adequada entre 4 e 5. Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5 (LIMA *et al*., 2001).

No processo com reutilização da levedura, é realizado tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2,0 a 3,2, durante uma a duas horas, visando à redução da carga microbiana. Desta forma, a fermentação alcoólica se inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0 (LIMA *et al*., 2001).

Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos em etanol, pelo fato de se restringir o crescimento do fermento, com a conseqüente redução da produção de glicerol e de contaminação bacteriana. Entretanto, fermentações alcoólicas se desenvolvem bem em níveis mais elevados de pH como em melaços (pH 5,8 a 5,9). Já os caldos de cana fermentam sem correção de acidez, em pH natural que varia de 5,2 a 6,8 (LIMA *et al*., 2001).

O processo fermentativo, ocorrendo na faixa mais elevada de pH nas indústrias, acaba beneficiando a integridade fisiológica da levedura em fermentações com altas concentrações de SO_2, sacarose e etanol (JONES *et al.* 1981).

A tolerância à acidez é uma característica importante para as leveduras industriais (LIMA *et al.,* 2001), mesmo assim, a utilização de linhagens de *S. cerevisiae* resistentes ao estresse ácido é uma característica importante para a indústria de álcool combustível (MONACO, 2007). Valores muito baixos de pH, além de ocasionarem perda de nutrientes como nitrogênio e potássio, segundo GOMES (1988), aumentam a sensibilidade ao etanol, aos ácidos orgânicos e ao SO_2.

DORTA (2006), no estudo de fatores sinérgicos entre sulfito, ácido lático, pH e etanol na fermentação alcoólica da levedura, após a análise de todos os parâmetros estressantes, verificou que o mais baixo valor de pH (pH = 3,6) foi o que mais interferiu no metabolismo das linhagens estudadas. Verificou, também que o pH 4,5 mostrou ser suficiente para minimizar os efeitos danosos do sulfito e etanol sobre a célula.

No pH 4,5 a ação deletéria do sulfito é minimizada pelo fato deste se apresentar em sua forma menos tóxica. O bissulfito de sódio ($NaHSO_3$) em pH 4,5 está predominantemente na forma de bissulfito (HSO_3^-), não sendo a forma mais tóxica para a levedura quanto à de SO_2. O pH mais elevado ocasiona menor entrada no interior das células de ácidos orgânicos, SO_2 e um menor efeito tóxico associado à presença do etanol (CARTWRIGHT *et al*., 1989).

2.3.3 – Presença de sulfito no meio

O sulfito é um dos componentes do melaço que pode afetar o desenvolvimento da fermentação alcoólica. Desde 1990, o uso de melaço na formulação dos mostos para fermentação alcoólica tem crescido bastante e conseqüentemente a concentração de sulfito no mesmo. O sulfito é normalmente utilizado no processo de clarificação do açúcar e está presente em altas concentrações no melaço da cana-de-açúcar, contribuindo para a diminuição do rendimento alcoólico e viabilidade das células das leveduras (DORTA, 2006).

A sulfitação consiste em um método de tratamento do caldo de cana-de-açúcar de uso generalizado no Brasil e nos países produtores de açúcar branco de consumo direto. Esse método foi introduzido a partir do século XVIII, com o objetivo de remover impurezas que conferem cor e turbidez ao caldo, sendo o dióxido de enxofre o principal reagente utilizado (MAFRA, 2004).

Estudos da toxidez do sulfito, tanto em laboratório, como a partir de informações coletadas na indústria, mostraram que a sua presença no meio de fermentação (em até cerca de 100 ppm), traz mais benefícios (redução da contaminação bacteriana) do que efeitos tóxicos à levedura (BASSO, 1991).

ALVES (1994) chegou à conclusão de que a presença de sulfito no mosto fermentativo pode ser benéfica se este atuar como bactericida, pois, a contaminação bacteriana causa maiores danos ao processo que a diminuição do rendimento causado pelo sulfito.

OLIVA-NETO E YOKOYA (2001) concluíram que a CMI (Concentração Mínima Inibitória) para o sulfito de sódio, em pH 4,5, se dá na faixa de 10-40 mg/mL para bactérias láticas (principais bactérias contaminantes da fermentação alcoólica), já para a levedura o CMI foi de 5000 mg/mL, nas mesmas condições.

O sulfito de sódio no processo industrial, é incorporado ao melaço de cana na faixa de 200 a 700 mg/L (OLIVA-NETO e YOKOYA, 1991) formando algumas vezes mostos com até 300 mg/L de SO_2, especialmente quando envolve a presença de caldo sulfitado da fábrica de açúcar.

O enxofre na forma de sulfito, quando está acima do nível ideal (principalmente no caso de uso do melaço como matéria-prima), aumenta a produção de glicerol e inibe o desenvolvimento das leveduras que, com o passar do tempo, passam a apresentar certa adaptação a tal situação (AMORIM, 2005).

Entretanto, GUTIERREZ (1988), no estudo do efeito da adição de sulfito sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica, apesar de observar uma diminuição da produção destes e elevação no teor de acetaldeído, verificou que na presença de 219 mg de SO_2/L de meio de melaço em pH 4 não foi observada alteração da produção de etanol.

A ação antibacteriana do sulfito em solução aquosa a vários valores de pH foi investigado por Carr *et al*. (1976). Em soluções com pH entre 5 e 9, uma mistura de bissulfito (HSO_3^-) e sulfito (SO_3^{2-}) era observada. Com o decréscimo do pH, a forma sulfito (SO_3^{2-}) aumentava e a bissulfito diminuía. Segundo os autores, a forma sulfito seria a responsável por maior ação antibacteriana.

ANACLETO e VAN UDEN (1982) estudaram a cinética de morte celular em função da elevação da concentração do sulfito e da temperatura. Eles concluíram que o efeito de

morte em *Saccharomyces cererisiae* foi dependente do pH e correlacionado com a concentração de dióxido de enxofre em suspensão no meio.

Os autores afirmaram, ainda, que o dióxido de enxofre molecular, aparentemente transportado seletivamente para o interior da célula é virtualmente inexistente em pH 6 (pH intracelular aproximado da levedura).

2.4 – Moléculas protetoras contra estresses à levedura

Os organismos unicelulares, para manter condições ótimas de crescimento e funcionamento, necessitam de um ambiente intracelular específico e balanceado. Qualquer flutuação no ambiente interno pode resultar em uma variedade de perturbações que podem reduzir a atividade enzimática, interromper o fluxo metabólico, danificar as estruturas celulares e alterar os gradientes químicos, levando a célula a uma condição de instabilidade. Porém, as células são capazes de manter a homeostase interna, mesmo diante de um ambiente externo variado (GASCH et al., 2001).

As respostas aos diferentes tipos de estresse é uma característica fundamental na adaptação dos organismos vivos às condições adversas do ambiente. As células de *Saccharomyces cerevisiae,* quando submetidas a condições de estresse, desenvolvem uma rápida resposta molecular para reparar danos e proteger as estruturas moleculares dos efeitos causados pelo estresse (ESTRUCH, 2000). Essa resposta é caracterizada pela síntese de proteínas específicas, aumento do nível celular de trealose e glicerol, alteração da composição lipídica da membrana plasmática, dentre outros fatores (MELO, 2006).

2.4.1 – Trealose

A trealose foi descoberta incidentalmente a partir do que parecia ser uma improvável fonte: a ergotamina, uma praga de cultura de natureza fúngica que já afetava culturas de arroz e outros cereais, atormentando civilizações durante anos registrados pela história (SINGER e LINDQUIST, 1998).

O ascomiceto chamou a atenção de Wiggers que, em 1832, identificou entre seus constituintes um até então desconhecido açúcar. Meio século depois, Berthelot encontrou o mesmo açúcar em casulos do besouro da espécie Larinus utilizados para fins medicinais. Esses casulos eram chamados “trehala” e inspiraram Berthelot a chamar o desconhecido açúcar de trealose (“trehalose”). A trealose foi então encontrada em uma grande variedade de

espécies, dentre elas, leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (SINGER e LINDQUIST, 1998).

A trealose é um dissacarídeo não redutor formado pela união de duas moléculas de glicose através de uma ligação α-1,1-glicosidíca. A Figura 2.1 apresenta a fórmula estrutural da trealose.

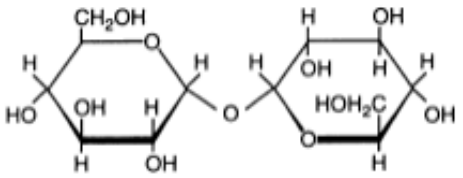


Figura 2.1 – Fórmula estrutural da trealose

Por mais de meio século, depois de se descobrir que leveduras sintetizavam trealose, o dissacarídeo foi primeiramente definido como sendo um carboidrato de reserva. Este ponto de vista foi baseado na observação de que o acúmulo de trealose se dá em estados fisiológicos nos quais reserva de energia é importante (fase estacionária de crescimento e esporulação) e não é produzida quando se tem abundância de nutrientes. Porém, uma dúvida sobre o porquê de leveduras requererem uma segunda forma de armazenar energia em adição ao glicogênio permanecia. Análises cuidadosas sobre o acúmulo de glicogênio e trealose em *S. cerevisiae* conduziram a mudanças importantes na percepção das funções da trealose em leveduras (WIEMKEN, 1990).

Reservas de energia poderiam ser esperadas para acúmulo quando nutrientes fossem abundantes, em preparação para futuras faltas. O glicogênio é de fato produzido durante a fase exponencial de crescimento das células de levedura, quando ainda há abundância de glicose. Em contraste, a trealose não é produzida até que níveis de glicose estejam próximos de serem esgotados e as células entrem na fase estacionária de crescimento. A síntese de trealose continua na fase estacionária, na ausência de glicose, metabolizando glicogênio, com formação de trealose (WIEMKEN, 1990; SINGER e LINDQUIST, 1998).

Os diferentes comportamentos do acúmulo de trealose e glicogênio sugerem que as duas moléculas exercem diferentes funções na fisiologia celular. Em particular, o comportamento da trealose se mostra singular para uma função de reserva de energia (SINGER e LINDQUIST, 1998). Surpreendentemente, a trealose se comporta de forma contrária ao que se esperaria de um típico composto de reserva em quase todos os aspectos (WIEMKEN, 1990).

Segundo THEVELIN (1984), a trealose é importante para a manutenção da viabilidade celular da levedura, contudo, é utilizada como carboidrato de reserva durante períodos em que a sobrevivência da célula depende do nível de trealose e de glicogênio. ARANDA *et al.* (2003), no estudo do acúmulo de trealose em células de *Saccharomyces cerevisie*, afirmaram que a capacidade da levedura estocar trealose está relacionada com um melhor estado fisiológico que esta se encontra, já que exerce proteção contra os fatores de estresse do meio fermentativo.

AMORIM, (2005), afirma que na fermentação industrial, a levedura se acha continuamente exposta a situações estressantes e que de acordo com a intensidade, tais situações podem acarretar a exaustão de seu conteúdo de trealose, o que, gera segundo ele, queda da viabilidade da célula.

AMORIM (2005) afirma ainda, que se a levedura consegue manter altos teores de trealose e glicogênio até o final da fermentação é um indicativo de que ela é resistente e suporta bem as ameaças à sobrevivência.

Outros estudos mostram-se em concordância a tais afirmações. SUOMALAINEN e PFAFFLI (1961), no estudo de reservas de carboidrato em leveduras de panificação, verificaram que estas durante armazenamento mantiveram sua viabilidade celular devido à trealose intracelular.

PARAZZI (2006) estudou o efeito da trealose na manutenção da viabilidade celular das células de leveduras desidratadas pelo processo de liofilização e concluíram que o acúmulo da trealose endógena proporcionou maior taxa de manutenção celular após este processo de desidratação em comparação com leveduras que não acumularam trealose.

Concentrações de trealose crescem como parte da resposta celular a elevadas temperaturas, concentração de etanol, dissecação e presença de peróxido de hidrogênio. A trealose previne proteínas presentes nas células da desnaturação a altas temperaturas (SINGER, LINDQUIST, 1998). Além disso, este açúcar desempenha função de osmorregulação protegendo células em condições de escassez de nutrientes e aumenta a resistência celular a condições externas como altas e baixas temperaturas.

Observações realizadas em relação a outros fungos, protozoários e nematóides evidenciam a correlação em leveduras que circunstâncias nas quais existem altos níveis de trealose coincidem com o aumento da tolerância a condições ambientais adversas (SINGER e LINDQUIST, 1998).

MANSURE, SOUZA e PANEK (1997) em estudo do metabolismo da trealose em *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação alcoólica concluíram que a levedura é capaz de responder a estresses do meio em que está inserida pela redução de danos causados às membranas e proteínas devido ao aumento de temperatura, pressão osmótica e concentração de etanol, inerentes ao processo.

Embora seja um carboidrato de reserva, o papel de trealose como protetor contra estresses em levedura é bastante reconhecido. A alta concentração intracelular da trealose em leveduras é associada à tolerância a um grande número de estresses incluindo calor, desidratação e alta pressão osmótica (CARVALHEIRO; ROSEIRO, GIRIO, 1999). Desta forma, a exemplo de WIEMKEN, 1990, pode-se defender o abandono da afirmação que a trealose em leveduras tem uma função principal de carboidrato de reserva. Isso porque existe um grande número evidências, com raras exceções, de que a função primordial da trealose é proteger componentes do citosol contra condições ambientais adversas.

2.4.2 – Glicerol

O glicerol (1,2,3 propanotriol ou glicerina) foi descoberto por Scheele em 1779 durante o processo de saponificação de azeite de oliva. Pasteur também observou sua formação como um subproduto da fermentação alcoólica, em concentrações de 2,5 - 3,6% do conteúdo de etanol, sendo ele, o segundo maior produto formado durante a fermentação alcoólica (ARRUDA *et al.*, 2007).

A Figura 2.2 ilustra a estrutura molecular do glicerol.

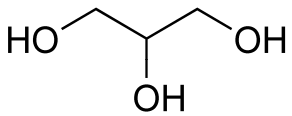


Figura 2.2 Estrutura do glicerol.

O glicerol está envolvido no metabolismo da levedura *S. cerevisiae* de diferentes formas. Ele pode ser utilizado como única fonte de carbono sob condições aeróbicas e pode tratar-se, por outro lado, de um subproduto quando a glicose ou outros açúcares facilmente fermentescíveis é convertido a etanol (NEVOIGT e STAHL, 1997).

Na biossíntese do glicerol, vários fatores ambientais e de crescimento como a linhagem da levedura selecionada, o nível de inoculação, a concentração de sulfito, a temperatura, a concentração de açúcar, o estresse osmótico, a fonte e a concentração de

nitrogênio, o pH, a aeração, influenciam a sua produção pela levedura no processo fermentativo (BEROVIC *et al.*, 2006).

De maneira geral, o acúmulo de glicerol é uma necessidade para a manutenção de um balanço redox favorável pela conversão do excesso de NADH, que é gerado durante a formação da biomassa, a NAD^+. Como a formação do glicerol requer a redução da dihidroxicetona-fosfato a glicerol-3-fosfato (G-3-P) pela dihidroxicetona-fosfato-redutase, ele acaba convertendo uma molécula de NADH, gerada na oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, a NAD^+ (BEROVIC *et al.*, 2006). A Figura 2.3 ilustra a rota metabólica de formação do glicerol.

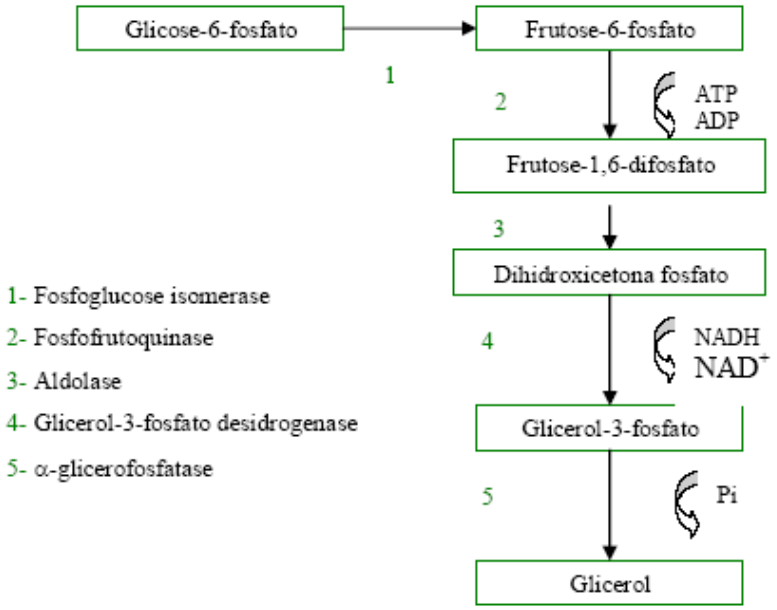


Figura 2.3 – Formação de Glicerol (glicose-6-fosfato - glicerol) (OLIVEIRA, 2006).

A função do consumo de NADH na formação de glicerol é entendida como sendo a manutenção do balanço redox citosólico, compensando as reações celulares que produzem NADH (NEVOIGT e STAHL, 1997). A produção de glicerol a partir da glicose é, portanto, um neutralizante redox natural do processo (BASSO, 2004).

No entanto, o glicerol pode também ser formado em decorrência de estresses físico (pressão osmótica), químico (presença de sulfito no mosto), e, como mais recentemente observado, microbiológico (sua produção também pode ser aumentada em decorrência da contaminação bacteriana) (BASSO, 2004).

Segundo CARVALHEIRO *et al.* (1999), o glicerol é semelhante à trealose em muitos aspectos. Trata-se de um composto que pode ser acumulado em concentrações

bastante elevadas nas células de levedura sem efeito tóxico ou inibitório, além de implicar em termoproteção de proteínas e de toda a célula.

ERASMUS *et al*. (2003), no estudo da adaptação metabólica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em condições de estresse a altas concentrações de açúcar, atribuem a síntese de glicerol a função de "válvula de segurança" que disponibiliza rapidamente carboidratos à levedura em condições adversas juntamente com a trealose e o glicogênio,

Ainda em relação a produção de glicerol em situações de estresse, Nevoigt e Stahl, (1997) no estudo intitulado "Osmorregulação e metabolismo do glicerol em *Saccharomyces cerevisiae*" afirmaram que o acúmulo de glicerol parece não ser necessariamente responsável pela sobrevivência ao estresse osmótico, mas é essencial na restauração das atividades biológicas normais da célula durante a osmorregulação.

Já MELO, (2006) afirmou que em condições normais, o glicerol é liberado para o meio extracelular, sendo porém, em condições de estresse, acumulado no citoplasma. Afirma, ainda, que o gicerol se acumula no meio intracelular devido a um aumento de sua síntese, retenção pela membrana plasmática ou absorção a partir do meio extracelular.

Desse modo, poder-se-ia, mediante adequação do meio fermentativo e de uma melhor condução da fermentação, minimizar a formação do glicerol associado aos estresses. (BASSO, 2004).

Em complemento ao exposto por BASSO (2004), o conhecimento da cinética de formação e os fatores que interferem na quantidade produzida de glicerol se mostram de relevante importância para determinar se é possível otimizar o rendimento fermentativo controlando sua produção.

2.5 – Bioquímica da fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é a ação de leveduras sobre açúcares fermentescíveis contidos em uma solução. É um processo biológico no qual a energia formada por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para o crescimento de leveduras e a oxidação parcial anaeróbia da hexose na produção de álcool e CO_2 (LIMA e MARCONDES, 2002).

A transformação do açúcar em etanol e CO_2 envolve 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica, conforme apresentado na Figura 2.4. Tal aparato enzimático encontra-se confinado no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (LIMA, *et al*., 2001).

Os carboidratos considerados substratos para a fermentação tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como o glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura (LIMA, *et al*., 2001).

O objetivo principal da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e CO_2 resultantes se constituem tão somente em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (LIMA, *et al*., 2001).

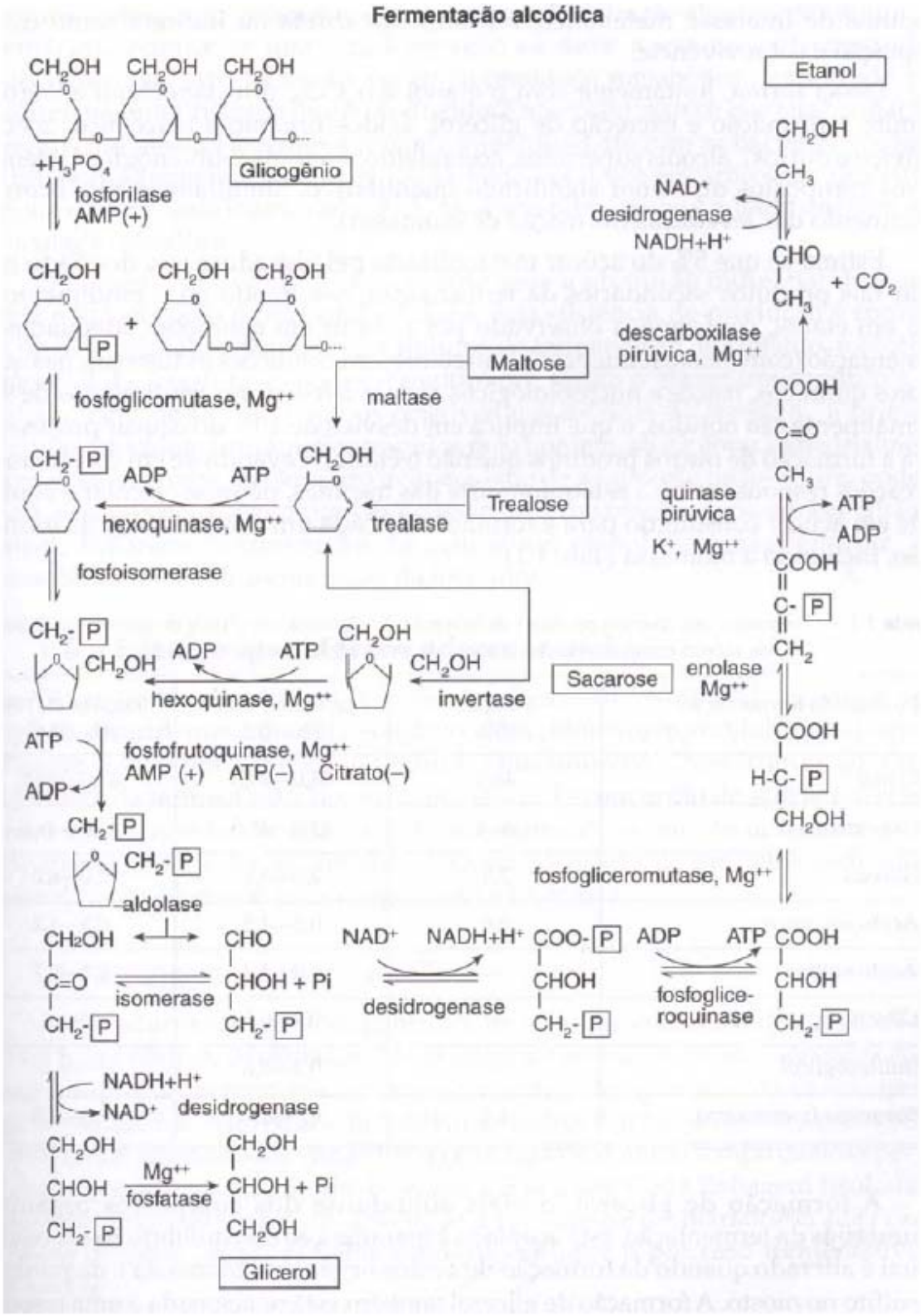


Figura 2.4 - Seqüência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae.* Fonte: (LIMA, *et al*., 2001).

De maneira simplificada pode-se descrever a formação de etanol em *Saccharomyces* e outras leveduras da forma ilustrada na Figura 2.5. A formação de etanol ocorre pela via Emden-Meyerhof-Parnas, ou via glicolítica (abordada anteriormente). Nesta via, a hexose (glicose) é oxidada a gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxicetona fosfato. O gliceraldeído é convertido a piruvato que é, então, descarboxilado a acetaldeído. Na reação subseqüente, o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase pelo uso de $NADH^+$. As duas moléculas de NAD^+ formadas são utilizadas na oxidação de outra molécula de glicose, mantendo-se assim, o equilíbrio redox na célula (WALCER, 1998 *apud* MELO, 2006). A dihidroxicetona pode ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato, e posteriormente a etanol, ou, alternativamente, reduzida a glicerol (MELO, 2006).

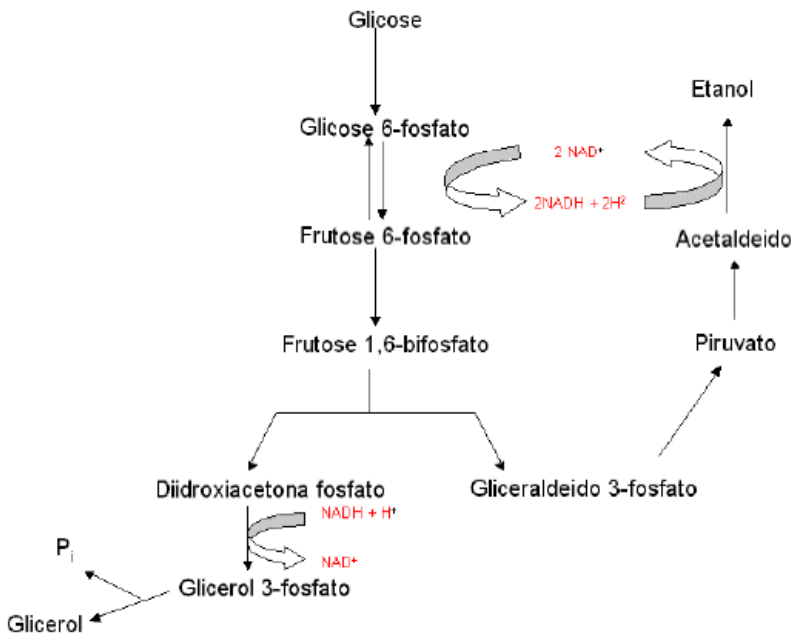


Figura 2.5 – Metabolismo central da produção de etanol e de glicerol a partir da glicose. Fonte: (MELO, 2006).

2.6 – Subprodutos da fermentação alcoólica

As hexoses são reagentes primários no metabolismo da fermentação alcoólica. Estequiometricamente, o rendimento do processo fermentativo é 0,511 g/g de hexose, porém ocorrem, juntamente com a fermentação alcoólica, reações secundárias, resultando na redução de rendimento teórico. Quando se trabalha com substratos complexos, em processos industriais, notadamente na presença de corpos estranhos ao meio (fibras, gomas, leveduras selvagens) observa-se a geração de novos subprodutos e o rendimento industrial é reduzido

para até 90% (LIMA e MARCONDES, 2002 & LIMA, *et al*., 2001). Quando se considera o substrato formado de sacarose, juntamente com pequenas porcentagens de glicose e frutose, como na indústria brasileira de etanol, o açúcar é definido como açúcar redutor total (ART) e o rendimento estequiométrico da fermentação é 0,511 g de etanol por grama de ART. Quando o rendimento estequiométrico é calculado com base na sacarose o valor do mesmo é 0,538 g de etanol por grama de sacarose. Na prática industrial o rendimento da fermentação alcoólica bem conduzida atinge de 90 a 92% do rendimento estequiométrico, havendo um consumo de açúcar para formação de biomassa celular e subprodutos. Se ocorre contaminação acentuada do meio, este rendimento é ainda menor.

Durante a fermentação alcoólica, além do etanol, também são produzidos outros metabólitos fermentativos e biomassa. Sua produção sempre é pequena quando comparada com a quantidade de açúcares convertidos em etanol e gás carbônico (BARRE *et al.*, 2004).

O etanol representa o produto principal da fermentação alcoólica e pode alcançar concentrações de até 12 a 14% v/v em fermentação normal. O gás carbônico, segundo produto da fermentação alcoólica, tem um rendimento de 0,4 a 0,5 gramas de CO_2 por grama de açúcar degradado consumido (BARRE *et al*., 2004). Seguindo a ordem de maior rendimento, fala-se em seguida do glicerol.

2.6.1 – Glicerol

A formação do glicerol, o mais abundante dos compostos orgânicos secundários da fermentação alcoólica, conforme abordado anteriormente, está acoplada à manutenção do equilíbrio redox celular, o qual é alterado com a formação de ácidos orgânicos, biomassa e com a presença de sulfito no mosto. A formação de glicerol também está relacionada a uma resposta ao estresse osmótico quando se trabalha com altas concentrações de açúcares ou sais no mosto.

Segundo GUTIERREZ (1991), a produção de glicerol durante a fermentação alcoólica sofre influência das linhagens presentes no processo, do pH, da temperatura e da concentração de sacarose no mosto. De modo geral, quanto maiores os valores destes parâmetros, maior a produção de glicerol.

Durante a fermentação alcoólica, de 2 a 5% do açúcar consumido pode ser convertido a glicerol a partir de um desvio da fosfodiidroxicetona da glicólise como é mostrado na Figura 2.6 (BASSO, 2004; LIMA *et al*., 2001). O glicerol, depois de produzido sai da célula por difusão passiva (BARRE *et al*., 2004).

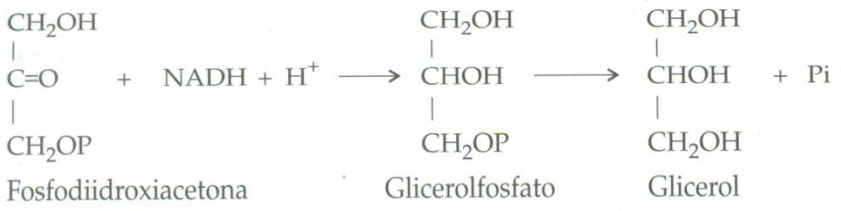


Figura 2.6 – Formação de Glicerol (fosfodiidroxiacetona - glicerol). Fonte: (LIMA *et al.*, 2001)

2.6.2 – Ácidos Orgânicos

Durante a fermentação alcoólica são formados mais de uma centena de ácidos orgânicos, sendo sua origem dependente de três vias do metabolismo da levedura. Um determinado número de compostos como acetato, succinato, α-cetoglutarato, malato e citrato derivam diretamente do piruvato pelo funcionamento limitado do ciclo do ácido tricarboxílico (BARRE *et al.*, 2004).

O ácido succínico é o ácido orgânico de maior expressão gerado durante a fermentação alcoólica. As razões fisiológicas que levam a levedura à sua produção e excreção ainda são discutíveis; admite-se que sua formação se deva a um meio fermentativo inadequado, pois não há evidência de necessidade metabólica desse ácido pela levedura na proporção em que é produzido. Entretanto, sua formação e excreção parece conferir às leveduras maior competitividade com as bactérias contaminantes numa fermentação industrial (LIMA, *et al.*, 2001).

O ácido succínico é formado pela fase oxidativa do ciclo de Krebs, ilustrado na Figura 2.7. Como em meio anaeróbio as mitrocôndrias estão inativas, a desidrogenase succínica não apresenta atividade e, portanto, acumula-se succinato.

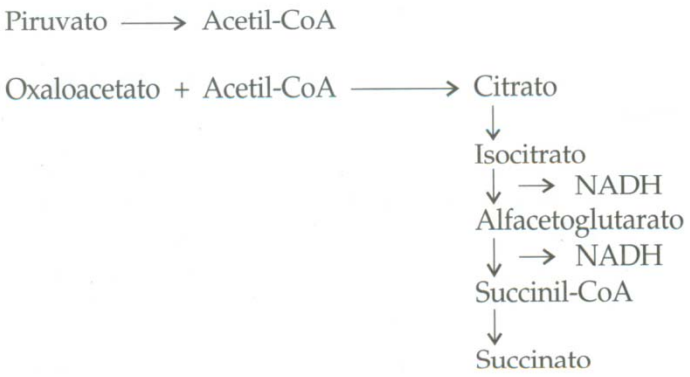


Figura 2.7 – Formação de Succinato. Fonte: (LIMA, *et al.*, 2001)

Outros ácidos orgânicos derivam das vias de síntese dos aminoácidos e dos alcoóis superiores. A maioria dos ácidos orgânicos restantes é produzida durante as vias de síntese dos ácidos graxos.

2.6.3 – Álcoois Superiores (Óleo Fúsel)

A formação dos alcoóis superiores depende de vários fatores como pH, concentração de açúcares, tipo de levedura utilizada, condições de temperatura, nível de aeração, entre outros. Os principais alcoóis superiores sintetizados durante a fermentação alcoólica são o 1-propanol, o 2-metil-1-propanol, o 1,2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol e o feniletanol (BARRE et al., 2004). Os alcoóis superiores podem ser produzidos pela levedura a partir de esqueletos carbonados dos aminoácidos, assimilados durante a fermentação alcoólica. O grupamento amina dos aminoácidos é removido e o cetoácido correspondente é descarboxilado em aldeído que pode ser reduzido pela álcool desidrogenase, promovendo assim a formação de álcool superior com um carbono a menos que o aminoácido de origem. A Figura 2.8 mostra a interrelação metabólica de aminoácidos, cetoácidos, alcoóis superiores e ésteres formados durante a fermentação (BARRE et al., 2004).

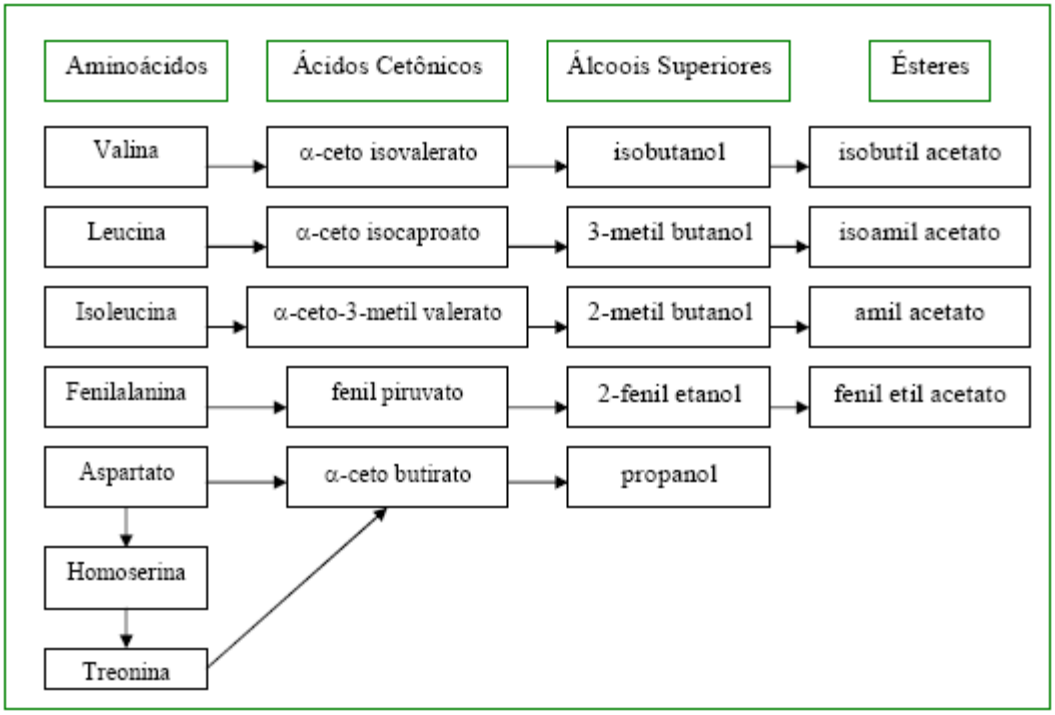


Figura 2.8 – Interrelação metabólica de aminoácidos, ácidos cetônicos, alcoóis superiores e ésteres formados durante a fermentação. Fonte: (BARRE et al., 2004).

É observada uma maior produção de álcoois superiores em temperaturas mais altas. Tal comportamento pode ser explicado pelo menor crescimento das leveduras em temperaturas mais elevadas conforme observado por GUTIERREZ (1991); assim, os cetoácidos não sendo utilizados para a síntese de aminoácidos, seriam convertidos em álcoois superiores.

Mantendo-se constante a fonte de nitrogênio e variando-se a concentração de sacarose, percebe-se que para altas concentrações de sacarose tem-se uma maior produção de álcoois superiores. Isso, provavelmente é devido à deficiência de nitrogênio induzida pelo seu alto consumo. Aumentando-se a disponibilidade de nitrogênio tem-se um maior crescimento celular e uma redução na formação de álcoois superiores.

Em relação ao pH, a conclusão de GUTIERREZ (1991) foi que o aumento do pH do meio de fermentação é acompanhado por redução na produção dos álcoois, principalmente no álcool isoamílico.

Tem-se um maior crescimento da levedura em pH mais elevado. Desvia-se, assim, os cetoácidos para a formação de aminoácidos.

2.7 – Estudo Cinético da fermentação alcoólica

A cinética da fermentação alcoólica é um assunto de interesse dos centros de pesquisa especializados, tendo em vista seu potencial industrial e econômico (LIMA e MARCONDES, 2002). O objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é quantificar a taxa de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados (VIEGAS, 2003). Os modelos cinéticos normalmente usados em fermentações podem ser divididos em:

- Não-estruturados e não segregados, nos quais as células de microrganismos são consideradas como soluto;
- Estruturados e não segregados, em que as células são tratadas como seres individuais de múltiplos componentes, porém com composição média semelhante;
- Não-estruturados e segregados, em que as células são tratadas como seres individuais distintos, porém descritos por um único componente; e
- Estruturados e segregados, em que as células de microrganismos são consideradas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes (BAILEY e OLLIS, 1986).

A complexidade da descrição cinética que é requerida e apropriada depende das situações físicas e da aplicação pretendida. Não é possível a formulação de um modelo que inclua todas

as características e detalhes celulares. O modelo deve ser formulado a partir de algumas aproximações (STREMEL, 2001).

O tipo de modelo mais encontrado na literatura para descrever a fermentação alcoólica é do tipo não-estruturado e não-segregado. A equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que considera a presença de substrato como limitante para o crescimento. A cinética de Monod está apresentada na Tabela 2.3, pela Eq. 2.1 (HAN E LEVENSPIEL, 1988) e é aplicável somente quando não ocorre a presença de produtos metabólicos tóxicos (LUONG, 1985). Entretanto, na fermentação alcoólica o rendimento de biomassa com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* diminui de 0,156 para 0,026 com o aumento da concentração de etanol de 0 a 107 g/L, indicando uma relação entre o rendimento da biomassa e a inibição pelo produto (THATIPALAMA *et al*., 1992). O etanol começa a ter efeito inibitório na taxa de crescimento celular acima de 15 g/L. A concentração máxima de etanol permitida, acima da qual as células não crescem, foi predita em 112 g/L. A capacidade de produção de etanol onde as células são completamente inibidas foi de 115 g/L de etanol (LUONG, 1985 e FERREIRA, 1998). Além da inibição provocada pela presença de etanol, outro fator a ser avaliado é a limitação relacionada ao crescimento microbiano ao substrato ou mesmo outras substâncias presentes no meio (HAN e LEVENSPIEL, 1988). A inibição pelo substrato é mais tóxica quando comparada à inibição pelo produto e desativa importantes enzimas além de modificar o caminho metabólico que é vital à sobrevivência da levedura. O efeito inibidor provocado pelo substrato na fermentação alcoólica ocorre quando a concentração supera 150 g/L (THATIPALAMA *et al.*, 1992).

A fermentação alcoólica é também afetada pela temperatura do biorreator, onde o rendimento alcoólico é maior em temperaturas mais baixas, 15ºC e 20ºC, porém apresentam uma demora para obtenção da população máxima. Quando a temperatura no biorreator é 25ºC e 30ºC a taxa inicial de fermentação é maior e a temperaturas superiores a 35ºC decresce a viabilidade celular (TORIJA *et al*., 2003). O intervalo de temperatura usual em indústrias é de 31 a 33 ºC.

A Tabela 2.3 apresenta modelos cinéticos desenvolvidos para a fermentação alcoólica por vários autores.

THATIPAMALA *et al.* (1992) propuseram um modelo para representar a diminuição do rendimento da biomassa ($Y_{x/s}$) com o aumento das concentrações iniciais de etanol e de substrato e a diminuição da taxa de crescimento específico com o aumento da concentração inicial de substrato. Os autores sugeriram um modelo específico para a fase *Lag* e

observaram experimentalmente que a inibição pelo substrato afetou mais o rendimento em etanol do que a inibição pelo produto, por provocar a diminuição da viabilidade celular. Observaram ainda que a fase *Lag* aumentou com o aumento da concentração inicial de substrato.

Um modelo para a produção de etanol a partir de uma mistura de glicose e maltose foi proposto por LEE *et al.* (1995), que incluiu um termo representando o efeito de repressão da glicose no consumo de maltose. FERREIRA *et al.* (1998) estimaram os parâmetros do modelo cinético de Andrews, citado por LUONG (1987), considerando concentrações iniciais de substrato na faixa de 5 a 190 g/l, por meio de experimentos num reator batelada usando *Saccharomyces cerevisiae*.

TOSETTO (2002) analisou o comportamento cinético da cepa de levedura Y904 em nove diferentes matérias-primas provenientes de unidades produtoras de açúcar e álcool. Foram estudadas as cinéticas de produção de etanol, células e de consumo de substrato, assim como o desempenho da cepa em cada matéria-prima com relação à produtividade e rendimento em etanol. Para a avaliação cinética, foram utilizados seis modelos do tipo não estruturado. Os que mais se adequaram aos dados experimentais foram os modelos de GHOSE e THYAGI (1979) (v. Tab. 2.3; Eq. 2.6 e Eq. 2.37) e o de JIN *et al.* (1981) (v. Tab. 2.3; Eq. 2.14) com a utilização de um único substrato, com concentrações iniciais de sacarose entre 150 e 190 g/L. Em todos os ensaios realizados, observou-se que a velocidade específica de produção de etanol esteve vinculada à velocidade específica de crescimento microbiano até determinada fase da fermentação. Após esta fase a diminuição da velocidade de crescimento microbiano não causou a diminuição da velocidade específica de produção de etanol, mostrando que as mesmas não estão mais associadas. VASCONCELOS *et al.* (1992) testaram dez modelos cinéticos para o processo de fermentação alcoólica industrial em batelada alimentada e concluíram que o modelo de GHOSE e THYAGI (1979) foi o que apresentou os melhores ajustes dos dados experimentais.

Tabela 2.3 - Modelos matemáticos propostos para a fermentação alcoólica.

Referência	Modelo	Nº Eq.
Sem inibição (*Monod*)	$\mu = \mu_{max} \dfrac{S}{K_S + S}$	2.1
Aiba et al., 1968	$\mu = \mu_{max} \dfrac{S}{K_S + S} exp(-K_1 \times P)$	2.2
	$\nu = \nu_{max} \dfrac{S}{K'_S + S} exp(-K_2 \times P)$	2.3

Aiba et al., 1969		$\mu = \frac{\mu_0}{1 + p/K_p} \frac{S}{K_S + S}$	2.4
		$\nu = \frac{\nu_0}{1 + p/K'_p} \frac{S}{K'_S + S}$	2.5
Ghose e Tyagi, 1979		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S + S^2/K_I} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)$	2.6
Ghose e Tyagi, 1979; citado por *Vasconcelos et al.*, 1992		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \frac{P}{K_P}\right)$	2.7
		$\nu = \nu_{max} \frac{S}{S + K'_S} \left(1 - \frac{P}{K'_P}\right)$	2.8
Levenspiel, 1980		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{p_m}\right)^n$	2.9
Hoppe e *Hansford*, 1982; citada por *Gòdia et al.*, 1988		$\mu = \mu_0 \frac{K_P}{K_P + P} \frac{S}{K_S + S}$	2.10
		$\nu = \nu_m \frac{K'_P}{K'_P + P} \frac{S}{K'_S + S}$	2.11
Lee et al.,1983		$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)^m$	2.12
Sevely et al., 1980; citado por *Dourado*, 1987		$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \left(\frac{K_P}{P + K_P}\right) \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)$	2.13
Jin et al., 1981; citado por *Dourado*, 1987		$\mu = \mu_{max} \, exp(-K_1 P - K_2 S) \left(\frac{S}{K_S + S}\right)$	2.14
Han e *Levenspiel*, 1988		$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_S (1 - I/I_{max})^m + S}\right) \left(1 - \frac{I}{I_{max}}\right)^n$	2.15
Andrews e *Noack*	Citadas em *Han e Levenspiel*, 1988	$\mu = \mu_{max} \left(\frac{1}{1 + K_S/S + S/K_I}\right)$	2.16
Webb		$\mu = \mu_{max} \frac{S(1 + KS/K'_S)}{K_S + S + S^2/K'_S}$	2.17
Yano et al.		$\mu = \mu_{max} \frac{1}{1 + K_S/S + \sum_j (S/K_I)^j}$	2.18
Teissier-type		$\mu = \mu_{max} [exp(-S/K_I) - exp(-S/K_S)]$	2.19
Webb		* $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S(1 + \sigma/K_I)} exp(1{,}17\sigma)$	2.20
Wayman e *Tseng*		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}, S < S'$	2.21
		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} - K_I (S - S'), S > S'$	2.22

Dagley e *Hinshelwood*		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}(1 - KP)$	2.23
Holzberg et al.		$\mu = \mu_{max} - K(P - K_I)$	2.24
Jerusalimsky e *Neronova*		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_I}{K_I + P}$	2.25
Bazua e *Wilke*		$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^{0,5} \frac{S}{K_S + S}$	2.26
Aboutboul et al., 1988		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S + S^2/K_I} exp(-K_P P)$	2.27
		$\nu = \nu_{max} \frac{S}{K'_S + S + S^2/K'_I} exp(-K'_P P)$	2.28
Thatipamala et al., 1992		$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n$	2.29
		$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S_{max} - S}{S_{max} - S_{min}}\right)$	2.30
Citadas em *Augusto et al.*, 1994		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S + S^2/K_I}$	2.31
		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S + S^2/K_I} \left(\frac{K_P}{K_P + S}\right)$	2.32
Han e *Levenspiel*, 1988		$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \left(1 - \frac{S}{S_{max}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n$	2.33
Aiba et al., 1968, acoplado ao de *Edwards*, 1987; citado por *Ferreira*, 1998		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} exp[-(K_1 S + K_2 P)]$	2.34
Wang e *Sheu* , 2000		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S + S^2/K_I} \frac{K_p}{K_p + P + P^2/K_1}$	2.35
		$\nu = \nu_{max} \frac{S}{K'_S + S + S^2/K'_I} \frac{K'_p}{K'_p + P + P^2/K'_1}$	2.36
Tosetto, 2002		$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S + S^2/K_I} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n$	2.37
Lee et al. modificado, 2003		$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_S + S + S^2/K_I}\right) \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)^m$	2.38

*σ é a força iônica.
Fonte: BORGES (2008)

A multiplicidade de modelos cinéticos que descrevem o crescimento microbiano se deve ao fato de que eles são construídos para uma levedura específica, em condições experimentais pré-definidas (DOURADO *et al*., 1987). A Tabela 2.4 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos das equações apresentadas na Tabela 2.3.

Tabela 2.4 - Parâmetros cinéticos dos modelos apresentados na Tabela 2.3.

Nº Eq.	μ_{max} (1/h)	K_s (g/L)	P_{max} (g/L)	X_{max} (g/L)	S_{max} (g/L)	n (-)	m (-)	K_i (g/L)	K_p (g/L)
2.2	0,408	0,22	-	-	-	-	-		-
2.3	1,0	0,44	-	-	-	-	-	-	-
2.4	0,408	0,22	-	-	-	-	-	-	16/55*
2.5	1,0	0,44	-	-	-	-	-	-	71,5/12,5*
2.6	0,40	0,48	87	-	-	1	-	203,49	-
2.7	0,04	0,05	-	-	-	-	-	-	69
2.8	0,77	0,5	-	-	-	-	-	-	71
2.9	0,42	0,222	87,5	-	-	0,41	-	-	-
**2.10	0,713	0,297	-	-	-	-	-	-	2,005
**2.11	1,385	1,925	-	-	-	-	-	-	7,1425
2.12	0,24	1,6	90	100	-	1	1	-	-
2.13	0,3	5	85	-	-	1	-	-	4,5
2.14	0,453	0,22	-	-	-	-	-	-	-
2.15	0,448	0,2355	83,57	-	-	0,304	0	-	-
2.15	0,117	30	-	-	700	1,82	66,8	-	-
2.27	0,46	5,6	-	-	-	-	-	620	0,033
2.28	2,3	9,6	-	-	-	-	-	480	0,024
2.29	0,46	-	106,9	-	-	1,958	-	-	-
2.30	0,46	-	Smin = 150		330	-	-	-	-
2.31	0,3	2,5	-	-	-	-	-	100	-
2.32	0,3	2,5	-	-	-	-	-	100	10
2.33	0,3052	2,3156	115	-	300	2,954	1,877	-	-
2.34	0,3052	2,3156	-	-	-	-	-	-	-
2.35	0,9819	2,3349	-	-	-	-	-	213,589	27,9036
2.36	2,3507	7,3097	-	-	-	-	-	5759,10	252,306
***2.37	0,5	21	85,5	-	-	0,9	-	10,5	-
***2.37	0,5	21	88	-	-	0,7	-	15,5	-
2.38	0,45	5	93	90	-	2	1,4	42	-

* Batelada/contínuo
** Média de 4 parâmetros obtidos a 4 diferentes S_0.
*** A primeira linha são os parâmetros estimados a partir de um meio sintético, e a segunda linha, a partir do mel da Usina Alvorada – MG.
Fonte: BORGES (2008)

Apesar dos vários trabalhos que tratam da cinética de fermentação, pouca influência estes tiveram sobre o arranjo das plantas industriais instaladas no Brasil. No entanto, o projeto rigoroso de uma planta de fermentação tem que passar, obrigatoriamente, por uma modelagem detalhada do processo, pelo uso de modelos cinéticos precisos que possibilitam a obtenção de condições ótimas de operação. Por outro lado, a manutenção destas condições dependerá da escolha de uma estratégia de controle adequada que só é possível conhecendo-se o comportamento do processo. Isto pode ser adequadamente realizado pelo estudo prévio de modelagem da planta e simulação em computador (ANDRIETTA, 1994).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Materiais

O meio fermentativo foi preparado de tal forma que as condições fossem próximas às industriais.

Foi utilizada a cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y940, cedida pela MAURI (Mauri Brasil Ind. Com. Ltda).

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

A composição do meio de cultivo consistiu-se de Sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), 180 g/L; KH_2PO_4, 5g/L; $MgSO_4.7H_2O$, 1g/L; NH_4Cl, 1 g/L, KCl, 5 g/L ; extrato de levedura, 6 g/L e $NaHSO_3$, variável, seguindo as concentrações de sulfito definidas pelo planejamento experimental na faixa de 0 a 345mg/L.

Os ensaios foram realizados em um reator de mistura da marca New Brunswick, modelo MultiGen, com volume útil de 2L, com controles de temperatura e agitação, disponível no laboratório de Engenharia Bioquímica.

Figura 3.1 – Foto do reator da marca New Brunswick, modelo MultiGen utilizado para realização dos experimentos.

3.2 – Métodos

3.2.1 – Metodologia experimental:

- Fermentações:

Foram conduzidos experimentos em batelada num fermentador com volume útil de 2 L e volume de trabalho de 1,7 L nas condições definidas para o planejamento experimental adotado. Temperatura: faixa de 21,5 a 48,5 °C; pH: faixa de 1,5 a 5,5 e concentração de sulfito: faixa de 0 a 345 mg/L.

- Obtenção da cultura:

O inóculo consistiu-se da levedura após reidratação em água durante 30 minutos. O volume correspondente ao inóculo foi de 510 mL (30% do volume total) e sua concentração de 100g/L.

3.2.2 – Metodologia analítica:

As fermentações foram acompanhadas ao longo do tempo pelas medidas de concentrações de sacarose, etanol, glicerol e células e, ao final de 12 h, foram determinadas, também, a viabilidade celular e a concentração de trealose em gramas por 100 gramas de biomassa seca.

Amostras de 35 mL eram retiradas do fermentador em intervalos de uma hora e meia. Era então centrifugada por 6 minutos a 12500 rpm. Do sobrenadante foram analisadas as concentrações de substrato, célula, glicerol e etanol e do sedimento, a trealose após sua extração.

- **Etanol**

A análise do etanol formado foi realizada utilizando-se o método espectrofotométrico baseado na oxidação do etanol a ácido acético pela reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional à concentração de álcool na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro (STECKELBERG, 2001). Anteriormente à quantificação do etanol produzido na fermentação, colocou-se 25 mL do sobrenadante em um balão volumétrico e acrescentou-se 50 mL de água destilada. Esta nova solução foi destilada e recolhidos 50 mL de destilado em um erlenmeyer que foi, então, diluído na proporção de 1:25. Transferiu-se 5 mL do destilado diluído para um tubo de ensaio

e acrescentou-se 2 mL de água destilada juntamente com 2 mL de reagente de cor. O tubo foi colocado em banho-maria na temperatura de 60°C por 30 minutos, resfriado à temperatura ambiente e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 600 nm. Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão (Apêndice B.2).

- **Glicerol:**

Para análise de glicerol foi utilizado um método enzimático-colorimétrico por meio de kit enzimático para determinação de triglicerídeos da marca *Gold Analisa* no qual o glicerol é fosforilado pela glicerolquinase formando glicerolfosfato que é oxidado a dihidroxicetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através de reação de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com a 4-aminoantipirina e clorofenol produzindo quinoneimina, cuja intensidade da cor (vermelho cereja) é proporcional à concentração de glicerol. Visando a leitura da absorbância, adicionou-se 20 μL da amostra hidrolisada e corretamente diluída em um tubo de ensaio a 2 mL do reativo de cor, e transferiu-se para banho-maria por 5 minutos a 37°C. A amostra do tubo de ensaio foi lida em espcetrofotômetro a 505 nm e comparada com uma curva padrão (Apêndice B.5).

- **Células:**

Para acompanhar o crescimento celular, foi utilizado método espectrofotométrico. De posse da curva de calibração relacionando massa seca com absorbância (Apêndice B.3) foi determinada a concentração celular em termos de massa seca por unidade de volume.

A viabilidade celular foi determinada utilizando microscópio óptico em câmara de Neubauer. Para tanto, as células de leveduras foram coradas com solução azul de metileno, sendo tomadas como parâmetro amostras do final de cada ciclo fermentativo (12h). Os resultados foram dados em frações de células vivas (células descoradas) em função do número total de células contadas.

- **Sacarose:**

A sacarose foi determinada indiretamente pela análise de glicose. Uma alíquota de 1 mL de sobrenadante foi hidrolisada durante 12 min, com 1 mL de HCl 2N a 67,5°C, e depois neutralizada com 3 mL de NaOH 1N. A concentração de glicose foi medida por um teste enzimático colorimétrico da marca *Laborlab* no qual a glicose é oxidada pela glicose-oxidase produzindo peróxido de hidrogênio, que em presença da peroxidase reage com a 4-aminoantipirina e fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade de cor é

proporcional à concentração de glicose. Visando a leitura da absorbância, adicionou-se 20 µL da amostra hidrolisada e corretamente diluída em um tubo de ensaio a 2 mL do reativo de cor, e transferiu-se para banho-maria por 10 minutos a 37°C. A amostra do tubo de ensaio foi lida em espcetrofotômetro a 505 nm e comparada com uma curva padrão (Apêndice B.1).

- **Trealose:**

A extração da trealose foi realizada de acordo com o método proposto por CHI *et al.* (2001). Uma alíquota de 5 mL do meio foi coletada, lavando-se as células três vezes com água destilada por centrifugação a 4000 rpm por 5 min. Em seguida, 4 mL de ácido tricloroacético 0,5 M foram adicionados ao precipitado de células, incubando-se a 0ºC por 20 min sob agitação freqüente. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, coletando-se o sobrenadante. No precipitado de células resultante desta etapa, a extração foi novamente realizada por duas etapas sucessivas de adição de 4 mL de ácido tricloroacético. Os sobrenadantes foram combinados para perfazer um total de 12 mL de extrato. O teor de trealose no extrato foi então determinado pelo Método de Antrona (STEWART, 1982). Retirou-se 1 mL do sobrenadante devidamente diluído em um tubo de ensaio, em seguida adicionou-se 5 mL de reagente antrona resfriado, mantendo-se o tubo em temperatura aproximada de 0°C. A mistura foi, então, colocada em banho-maria a 100°C por 10 minutos e em seguida retornada à temperatura de 0°C. Depois de resfriada a amostra do tubo de ensaio, foi lida a absorbância em espectrofotômetro a 650 nm e comparada com uma curva padrão (Apêndice B.4). Os resultados foram expressos em gramas de trealose contidas em 100 gramas de massa seca de levedura.

3.3 – Cálculos relacionados às fermentações

3.3.1 – Rendimento g_{etanol} por $g_{sacarose}$

O rendimento em g_{etanol} por $g_{sacarose}$ ao final de 12 horas de fermentação foi determinado a partir da seguinte equação:

$$Y_{E/S} = \frac{C_{et_{12}}}{(C_{sac_0} - C_{sac_{12}})} \qquad (3.1)$$

em que:

$Y_{E/S}$ = rendimento de etanol formado em relação à sacarose consumida ($g_{etanoL}/g_{sacarose}$)

$C_{et_{12}}$ = concentração de etanol (g/L) ao final de 12h de fermentação

C_{sac_0} = concentração de sacarose inicial (g/L)

$C_{sac_{12}}$ = concentração de sacarose (g/L) ao final de 12h de fermentação

3.3.2 – Rendimento $g_{glicerol}$ por $g_{sacarose}$

O rendimento em $g_{glicerol}$ por $g_{sacarose}$ ao final de 12 horas de fermentação foi determinado a partir da seguinte equação:

$$Y_{G/S} = \frac{C_{glic_{12}}}{(C_{sac_0} - C_{sac_{12}})} \tag{3.2}$$

em que:

$Y_{G/S}$ = rendimento de glicerol formado em relação à sacarose consumida ($g_{etanoL}/g_{sacarose}$)

$C_{glic_{12}}$ = concentração de glicerol (g/L) ao final de 12h de fermentação

C_{sac_0} = concentração de sacarose inicial (g/L)

$C_{sac_{12}}$ = concentração de sacarose (g/L) ao final de 12h de fermentação

3.3.3 – Produtividade etanólica

O cálculo da produtividade etanólica é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção da referida substância. Ao final de 12h de fermentação foi calculada da seguinte forma:

$$P_{et} = \frac{C_{et_{12}}}{t} \tag{3.3}$$

em que:

P_{et} = produtividade do etanol expressa em g/ L.h

$C_{et_{12}}$ == concentração de etanol (g/L) ao final de 12h de fermentação

t = tempo de fermentação (h) =12h

3.4 – Testes Preliminares

Foram realizados testes preliminares para completa definição dos métodos analíticos a serem utilizados, para eliminação de possíveis causas de erros sistemáticos e para definição do tempo do ciclo fermentativo a ser adotado.

Como teste preliminar, foram realizadas fermentações com concentração inicial de sacarose de 180g/L, pH inicial 4,5, temperatura mantida a 30°C, com e sem a presença de sulfito (na forma HSO_3^-). Para as fermentações dos testes preliminares em presença de sulfito adotou-se uma concentração de 450 mg/L. Foram acompanhados o consumo de sacarose, a produção de etanol, glicerol e trealose e a viabilidade celular até que todo o substrato fosse consumido.

3.5 – Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica

Foi realizado um Planejamento Composto Central (PCC): fatorial completo 2^3, incluindo os 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos, utilizando-se o software *Statistica 7.0*. A temperatura variou de 21,5 a 48,5 °C, o pH de 1,5 a 5,5 e concentração de sulfito de 0 a 345 mg/L, (todas as variáveis englobando condições de estresse e não estresse). O alfa de ortogonalidade utilizado no planejamento foi de 1,3531 e as Equações de codificação foram 3.4, 3.5 e 3.6, para temperatura (T), pH e concentração de sulfito (B_t), respectivamente.

$$X_1 = \frac{(\text{T-35})}{10} \tag{3.4}$$

$$X_2 = \frac{(\text{pH-3,5})}{1,5} \tag{3.5}$$

$$X_3 = \frac{(Bt\text{-172,5})}{127,5} \tag{3.6}$$

A Tabela 3.1 apresenta os valores utilizados no planejamento e a Tabela 3.2 mostra a matriz do Matriz do Planejamento Composto Central com valores codificados e originais das variáveis em estudo.

Tabela 3.1 - Valores utilizados no PCC para três variáveis independentes.

Variáveis		**-1,353**	**-1**	**0**	**1**	**1,353**
Temperatura (°C)	**T**	21,5	25	35	45	48,5
pH	**pH**	1,5	2	3,5	5	5,5
Conc. de sulfito (mg/L)	**[HSO_3^-]**	0	45	172,5	300	345

Tabela 3.2 - Matriz do PCC com valores codificados e originais das variáveis estudadas.

T (°C)	pH	[$HSO3^-$] (mg/L)
25 (-1)	2 (-1)	45 (-1)
25 (-1)	2 (-1)	300 (+1)
25 (-1)	5 (+1)	45 (-1)
25 (-1)	5 (+1)	300 (+1)
45 (+1)	2 (-1)	45 (-1)
45 (+1)	2 (-1)	300 (+1)
45 (+1)	5 (+1)	45 (-1)
45 (+1)	5 (+1)	300 (+1)
21,5 (-α)	3,5 (0)	172,5 (0)
48,5 (+α)	3,5 (0)	172,5 (0)
35 (0)	1,5 (-α)	172,5 (0)
35 (0)	5,5 (+α)	172,5 (0)
35 (0)	3,5 (0)	0 (-α)
35 (0)	3,5 (0)	345 (+α)
35 (0)	3,5 (0)	172,5 (0)
35 (0)	3,5 (0)	172,5 (0)
35 (0)	3,5 (0)	172,5 (0)

3.6 – Influência do sulfito na fermentação alcoólica

A fim de se investigar mais profundamente o efeito do sulfito na fermentação, foram realizados dois experimentos complementares adotando-se, em ambos, o pH e a temperatura considerados ótimos para satisfação das respostas analisadas no PCC (pH=4 e T=32,5ºC).

Em um experimento foi adotada a máxima concentração de sulfito presente no planejamento (345 mg/L). E no outro, essa concentração foi duplicada (690 mg/L). Pôde-se comparar, assim, o andamento da fermentação em ausência de sulfito e em presença dele em concentrações mais altas e analisar o efeito isolado do sulfito na fermentação.

Nesta análise, foram acompanhados o consumo da sacarose e a produção de etanol e de glicerol ao longo do tempo, bem como, a viabilidade celular. O final das fermentações foi determinado pelo consumo de todo o substrato adotado (180 g/L de sacarose). Desta forma, foi possível investigar o efeito do sulfito no rendimento ($g_{etanol}/g_{sacarose}$), na produtividade de etanol (g/L.h), no rendimento de glicerol ($g_{glicerol}/g_{sacarose}$) e na viabilidade celular.

3.7 – Estudo cinético da fermentação alcoólica

Para o estudo cinético, foi realizado outro experimento, agora com acompanhamento da concentração celular, nas condições consideradas ótimas, após a análise realizada no PCC e

na literatura. Buscou-se uma condição que se baseou nas faixas de interesse para as respostas avaliadas (maximização da produção de etanol, da viabilidade, do teor final de trealose e minimização da produção de glicerol). O estudo cinético foi feito, assim, às condições de T=32,5°C, pH=4 e concentração de sulfito=0 mg/L.

3.7.1 – Estimação dos parâmetros cinéticos

Foi utilizada uma técnica Não-Determinística para a estimação dos parâmetros cinéticos comuns aos processos de fermentação. Para esta finalidade foi escolhida a Técnica de Evolução Diferencial (ED) proposta por STORN e PRICE (2005) para otimização de problemas algébricos sem restrições. Foi utilizada a versão implementada em ambiente *Matlab* disponível no endereço http://www.ICSI.Berkeley.edu/~storn/code.html.

De forma resumida, a técnica pode ser definida pelo seguinte procedimento geral:

- Geração uma população inicial;
- Seleção de um indivíduo de forma aleatória, para ser substituído;
- Modificação de cada variável do genitor principal com alguma probabilidade;
- Operador de cruzamento na Evolução Diferencial ;
- Substituição ou não pelo vetor resultante.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Testes Preliminares

Com a realização dos testes preliminares, além de se confirmarem os métodos analíticos a serem utilizados e de se eliminarem causas possíveis de erros sistemáticos, foi definido o tempo de 12h para as fermentações. O tempo de 12h foi estipulado baseando-se no tempo de consumo completo do substrato em fermentações em pH 4, temperatura de 30°C, com e sem a presença de sulfito no mosto.

As fermentações em ausência de sulfito demandaram em média 11h para o consumo completo da sacarose inicial (180 g/L). Em presença de 450 mg/L de sulfito (HSO_3^-) o tempo necessário foi por volta de 13h.

4.2 – Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica

Neste trabalho estudou-se como o rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$, a produtividade de etanol, a viabilidade celular, a quantidade final de trealose e o rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ são afetados pela temperatura, pelo pH e pela concentração de sulfito no meio fermentativo em condições estressantes à levedura. Assim, foram avaliadas três variáveis independentes importantes no andamento da fermentação alcoólica: temperatura (21,5 a 48,5°C), pH (1,5 a 5,5), concentração de sulfito (0 a 345 mg/L), sendo as três variáveis analisadas para 12 horas de processo fermentativo.

Conforme as condições utilizadas na fermentação alcoólica, a viabilidade variou de 0 a 0,98, a quantidade final de trealose de 1,2 a 10,9 (g por 100 g de biomassa celular), o rendimento de etanol de 0 a 0,48 $g_{etanol}/g_{sacarose}$, o rendimento em glicerol de 0,01 a 0,066 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ e a produtividade de etanol de 0 a 7,3 (g/L.h). Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas indicando uma boa repetibilidade do processo.

A Tabela 4.1 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas viabilidade (V), quantidade final de trealose em gramas por 100 gramas de biomassa seca (Trealose), rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$ (Yg_{et}/g_{sac}), produtividade de etanol (P_{et}) e rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ (Yg_{glic}/g_{sac}).

Tabela 4.1 – Valores codificados e nomimais utilizados no PCC para as três variáveis estudadas e das respostas obtidas após 12 horas de fermentação.

Ensaios	**T(°C) (X1)**	**pH (X_2)**	**Bt (mg/L) (X_3)**	**V**	**Trealose ($g/100g_{biomassa}$)**	**$Y_E/_S$ (g_{et}/g_{sac})**	**Pet (g/L.h)**	**$Y_G/_S$ ($g_{glicerol}/g_{sac}$)**
1	25 (-1)	2 (-1)	45 (-1)	0,96	10,1	0,38	4,8	0,058
2	25 (-1)	2 (-1)	300 (+1)	0,35	3,5	0,32	0,1	0,010
3	25 (-1)	5 (+1)	45 (-1)	0,88	9,2	0,40	6,0	0,061
4	25 (-1)	5 (+1)	300 (+1)	0,75	9,5	0,39	5,6	0,060
5	45 (+1)	2 (-1)	45 (-1)	0,32	7,0	0,33	3,3	0,060
6	45 (+1)	2 (-1)	300 (+1)	0,00	1,2	0,00	0,0	0,025
7	45 (+1)	5 (+1)	45 (-1)	0,19	8,2	0,43	6,0	0,066
8	45 (+1)	5 (+1)	300 (+1)	0,45	7,9	0,37	4,9	0,064
9	**21,5 (-α)**	3,5 (0)	172,5 (0)	0,93	9,1	0,40	4,9	0,042
10	**48,5 (+α)**	3,5 (0)	172,5 (0)	0,10	4,3	0,30	3,3	0,056
11	35 (0)	**1,5 (-α)**	172,5 (0)	0,30	2,9	0,30	0,4	0,017
12	35 (0)	**5,5 (+α)**	172,5 (0)	0,83	10,9	0,48	7,2	0,057
13	35 (0)	3,5 (0)	**0 (-α)**	0,98	10,6	0,48	7,3	0,058
14	35 (0)	3,5 (0)	**345 (+α)**	0,75	6,7	0,45	6,8	0,050
15	35 (0)	3,5 (0)	172,5 (0)	0,86	10,8	0,48	7,3	0,053
16	35 (0)	3,5 (0)	172,5 (0)	0,82	10,6	0,48	7,2	0,054
17	35 (0)	3,5 (0)	172,5 (0)	0,84	10,8	0,48	7,2	0,053

*Bt=Bissulfito total (mg/L), V = viabilidade (fração de 0 a 1), $Y_E/_S$ = rendimento etanol por sacarose, Pet = produtividade de etanol (g/L.h), $Y_G/_S$ = rendimento glicerol por sacarose.

Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos, foram considerados significativos os parâmetros de nível de significância menores que 10% ($p<0,1$).

Utilizando-se os resultados apresentados na Tabela 4.1, após a realização de regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, foi possível determinar os coeficientes de regressão para cada resposta.

4.2.1 – Viabilidade Celular

Os coeficientes de regressão para a resposta viabilidade (V) estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Coeficientes de regressão para a resposta viabilidade celular.

	Coeficientes de regressão	**Erro Padrão**	**p – valor**
Média	0,85	0,042	0,000
X_1 (L)	-0,27	0,024	0,000
X_1 (Q)	-0,19	0,031	0,001
X_2 (L)	0,12	0,024	0,002
X_2 (Q)	-0,16	0,031	0,001
X_3 (L)	-0,10	0,024	0,005
X_3 (Q)	0,00	0,031	0,955
X_1X_2	0,00	0,029	0,987
X_1X_3	0,09	0,029	0,019
X_2X_3	0,13	0,029	0,002

Com exceção dos termos quadrático da concentração de sulfito (X_3(Q)) e da interação da temperatura com o pH (X_1X_2), todos os parâmetros do modelo foram altamente significativos. A Equação 4.1 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para viabilidade celular.

$$V= 0,85-0,27X_1-0,19X_1^2+0,12X_2-0,16X_2^2-0,10X_3+0,087X_1X_3+0,13X_2X_3 \quad (4.1)$$

Pela análise dos coeficientes das variáveis isoladas na Equação 4.1 é possível que se façam algumas observações. O sinal negativo dos coeficientes X_1 e X_3 indica que maiores temperaturas e concentrações de sulfito no mosto contribuem para uma redução na viabilidade celular e de forma contrária, o pH contribui de forma positiva dentro da região experimental trabalhada para viabilidade. Fica evidente, também, que o efeito da temperatura se pronuncia de forma mais significativa que o efeito do pH e a da concentração de sulfito, sendo este o parâmetro menos significativo em relação à resposta analisada. Esta análise está em concordância com a Tabela 4.1 na qual, em observação aos pontos axiais relativos à temperatura, verifica-se para T= 21,5°C uma viabilidade de 0,93 enquanto para T=48,5°C um

valor de apenas 0,10. De forma não tão expressiva para resposta, os pontos axiais inferior e superior da concentração de sulfito geram, respectivamente, uma viabilidade de 0,98 (em ausência de sulfito) e de 0,75 em concentração de 345mg/L. A resposta para os pontos axiais relativos ao pH, tem efeito contrário à temperatura e à concentração de sulfito. Observou-se uma fração de 0,30 de células vivas para o ponto axial inferior (pH 1,5) e de 0,83 para o ponto axial superior (pH 5,5).

CARMELO *et al*. (1998), apud (MELO, 2006), no estudo da modificação da termotolerância em *S. cerevisiae* submetida à rápida exposição a estresse ácido, ao submeterem por 60 minutos a levedura *S. cerevisiae* ao estresse ácido com HCl (pH 2) e temperatura de 47ºC observaram uma queda da viabilidade celular de 99%, principalmente em meio suplementado com glicose. Este resultado se mostra bastante próximo ao observado no presente estudo, já que neste, foi determinada uma viabilidade celular nula (redução de 100%) ao final de 12 horas de fermentação em condição estressante bem próxima à abordada por Carmelo e colaboradores (temperatura de 45ºC e pH igual a 2, acrescido de um agravante de uma concentração de sulfito de 360mg/L).

No estudo do efeito da temperatura em relação à viabilidade celular MELO (2006), chegou-se às mesmas conclusões afirmando que populações de células das linhagens industriais de *S. cerevisiae* podem apresentar diminuições na viabilidade da ordem de 50% em meio ácido a 37ºC chegando a mais de 80% quando a temperatura é elevada a 42ºC. Observando que maiores temperaturas causam quedas expressivas na viabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae* como no presente estudo.

DORTA (2006), no estudo de fatores sinérgicos entre sulfito, ácido lático, pH e etanol na fermentação alcoólica da levedura, após a análise de todos os parâmetros estressantes, verificou que o pH e a concentração de etanol foram os principais fatores de estresse para a viabilidade celular dos dois microrganismos estudados (*Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26).

Realizando-se a análise de variância (ANOVA) e analisando a Tabela 4.3, verifica-se que o Fcalc foi significativo (p=0,0001) e a porcentagem de variação explicada foi de 97%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.1.

Tabela 4.3 - ANOVA para a resposta viabilidade celular.

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F-calc.	p-valor
Regressão	1,716371	9	0,1907079	28,3	0,000108
Resíduos	0,047217	7	0,0067453		
Total	1,763588	16			

$F_{9;\,7;\,0,1} = 2,72$

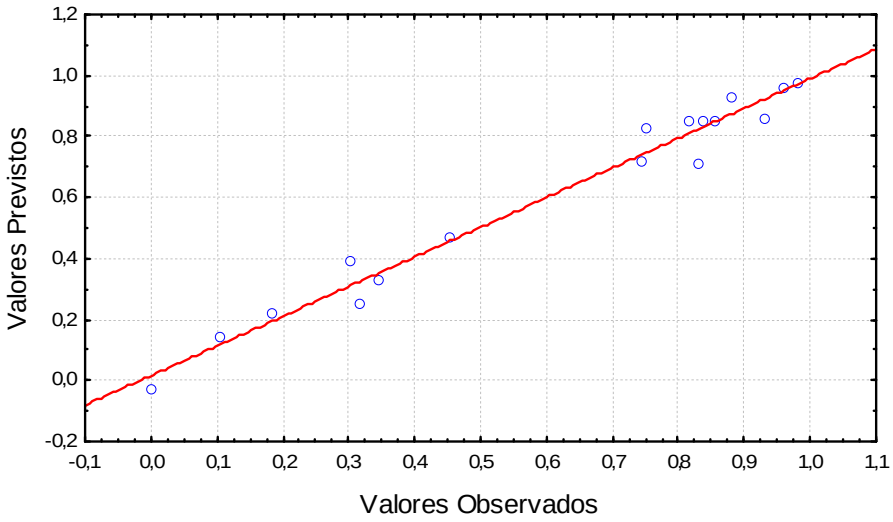


Figura 4.1 – Valores experimentais em função valores previstos pelo modelo para a viabilidade celular.

Pela Figura 4.2 pode-se observar que os erros de ajustamento se mostram independente e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta viabilidade.

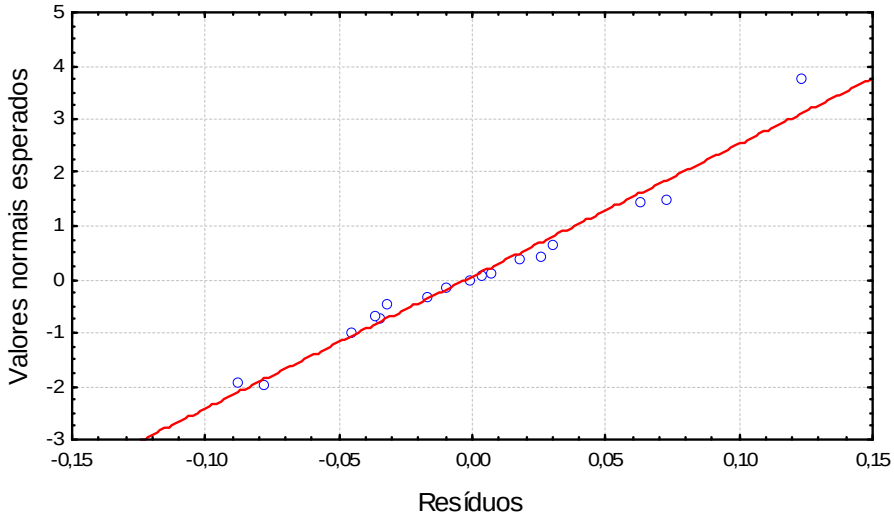


Figura 4.2 – Distribuição dos resíduos em torno da reta para a resposta viabilidade celular.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. As superfícies estão representadas na Figura 4.3.

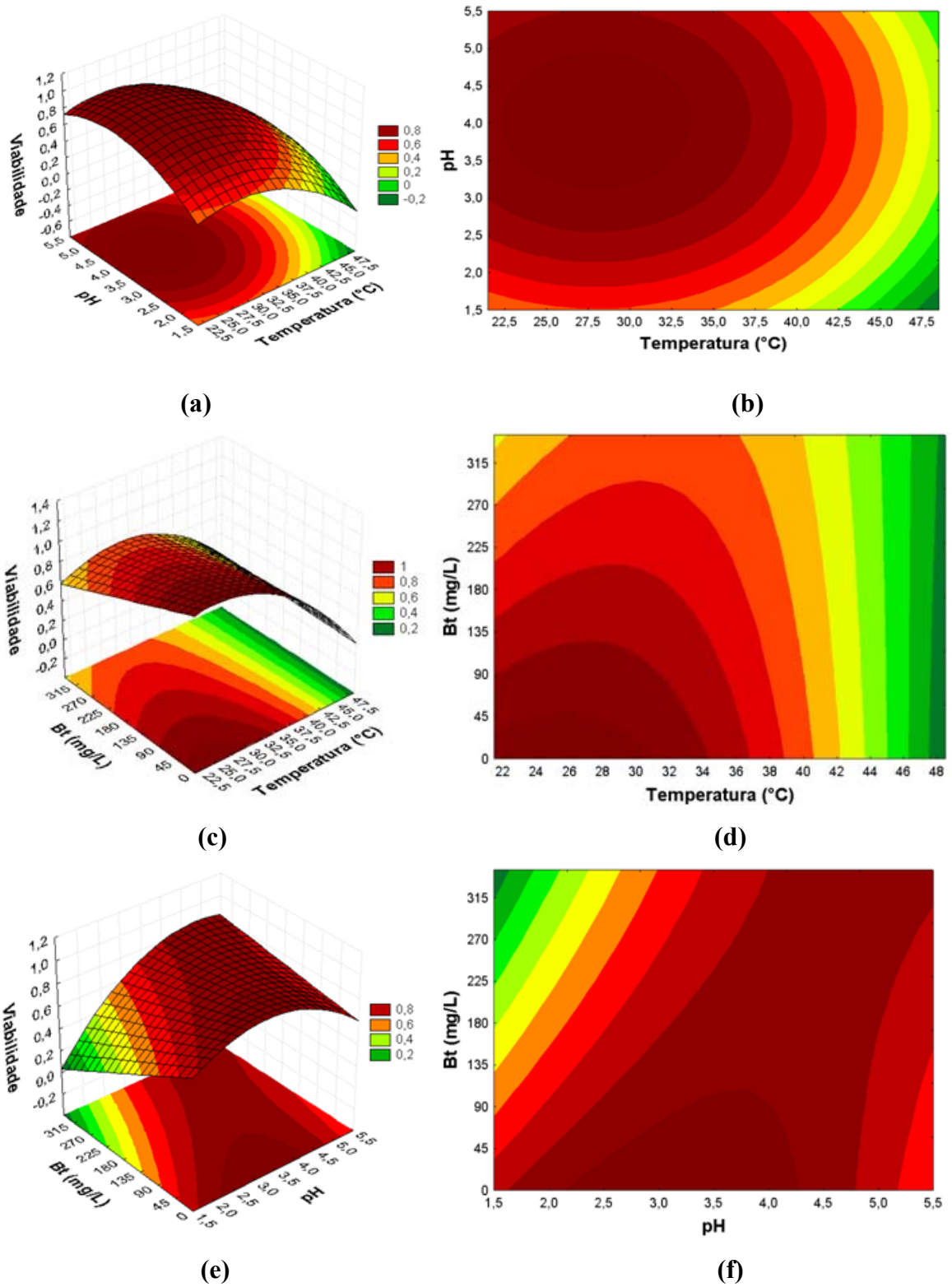
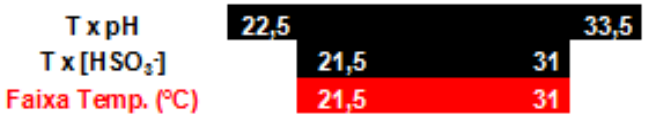


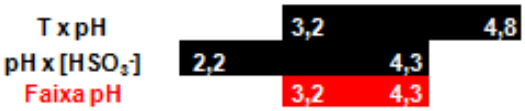
Figura 4.3 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para viabilidade em função da temperatura e do pH (a) e (b), da temperatura e da concentração de sulfito (c) e (d) e do pH e concentração de sulfito (e) e (f).

Analisando as curvas de contorno (b) e (d) da Figura 4.3 definiu-se a faixa de temperatura que maximiza a viabilidade.

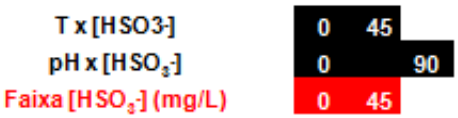
A curva de contorno que representa o efeito da temperatura em sinergismo com o pH na viabilidade celular (Figura 4.3 – b) indica uma faixa aproximada de 22,5 a 33,5°C para a maximização da resposta em questão. O efeito combinado da temperatura e a concentração de sulfito no mosto (Figura 4.3 – d) indica uma faixa de 21,5 a 31°C. Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que para maximização da viabilidade celular, dentro da região experimental trabalhada, a temperatura deve estar entre 21,5 e 31°C.



Da mesma forma que para temperatura, a partir das curvas de contorno (b) e (f) da Figura 4.3 definiu-se a faixa de pH que maximiza a viabilidade na região experimental trabalhada. A faixa aproximada de pH correspondente à máxima viabilidade engloba o pH de 3,2 a 4,3.



Para a definição da concentração de sulfito que maximiza a viabilidade celular foi realizada a análise das curvas de contorno (d) e (f) da Figura 4.3. De acordo com esta análise, visando uma maior viabilidade celular é interessante que a concentração de sulfito esteja em até 45 mg/L.



A fim de se obter o ponto estacionário que maximiza a viabilidade na região experimental adotada, realizou-se uma análise canônica utilizando o modelo completo representado pelos coeficientes de regressão mostrados na Tabela 4.2. Utilizou-se o *software Maple Release* 8.0 e definiram-se as condições que maximizaram a resposta viabilidade celular: a temperatura deve estar em 25°C, o pH deve estar em 3,3 e a concentração de sulfito em 0 mg/L. Tal resultado mostra-se em concordância à análise anterior já que todas as variáveis determinadas se encontram dentro da faixa definida.

4.2.2 – Quantidade final de trealose

Os coeficientes de regressão para a resposta que indica a quantidade final de trealose em gramas por 100g de biomassa seca estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Coeficientes de regressão para a resposta trealose ($g/100g_{biomassa}$).

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	p – valor
Média	10,2	0,64	0,000
X_1 (L)	-1,2	0,36	0,011
X_1 (Q)	-1,6	0,48	0,014
X_2 (L)	2,0	0,36	0,001
X_2 (Q)	-1,4	0,48	0,021
X_3 (L)	-1,5	0,36	0,004
X_3 (Q)	-0,5	0,48	0,351
X_1X_2	0,4	0,44	0,434
X_1X_3	0,0	0,44	0,954
X_2X_3	1,6	0,438	0,009

A Equação 4.2 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para teor de trealose ($g/100g_{biomassa}$) ao final do ciclo fermentativo (12h).

$$\text{Trealose}(\%) = 9{,}88-1{,}25X_1-1{,}56X_1^2+2{,}03X_2-1{,}41X_2^2-1{,}50X_3+1{,}57X_2X_3 \qquad (4.2)$$

De forma bem próxima à viabilidade, só não constam na Equação ajustada (4.2) para resposta trealose o termo quadrático da concentração de sulfito (X_3(Q)) e a interação temperatura com a concentração de sulfito (X_1X_3) e de forma pouco expressiva tem-se a interação temperatura com o pH (X_1X_2).

Percebe-se, baseando-se na análise dos parâmetros da Equação 4.2, que a temperatura, o pH e a concentração de sulfito no mosto têm influência na quantidade de trealose ao final do ciclo fermentativo. Os três parâmetros apresentam efeito aproximado em relação à resposta analisada, sendo mais expressivo o efeito do pH, seguido da concentração de sulfito e da temperatura nesta ordem.

Pelos sinais dos parâmetros, percebe-se que para os maiores valores de temperatura e de concentração de sulfito tem-se uma menor quantidade de trealose restante. O mesmo

acontece para baixos valores de pH (parâmetro com sinal positivo). Essa menor concentração final indica o consumo do carboidrato para proteção celular, aspecto característico do comportamento e função da trealose.

Confirmando o exposto acima, baseando-se na Tabela 4.1, em observação aos pontos axiais relativos à trealose, verifica-se para T=21,5°C, uma quantidade de 9,1 $g_{trealose}/100g_{biomassa}$ enquanto para T=48,5°C, de 4,3 $g_{trealose}/100g_{biomassa}$. De forma ainda mais expressiva, para os pontos axiais inferior e superior relativos ao pH, tem-se apenas 2,9 $g_{trealose}/100g_{biomassa}$ de teor de trealose para o menor valor de pH e 10,9 $g_{trealose}/100g_{biomassa}$ para o pH mais alto adotado. A resposta para os pontos axiais relativos à concentração de sulfito foi de 10,6 $g_{trealose}/100g_{biomassa}$ para o ponto axial inferior (em ausência de sulfito) e 6,7 $g_{trealose}/100g_{biomassa}$ para o superior (345 mg/L).

Realizando a análise de variância (ANOVA) e analisando a Tabela 4.5, verifica-se que o Fcalc foi significativo (p=0,0026) e a porcentagem de variação explicada de 90%. Estes resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.4.

Tabela 4.5 - ANOVA para a resposta trealose.

Fonte de variação	**Soma de Quadrados**	**Graus de Liberdade**	**Quadrado Médio**	**F-calc.**	**p-valor**
Regressão	144,7123	9	16,079140	10,5	0,002648
Resíduos	10,7089	7	1,529843		
Total	155,4212	16			

$F_{9;\,7;\,0,1} = 2,72$

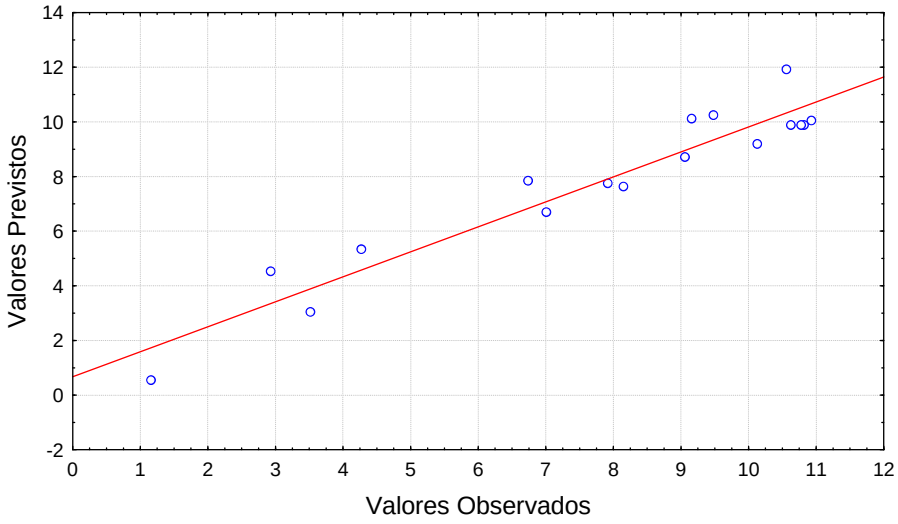


Figura 4.4 – Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a quantidade final de trealose em gramas por 100g de biomassa seca.

Pela Figura 4.5 pode-se observar que os erros de ajuste se mostram independente e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta quantidade de trealose (g/100$g_{biomassa}$).

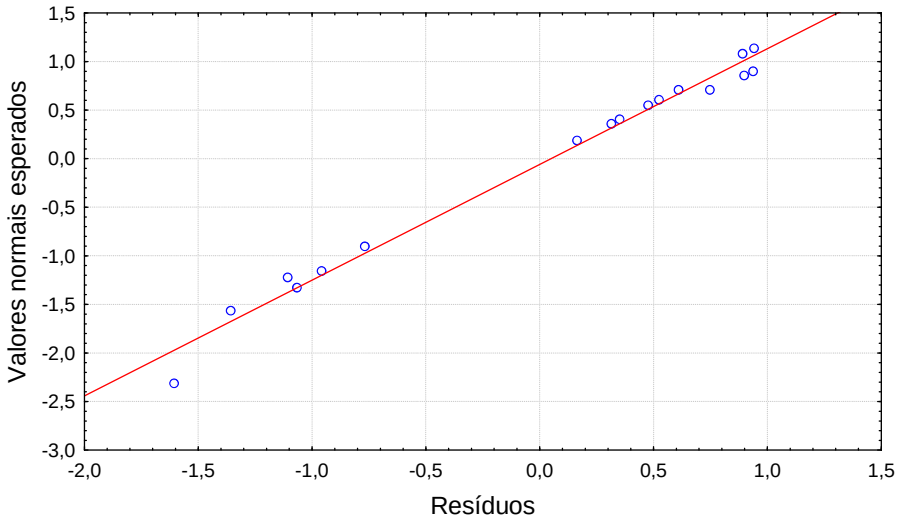


Figura 4.5 - Distribuição dos resíduos em torno da reta para a resposta teor de trealose final.

Foi possível, construir as superfícies de resposta (Figura 4.6) e definir a região de interesse.

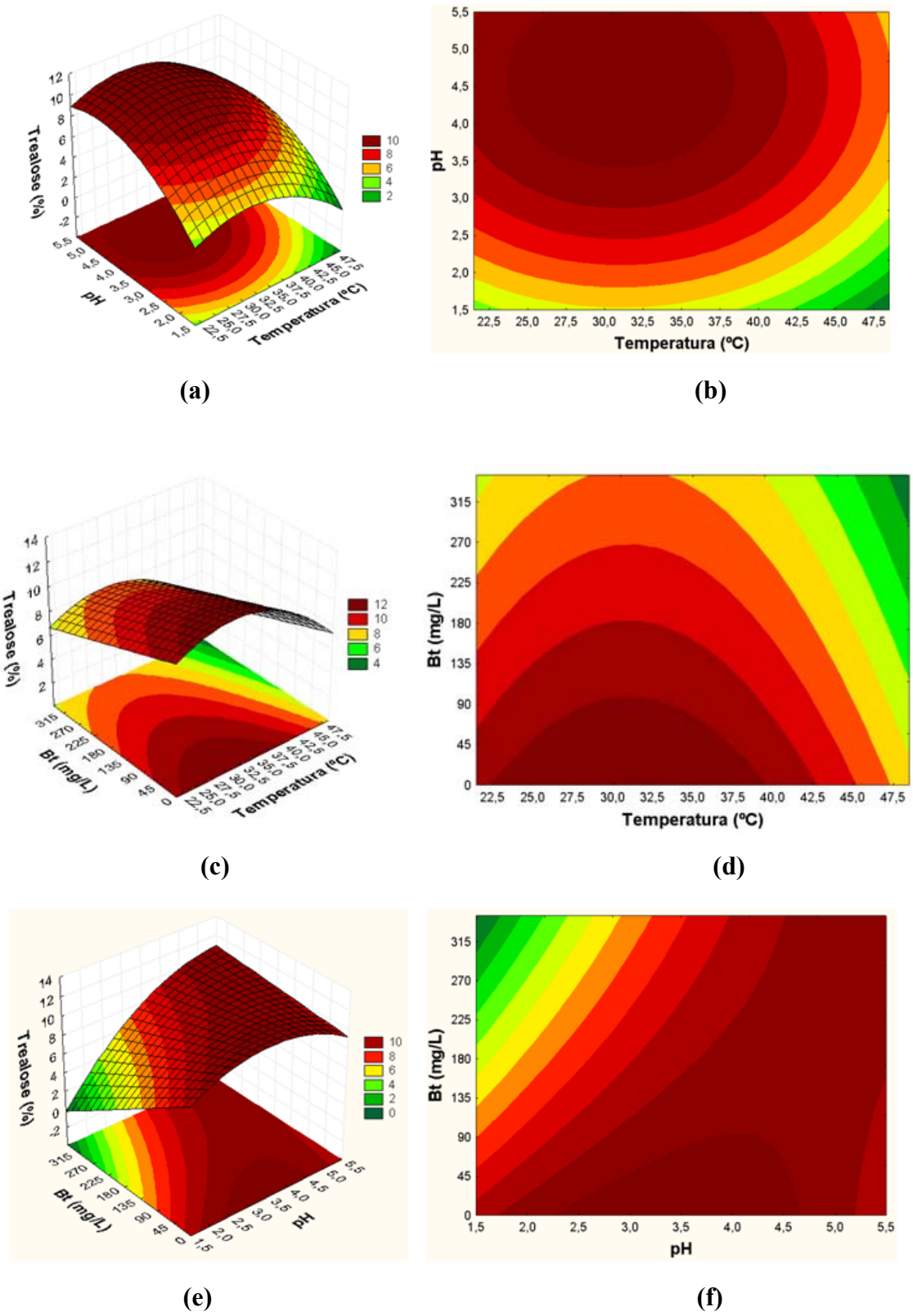
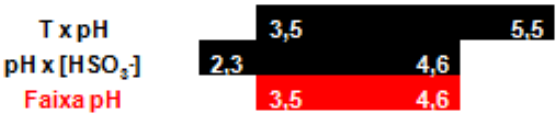


Figura 4.6 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para o teor de trealose (%) em função da temperatura e do pH (a) e (b), da temperatura e da concentração de sulfito (c) e (d) e do pH e concentração de sulfito (e) e (f).

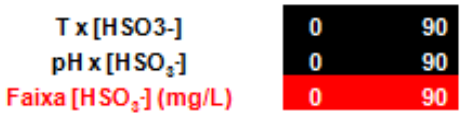
Analisando as curvas de contorno (b) e (d) da Figura 4.6 definiu-se a faixa de temperatura que maximiza a quantidade de trealose no final do ciclo de 12h de fermentação.

A curva de contorno (Figura 4.6 – b) que representa o efeito da temperatura em sinergismo com o pH indica uma faixa aproximada de 23 a 38°C para a maximização da resposta em questão. O efeito combinado da temperatura e a concentração de sulfito no mosto (Figura 4.6 – d) indica uma faixa mais abrangente que parte da temperatura mínima de 22,5 até 39°C. Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que, para maximização da quantidade final da trealose, na região experimental adotada, a temperatura deve estar entre 23,5 e 38°C.

A curva de contorno (Figura 4.6 – b) que representa o efeito da temperatura em sinergismo com o pH indica uma faixa que engloba o valor de mais alto pH adotado. A faixa engloba valores de pH entre 3,5 e 5,5. O efeito combinado do pH e a concentração de sulfito no mosto (Figura 4.6 – f) indica uma faixa de 2,3 até 4,6 para o parâmetro em questão. Buscando-se uma faixa que combinou ambos os efeitos em sinergismo, pode-se afirmar que para maximização da quantidade final da trealose, na região experimental adotada, o pH deve estar entre 3,5 e 4,6.



Da mesma forma que para temperatura e o pH, a partir das curvas de contorno (d) e (f) da Figura 4.6 definiu-se a faixa da concentração de sulfito que maximiza a trealose final na região experimental trabalhada. De acordo com esta análise, visando a melhores condições para a célula no processo fermentativo dentro das condições adotadas (maior quantidade de trealose restante encerrado o ciclo fermentativo) é interessante que a concentração de sulfito esteja em até aproximadamente 90 mg/L.



Para se determinar a condição que fornece a maximização da trealose final (g/100$g_{biomassa}$) na região experimental trabalhada utilizou-se o *software Maple Release* 8.0 e definiram-se os valores das variáveis estudadas: a temperatura menos agressiva foi a de 30°C,

o pH de 3,4 e a concentração de sulfito de 0 mg/L. Nessa condição, a concentração final de trealose foi de $11{,}41g_{trealose}/100g_{biomassa}$.

Conclui-se, com base nas análises em relação à viabilidade e à quantidade final de trealose dentro da faixa experimental trabalhada, que valores mais elevados de temperatura, mais baixos de pH e mais alta concentração de sulfito são condições estressantes à levedura que faz uso de seu carboidrato endógeno de proteção para se manter.

Assim como no presente estudo, foi observada uma forte relação entre o acúmulo de trealose intracelular e a viabilidade celular. Segundo SOUMALAINEN e PFAFFLI (1961), a maior viabilidade celular e a atividade da levedura eram decorrentes de elevado teor de trealose. Estudos com tempos de tratamento mais prolongados, foram demonstradas por AMORIM (2005) e GOMES (1988), que verificaram quedas significativas nestes teores.

AMORIM (2005) confirma esta relação entre o teor de trealose e a viabilidade celular quando afirma que dependendo da intensidade do estresse a que a levedura é submetida durante um processo fermentativo, pode-se ter a exaustão de seu conteúdo de trealose, o que acarreta, segundo ele, queda da viabilidade da célula.

BASSO (1999) *apud* AMORIM (2005), afirma, ainda, que se a levedura consegue manter altos teores de trealose até o final da fermentação, tem-se um indicativo de que ela é resistente e suporta bem as ameaças à sobrevivência.

4.2.3 – Rendimento e produtividade de etanol

Os coeficientes de regressão para a resposta rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$ estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Coeficientes de regressão para a resposta rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$.

	Coeficientes de regressão	**Erro Padrão**	**p – valor**
Média	0,49	0,022	0,000
X_1 (L)	-0,04	0,012	0,011
X_1 (Q)	-0,08	0,016	0,002
X_2 (L)	0,07	0,012	0,001
X_2 (Q)	-0,06	0,016	0,009
X_3 (L)	-0,04	0,012	0,010
X_3 (Q)	-0,02	0,016	0,358
X_1X_2	0,05	0,015	0,016
X_1X_3	-0,04	0,015	0,033
X_2X_3	0,04	0,015	0,037

A Equação 4.3 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para o rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$ com porcentagem de variação explicada de 94%.

Com exceção do termo quadrático da concentração de sulfito (X_3(Q)), todos os parâmetros do modelo foram estatisticamente significativos.

$$Y_{E/S} = 0{,}48 - 0{,}042X_1 - 0{,}080X_1^2 + 0{,}069X_2 - 0{,}059X_2^2 - 0{,}043X_3 + 0{,}047X_1X_2 - 0{,}040X_1X_3 + 0{,}039X_2X_3 \quad (4.3)$$

Pela análise dos coeficientes das variáveis isoladas na Equação 4.3 é possível fazer algumas observações. O sinal negativo dos coeficientes X_1 e X_3 indica que um aumento da temperatura ou da concentração de sulfito no mosto gera uma redução no rendimento de etanol em relação à sacarose e de forma contrária, um aumento do pH contribui para o aumento desse rendimento. Fica evidente, também, que o efeito do pH se pronuncia de forma mais significativa dentre os parâmetros avaliados.

Esta análise está em concordância com a Tabela 4.1 na qual, em observação aos pontos axiais relativos ao pH, o parâmetro de efeito mais expressivo, verifica-se para o pH 1,5 um rendimento de 0,30 $g_{etanol}/g_{sacarose}$ enquanto para o pH 5,5 um valor de 0,48 $g_{etanol}/g_{sacarose}$.

De forma não tão expressiva para resposta, os pontos axiais inferior e superior da concentração de sulfito geram um rendimento de 0,48 $g_{etanol}/g_{sacarose}$ (em ausência de sulfito) e de 0,45 $g_{etanol}/g_{sacarose}$ em concentração de 345 mg/L. As respostas para os pontos axiais relativos à temperatura foram de 0,40 $g_{etanol}/g_{sacarose}$ para o ponto axial inferior (T=21,5ºC) e de 0,30 $g_{etanol}/g_{sacarose}$ para o superior (T=48,5ºC).

DORTA (2006), no estudo dos fatores sinérgicos entre sulfito, ácido lático, pH e etanol na fermentação alcoólica da levedura, após a análise de todos os parâmetros estressantes, assim como no presente estudo, verificou que o fator de estresse que se destacou para rendimento etanólico para uma linhagem da levedura em estudo, (*Saccharomyces cerevisiae* M-26) foi o pH.

Realizando-se a análise de variância (ANOVA) e analisando-se a Tabela 4.7, verifica-se que o Fcalc foi significativo (p=0,0013) e a porcentagem de variação explicada de 94%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo. Uma confirmação pode ser visualizada pela Figura 4.7.

Tabela 4.7. ANOVA para a resposta rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$.

Fonte de variação	**Soma de Quadrados**	**Graus de Liberdade**	**Quadrado Médio**	**F-calc.**	**p-valor**
Regressão	0,209216	9	0,0232462	13,0	0,001361
Resíduos	0,012479	7	0,00178265		
Total	0,221694	16			

$F_{9;\,7;\,0,1} = 2,72$

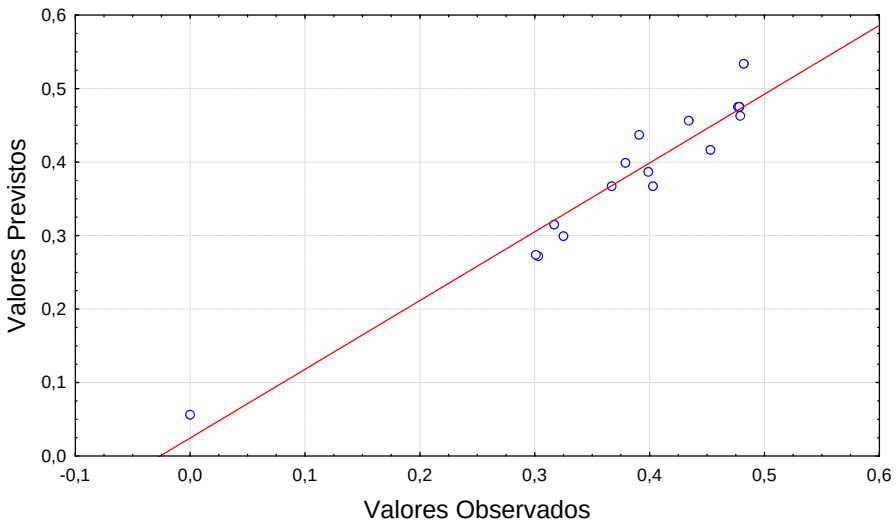


Figura 4.7 - Valores experimentais em função valores previstos pelo modelo para a resposta rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$.

Pela Figura 4.8 pode-se observar que os erros de ajustamento se mostram independente e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$.

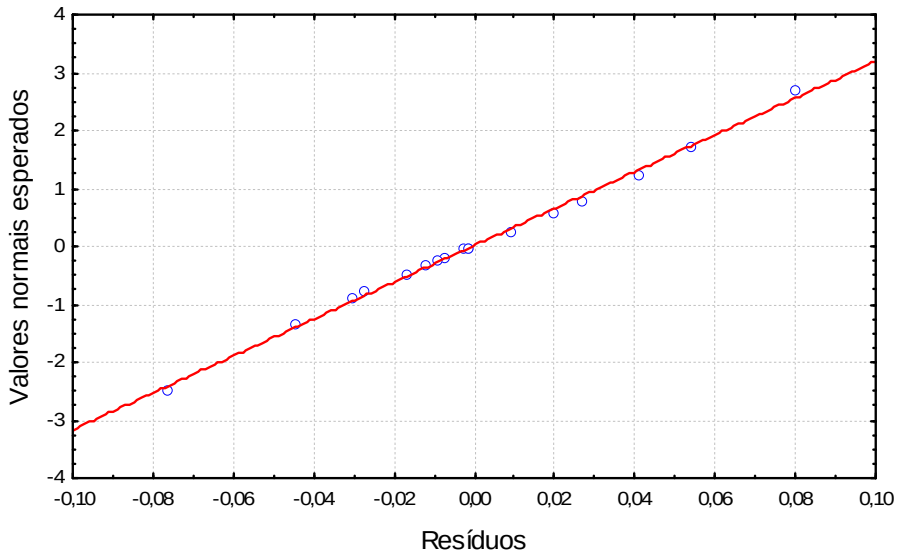
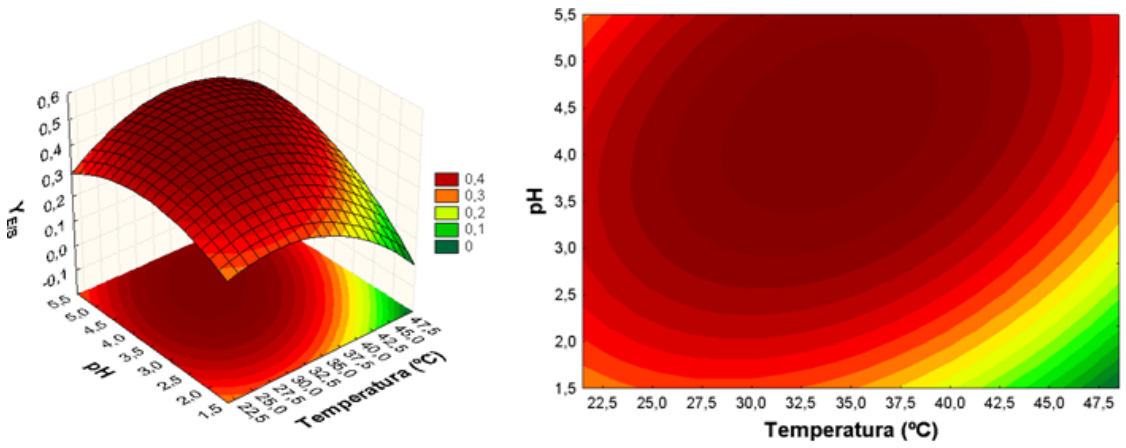
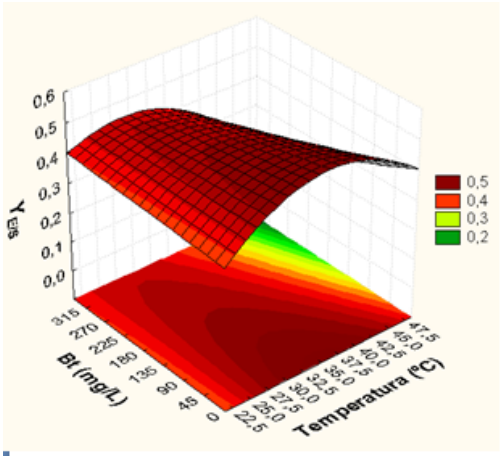


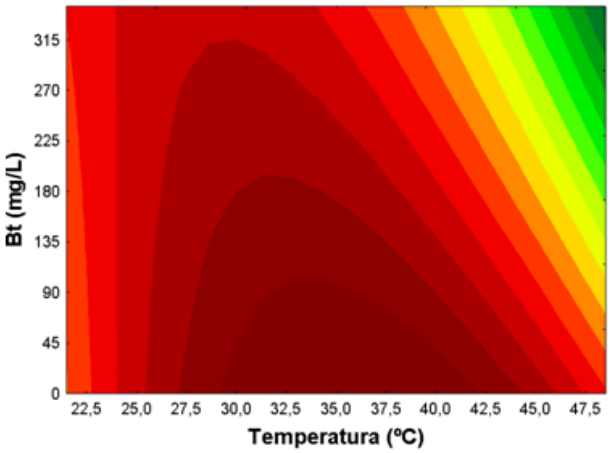
Figura 4.8 – Distribuição dos resíduos em torno da reta para a resposta rendimento de etanol em relação à sacarose.

As superfícies de resposta, relativas ao rendimento em etanol, Figura 4.9, foram construídas e definiu-se a região de interesse.

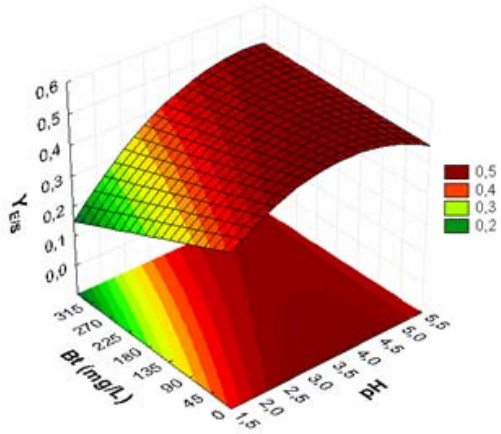


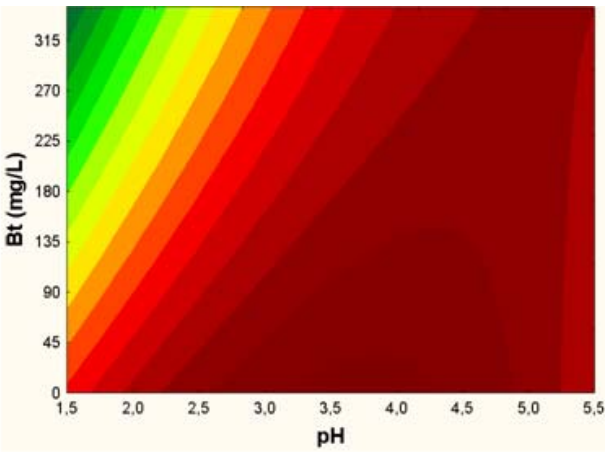
(a) **(b)**





(c) **(d)**



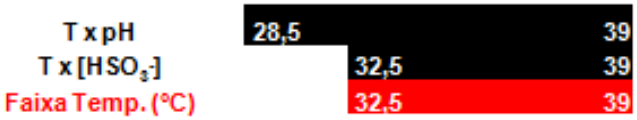


(e) **(f)**

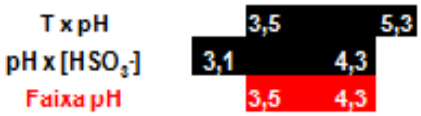
Figura 4.9 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para o rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$ em função da temperatura e do pH (a) e (b), da temperatura e da concentração de sulfito (c) e (d) e do pH e concentração de sulfito (e) e (f).

Analisando as curvas de contorno (b) e (d) da Figura 4.9 definiu-se a faixa de temperatura que maximiza o rendimento em grama de etanol /grama de sacarose.

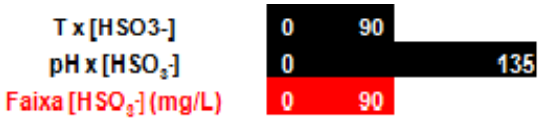
A curva de contorno (Figura 4.9 – b) que representa o efeito combinado da temperatura e o pH indica uma faixa aproximada de 28,5 a 39°C para a maximização da resposta em questão. O efeito combinado da temperatura e da concentração de sulfito no mosto (Figura 4.9 – d) indica uma faixa bem próxima à anterior, sendo apenas menos abrangente, de 32,5 até 39°C. Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que para maximização da resposta rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$ a temperatura deve estar entre 32,5 e 39°C.



A curva de contorno (Figura 4.9 – b) que representa o efeito da temperatura em sinergismo com o pH indica uma faixa que engloba valores de pH entre 3,5 e 5,3. O efeito combinado do pH e da concentração de sulfito no mosto (Figura 4.9 – f) indica uma faixa de 2,3 até 4,3 para o parâmetro em questão. Após se fazer a combinação dos efeitos em sinergia, pode-se afirmar que para maximização do rendimento em etanol, na região experimental adotada no planejamento, o pH deve estar entre 3,5 e 4,3.



Da mesma forma que para temperatura e o pH, a partir das curvas de contorno (d) e (f) da Figura 4.9 definiu-se a faixa da concentração de sulfito que maximiza o rendimento de etanol em função da sacarose. De acordo com esta análise, visando a um maior rendimento em etanol ($g_{etanol}/g_{sacarose}$) é interessante que a concentração de sulfito esteja no máximo igual a 90 mg/L.



A fim de se obter o ponto estacionário que maximiza o rendimento de etanol ($g_{etanol}/g_{sacarose}$) foi utilizado um programa implementando em *Maple Release* 8.0 e definiram-se os valores das variáveis estudadas: a temperatura deve estar em 38°C, o pH em 4,3 e deve-se trabalhar em uma concentração de sulfito de 19,5 mg/L. Tal resultado mostra-se em concordância com a análise anterior já que todas as variáveis determinadas encontram-se dentro da faixa definida.

Foi feita, da mesma forma que para a determinação do ponto de maximização da resposta, a determinação do ponto de minimização do rendimento $Y_{E/S}$ dentro da região experimental trabalhada. O ponto estacionário que fornece o menor rendimento em etanol foi o codificado pelas seguintes variáveis: X1=1,353, X2=-1.353 e X3=1.353, que representam a condição de temperatura de 48,5°C, pH de 1,5 e concentração de sulfito de 345 mg/L.

Fica claro o efeito prejudicial de baixos valores de pH, de altas temperaturas e altas concentrações de sulfito na produção de etanol, como citado na literatura.

Os coeficientes de regressão para a resposta produtividade de etanol (g/L.h) estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Coeficientes de regressão para a resposta produtividade de etanol (g/L.h).

	Coeficientes de regressão	**Erro Padrão**	**p – valor**
Média	7,15	0,42	0,000
X_1 (L)	-0,38	0,24	0,141
X_1 (Q)	-1,60	0,32	0,001
X_2 (L)	2,00	0,24	0,000
X_2 (Q)	-1,76	0,32	0,001
X_3 (L)	-0,88	0,24	0,008
X_3 (Q)	0,01	0,32	0,974
X_1X_2	0,11	0,29	0,761
X_1X_3	0,09	0,29	0,805
X_2X_3	0,81	0,29	0,026

Com exceção da temperatura (X_1), do termo quadrático da concentração de sulfito (X_3(Q)) e das interações da temperatura com o pH (X_1X_2) e da temperatura com a concentração de sulfito (X_1X_3), os outros parâmetros do modelo foram altamente significativos. A Equação 4.4 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para a produtividade de etanol.

$$P_{et} = 7,13-0,39X_1-1,59X_1^2+2,00X_2-1,76X_2^2-0,88X_3+0,81X_2X_3 \quad (4.4)$$

Analisando-se os coeficientes das variáveis na Equação 4.4 tem-se uma estimativa a respeito do efeito de cada uma isolada. Definiu-se se é gerada uma contribuição positiva ou negativa para a resposta e se o efeito isolado é expressivo ou não. Da mesma forma que para o rendimento em $g_{etanol}/g_{sacarose}$, o sinal negativo dos coeficientes X_1 e X_3 indica que maiores temperaturas e concentrações de sulfito no mosto contribuem para uma redução na produtividade de etanol (sinal negativo) e de forma contrária, maiores valores de pH contribuem para um aumento da produtividade (sinal positivo).

Esta análise está em concordância com os resultados da Tabela 4.1 na qual, em observação aos pontos axiais relativos à produtividade, verifica-se para T= 21,5°C, uma

produtividade de 4,9 g/(L.h) enquanto para T=48,5°C, de 3,3 g/(L.h). De forma ainda mais expressiva, os pontos axiais inferior e superior relativos ao pH indicam, respectivamente, 0,4 e 7,2 g/(L.h). As respostas para os pontos axiais relativos à concentração de sulfito foram de 7,3 g/(L.h) em ausência de sulfito e 6,8 g/(L.h) para uma concentração máxima de sulfito de 345mg/L.

Comparando-se a influência das variáveis isoladas no rendimento em $g_{etanol}/g_{sacarose}$, e na produtividade de etanol, pode-se perceber que apesar de serem observadas as mesmas variáveis significativas, fica claro que existe diferença na intensidade dos efeitos de cada uma destas variáveis nas respostas. A mais expressiva diferença é em relação à concentração de sulfito no meio. Em análise relacionada à produtividade, tal parâmetro isolado se mostra muito mais expressivo que em relação ao rendimento. Já o efeito do pH se mostra bastante significativo para as duas respostas.

MELO (2006), na análise dos fatores celulares responsáveis pela resistência ao estresse ácido em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, comparou fermentações com valores de pH inicial iguais a 6 e a 2,5 para duas diferentes linhagens e observou, assim como prevê a Equação 4.4 do modelo da produtividade de etanol no presente estudo, uma diminuição na produção de etanol em ambas as linhagens. Para Melo, esta baixa produção pode estar relacionada à falta de uma resposta celular imediata à condição de baixo pH.

Já em relação à concentração de sulfito, GUTIERREZ (1988) observou que na presença de 219 mg/L de SO_2 em meio de melaço não houve alteração da produção de etanol em pH 4. Tal resultado se mostra concordante com o presente estudo já que neste foi observada uma influência pouco expressiva da concentração de sulfito no meio em até 345 mg/L.

Realizando a análise de variância (ANOVA) e analisando a Tabela 4.9, verifica-se que o Fcalc foi significativo (p=0,0006) e a porcentagem de variação explicada de 95%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.10.

Tabela 4.9 - ANOVA para a resposta produtividade em etanol.

Fonte de variação	**Soma de Quadrados**	**Graus de Liberdade**	**Quadrado Médio**	**F-calc.**	**p-valor**
Regressão	101,5252	9	11,280578	16,6	0,000624
Resíduos	4,7560	7	0,679429		
Total	106,2812	16			

$F_{9;\,7\,;0,1} = 2,72$

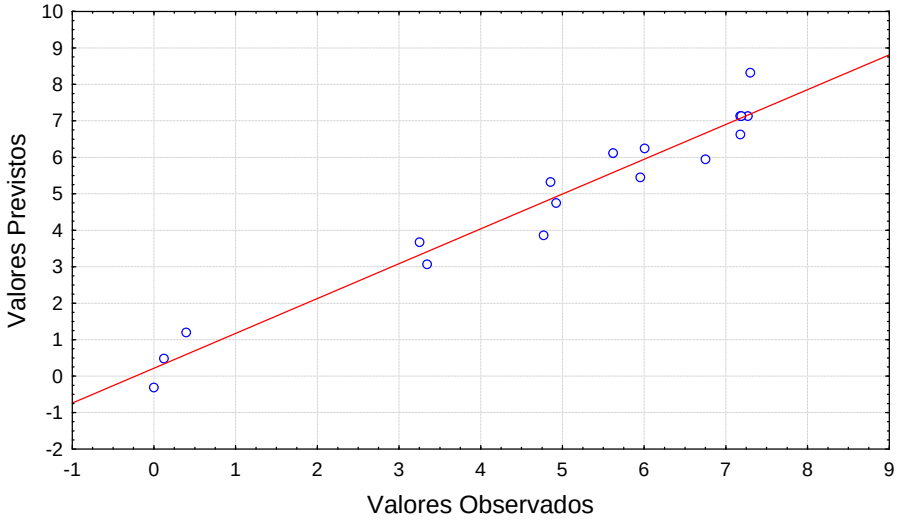


Figura 4.10 - Valores experimentais em função valores previstos pelo modelo para a resposta produtividade de etanol.

Pela Figura 4.11 pode-se observar que os erros de ajustamento se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta.

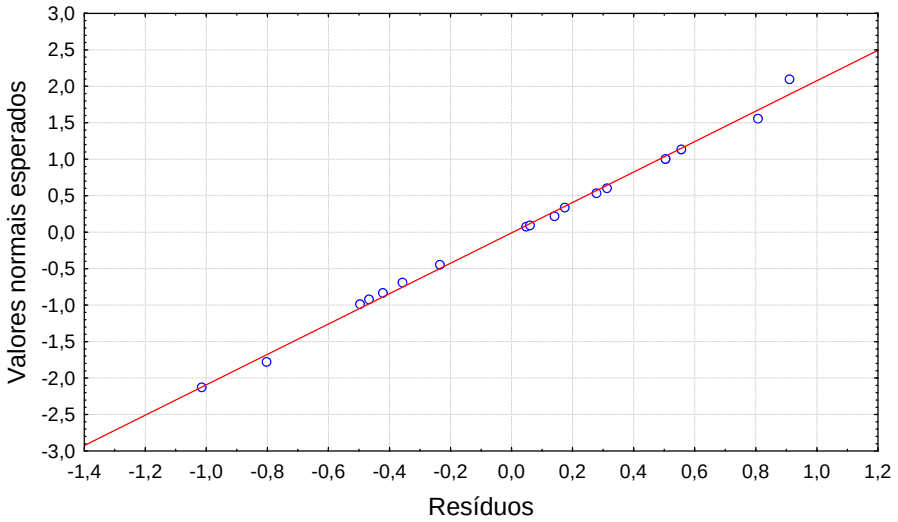


Figura 4.11 – Distribuição dos resíduos em torno da reta para a resposta produtividade de etanol.

Foi possível, então, construir as superfícies de resposta, Figura 4.12 e definir a região de interesse para maximização da produtividade de etanol.

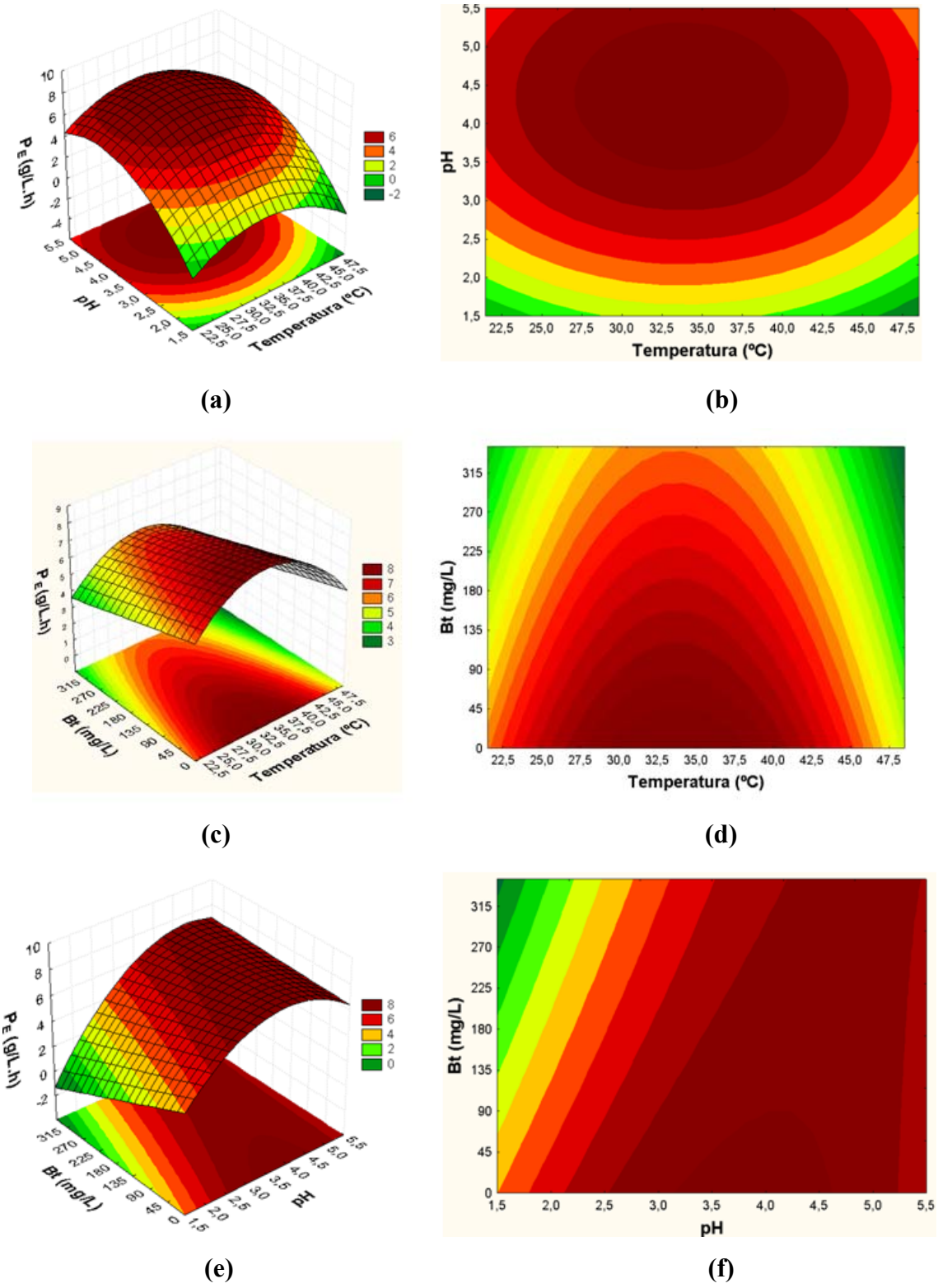


Figura 4.12 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta produtividade de etanol (g/L.h) em função da temperatura e do pH (a) e (b), da temperatura e da concentração de sulfito (c) e (d) e do pH e concentração de sulfito (e) e (f).

Analisando as curvas de contorno (b) e (d) da Figura 4.12 definiu-se a faixa de temperatura que maximiza a produtividade de etanol em g/L.h. Visando a uma maior produtividade de etanol, a temperatura deve estar entre 29 e 38,5ºC. Dessa forma, são satisfeitas as respostas fornecidas pelo efeito combinado da temperatura e o pH (faixa bastante abrangente que engloba a temperatura de 27,5 até 41°C e o efeito combinado da temperatura e a concentração de sulfito no mosto (de 29 a 38,5°C).

T x pH	27,5	41
T x [HSO_3-]	29	38,5
Faixa Temp. (ºC)	29	38,5

Pelas curvas de contorno (b) e (f) da Figura 4.12 definiu-se a faixa de pH que maximiza a produtividade de etanol (g/L.h). Ambos os efeitos (temperatura em sinergismo com o pH e pH em sinergismo com a concentração de sulfito) englobam uma faixa aproximada da variável em questão. Buscando-se que se respeitem ambas as faixas, o pH deve estar entre 3,5 e 4,6 para uma maximização da produtividade de etanol.

T x pH	3,5	5,3
pH x [HSO3-]	3,1	4,6
Faixa de pH	3,5	4,6

Para a definição da concentração de sulfito que maximiza a produtividade foi realizada a análise das curvas de contorno (d) e (f) da Figura 4.12. A concentração de sulfito deve estar em até 45 mg/L para uma maior produtividade de etanol.

T x [HSO3-]	0	90
pH x [HSO_3-]	0	45
Faixa [HSO_3-] (mg/L)	0	45

Para se determinar a condição que fornece a máxima produtividade de etanol na região experimental trabalhada, utilizou-se um programa implementado no *software Maple Release* 8.0 e definiram-se os valores das variáveis estudadas: a temperatura encontrada foi de 33,5°C, o pH de 3,9 e deve-se trabalhar em ausência de sulfito.

4.2.4 – Rendimento de glicerol

Os coeficientes de regressão para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Coeficientes de regressão para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$.

	Coeficientes de regressão	**Erro Padrão**	**p – valor**
Média	0,051	0,0034	0,000
X_1 (L)	0,004	0,0019	0,082
X_1 (Q)	0,001	0,0025	0,799
X_2 (L)	0,013	0,0019	0,000
X_2 (Q)	-0,006	0,0025	0,051
X_3 (L)	-0,008	0,0019	0,003
X_3 (Q)	0,003	0,0025	0,218
X_1X_2	-0,001	0,0023	0,676
X_1X_3	0,002	0,0023	0,535
X_2X_3	0,010	0,0023	0,003

Para a resposta em estudo, verificou-se que os termos quadráticos da temperatura e da concentração de sulfito assim como as interações temperatura e pH e temperatura e concentração de sulfito não se mostraram significativas.

A equação 4.5 representa o modelo ajustado codificado para o rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ com porcentagem de variação explicada de 91%.

$$Y_{G/S} = 0{,}054+0{,}004X_1+0{,}013X_2-0{,}006X_2^2-0{,}008X_3+0{,}010X_2X_3 \qquad (4.5)$$

O sinal positivo dos coeficientes X_1 e X_2 na Equação 4.5 indica que aumentos nos valores da temperatura e do pH contribuem para um aumento no rendimento de glicerol em relação à sacarose e de forma contrária, maiores valores de concentração de sulfito contribuem de forma negativa para tal resposta. Esta análise está em concordância com a Tabela 4.1 na qual, em observação aos pontos axiais relativos ao pH, o parâmetro de efeito mais expressivo, verifica-se para o pH de 1,5 um rendimento de 0,017 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ enquanto para o pH de 5,5 um valor de 0,057 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$. De forma não tão expressiva para a resposta, os pontos axiais inferior e superior da concentração de sulfito geram um rendimento de 0,058 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ (em ausência de sulfito) e de 0,050 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ em concentração de 345mg/L. As respostas para os pontos axiais relativos à temperatura foram de 0,042 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ para o ponto axial inferior (T=21,5ºC) e de 0,056 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ para o superior (T=48,5ºC).

Realizando-se a análise de variância (ANOVA) e analisando-se a Tabela 4.11, verificou-se que o Fcalc foi significativo (p=0,0024) e a porcentagem de variação explicada de 91%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.13.

Tabela 4.11. ANOVA para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$.

Fonte de variação	**Soma de Quadrados**	**Graus de Liberdade**	**Quadrado Médio**	**F-calc.**	**p-valor**
Regressão	0,004100	9	0,000455556	10,8	0,002428
Resíduos	0,000296	7	4,22857E-05		
Total	0,004396	16			

$F_{9;\,7;\,0,1} = 2,72$

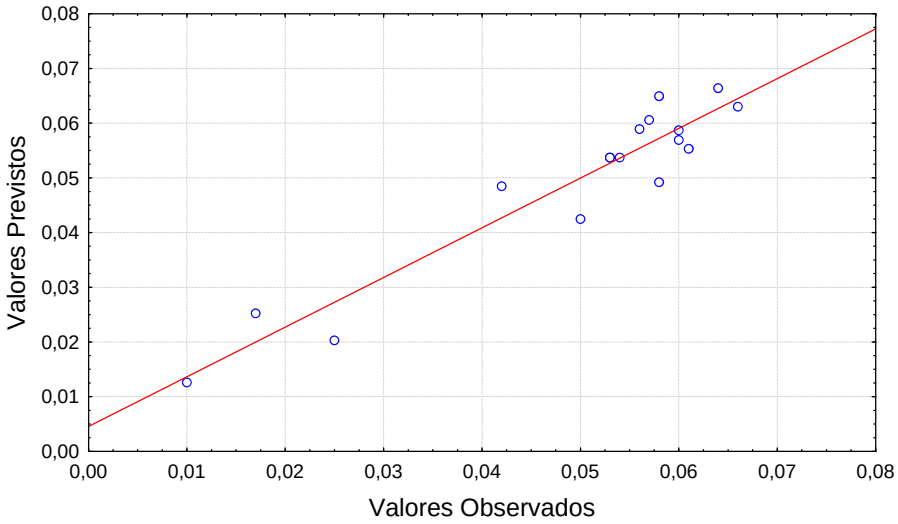


Figura 4.13 - Valores experimentais em função valores previstos pelo modelo para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$.

Pela Figura 4.14 pode-se observar que os erros de ajustamento se mostram independente e normalmente distribuídos em torno da reta.

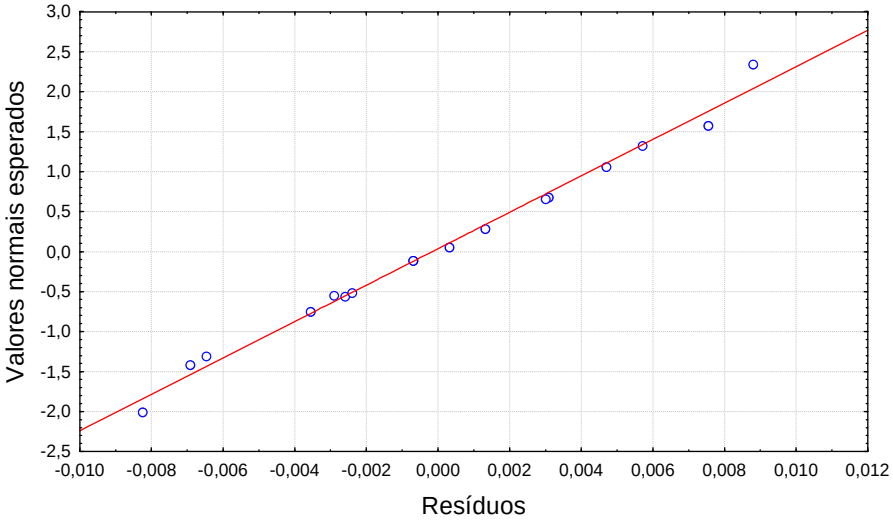
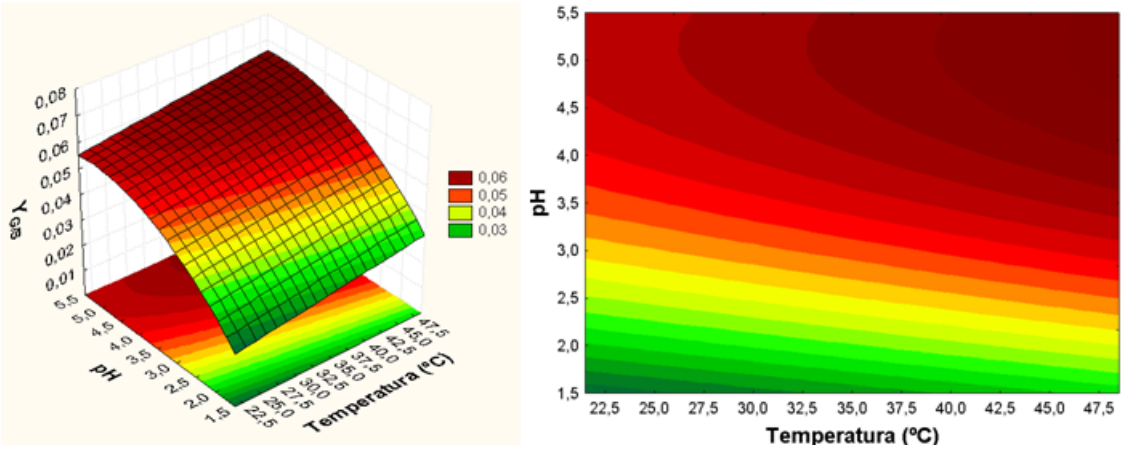
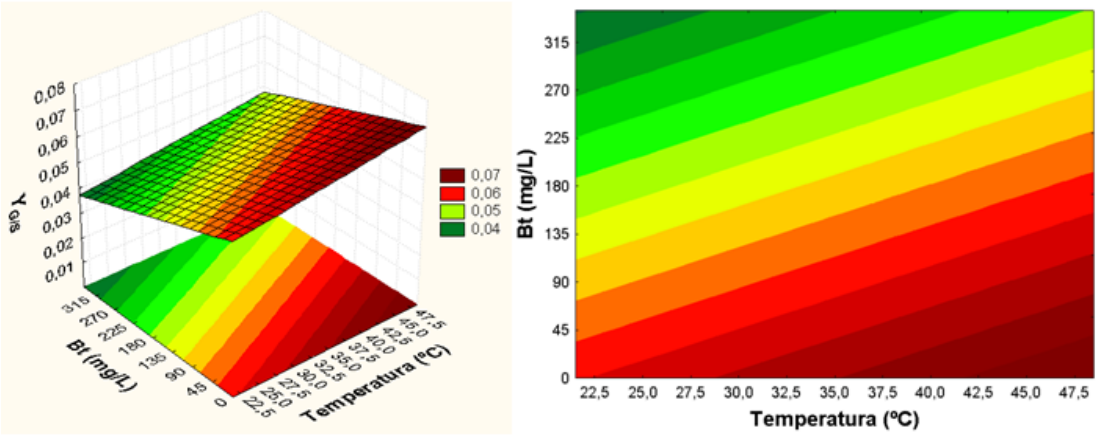


Figura 4.14 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$.

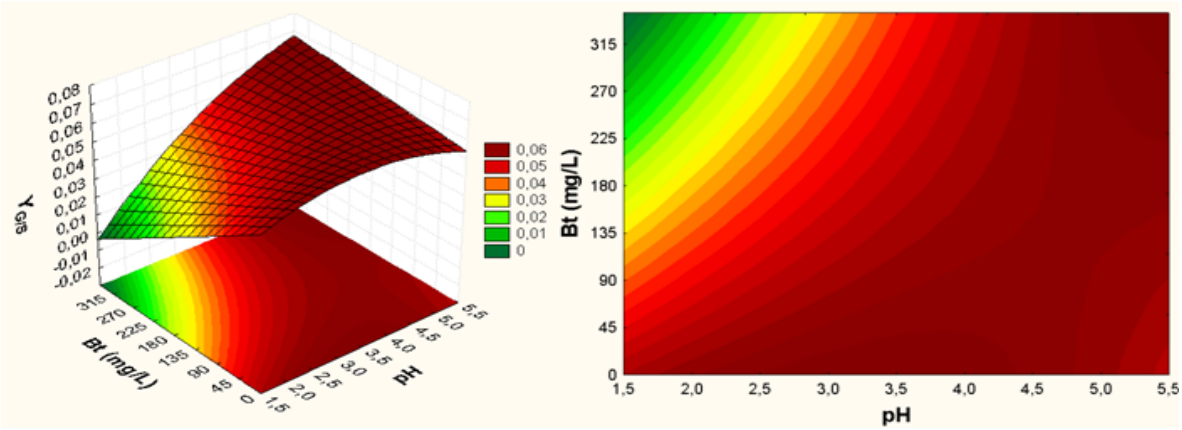
Com a Equação 4.5 foram construídas as superfícies de resposta, Figura 4.15, para o rendimento em glicerol e definiu-se, desta vez, a região de não interesse como sendo a região que maximizava o rendimento em glicerol.



(a) **(b)**



(c) **(d)**

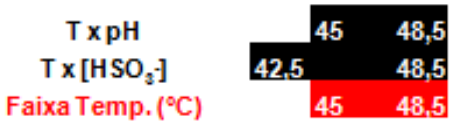


(e) **(f)**

Figura 4.15 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta rendimento $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ em função da temperatura e do pH (a) e (b), da temperatura e da concentração de sulfito (c) e (d) e do pH e concentração de sulfito (e) e (f).

Analisando as curvas de contorno (b) e (d) da Figura 4.15 definiu-se a faixa de temperatura que maximiza o rendimento em glicerol por sacarose. A determinação desta faixa para a maximização serve de referência para não adoção em uma fermentação, já que desta forma, seria promovida a formação do subproduto, não interessante na fermentação.

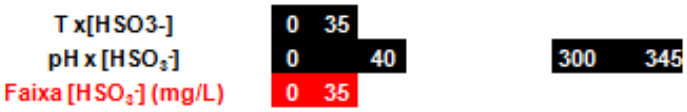
A curva de contorno (Figura 4.15 – b) que representa o efeito da temperatura em combinação com o pH, assim como a que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração de sulfito (Figura 4.15 – d) indicam uma maximização do rendimento em $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ para altas temperaturas, o que pode caracterizar o estresse térmico. Ambas forneceram faixas de temperatura que englobavam a mais alta temperatura adotada no planejamento. A faixa de temperatura combinada de ambos os efeitos foi de 45 a 48,5°C.



Da mesma forma que para temperatura, a partir das curvas de contorno (b) e (f) da Figura 4.15 definiu-se a faixa de pH que maximiza o rendimento em glicerol em relação à sacarose na região experimental trabalhada. A faixa de pH correspondente ao máximo rendimento deste subproduto engloba valores de pH de 5,2 a 5,5, novamente englobando o maior valor de pH adotado no planejamento.

Percebe-se, com base nesta análise, que altos valores de temperatura e pH geram maior produção de glicerol. Este comportamento é confirmado pela literatura. LIMA, BASSO e AMORIM, (2001), afirmaram que quanto maiores os valores pH, temperatura e concentração de sacarose no mosto, maior é a produção de glicerol.

Da mesma forma que para temperatura, pela definição da concentração de sulfito que maximiza a resposta em questão foi realizada a análise das curvas de contorno (d) e (f) da Figura 4.15. De acordo com esta análise, se a concentração de sulfito se encontrar em até 35mg/L, obter-se-á uma maior formação de glicerol na fermentação.



A fim de se obter o ponto estacionário que mais favorece a produção de glicerol, realizou-se uma análise canônica utilizando-se o modelo completo representado pelos coeficientes de regressão mostrados na Tabela 4.10. Utilizou-se um programa implementado no *software Maple Release* 8.0 e definiram-se os valores das variáveis estudadas. Se a temperatura se encontrar em 48,5ºC, o pH em 5,5 e a concentração de sulfito em 345 mg/L será favorecida a formação do glicerol, um subproduto não desejável na fermentação. Tal resultado mostra-se em concordância com a análise da faixa para maximização da resposta em questão exceto em relação à concentração de sulfito no meio.

Foi feita, da mesma forma que para a determinação do ponto de maximização da resposta, a determinação do ponto de minimização do rendimento $Y_{G/S,}$ o que realmente se busca em uma fermentação. O ponto estacionário que fornece o menor rendimento em glicerol foi o codificado pelas seguintes variáveis: X1=-1,353, X2=-1,353 e X3=1,30, que

representam a condição de temperatura de 21,5°C, de pH de 1,5 e de concentração de sulfito de 338 mg/L.

Fica claro o efeito do aumento nos valores de pH e da temperatura na produção de glicerol. Quando se trabalha em altas temperaturas e em meios mais alcalinos favorece-se, assim como prevê a literatura, a formação de glicerol. Já em relação ao sulfito nas concentrações abordadas no planejamento (até 345 mg/L) não se pôde tirar conclusões definitivas. Na avaliação conjunta das variáveis, a concentração de sulfito não influencia na produção de glicerol.

4.2.5 – Avaliação da reprodutibilidade do ponto otimizado

Baseando-se nas faixas de interesse para as respostas avaliadas e na literatura, definiram-se as condições para realização do experimento para validação. Nas condições de T=32,5°C, pH=4 e concentração de sulfito=0 mg/L foram respeitadas as faixas de maximização da viabilidade celular, da quantidade final de trealose, do rendimento $g_{etanol}/g_{sacarose}$ e da produtividade de etanol. A Figura 4.16 representa o experimento de validação do planejamento.

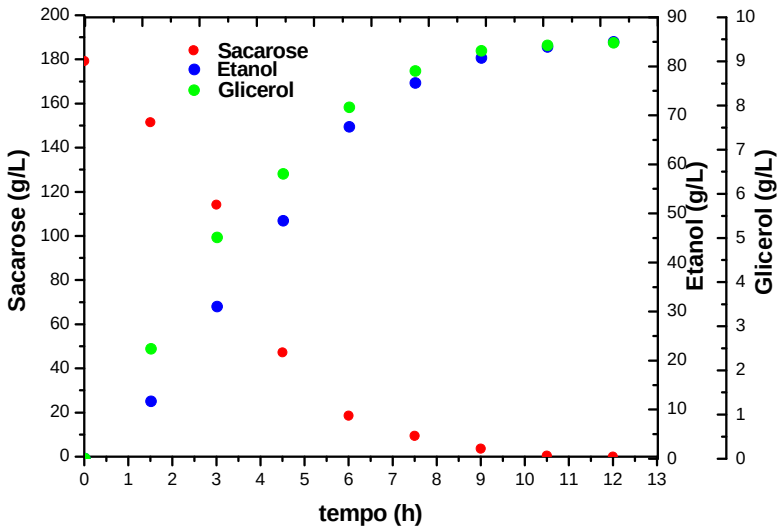


Figura 4.16 – Experimento cinético de validação do Planejamento Composto Central realizado.

No experimento de validação foram obtidos os seguintes resultados para as respostas analisadas: viabilidade celular de 0,90±1,0 %, quantidade final de trealose de 10,7±1,2 g/100

g de sacarose, 0,47±0,1 $g_{etanol}/g_{sacarose}$ de rendimento de etanol em relação à sacarose, 0,053±0,01 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ de rendimento de glicerol em relação à sacarose e produtividade de etanol de 7,1±1,0 g/L.h.

Trabalhando com as variáveis codificadas tem-se X_1= -0,25, X_2= 0,333 e X_3= -0,353. Substituindo estes valores nas equações do modelo ajustado para cada resposta, tem-se que a viabilidade celular é de 1,0 %, a quantidade final de trealose é de 11,8 g/100 g de sacarose, o rendimento de etanol em relação à sacarose de 0,56 $g_{etanol}/g_{sacarose}$, o rendimento de glicerol em relação à sacarose de 0,063 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ e a produtividade de etanol é de 8,5 g/L.h. Os valores obtidos pelo experimento e o modelo estão próximos, o que indica a validade do modelo ajustado.

4.3 – Efeito do sulfito na fermentação alcoólica

Nas fermentações realizadas, o sulfito foi incorporado na forma bissulfito (HSO_3^-) pela adição de bissulfito de sódio ($NaHSO_3$) ao meio fermentativo. Em presença de água o bissulfito de sódio se dissocia em Na^+ e HSO_3^-, conforme Equação 4.6.

$$NaHSO_3 \xrightarrow{água} Na^+_{(aq)} + HSO^-_{3(aq)} \tag{4.6}$$

Este bissulfito inicial $[HSO_3^-]_0$, acaba sofrendo reações com a água segundo as Equações 4.7 e 4.8, de forma que no final o que se têm são três espécies cujas concentrações dependem do pH do meio.

$$HSO_3^- + H_2O \rightleftharpoons H_2SO_3 + OH^- \tag{4.7}$$

$$HSO_3^- + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+SO_3^{2-} \tag{4.8}$$

Portanto, depois de adicionado o bissulfito de sódio ao meio fermentativo, tem-se uma mistura de três espécies: o bissulfito que não reagiu $[HSO_3^-]$, o sulfito $[SO_3^{2-}]$ e o ácido sulfuroso $[H_2SO_3]$. Porém, segundo a literatura, é questionável que este ácido realmente exista já que a constante de equilíbrio entre ele e o dióxido de enxofre é tão pequena que menos de uma molécula por bilhão está na forma de ácido sulfuroso.

$$H_2SO_{3(aq)} \rightleftharpoons SO_{2(aq)} + H_2O \tag{4.9}$$

Pode-se considerar, dessa forma, que dependendo do pH, o sulfito adicionado por meio do bissulfito de sódio pode encontrar-se nas formas de dióxido de enxofre (SO_2), bissulfito (HSO_3^-) e de sulfito (SO_3^-).

A distribuição dos íons em solução em função do pH foi calculada conforme procedimento descrito em COTTON e WILKINSON, (1988) e os resultados são apresentados na Tabela 4.12 e Figura 4.17.

Tabela 4.12 – Distribuição dos íons relacionados ao sulfito em solução como função do pH.

pH	$H_2SO_3=SO_2$(%)	HSO_3^-(%)	SO_3^{--}(%)
0	98,72	1,18	0,00
1	88,50	10,62	0,00
2	43,48	52,17	0,00
3	7,14	85,71	0,01
4	0,76	91,55	0,06
5	0,08	91,71	0,57
6	0,01	87,30	5,41
7	0,00	58,71	36,40
8	0,00	13,73	85,13
9	0,00	1,59	98,28

Como se pode observar pela Figura 4.17, para valores de pH mais baixos (pH até 4) coexistem principalmente as formas óxido de enxofre (SO_2) e bissulfito (HSO_3^-), enquanto entre valores de pH 5,0 e 9,0, há uma composição mista de bissulfito e sulfito (SO_3^{-2}).

O SO_2, porém, é sempre transportado para o interior da célula onde se converte nas outras duas formas devido o ambiente ser caracterizado pelo valor de pH próximo de 6 (CARR *et al.*,1976; ANACLETO e van UDEB, 1982; CARTWRIGHT *et al.*, 1989).

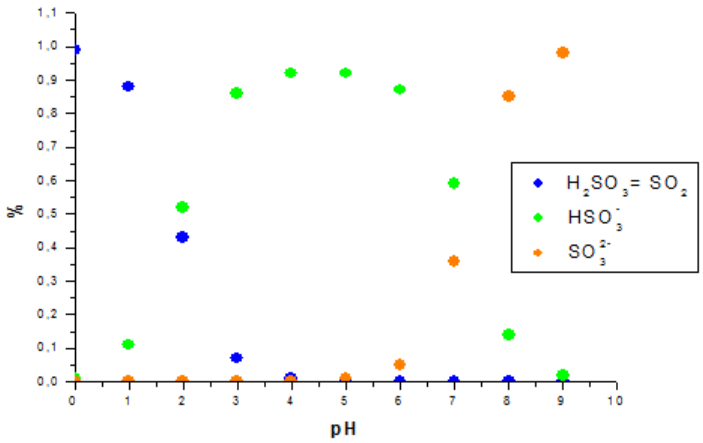


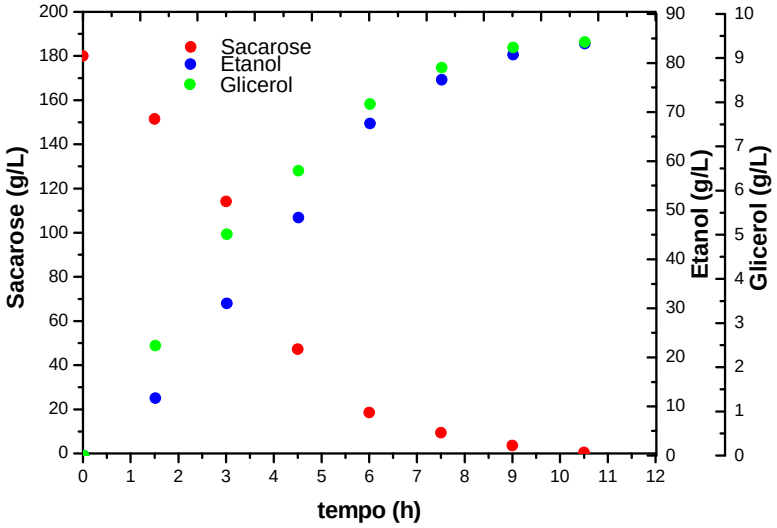
Figura 4.17 – Distribuição dos íons relacionados ao sulfito em solução como função do pH.

A fim de se investigar mais profundamente o efeito do sulfito na fermentação, foram realizados mais dois experimentos adotando-se, em ambos, o pH e a temperatura considerados ótimos (pH=4 e T=32,5ºC) e concentrações de sulfito de 345 mg/L e 690 mg/L.

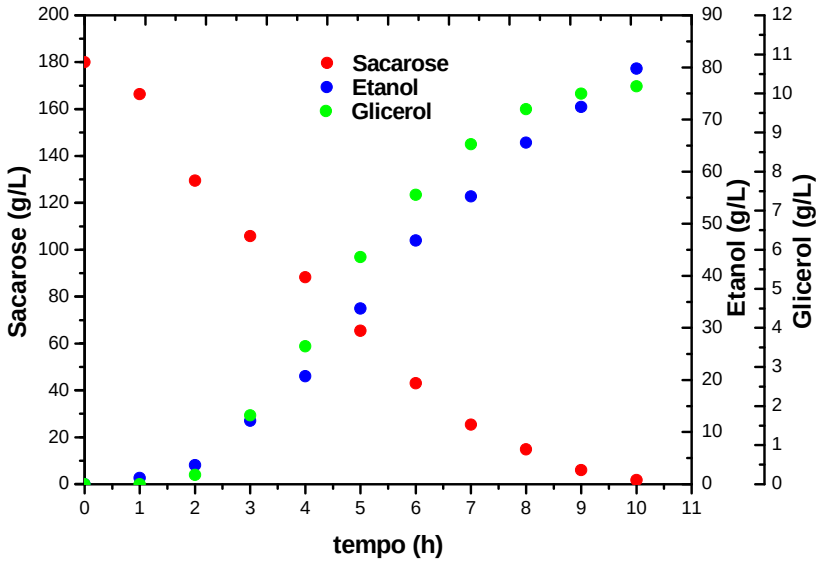
No pH 4, como se pode observar pela Tabela 4.12 e também pela Figura 4.17, tem-se predominantemente, a espécie bissulfito (HSO_3^-), sendo analisado, portanto o efeito desta espécie no processo fermentativo.

A Figura 4.18 (a), (b) e (c) mostra, respectivamente, as fermentações em ausência de sulfito, e aquelas com concentração de 345 mg/L e de 690 mg/L desta espécie.

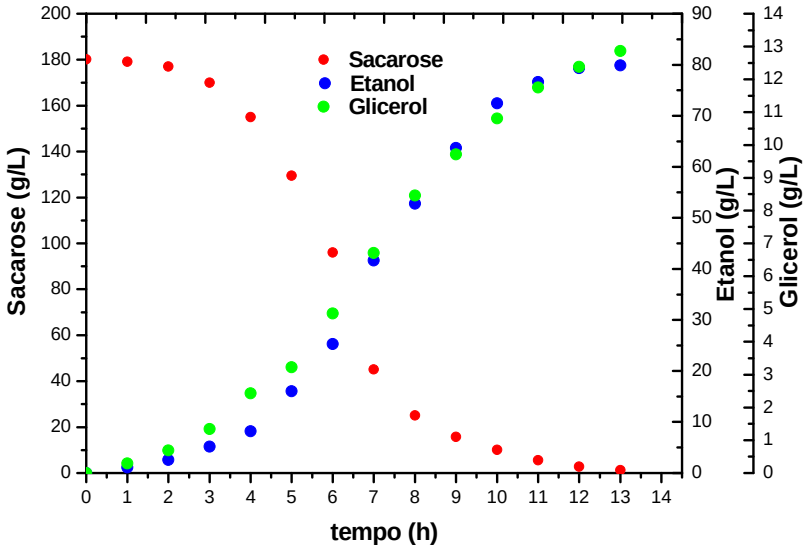
Baseando-se nas equações dos cálculos relacionados às fermentações (Equações 3.1, 3.2 e 3.3), a produtividade de etanol calculada foi de 8,3 g/L.h e 8,0 g/L.h e o rendimento de glicerol por sacarose de 0,057 e 0,072 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ nas concentrações de 345 e 690 mg/L, respectivamente. Já o rendimento de etanol por sacarose foi de 0,45 $g_{etanol}/g_{sacarose}$ para ambas concentrações.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.18 – Fermentações alcoólicas na condição de pH igual a 4, temperatura de 32,5ºC e concentrações de sulfito de 0 mg/L (a), 345 mg/L (b) e 690 mg/L (c).

Pelo acompanhamento das fermentações observou-se que na corrida com maior concentração de sulfito (690 mg/L), durante a primeira hora de fermentação, praticamente não

se nota diferença em relação ao substrato e aos produtos, respostas que só começam a se pronunciar a partir de duas horas aproximadamente.

Na primeira hora, a concentração de sacarose praticamente não se altera, diminui apenas de 180 para 179,07 g/L. Em ausência de sulfito, na primeira hora, essa concentração chega a aproximadamente 161,01 g/L. E no experimento com sulfito na concentração de 345 mg/L, o consumo de substrato foi intermediário entre os dois extremos adotados tendo-se, ao final da primeira hora de fermentação, 166,32 g/L de sacarose. Este comportamento se repete ao longo do tempo e é representado pela produtividade de etanol. No final de cada ciclo (consumo completo do substrato), a produtividade de etanol foi de 8,3 g/L.h em ausência de sulfito, de 8,0 g/L.h na concentração de 345 mg/L de sulfito e de 6,1 g/L na máxima concentração do reagente.

Para a fermentação com a máxima concentração de sulfito, o tempo de consumo de 180g/L de sacarose foi de aproximadamente 13 horas enquanto para as demais foram por volta de 10 horas.

Visando a uma melhor forma de comparação, calculou-se a produtividade de etanol no final de 10 horas para os três experimentos, obtendo-se 8,3 g/L.h de etanol em ausência de sulfito, 8,0 g/L.h de etanol na concentração de 345mg/L de sulfito e 7,3 g/L.h na máxima concentração (690mg/L).

Essa diferença de comportamento é observada para o rendimento do etanol em relação à sacarose, mas de forma bem menos expressiva. Em ausência de sulfito, com o consumo de praticamente todo o substrato, obteve-se um rendimento de 0,47 $g_{etanol}/g_{sacarose}$. Enquanto para as fermentações em presença de sulfito, os rendimentos foram de 0,45 $g_{etanol}/g_{sacarose}$ (menor concentração) e de 0,45 $g_{etanol}/g_{sacarose}$ (maior concentração). Ou seja, praticamente não se observou queda no rendimento do etanol com o aumento da concentração de sulfito.

Quanto à viabilidade celular ao final dos ciclos, foi observado o mesmo comportamento obtido na produtividade de etanol, ou seja, quanto maior a concentração de sulfito presente no mosto menor foi a viabilidade celular. Em ausência de sulfito obteve-se uma viabilidade celular de 0,90. Na presença dele, para concentração de 345mg/L, a viabilidade foi de 0,89 e para concentração de 690 mg/L, de 0,61.

Toda esta análise mostrou-se em concordância com a resposta obtida no PCC realizado. Pela análise das equações que representam a viabilidade (Equação 4.1), o rendimento de etanol em relação à sacarose (Equação 4.3) e a produtividade de etanol (Equação 4.4), percebe-se que em todas elas os parâmetros relacionados à variável X_3

(concentração de sulfito) atuam de modo a contribuir para uma diminuição das respostas em questão. Fica claro, também, que a expressão mais significativa do efeito do sulfito se mostra em relação à produtividade de etanol e à viabilidade celular já que o rendimento de etanol quase não se altera.

Já em relação ao rendimento de glicerol ($g_{glicerol}/g_{sacarose}$), o que se observou foi o contrário. Para maiores concentrações de sulfito, obteve-se um aumento da resposta em questão. Após o consumo de praticamente todo o substrato, foi obtido um rendimento de 0,053 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ na fermentação em ausência de sulfito, enquanto para as demais fermentações obtiveram-se as respostas de 0,057 e 0,072 $g_{glicerol}/g_{sacarose}$ em ordem crescente de quantidade de sulfito adotada. Este resultado mostra-se em desacordo com o resultado obtido no PCC (item 4.2.4) que indicou maiores rendimentos de glicerol em relação à sacarose para menores concentrações de sulfito. Tal desacordo pode ser justificado por uma série de fatores. Pode indicar, por exemplo, que a região experimental trabalhada no PCC não tenha englobado a faixa em que se observa tal comportamento (concentrações de sulfito maiores que 345mg/L).

Porém, outra justificativa é que os 17 experimentos realizados no planejamento combinavam diferentes valores de pH com as diferentes concentrações de sulfito. Como abordado anteriormente, o pH interfere na espécie em que o sulfito se encontra e cada espécie gera diferentes respostas para a viabilidade celular e o seu metabolismo, tendo-se, desta forma a partir do planejamento, uma resposta que englobava todos os efeitos em sinergismo. Nesta análise complementar, o efeito do sulfito na fermentação alcoólica, foi fixado o pH, mantendo assim a forma em que o sulfito se encontrava e a sua proporção, o que, necessariamente gera uma resposta mais apurada do seu efeito.

No planejamento trabalhou-se com o pH nos valores de 1,5; 2; 3,5; 5 e 5,5. Mais precisamente o que se tinha no meio fermentativo eram misturas em diferentes proporções de dióxido de enxofre (SO_2) e bissulfito (HSO_3^-) para os valores de pH de 1,5; 2 e 3,5 e para os valores mais altos de pH, uma mistura também em diferentes proporções de bissulfito (HSO_3^-) e sulfito (SO_3^{2-}) (pH 5 e 5,5).

Outra possível justificativa é que nas condições adotadas no PCC o glicerol produzido tenha se mantido no interior das células. Em grande parte dos experimentos trabalhou-se em condições de estresse e neste caso o glicerol é utilizado, assim como a trealose, para manutenção celular, não sendo excretado para meio.

4.4 – Estudo cinético da fermentação alcoólica

A estimativa dos parâmetros foi realizada a partir do experimento nas condições consideradas ótimas definidas pela análise realizada no PCC e pela literatura (temperatura = 32ºC, pH=4, concentração de sulfito = 0). O rendimento experimental final em glicerol (0,059) foi utilizado na estimação. Para o etanol e a célula foram utilizados rendimentos experimentais médios ao longo do tempo da fermentação (0,437 e 0,04, respectivamente).

Para se definir o modelo que melhor representa os dados experimentais obtidos, foram testados alguns dos modelos mostrados na Tabela 2.3. O modelo proposto por Levenspiel em 1980 e o modelo de Ghose e Thiagy (1979) foram os que mais se ajustaram aos dados experimentais e que menores erros apresentaram.

Para o modelo de Ghose e Thiagy a função objetivo encontrada foi de 508,51. Para o modelo de Levenspiel foi de 513,27. Tais valores se referem ao somatório da diferença entre os valores estimados pelo modelo e os experimentais. Como tais valores apresentavam dimensões (não foram normalizados) é esperado e justificável que sejam expressivos.

Assim como VASCONCELOS *et al.* (1992), que testaram dez modelos cinéticos para o processo de fermentação alcoólica industrial e concluíram que o modelo de Ghose e Thyagi (1979) foi o que apresentou os melhores ajustes dos dados experimentais, o atual trabalho também chegou aos melhores resultados com tal modelo para as condições experimentais adotadas (Figura 4.19).

A Equação 4.7 define o modelo proposto por Ghose e Thiagy (1979).

$$\mu = \mu_m \frac{s}{s + k_s + s^2/k_i}\left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)$$

Na Tabela 4.13 são apresentados os valores dos rendimentos utilizados para estimar e os parâmetros estimados pelo método de Evolução Diferencial com o tamanho da população (NP) igual a 20, estratégia sete, 300 iterações, taxa de perturbação (F) igual a 0,8 e probabilidade de cruzamento (CR) igual a 0,8.

Tabela 4.13 – Valores dos parâmetros cinéticos na forma dimensional e dados experimentais dos rendimentos para a estimação dos parâmetros.

Rendimentos experimentais utilizados	
$Y_{E/S}$ (g/g)	0,437
$Y_{G/S}$ (g/g)	0,059
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,04
Parâmetros estimados	
μ_{max} (1/h)	0,15
K_S (g/L)	3,31
K_i (g/L)	135,87
P_m (g/L)	84,23

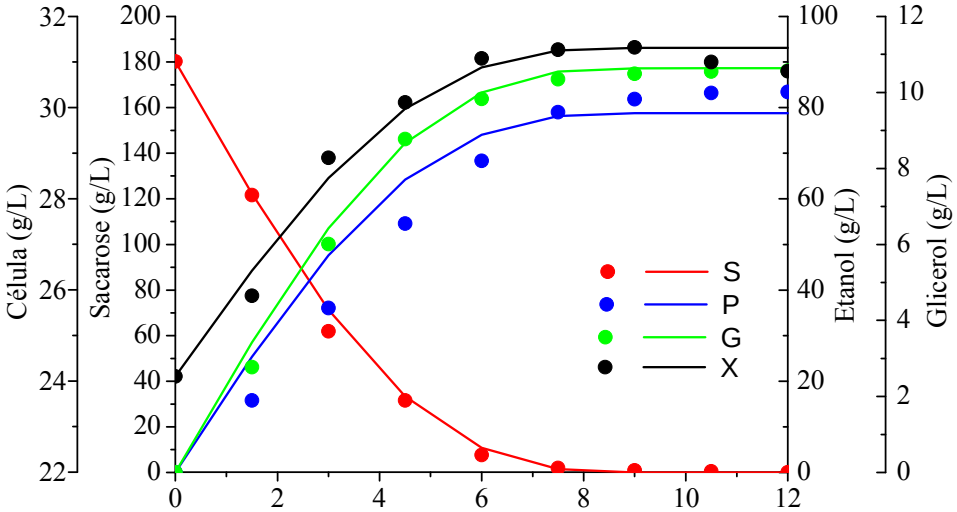


Figura 4.19 – Estudo cinético da fermentação no ponto T=32,5ºC e pH=4 – Estimação segundo modelo proposto por Ghose e Thiagy.

5 – CONCLUSÕES

- Altas temperaturas (T>45ºC) e baixos valores de pH (<2) influenciam negativamente no rendimento e na produtividade de etanol.

- A viabilidade celular é fortemente influenciada pela temperatura e pelo pH e sofre uma influência não tão pronunciada em relação à concentração de sulfito no mosto. Dentro das faixas estudadas, altos valores de pH e baixos valores da temperatura implicam em altas viabilidades.

- O estresse térmico (T>45ºC) foi o fator mais agressivo às células de levedura.

- Os maiores valores da viabilidade celular foram verificados para situações de maior teor de trealose intracelular.

- A trealose acumulada durante o ciclo fermentativo é consumida para proteção celular visando sobrevivência em condições estressantes à levedura.

- A concentração de sulfito em sinergismo com a temperatura e o pH se pronuncia de forma discreta em concentrações de até 345ppm.

- O efeito da concentração de sulfito está intimamente ligado ao pH do meio.

- O efeito isolado da concentração de sulfito (a partir de 345ppm) se pronuncia e promove uma redução na produtividade de etanol e na viabilidade celular.

- Maiores valores da concentração de sulfito no meio implicaram em menor produtividade de etanol quando comparado com o meio sem sulfito.

- Baseando-se na análise da função objetivo, o modelo de Ghose e Thiagy foi o que melhor representou a cinética da fermentação para a condição experimental definida como ótima.

6 – SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

- Investigar o comportamento dos teores de glicerol intracelular e liberado para o meio por leveduras submetidas a condições estressantes em relação à temperatura, pH e concentração de sulfito.

- Acompanhar o teor de glicogênio (carboidrato endógeno de reserva) durante os experimentos para se entender melhor sua função e permitir uma comparação com a trealose, outro carboidrato endógeno ligado ao estresse celular.

- Realizar fermentações que englobem longos períodos de tempo com o objetivo de se acompanhar a fermentação após o consumo total do substrato, visando analisar o comportamento dos carboidratos endógenos e a viabilidade celular.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D. M. G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. (Tese Doutorado). ESALQ. Piracicaba, 199p, 1994.

AMORIM, H. V. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. Piracicaba – SP, Fermentec, 448p, 2005.

ANACLETO, J.; van UDEN, N. Kinectics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulphor dioxide. *Biotech. Bioeng.*, v.34, p. 2477-2486, 1982.

ANDRIETA, S. R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 178p, 1994.

ARANDA et al, Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structured modeling a Department of Bioengineering, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnolog´ıa, Instituto Politécnico Nacional (UPIBI-IPN), Mexico, D.F., Mexico, 2003.

ARRUDA, Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP, Revista Analítica, N° 26, p. 56-62, Janeiro 2007.

ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, R. e MAUGERI FILHO, F.; Fermentação Alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de parâmetros; Livro de Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000.

AUSTON, Empresa de Desenvolvimento de Negócios, Etanol, Estudo do Mercado Interno Produção e Consumo, p. 30, 2008.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. New York: McGraw-Hill Book Company, 984p. (Second Edition), 1986.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.;
BASSO, L. C., Fisiologia e ecologia microbiana, I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.

BASSO, L.C. Fisiologia e ecologia da fermentação alcoólica, I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, 2004.

BASSO, L.C. 1991.In: ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. (Tese Doutorado). ESALQ. Piracicaba, p.199, 1994.

BENEY, L., GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 57, n. 1-2, p. 34-42, 2001.

BEROVIC et al, Influence of Heat Shock on Glycerol Production in Alcohol Fermentation, University of Ljubljana, Ljubljana/Slovenia, 2006.

BEROVIC *et al,* Influence of Heat Shock on Glycerol Production in Alcohol Fermentation, University of Ljubljana, Ljubljana/Slovenia, 2006.

BORGES, P.C.S. Otimização dinâmica da fermentação alcoólica do processo em batelada alimentada. (Dissertação-Mestrado- Faculdade de Engenharia Química, UFU). Uberlândia, 141 p., 2008.

BOULTON, R. B., SINGLETON, V. L., BISSON, L. F., AND KUNKEE, E. R. Principles and practices of winemaking, p. 146–150. Chapman & Hall, New York 1996.

CARR, J.G.; PATRICIA, A.D.; SPARKS, A.H. The toxicity of sulphur dioxide towards certain lactic acid bacteria from fermented apple juice. *J. Appl. Bacteriol.*, v.40, n.2, p. 201-212, 1976.

CARTWRIGHT, C.P.; ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M.H.J. Solute Transport. In: The Yeasts. Ed. ROSE, A.H., Academic Press, London, v.3, p. 5-56, 1989.

CARVALHEIRO, F., ROSEIRO, J. C., GÍRIO, F. M., Food Microbiology, Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*, 16, p. 543-550, 1999.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, p. 205-222. (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.

CHI, Z.; LIU, J.; ZHANG, W., Trehalose accumulation from soluble starch by Saccharomycopsis fibuligera sdu. Enzyme Microb. Tech., 28, 240-245, 2001.

COTTON F. A.; WILKINSON, G. S. Advenced Inorganic Chemistry, 5ª ed., New York, John –Wiley, 1455p, 1988.

CYSEWSKI, G.R. e WILKIE, C.W. Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol. *Biotechnol.* and *Bioeng.* v. 20, p.1421-1430, 1978.

DEDINI, DEDINI S/A Indústrias de Base. www.dedini.com.br, 2006.

DORTA, C. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26) Tese de Doutorado.Rio Claro/SP, Universidade Estadual Paulista, 144p, 2006.

DOURADO, A., GOMA, G., ALBUQUERQUE, U., SEVELY, Y. Modeling and Statistic Optimization of the Ethanol Production in a Cascate Reactor I.Modeling. Biotechnology and Bioengineering, 29, n.2, 187-194, 1987.

ELLIOT, B.; FUTCHER, B. Stress resistence of yeast cells is largely independent of cell cycle phase. Yeast, Chichester, v. 9, n. 1, p. 33-42, Jan. 1993.

ERASMUS, D.J., VAN DER MERWE, G.K. & VAN VUUREN, H.J.J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. FEMS Yeast Res. 3: 2003.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-nduced genes and stress tolerance in budding yeast. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 24, p.469-486, 2000.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. Inc: Schmidell et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquimica. São Paulo: Edgar Blücher, p.223-246 (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: Schmidell et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, 223-246. (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.

FERREIRA, A. A., RIBEIRO, E. J., MURATA, V. V. Simulação da Fermentação Alcoólica de Meios à Base de Glicose por Saccharomyces cerevisiae. Faculdade de Engenharia Química – UFU. Uberlândia/MG, 1998.

FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Yeasts-growth during fermentation. In: FLEET, G. H. (Ed.) Wine microbiology and biotechnology. Switzerland: Harwoord Academic Publisher, chap. 2, 27-54, 1993.

FURTADO, T. A. e SCANDIFFIO, M. G. Álcool no Brasil - Uma longa história. *Scientific American Brasil*, p. 66-71, Outubro, 2006.

GASCH, A. P., SPELLMAN, P. T., KAO, C. M., CAMEL-HAREL, O., EISEN, M. B., STORZ, G., BOLSTEIN, D. Genomic expression programs in response of yeast to environmental changes. Molecular and Cell Biology, 11, 4241-4257, 2001.

GHOSE, T.K., TYAGI, R.D. Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate. II Product and Substrate Inhibition and Optimization of Fermentor Design. Biotechnology and Bioengineering, 21, p. 1401-1420, 1979.

GOMES, E. Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. (Dissertação-Mestrado- Escola Superior de Agricultura " Luiz de Queiroz" USP). Piracicaba, p. 206, 1988.

GUTIERREZ, L. E. Produção de glicerol por linhagens de Saccharomyces durante fermentação alcoólica. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, n.48, p. 55-69, 1991.

GUTIERREZ, L.E. Efeito da adição de sulfito sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, v.45, n.2, p. 359-368, 1988.

HAN, K. & LEVENSPIEL, O., Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition, Biotechnology and Bioengineering 32, pp. 430–437, 1988.

HARADA, K.; HIGUCHI, R.; UTSUMI, I. Studies on sorbic acid, part 4. Inhibition of the respiration in yeast, 1968. In WARTH, A. D. Resistence of yeast species to benzoic and sobic acids and to sulfor dioxide. *J. Food Protect*., v. 48, n. 7, p. 564-569, 1985.

HARRISON, J., S. Yeast production. Progress in industrial microbiology. London, Colchester and Beccles, cap. 4, p. 129-178, 1971.

IMPE VAN, J. F., NICOLAY, B. M. VANROLLEGHM, P. A., SPRIET, J. A., MOOR, B. D., VANDEWALLE, J. Optimal control of the penicillin G. fed-batch fermentation: an analysis of the model of Heijnen et al. Optimal Control Appl. & Methods, 15, p. 13-34, 1994.

JACKSON, R. S. Wine science: principles and applications, p. 186–240. Academic Press, San Diego, 1994.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. *Proc. Biochemist.*, v. 16, p.42-49, 1981.

LAPENAITE, A., RAMANAVICIENE, A., RAMANAVICIUS. Current Trends in Enzymatic Determination of Glycerol, Critical Reviews in Analytical Chemistry, Vol 36, N° 1 p. 13-25, 2006.

LEE, J.H., PAGAN, R.J., ROGERS, P.L. Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using Zimomonas mobilis. Biotechnology and Bioengineering, 25, 659-669, 1983.

LEE, Y., LEE, W. G., CHANG, Y. K., CHANG, H. N. Modelling of Ethanol Production by Saccharomyces cerevisiae from a Glicose and Maltose Mixture. Biotechnology Letters, 17, nº 8, 791-796, 1995.

LEVENSPIEL, O. The Monod Equation: A Revisit and a Generalization to Product Inhibition Situations. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 1671-1687, 1980.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, p.1-43. (Biotecnologia Industrial; v.3), 2001.

LIMA, L.R.; MARCONDES, A. A., Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira. Curitiba: Editora UFPR, 248p, 2002.

LUONG, J. H. T. Kinetics of Ethanol inhibition in Alcohol Fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 280-285, 1985.

LUONG, J. H. T. Generalization of Monod Kinetics for Analysis of Growth Data with Substrate Inhibition. Biotechnology and Bioengineering, 29, 242-248, 1987.

MAFRA, P. H. Sulfitação do caldo de canda-de-açúcar e aspectos ambientais decorrentes, Tese de mestrado. Belo Horizonte/MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 159p, , 2004.

MANSURE J., SOUZA R.C., PANEK A.D. *Trehalose metabolism in Saccharomyces cerevisiae during alcoholic fermentatio*n, Biotechnology Letters, Vol 19, N° 12, pp. 1201–1203, Dezembro 1997.

MATTOS, J. Etanol pode ganhar mais espaço no governo Obama. Jornal da Cana. 22/1/2009 Disponível em http://www.procana.com.br/conteudo/noticia.asp?id_materia=33483. Acesso em 30/01/2009.

McNEIL, B. e HARVEY, L. M. Fermentation – a practical approach. 1st ed. IRL PRESS at Oxford University Press, 1990.

MELO, H. F. Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial Tese de Mestrado, Recife/PE, p. 118, 2006.

MONACO, M. A. S. L. Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras Saccharomyces cerevisiae. Piracicaba, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", p. 64, 2007.

NEVOIGT E. & STAHL U., Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 1997.

OLIVA-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.

OLIVEIRA M. C. S. Avaliação do processo de fermentação alcoólica de suco de maçã obtido por liquefação enzimática. Tese de Mestrado, Univerisdade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

PARAZZI, Jr. O. Metabolismo de Açúcares sem linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase, Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PIPER, P. W. Molecular events associated with the acqusition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 339-355, 1993.

QUEINNEC, I. & DAHHOU, B. Optimization and control of a fedbatch fermentation process. Optimal Control Application Methods. 15 3, pp. 175–191,1994.

SALMON, J.M. *La levedura de fermnetación alcohólica*. In: FLANZY, C. Enología: fundamentos científicos e tecnológicos. Madrid: Mundi-Prensa e AMV, p. 274-315, 2000.

SCHMIDELL, W., FACCIOTTI , M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, p. 179-192. (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.

SEBOLLELA *et al*, Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications in yeast survival and recovery from stress, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

SILVA-FILHO, E., A., SANTOS, S., K., B., RESENTE, A., M., MORAIS, J., O., F., MORAIS JR, M., A., and SIMÕES D., A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting, 88, p. 13-23, 2005.

SINGER A. M., LINDQUIST S. Thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae: the Ying and Yang of trehalose, Tibtech, Vol. 16, p. 460-468, 1998.

SIQUEIRA, M. A. Proposta de Otimização para Destilarias Autônomas. Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos, p. 33-38, 1993.

SUOMALAINEN, H., PRAFFLI, S. Changes in the carbohydrates reserves of baker's yeast during growth ando n standing. Jornal of the Institute of Brewing, v. 67, p. 249-254, 1961.

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 215p, 2001.

STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN J. Metabolic engineering: principles and methodologies, Academic Press, 1998.

STEWART, P.R.. In: Methods in Cell Biology. Academic Press, London and New York, pp.111-147. Thevelein, J. M. (1984), Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiol. Rev., 48, 42-59, 1982.

STORN, R., PRICE, K., LAMPINEN, J. A. Differential Evolution – A Pratical Approach to Global Optimization. Springer. Natural Computing Series, 2005.

STREMEL, D. P. Desenvolvimento de Modelos Estruturados Alternativos para o Processo de Produção de Etanol. 283p, 2001.

THATIPAMALA, R. ROZÈS, N.,POBLET, M. GUILLAMÓN, J. M., MAS, A. Effects of High Product and Substrate Inhibitions on the Kinetics and Biomass and Product Yield during Ethanol Batch Fermentation. Biotecnology and Bioengeneering, 40, p. 289-297, 1992.

THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiol. Rev., 48, 42-59, 1984.

TEIXEIRA, G. Biocombustíveis e Instrumentos Econômicos para a Gestão Ambiental no Brasil - Tese Doutorado em Ciências Biológicas (área de microbiologia aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro–SP, 2006.

TORIJA, M. J., ROZES, N., POBLET, M., GUILLAMON, J.M., MAS, A. Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae.* International Journal of Food Microbiology, 80, p. 47-53, 2003.

TOSETTO, G. M. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de Etanol. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, p. 82, 2002.

VASCONCELOS, J. N., PINTO, V. C., SILVA, R. A. Fermentação Alcoólica Industrial: Modelagem e simulação do Processo Descontínuo Alimentado. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 1992, Salvador-BA. Anais do IX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. São Paulo : ABEQ, 2, p. 403-410, 1992.

VIEGAS, M. C. Otimização de Sistema de Fermentação Alcoólica Contínua Utilizando Reatores Tipo Torre e Leveduras com Características Floculantes. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 135p, 2003.

WALKER, G. M. The roles of magnesium in botechnology. Critical Reviews in Biotechnology, Boca Raton, v. 14, n. 4, p. 311-354, 1994.

WARTH, A. D. Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfor dioxide. *J. Food Protect*. v. 48, n. 7, p. 564-569, 1985.

WIEMKEN, A. Trehalose in yeast, stress protection rather than reserve carbohydrate. *Ant. van Leeuw.*, Amsterdam, v.58, p. 209-217, 1990.

APÊNDICE A

DADOS EXPERIMENTAIS

Apêndice A.1 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 5,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= 0, X2= +1,353, X3= 0)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	179,89	0,00	0,00	22,60
1,5	135,82	16,21	2,54	23,73
3	70,29	39,77	6,24	25,98
4,5	25,93	60,67	8,67	26,97
6	5,37	71,76	9,41	28,13
7,5	0,40	81,01	9,68	27,99
9	0,34	84,08	10,04	27,67
10,5	0,12	85,42	10,15	27,62
12	0,11	86,15	10,25	27,11

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,83

Apêndice A.2 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 25ºC, pH = 5 e Bt = 45 mg/L (X1= -1, X2= +1, X3= -1)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	181,23	0,00	0,00	23,99
1,5	164,74	5,63	0,50	23,40
3	128,15	14,54	2,31	23,97
4,5	91,22	24,35	4,11	24,51
6	68,88	34,79	5,78	25,64
7,5	45,35	47,83	7,31	27,24
9	24,14	57,23	9,39	27,47
10,5	9,32	67,95	10,52	28,37
12	2,44	72,10	10,90	28,46

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,88

Apêndice A.3 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 25ºC, pH = 2 e Bt = 45 mg/L (X1= -1, X2= -1, X3= -1)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	178,18	0,00	0,00	24,83
1,5	160,86	5,86	0,36	23,69
3	129,59	13,07	1,66	24,57
4,5	110,11	19,63	3,65	25,33
6	86,84	27,34	4,69	26,20
7,5	68,58	35,93	5,66	26,73
9	50,46	47,23	6,79	27,67
10,5	40,22	52,79	7,42	28,09
12	27,23	57,18	8,72	28,33

Viabilidade celular ao final de 12h= 0,96

Apêndice A.4 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 3,5 e Bt = 345 mg/L (X1= 0, X2= 0, X3= +1,353)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	179,43	0,00	0,00	24,41
1,5	167,56	2,18	1,299	24,21
3	130,02	12,62	3,000	24,09
4,5	82,27	30,79	4,170	25,48
6	55,43	49,12	6,265	26,50
7,5	23,97	63,39	8,109	27,17
9	5,03	77,83	8,789	27,48
10,5	1,16	79,59	8,989	27,67
12	0,52	80,97	9,026	27,88

Viabilidade ao final de 12h = 0,75

Apêndice A.5 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 45ºC, pH = 5 e Bt = 300 mg/L (X1= +1, X2= +1, X3= +1)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	179,27	0,00	0,00	23,38
1,5	144,90	9,32	2,49	23,43
3	106,62	22,88	5,01	23,44
4,5	86,96	29,64	6,45	23,74
6	64,52	37,87	7,96	24,42
7,5	46,72	45,13	9,26	24,66
9	34,17	54,04	9,75	24,76
10,5	24,60	57,04	9,96	24,15
12	20,38	58,27	10,16	23,76

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,45

Apêndice A.6 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 3,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= 0, X2= 0, X3= 0)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	180,63	0,00	0,00	27,62
1,5	156,66	9,56	1,299	27,35
3	111,69	26,68	3,000	27,55
4,5	55,68	47,03	4,170	28,47
6	27,46	63,05	6,265	29,03
7,5	6,13	72,89	8,109	29,28
9	3,68	83,71	8,989	29,22
10,5	1,45	84,87	9,031	29,00
12	0,14	86,27	9,527	28,89

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,84

Apêndice A.7 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 3,5 e Bt = 0 mg/L (X1= 0, X2= 0, X3= -1,353)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	181,89	0,00	0,00	25,88
1,5	131,50	16,67	2,20	24,61
3	77,87	38,74	5,03	23,62
4,5	38,53	54,87	7,84	24,38
6	11,10	70,01	9,43	24,85
7,5	2,98	81,54	9,97	25,33
9	1,86	85,86	10,49	25,86
10,5	0,75	86,75	10,43	26,44
12	0,11	87,54	10,52	26,97

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,98

Apêndice A.8 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 25ºC, pH = 2 e Bt = 300 mg/L (X1= -1, X2= -1, X3= +1)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	178,86	0,00	0,00	26,98
1,5	174,91	0,68	0,05	26,31
3	173,21	1,19	0,05	26,06
4,5	173,73	1,23	0,05	25,88
6	173,25	1,39	0,05	25,60
7,5	174,02	1,26	0,04	25,43
9	173,98	1,38	0,06	25,13
10,5	174,46	1,34	0,04	25,06
12	174,17	1,49	0,04	25,11

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,35

Apêndice A.9 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 48,5ºC, pH = 3,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= +1,353, X2= 0, X3= 0)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	181,38	0,00	0,00	25,73
1,5	141,83	5,76	0,71	26,65
3	116,57	13,39	2,26	27,53
4,5	97,70	20,22	3,44	25,93
6	82,76	29,95	5,24	25,93
7,5	73,05	35,16	6,85	26,43
9	64,11	36,23	6,99	25,19
10,5	55,95	38,76	6,96	24,41
12	52,46	39,04	7,19	22,74

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,10

Apêndice A.10 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 21,5ºC, pH = 3,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= -1,353, X2= 0, X3= 0)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	183,24	0,00	0,00	25,88
1,5	160,09	2,62	0,13	24,61
3	140,66	8,16	0,58	24,62
4,5	117,13	15,37	1,84	24,58
6	99,42	22,95	3,48	24,55
7,5	89,25	30,21	4,78	25,33
9	70,14	39,35	5,45	26,02
10,5	54,88	48,91	5,87	26,44
12	35,07	59,07	6,20	26,97

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,93

Apêndice A.11 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 3,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= 0, X2= 0, X3= 0)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	182,64	0,00	0,00	25,23
1,5	155,16	11,19	0,70	25,22
3	112,06	29,39	4,24	25,98
4,5	66,61	45,56	7,23	26,54
6	28,75	64,33	9,23	26,66
7,5	7,97	79,78	9,49	26,69
9	3,94	85,20	9,96	26,53
10,5	1,53	86,53	9,72	26,26
12	0,17	87,22	9,90	26,08

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,82

Apêndice A.12 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 45ºC, pH = 5 e Bt = 45 mg/L (X1= +1, X2= +1, X3= -1)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	176,79	0,00	0,00	25,19
1,5	121,62	4,67	5,05	25,05
3	81,29	17,05	7,77	25,61
4,5	54,12	27,70	9,18	26,02
6	35,63	36,05	10,11	26,56
7,5	21,73	48,51	10,44	26,70
9	12,38	58,97	10,60	26,01
10,5	13,22	69,59	10,76	24,58
12	12,25	71,44	10,85	23,80

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,19

Apêndice A.13 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 1,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= 0, X2= -1,353, X3= 0)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	179,32	0,00	0,00	28,74
1,5	173,13	0,54	0,055	26,89
3	169,95	1,14	0,101	26,46
4,5	168,28	1,72	0,127	26,10
6	168,59	2,30	0,153	25,71
7,5	166,32	3,37	0,174	25,56
9	165,77	3,92	0,202	25,77
10,5	163,08	4,89	0,229	26,01
12	163,50	4,76	0,256	26,15

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,30

Apêndice A.14 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 25ºC, pH = 5 e Bt = 300 mg/L (X1= -1, X2= +1, X3= +1)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	177,54	0,00	0,00	24,04
1,5	163,58	4,35	0,40	22,72
3	141,07	13,00	1,95	23,29
4,5	111,82	26,84	4,00	24,33
6	90,23	36,28	6,26	25,50
7,5	66,37	47,03	8,32	26,63
9	35,30	60,97	9,37	27,01
10,5	23,13	64,05	10,10	27,62
12	5,11	67,44	10,40	28,29

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,75

Apêndice A.15 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 45ºC, pH = 2 e Bt = 300 mg/L (X1= +1, X2= -1, X3= +1)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	179,51	0,00	0,00	26,98
1,5	179,45	0,00	0,03	26,51
3	179,27	0,00	0,03	26,26
4,5	179,45	0,00	0,03	25,98
6	179,39	0,00	0,03	25,60
7,5	179,21	0,00	0,03	25,13
9	179,15	0,00	0,03	25,03
10,5	178,94	0,00	0,03	25,14
12	178,12	0,00	0,03	25,11

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,00

Apêndice A.16 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 35ºC, pH = 3,5 e Bt = 172,5 mg/L (X1= 0, X2= 0, X3= 0)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	180,65	0,00	0,00	25,37
1,5	157,67	8,29	0,70	25,56
3	125,44	19,12	2,59	26,21
4,5	65,54	42,27	5,61	26,82
6	24,05	61,66	8,07	27,67
7,5	9,26	74,46	9,02	27,74
9	2,20	83,02	9,27	27,57
10,5	0,46	85,45	9,36	27,36
12	0,09	86,13	9,41	27,11

Viabilidade celular ao final de 12h = 0,88

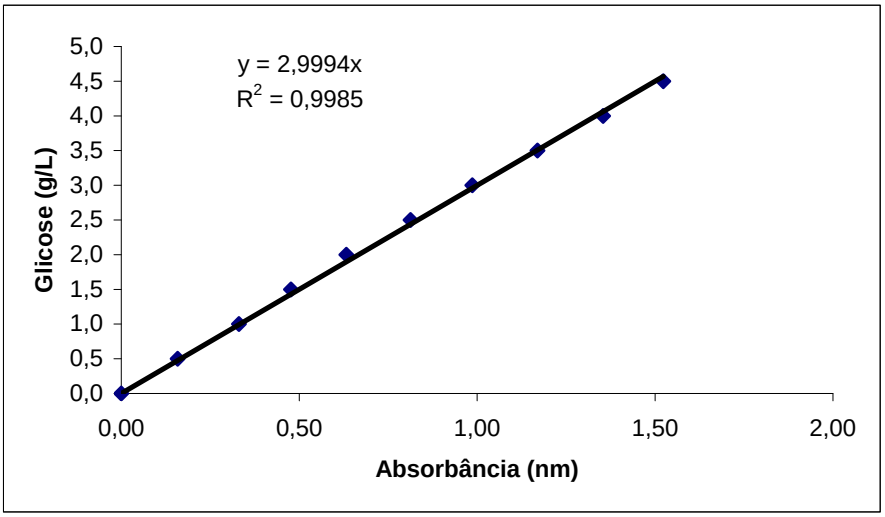
Apêndice A.17 – Resultado do Experimento em batelada na condição: T = 45ºC, pH = 2 e Bt = 45 mg/L (X1= +1, X2= -1, X3= -1)

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Célula (g/L)
0	181,15	0,00	0,00	25,92
1,5	150,04	6,66	1,74	26,17
3	136,45	13,49	3,12	26,15
4,5	115,89	19,41	4,40	26,18
6	100,03	26,42	5,15	25,68
7,5	91,81	30,33	6,47	25,17
9	83,97	36,35	6,58	25,01
10,5	75,22	38,45	7,29	24,53
12	57,55	40,13	7,47	23,76

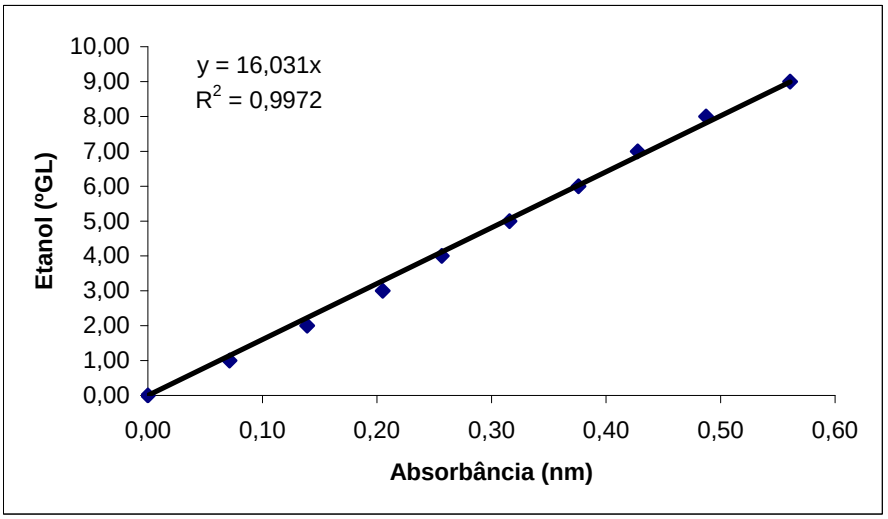
Viabilidade celular ao final de 12h = 0,32

APÊNDICE B
CURVAS DE CALIBRAÇÃO

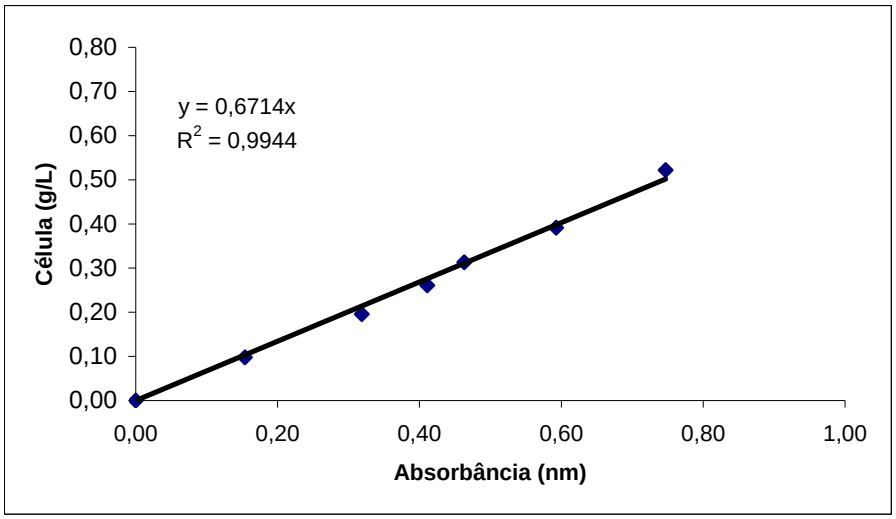
Apêndice B.1 – Curva de calibração relativa à concentração de sacarose.



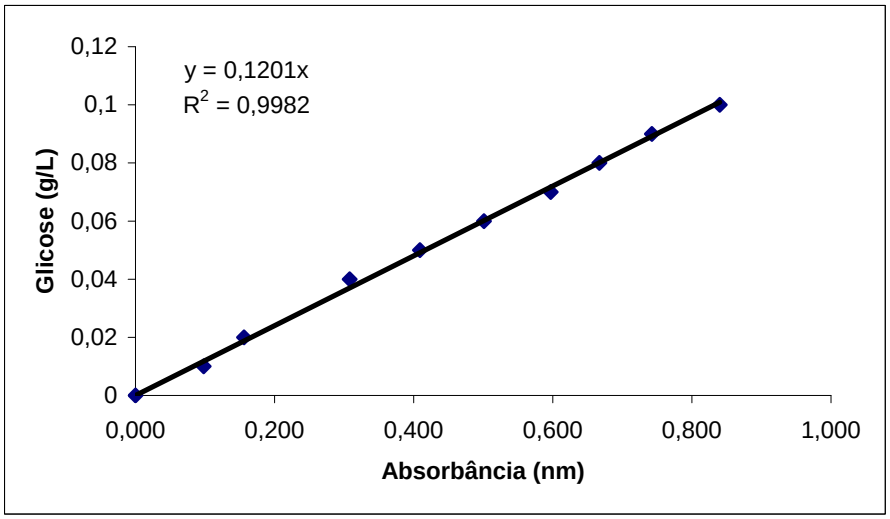
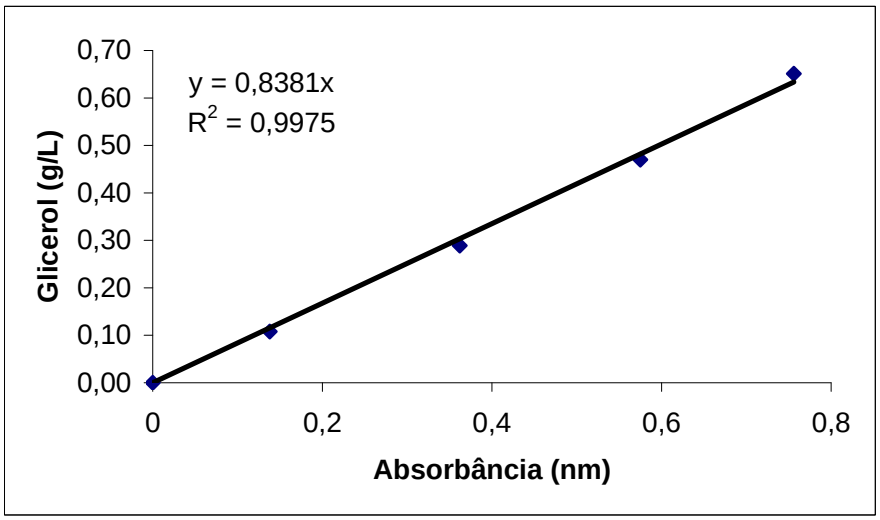
Apêndice B.2 – Curva de calibração relativa à concentração de etanol.



Apêndice B.3 – Curva de calibração relativa à concentração celular.



Apêndice B.4 – Curva de calibração relativa à concentração de trealose.



Apêndice B.5 – Curva de calibração relativa à concentração de glicerol.