LUIGE ARMANDO LLERENA CALDERÓN

"ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO POR *Propionibacterium acidipropionici* UTILIZANDO XAROPE DE CANA-DE-AÇÚCAR"

CAMPINAS
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

LUIGE ARMANDO LLERENA CALDERÓN

"ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO POR *Propionibacterium acidipropionici* UTILIZANDO XAROPE DE CANA-DE-AÇÚCAR"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Luige Armando Llerena Calderon
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C127e

Calderón, Luige Armando Llerena, 1986-
Estudo de otimização das condições da fermentação para produção de ácido propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* utilizando xarope de cana-de-açúcar / Luige Armando Llerena Calderón. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Otimização. 2. Fermentação. 3. Ácido propiônico. 4. *Propionionibacterium*. 5. Cana-de-açúcar. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Optimization study of fermentation conditions for propionic acid production with *Propionibacterium acidipropionici* using sugarcane syrup
Palavras-chave em Inglês:
Optimization
Fermentation
Propionic acid
Propionibacterium
Sugarcane
Área de concentração: Bioquímica
Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular
Banca examinadora:
Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]
Luiz Carlos Basso
Francisco Maugeri Filho
Data da defesa: 31-07-2012
Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 31 de Julho de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso

Assinatura

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Jose Samenho Moran

Assinatura

Prof. Dr. Carmen Verissima Ferreira Halder

Assinatura

Dedicado à Martin e Rosa, as pessoas mais importantes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos dadas.

Aos meus pais, Martin e Rosa, pelo amor, carinho e apoio incondicional apesar da distância.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gonçalo pela oportunidade, confiança, ensinamentos, não apenas científicos e profissionais como também pessoais.

Ao Prof. Dr. Francisco, por permitir iniciar meus trabalhos no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e à Profa. Dra. Isabel pela ajuda nos delineamentos experimentais.

Aos meus amigos e colegas de bancada Ane, Carol, Lucas e André pelos conselhos, conversas e a valiosa ajuda no desenvolvimento deste trabalho. A Ane pela paciência, ensinamentos e correções na escrita de meus relatórios e desta dissertação.

À todo o grupo do laboratório de Genômica e Expressão, especialmente aos meus grandes amigos, Paulo e Osmar, pelos conselhos, longas conversas e grandes momentos. Aos meus amigos Maria, Leandro, Inês, Pedro e Mauricio.

À todo o grupo do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, especialmente a Cristiane, Susan, Suzana, Remi e Fifa pela amizade e os inesquecíveis momentos de alegria e descontração. Ao Geraldo por ter me ensinado a trabalhar com os fermentadores e ao Remi pelo treinamento no HPLC.

À Eliane, Silvia e Mariana pela grande disposição em ajudar nos mais diversos assuntos.

À BRASKEM, pelo apoio financeiro; ao diretor de Competitividade e Inovação da Divisão de Polímeros da Braskem, Antônio Morschbacker, pelo apoio e discussões sobre este trabalho. Ao Luiz Claudio e à Johana pelos conselhos e apoio.

À FAPESP pelo apoio financeiro em conjunto com a BRASKEM.

RESUMO

O ácido propiônico possui grande importância para a economia devido às suas diversas aplicações nas indústrias química e alimentícia. Atualmente, ele é produzido a partir de derivados do petróleo, mas as atuais preocupações ambientais relacionadas às emissões de carbono provenientes de fontes fósseis tornam a sua produção por rotas biológicas e fontes renováveis um processo cada vez mais atraente. O ácido propiônico também pode ser produzido a partir do metabolismo heterofermentativo da *Propionibacterium acidipropionici.* Embora existam diversos estudos que visem a otimização do processo de produção de ácido propiônico por rotas biológicas, ainda não existe nenhum processo eficiente que possa ser escalonado a um nível industrial. Consequentemente, o foco deste trabalho está no uso de ferramentas de planejamento experimental para a produção de ácido propiônico a partir de xarope de cana-de-açúcar (caldo de cana-de-açúcar concentrado), levando-se em conta três respostas de extrema importância para este bioprocesso: rendimento, produtividade volumétrica e a resposta de menor formação de ácido succínico (RMS). Na primeira parte do trabalho foram realizados a adequação de um método cromatográfico para a quantificação dos açúcares presentes no xarope de cana-de-açúcar, a identificação da linhagem *P. acidipropionici ATTC 4875* como a mais adequada para a produção de ácido propiônico e o estudo do papel do extrato de levedura como fonte de nitrogênio para o meio de cultura. Utilizando-se o delineamento experimental Plackett & Burman, foram estudados 8 fatores com o objetivo de avaliar a sua importância no processo. Dos 8 fatores, três (temperatura, concentração de extrato de levedura e concentração de xarope de cana-de-açúcar) foram selecionados por apresentarem influência significativa no processo de produção de ácido propiônico. Em uma segunda etapa, utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR), foram determinados os valores ótimos desses fatores como sendo 35 ^{o}C de temperatura, 22 g/L de extrato de levedura e 54 g/L de concentração de xarope de cana-de-açúcar. Com estas condições, obteve-se um rendimento de 47% (m/m), uma produtividade volumétrica de 0,89 g/L.h e uma RMS de 94%. Estes resultados significaram um

incremento de 5%, 196% e 8% no rendimento, na produtividade volumétrica e na RMS, respectivamente, quando comparados à condição de cultivo inicial.

ABSTRACT

Propionic acid is of great importance for economy because of its variety of applications in the chemical and food industries. It is currently produced from petroleum , but due to environmental concerns related to carbon emissions from fossil fuels the production based on renewable biological routes is becoming more attractive. Propionic acid can be produced through the heterofermentative metabolism of *Propionibacterium acidipropionici*. Despite the existence of several studies aimed at optimization of propionic acid production through biological routes, no efficient process that can be scaled up to an industrial level has been developed yet. Consequently, the goal of this project is the use of chemometric tools for the production of propionic acid from sugar cane syrup (concentrated sugar cane juice), taking into account three responses of extreme importance to an industry level process: yield, volumetric productivity and the response of lowest succinic acid formation (RMS). The first steps were the adaptation of a chromatography method for the quantification of sugars present in sugar cane syrup, the identification of strain *P. acidipropionici* ATCC 4875 as the most suitable organism for propionic acid production and the role of yeast extract as a nitrogen source in the culture medium. Using the experimental design method, developed by Plackett and Burman, 8 factors were evaluated to assess their importance in the process. Three of these eight factors (temperature, yeast extract concentration and sugar cane syrup concentration) were selected because of their significant influence on propionic acid production. In a second step, central composite design (CCD) was used to determine the optimum values of these factors, being 35°C for temperature, 22 g/L of yeast extract and 54 g/L of sugar cane syrup. Under these conditions, a yield of 47% (w/w), a volumetric productivity of 0.89 g/L.h and a RSM of 94% were obtained. These results represented an increase of 5%, 196% and 8% in yield, volumetric productivity and RMS, respectively, compared to the initial culture condition.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS v
RESUMO vi
ABSTRACT viii
1. Introdução 1
2. Revisão bibliográfica 2
2.1. Ácido Propiônico 2
2.2. Micro-organismo 4
2.2.1. Metabolismo do *P. acidipropionici:* fontes de carbono e implicações no desempenho produtivo 6
2.2.2. Metabolismo de Propionibacteria na presença de oxigênio 9
2.3. Processo Fermentativo 10
2.4. Considerações sobre o meio e condições de cultivo. 12
2.5. Caldo de cana-de-açúcar como substrato 15
2.5.1. Cana-de-açúcar 15
2.5.2. Caldo de cana-de-açúcar como substrato fundamental do meio de cultura 15
2.6. Otimização e planejamento experimental multivariado 17
2.6.1. Metodologia Plackett & Burman (Plackett and Burman, 1946) 18
2.6.2. Delineamento composto central (DCC) 18
2.6.3. Metodologia de superfície de resposta (RSM) 18
3. Objetivos 19
4. Materiais e métodos 19
4.1. Equipamentos 19
4.2. Reagentes e soluções 20
4.3. Preparação da matéria-prima 20
4.3.1. Caldo de cana-de-açúcar 20
4.3.2. Xarope de cana-de-açúcar 21
4.4. Meios de cultura e soluções. 21
4.4.1. Meio de conservação 21
4.4.2. Meio de crioconservação 21
4.4.3. Soluções de micronutrientes 22
4.5. Micro-organismos 22
4.6. Seleção de linhagens de *Propionibacterium acidipropionici* 22

4.6.1. Meio de cultura.....22

4.6.2. Reativação e preparação do inóculo.....22

4.6.3. Cultivo no biorreator 22

4.7. Análise comparativa entre os meios de cultura contendo extrato de levedura e peptona como fontes de nitrogênio.....23

4.7.1. Meio de cultura.....23

4.8. Preparação e adequação do método de quantificação do xarope e do caldo de cana-de-açúcar para utilização nos delineamentos experimentais 24

4.9. Delineamento experimental Plackett & Burman (PB).....25

4.9.1. Reativação e pre-inóculo.....28

4.9.2. Preparação do inóculo.....29

4.9.3. Cultura no biorreator.....30

4.10. Realização do delineamento central composto rotacional (DCCR): 31

4.12. Quantificação dos produtos da fermentação.....35

4.13. Cálculo das respostas (parâmetros de desempenho fermentativo) nos delineamentos experimentais multivariados......36

4.14. Análise estatística......38

5. Resultados e discussão 38

5.1. Adequação de um método para quantificação dos açúcares no xarope e no caldo de cana-de-açúcar 38

5.2. Seleção de linhagens de *Propionibacterium acidipropionici* 44

5.3. Análise comparativa de meio de cultura contendo extrato de levedura e peptona como fontes de nitrogênio.....50

5.4. Seleção de fatores que influenciam o processo de produção de ácido propiônico. Planejamento Experimental Plackett & Burman (PB).....56

5.4.1. Análise da reprodutibilidade 57

5.4.2. Análise do delineamento experimental PB.....59

5.4.2.1. Análise: resposta rendimento 62

5.4.2.2. Análise: resposta produtividade volumétrica 62

5.4.2.3. Análise: resposta de menor produção de ácido succínico (RMS) 64

5.4.3. Análise global e fatores para o próximo delineamento experimental.....65

5.5. Estudo de otimização para a produção de ácido propiônico. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 66

5.5.1. Análise da reprodutibilidade 67

5.5.2. Análise do delineamento composto central rotacional (DCCR) 69

5.5.2.1. Análise: resposta rendimento 69

5.5.2.2. Análise: resposta produtividade volumétrica 73

5.5.2.3. Análise: resposta menor produção de ácido succínico (RMS) 76

5.5.2.4. Análise: rendimento em biomassa 80

5.5.3. Análise global e validação 82

5.6. Avaliação do perfil de *P. acidipropionici* em condições aeróbias 86

6. Conclusões **93**

7. Perspectivas para trabalhos futuros **95**

8. Referências bibliográficas **96**

9. Anexos **101**

1. Introdução

O ácido propiônico, um composto alifático, monocarboxílico incolor e corrosivo, tem uma significativa importância econômica devido às suas diversas aplicações na indústria. Na indústria química, o ácido é largamente empregado na produção de fármacos, agroquímicos, agentes antifúngicos, plásticos, corantes, flavorizantes artificiais e odoríficos. Sais, como o propionato de sódio, são também bastante utilizados na conservação de alimentos e rações animais. Como consequência das diversas aplicações industriais, a demanda mundial de ácido propiônico no ano de 2010 foi estimada em 293 mil toneladas, representando um mercado de aproximadamente 530 milhões de dólares com uma expectativa de crescimento de 3,9% até 2014 (Bizzari and Gubler, 2010).

Atualmente o ácido propiônico é produzido industrialmente a partir de derivados petroquímicos, como por exemplo, propeno, propanol e propionaldeído (Boyaval and Corre, 1995). No entanto, devido a questões ambientais e flutuações no preço do petróleo, diversos estudos estão sendo desenvolvidos visando a substituição das matrizes energéticas e compostos derivados que dependem desta fonte fóssil. Neste contexto, procedimentos que envolvem a utilização de fontes renováveis de carbono em processos fermentativos para a produção de monômeros biológicos, como o ácido propiônico, tornam-se cada vez mais atraentes.

Diversos micro-organismos são capazes de produzir o ácido propiônico, porém, as bactérias do gênero *Propionibacterium* têm sido mais estudadas pela sua capacidade diferenciada de produzir este composto. Uma característica desejável deste gênero é a capacidade de consumir diversos substratos como glicose, lactose, frutose, xilose, sacarose, entre outros.

O caldo de cana-de-açúcar, principal substrato para a produção de etanol no Brasil, apresenta-se como uma importante matriz na formulação de um meio de cultura industrial pela sua abundancia em açúcares e sais minerais. O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar, tendo processado, na safra 2010/2011, 620 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (UNICA, 2012). Logo, visando desenvolver um processo que se ajuste à realidade brasileira, a redução

dos custos de produção e a obtenção de um processo autossustentável, o caldo de cana-de-açúcar e seus derivados surgem como uma importante opção para serem utilizados como base fundamental do meio de cultura no processo de produção de ácido propiônico.

Entretanto, a fermentação propiônica apresenta algumas dificuldades que afetam significativamente o seu processo. Parâmetros relacionados ao desempenho fermentativo, como a produtividade e o rendimento, ainda não são considerados satisfatórios para sustentar o escalonamento para um nível industrial. Aliado a isto, a via fermentativa possui um alto custo de produção (1,5 – 2 USD/kg) (Liu et al., 2012), quando comparado aos custos dos processos químicos (0,15 USD/kg) (Eastman, 2012), tornando impossível a sua competição no mercado e inviabilizando economicamente este bioprocesso.

Consequentemente, diversas pesquisas têm sido realizadas visando a produção de ácido propiônico com maior eficiência por bactérias do gênero *Propionibacterium,* utilizando uma variedade de substratos, diferentes condições fermentativas e modos de cultivo. No entanto, apesar de existirem inúmeros estudos buscando o incremento do desempenho fermentativo, surgem algumas perguntas sem respostas na literatura: Qual é a melhor linhagem para a produção de ácido propiônico? Quais são as condições de cultivo e qual o meio de cultura mais adequado para produzir ácido propiônico? Neste contexto, este trabalho foi focado na avaliação de linhagens e principalmente no estudo e otimização das condições de cultivo e do meio de cultura para a produção fermentativa do ácido propiônico por *Propionibacterium acidipropionici.* Para isto, foi utilizado xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Além disso, foi avaliado o perfil produtivo de *P. acidipropionici* na presença de oxigênio visando aprofundar o conhecimento do metabolismo do micro-organismo.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Ácido Propiônico

O ácido propiônico ou ácido propanóico, cuja formula química é CH_3CH_2COOH, é um ácido orgânico de cadeia alifática, monocarboxílico, incolor

(em estado puro), corrosivo, com um odor pungente e solúvel em água e em etanol.

O ácido propiônico é considerado quimicamente como um ácido fraco (pKa=4,85) tendo a capacidade de inibir o crescimento de diversos micro-organismos. Essa inibição é causada pela dissociação da molécula do ácido no citoplasma da célula, liberando um próton e diminuindo o pH. A acidificação do citoplasma pode deter o crescimento celular por inibição da glicólise, por impedimento do transporte ativo ou por interferência com a transdução de sinal celular. (Lambert and Stratford, 1999). Assim, o ácido propiônico é utilizado na indústria alimentícia como conservante para queijos ou para produtos de panificação. A utilização do ácido propiônico como conservante alimentício teve sua importância elevada quando a agência americana "Food and Drug Administration" (FDA) listou os sais do propionato de sódio, potássio e cálcio como aditivos "Geralmente Reconhecidos como Seguros" (GRAS) e sem limites superiores exceto para queijos e pão (0.30 - 0.38%) (Boyaval and Corre, 1995).

Na indústria química o ácido propiônico é utilizado na manufatura de fármacos, antifúngicos, agroquímicos, plásticos, gomas químicas, corantes, flavorizantes artificiais e em produtos de perfumaria (Suwannakham and Yang, 2005). A demanda mundial de ácido propiônico no ano de 2010 foi estimada em 293 mil toneladas, representando um mercado de aproximadamente 530 milhões de dólares com uma expectativa de crescimento de 3,9% para o ano 2014 (Bizzari and Gubler, 2010).

O ácido propiônico é produzido industrialmente por síntese química. Na síntese química, o ácido propiônico é produzido por diversas vias: pelo processo Rippe que utiliza etileno, dióxido de carbono e vapor; pela oxidação direta de hidrocarbonetos (Boyaval and Corre, 1995) e pela oxidação do propanol e do propanal. O ácido propiônico pode ser também produzido por via biológicas, como por exemplo, por bactérias do gênero *Propionibacterium*. As fontes de carbono podem ser convertidas pela bactéria a ácido propiônico, como parte do metabolismo energético dela. Esta conversão utiliza a via dos ácidos dicarboxílicos, sendo o ácido propiônico o produto principal dentro de um

metabolismo heterofermentativo, onde também, podem ser produzidos o ácido acético, o ácido succínico e o n-propanol.

2.2. Micro-organismo

As bactérias produtoras de ácido propiônico pertencem à classe Actinobacteria e ao gênero *Propionibacterium*. Em geral são micro-organismos gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, pleomórficos, sem capacidade de mobilidade e majoritariamente encontrados na forma de bastões curvados (Vorobjeva, 1999). O gênero *Propionibacterium* pode ser dividido em dois grandes grupos, de acordo com seu habitat: propionibactérias cutâneas e clássicas. As primeiras são, em geral, patogênicas e encontradas principalmente na pele humana. Já as segundas são espécies não patogênicas isoladas do queijo, leite, solos e esgotos. As propionibactérias clássicas têm sido largamente utilizadas para a produção de queijo suíço (Piveteau, 1999), de vitamina B12 (Gardner and Champagne, 2005; Ye et al., 1996a) e de ácido propiônico (Barbirato et al., 1997; Boyaval and Corre, 1987; Martínez-Campo and De La Torre, 2002; Quesada-Chanto et al., 1994b; Suwannakham and Yang, 2005; Zhang and Yang, 2009a) sendo este último o produto mais estudado. A *P. acidipropionici* (Barbirato et al., 1997; Coral et al., 2008; Suwannakham and Yang, 2005), *P. shermanii* (Anderson et al., 1986; Colomban et al., 1993), *P. freudenreichii* (Balamurugan et al., 1999), e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (Himmi et al., 2000) são bactérias amplamente estudas para a produção de ácido propiônico. No entanto, a *P. acidipropionici* é apontada como a espécie mais promissora para o desenvolvimento da produção industrial deste ácido (Colomban et al., 1993).

Em condições anaeróbias *a P. acidipropionici* produz, como produto principal, o ácido propiônico pela via dos ácidos dicarboxílicos, e como subprodutos o ácido acético, o succínico e o propanol. Uma visão geral do metabolismo de *P. acidipropionici* pode ser observada na Figura 1.

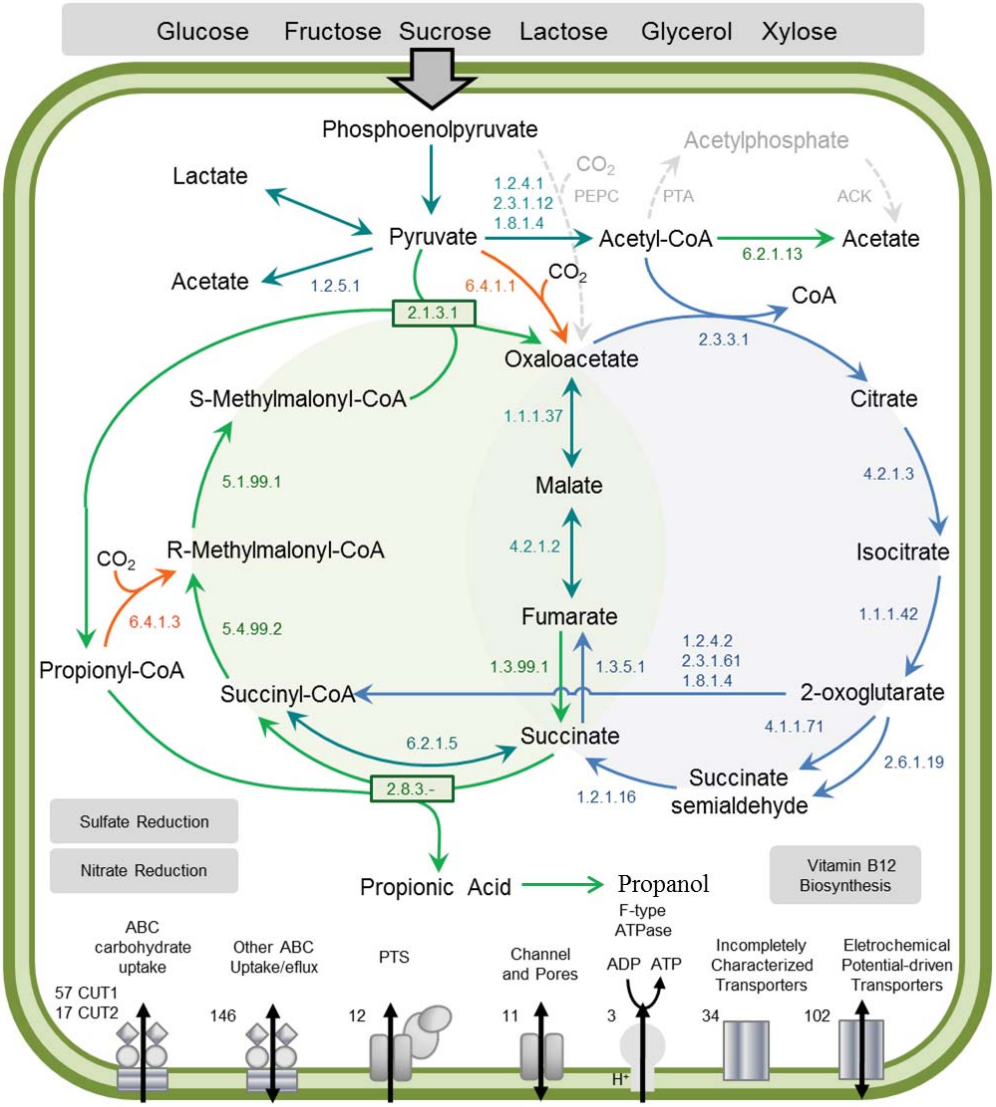

Figura 1. Metabolismo de *P. acidipropionici 4875.* As setas verdes representam as reações do metabolismo fermentativo (anaerobiose). As setas azuis representam o metabolismo respiratório (aerobiose em meio liquido). As setas pontilhadas representam reações ausentes segundo o genoma de *P. acidipropionici* 4875. As setas laranja representam reações putativas para a fixação de CO_2 (Parizzi et al., 2012. Artigo submetido)

A P. acidipropionici apresenta características importantes, como a versatilidade no consumo de fontes de carbono. Dentre estas fontes, tem sido reportado crescimento em glicose (Suwannakham and Yang, 2005), glicerol (Barbirato et al., 1997), lactose (Goswami and Srivastava, 2001), sacarose, (Quesada-Chanto et al., 1994a) lactato (Gu et al., 1998) e melaço (Coral et al.,

2008; Quesada-Chanto et al., 1994a). Devido a esta característica metabólica da *P. acidipropionici* é possível estabelecer o uso de substratos com baixo custo que ofereçam altos rendimentos na produção de metabolitos de interesse.

Entretanto, a utilização da *P. acidipropionici* na produção de ácido propiônico também apresenta algumas dificuldades relacionadas principalmente à baixa produtividade e ao baixo rendimento fermentativo. Outro problema é o perfil de produção heterofermentativo da *P. acidipropionici*. Dependendo do substrato, a bactéria apresenta diferentes rendimentos de produto de ácido propiônico e de seus subprodutos como o ácido acético, ácido succínico e propanol. Estes subprodutos, dada a sua natureza semelhante ao ácido propiônico podem dificultar e encarecer o *"downstream"* (separação e purificação do produto) do processo fermentativo industrial.

2.2.1. Metabolismo do *P. acidipropionici:* fontes de carbono e implicações no desempenho produtivo

De acordo com as fontes de carbono, a *P. acidipropionici,* pode apresentar diferenças no perfil produtivo da fermentação, como por exemplo, a diferença encontrada quando se utiliza glicerol ou glicose.

- **Metabolismo de Glicerol**: O glicerol é um dos substratos mais bem estudados na literatura para a produção de ácido propiônico. Além das vantagens referentes à disponibilidade do glicerol em grandes quantidades e com baixo custo como subproduto do biodiesel (Zhang and Yang, 2009b), a utilização deste substrato como fonte de carbono favorece o rendimento em ácido propiônico. O rendimento teórico do ácido propiônico a partir de glicerol é dado pela equação 1 (Liu et al., 2011):

$$1\ C_3H_8O_3 \rightarrow 1\ CH_3CH_2COOH\ +\ 1\ H_2O + 2\ \mathrm{ATP} \quad (1)$$

A partir da equação 1 podemos deduzir que a partir de glicerol podemos obter um rendimento teórico (m/m) de 80,4% de ácido propiônico.

Experimentalmente, esse rendimento é inferior, devido à utilização de parte do carbono disponível para a formação de biomassa e outros subprodutos.

Uma fermentação típica com glicerol (20 g/L) em batelada alimentada utilizando *P. acidipropionici* ATCC 25562 pode apresentar um rendimento em massa de ácido propiônico de 67% (0,84 mol/mol), 0.015% (0.023 mol/mol) de ácido acético, 0,064% (0,05 mol/mol) de ácido succínico e 0,023% (0,036 mol/mol) de propanol (Barbirato et al., 1997). Metabolicamente este perfil de produção pode ser explicado pelo balanço redox intracelular dos cofatores NAD^+/NADH. O glicerol, para ser convertido em piruvato, gera 2 mols de NADH. Esse piruvato é então convertido em propionato regenerando 2 mols de NAD^+ mantendo o balanço redox. Porém, é necessário desviar o carbono para o crescimento celular, mas a conversão de piruvato em biomassa consome apenas 1,44 mols de NADH ocasionando um desbalanço redox dos cofatores. Por esta razão o glicerol é majoritariamente desviado para a produção de ácido propiônico, porém com uma baixa taxa de crescimento celular (Zhang and Yang, 2009b). Como alternativa metabólica para restabelecer o equilíbrio redox, o micro-organismo, transforma o ácido propiônico em propanol já que esta reação consome NADH. A produção de ácido acético poderia ser explicada porque a conversão de piruvato a acetato gera 1 mol de ATP, favorecendo assim a obtenção de energia para o crescimento celular, como mostrado na Figura 2.

Em resumo, a utilização de glicerol como fonte de carbono favorece a formação de ácido propiônico, uma vez que menos carbono é utilizado para a formação dos subprodutos, os quais são produzidos com baixos rendimentos.

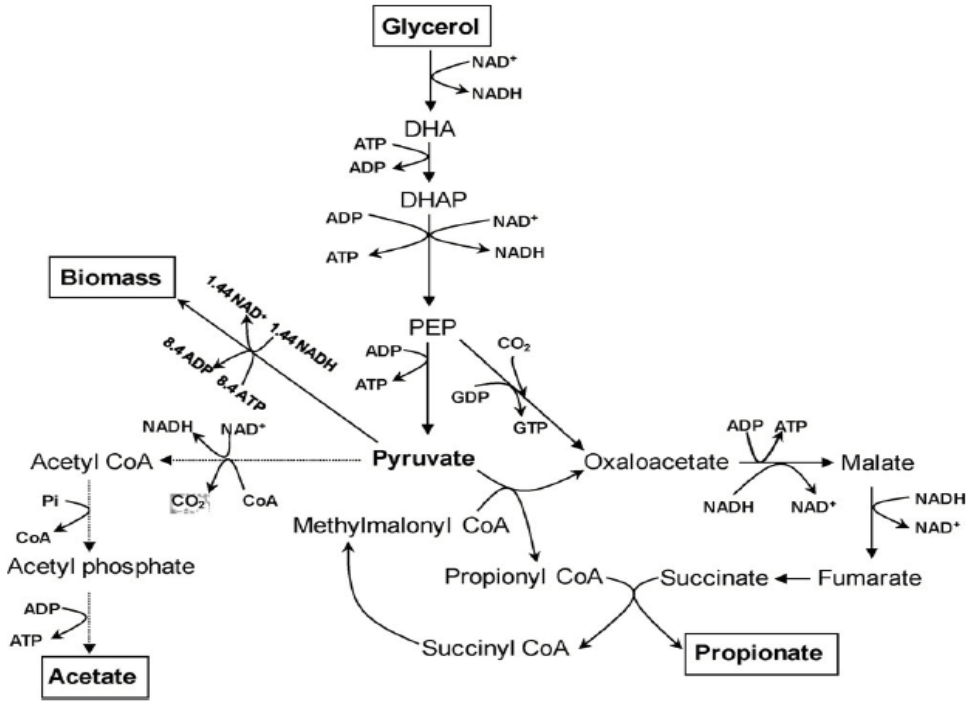

Figura 2. Via dos ácidos dicarboxílicos na *Propionibacterium acidipropionici* para a produção de ácido propiônico (Zhang and Yang, 2009b).

- **Metabolismo de Glicose**: A produção de ácido propiônico utilizando glicose como fonte de carbono tem sido também bastante estudada. A base do entendimento do metabolismo dos micro-organismos é sempre ou majoritariamente a partir do consumo de glicose. O rendimento teórico do ácido propiônico a partir de glicose é dado pela equação 2 (Liu et al., 2011):

$$1{,}5\ C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3CH_2COOH + 1\ CH_3COOH + 1\ CO_2 + 1\ H_2O + 6\ ATP \quad (2)$$

De acordo com a equação 2, a partir de glicose pode-se obter um rendimento teórico (m/m) de 54,8% de ácido propiônico, 22% de ácido acético e 17% para CO_2. Experimentalmente estes valores são inferiores devido à utilização de parte do carbono para formação de biomassa e outros subprodutos.

Uma fermentação típica com glicose (20 g/L) em batelada simples utilizando *P. acidipropionici* ATCC 25562 pode apresentar um rendimento em massa de ácido propiônico de 44% (1,1 mol/mol), 21% (0.63 mol/mol) de ácido

acético e 2,1% (0,03 mol/mol) de succinato (Himmi et al., 2000). Para este caso a formação de acetato pode ser metabolicamente explicada pelo balanço redox intracelular dos cofatores NAD^+/NADH. A glicose, ao ser convertida em 2 mols de piruvato, gera 2 mols de NADH. Um mol de piruvato é então convertido a propionato regenerando 2 mols de NAD^+. No entanto, o outro mol de piruvato é convertido a acetato, para formar ATP e principalmente gerar 1 mol de NADH. Desta forma, o terceiro mol de glicose será completamente convertido em propionato mantendo o equilíbrio redox (Liu et al., 2011). Em resumo, quando se utiliza glicose o rendimento é menor ao obtido com glicerol, pois parte do carbono é desviado para a formação de acetato e consequentemente CO_2, como descrito na Figura 2. É importante ressaltar que a equação 2, assim como a relação dos produtos tanto teóricos como experimentais, podem ser aplicadas para outras fontes de carbono que seguem a mesma rota metabólica como por exemplo a sacarose ou a lactose após quebra da respectiva ligação glicosídica.

Outro ponto importante são as razões molares de ácido propiônico e ácido ácetico (P:A) e ácido propiônico e ácido succínico (P:S). A razão molar P:A com a utilização de glicerol como fonte de carbono pode ser de 36:1, entretanto com a glicose podem ser de 1,76:1 (experimental) ou 2:1 (teórico). A razão de P:S molar para glicerol pode ser de 17:1 enquanto que para glicose pode ser de 37:1. Experimentalmente, principalmente quando se trabalha em concentrações maiores de glicose, glicerol e outras fontes de carbono, existem variações nos perfis produtivos, nas razões molares e nos parâmetros de desempenho devido a outras causas como inibição pelo produto e variações no meio de cultura.

2.2.2. Metabolismo de Propionibacteria na presença de oxigênio

As espécies de *Propionibacterium* são conhecidas por crescerem em condições anaeróbicas e utilizarem glicose como substrato. O crescimento celular é acompanhado pela produção de ácido propiônico, ácido acético e dióxido de carbono (Ye et al., 1999). No entanto, também é reportado que espécies de *Propionibacterium* podem crescer na presença de oxigênio em meio liquido, mudando o perfil de produção dos ácidos orgânicos e inclusive potencializando o

crescimento celular (De Vries et al., 1972). Em um trabalho com o objetivo de avaliar o comportamento de *P. freudenrichii* em culturas com aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), houve acumulação de ácido pirúvico e não foi observada a produção de ácido propiônico, ácido acético e nem de ácido succínico (De Vries et al., 1972). Em outro reporte, procurando aumentar a produção de cobalamina (vitamina B12), composto produzido por *P. freudenrichii,* foram realizados cultivos em dois estágios, um anaeróbio, produzindo ácido propiônico e ácido acético (principalmente) e um segundo estágio aeróbio para aumentar a produção de vitamina B12. No estágio aeróbio interrompeu-se a produção e iniciou-se o consumo de ácido propiônico. Por outro lado, a produção de ácido acético foi constante (Quesada-Chanto et al., 1994b). Em outros trabalhos usando *P. shermanii* em culturas com altos níveis de oxigênio dissolvido (24 mmol O_2/L.h), foi produzido ácido acético como principal produto, e também foi observada a presença de ácido láctico (Quesada-Chanto et al., 1998). Estes reportes mostram a capacidade de espécies de *Propionibacterium* de crescer e mudar o seu perfil produtivo em condições de aerobiose.

2.3. Processo Fermentativo

Ao longo dos anos tem-se buscado melhorar os parâmetros de desempenho produtivo para ácido propiônico utilizando-se diversas fontes de substrato. A Tabela 1 apresenta um resumo dos principais estudos focados na produção de ácido propiônico utilizando glicose, melaço, lactato e sacarose como fonte de carbono.

Tabela 1: Resumo dos principais estudos realizados visando a produção de ácido propiônico utilizando diversas fontes de carbono.

Linhagem	Modo de cultivo	Fonte de carbono	Rendimento % (m/m)	Produtividade volumétrica (g/Lh)	Referência
P. acidipropionici P9	Batelada	Glicose	35	0,39	(Woskow and Glatz, 1991)
P. acidipropionici ATCC4875	Batelada	Glicose	45	0,24	(Himmi et al., 2000)
P. acidipropionici ATCC 25562	Batelada	Glicose	59	0,171	(Barbirato et al., 1997)
P. acidipropionici ATCC 4875 ACK-Tet*	Batelada alimentada – Imobilizada	Glicose	53	0,41 (10)	(Zhang and Yang, 2009a)
P. acidipropionici ATCC 25562	Batelada alimentada	Glicose/Glicerol	57	0,152	(Liu et al., 2011)
P. acidipropionici ATCC 4965	Batelada	Melaço de cana-de-açúcar	46	0,062	(Coral et al., 2008)
P. acidipropionici ATCC 4875	Batelada alimentada e imobilizada	Hidrolisado de alcachofra	43	1,55	(Liang et al., 2012)
P. acidipropionici ATCC 25562	Continua	Lactato	40,5	0,9	(Goswami and Srivastava, 2001)
P. acidipropionici DSM 8250	Continua	Sacarose	0,36-0,45	3	(Quesada-Chanto et al., 1994b)

* linhagem modificada geneticamente. Deleção do gene ACK (ver Figura 1).

Como pode ser observado na Tabela 1, os rendimentos de ácido propiônico utilizando fontes de carbono como glicose, lactose, sacarose ou misturas de açúcares como o melaço de cana-de-açúcar variam entre 35% e 59 % (m/m).

Por outro lado as produtividades variam entre 0,17 e 3 g/L.h. Pode ser observado que cultivos tipo contínuo e com células imobilizadas melhoram consideravelmente a produtividade. Em fermentações tipo batelada simples as produtividades volumétricas obtidas variam entre 0,062 e 0,39 g/L.h.

2.4. Considerações sobre o meio e condições de cultivo.

O desenvolvimento de um meio de cultura para um micro-organismo depende do objetivo do bioprocesso. Um meio de cultura pode ser desenvolvido, por exemplo, para a produção de biomassa. Neste caso o meio de cultura deve conter os nutrientes que maximizem o crescimento celular. Por outro lado, quando se trata de produção de compostos secretados pela célula, na qual, o crescimento celular não é prioridade, o meio de cultura será desenvolvido para priorizar a produção do composto de interesse. Em um processo industrial em desenvolvimento, a escolha dos componentes do meio de cultura pode afetar significativamente a concentração do produto, rendimento e produtividade volumétrica. Isto pode ser acentuado quando o objetivo é a produção de produtos "commodities" (Kennedy and Krouse, 1999). A composição do meio de cultura pode também afetar a viabilidade e o custo nas etapas de separação e purificação. (Kennedy and Krouse, 1999)

As condições de cultivo dependem majoritariamente do micro-organismo utilizado. Da mesma forma que para o meio de cultura, é necessário utilizar as condições de cultura que mais se adequem às necessidades do processo. As condições de cultura como pH, temperatura, força iônica, entre outros podem afetar significativamente o desempenho da fermentação (Nagata and Chu, 2003).

Para a produção de ácido propiônico têm sido utilizados diversos meios de cultura e condições de cultura. No entanto, pouco é explicado sobre os motivos das variações entre os diferentes trabalhos. Na Tabela 2 são apresentados os

principais meios de cultura assim como as condições de cultivo mais utilizadas para a produção de ácido propiônico por *P. acidipropionici*.

Tabela 2: Principais variações de meio e condições de cultura de *P. acidipropionici*

Temperatura (°C)	pH	Velocidade agitação (rpm)	Fontes de nitrogênio	Fonte de Fósforo	Outros micronutrientes	Referência
32	7	200	Extrato de levedura Triptona	-	-	(Woskow and Glatz, 1991)
30	6,5	-	Triptona	K_2HPO_4	MnSO4	(Goswami and Srivastava, 2001)
30	7	250	Extrato de levedura Triptona	K_2HPO_4 KH_2PO_4	-	(Himmi et al., 2000)
32	6,5	-	Extrato de levedura Triptona	K_2HPO_4	MnSO4	(Zhang and Yang, 2009a)
30	6,5	150	Extrato de levedura Triptona	K_2HPO_4 KH_2PO_4	-	(Liu et al., 2011)
30-36	6,8 - 7	-	Extrato de levedura (NH4)2HPO4	KH_2PO_4	FeSO4·7H2O, MgSO4·7H2O, MnSO4·H2O, CaCl2·6H2O, CoCl2·6H2O	(Coral et al., 2008)
30	6,5	-	Peptona $(NH_4)_2SO_4$	KH_2PO_4	$Na_2HPO_4.7H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$ $CaCl_2$ H_3BO_3,$CoCl_2.6H_2O$, $ZnSO_4.7\ H_2O$, $MnCl_2$	(Ramsay, 1998)

2.5. Caldo de cana-de-açúcar como substrato

2.5.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Sacharum ssp.*) é um dos principais produtos agrícolas e tradicionais do Brasil. Desde 1532 há referências sobre o cultivo da cana e produção de açúcar no nordeste brasileiro, especificamente no estado de Pernambuco , onde se implantou o primeiro centro açucareiro do Brasil. A região apresentava como vantagens o fato de possuir terra e clima favoráveis à cultura da cana, além de sua localização geográfica, mais próxima da Europa em relação à região de São Vicente (São Paulo), outro centro que se destacou como produtor de açúcar no Brasil Colonial (Pinto, 1965).

A cana ocupa cerca de 7 milhões de hectares, ou cerca de 2% de toda a terra arável do Brasil, cuja safra 2010/2011 foi de cerca de 620 milhões de toneladas, o que o torna o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (UNICA, 2012). Nos últimos anos a cana tem se convertido na principal cultura para produção de energia limpa e renovável.

A fim de se obter plantas cada vez mais resistentes às pragas e com alta produtividade, uma série de variedades têm sido desenvolvidas visando a obtenção de plantas com características agronômicas de interesse, tais como produtividade, rusticidade, resistência a pragas e doenças, além de características industriais como alto teor de sacarose e médio teor de fibras (Paranhos, 1987).

O potencial da cana-de-açúcar deve-se ao fato de seu processamento garantir a autossustentabilidade de uma usina. A cana açúcar é uma matéria prima altamente eficiente em termos energéticos, pois o caldo de cana-de-açúcar pode ser utilizado como substrato para obter o produto desejado, enquanto o bagaço e a palha são queimados para a obtenção da energia para a própria usina, fechando assim o seu ciclo energético.

2.5.2. Caldo de cana-de-açúcar como substrato fundamental do meio de cultura

O caldo de cana-de-açúcar, resultante da moagem da cana açúcar, é um líquido opaco de coloração que varia de verde claro a pardo. A sua composição é variável em função da variedade, idade e integridade da cana, solo, condições

climáticas e planejamento agrícola (Paranhos, 1987).

O caldo de cana é constituído basicamente por água, sacarose, glicose e frutose. Entretanto, ele também é rico em componentes inorgânicos como potássio, magnésio e cálcio entre outros. No Brasil, é amplamente utilizado na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae,* tendo se convertido na base do seu meio de cultura. Na Tabela 3 é apresentada a sua composição.

Tabela 3. Composição do caldo de cana-de-açúcar**.**

Componentes	**Quantidade / 100g (A)**	**Quantidade /100g (B)**
Umidade	NR	82%
Lipídeos	0	Tr
Carboidratos (g)	13,7	18
Proteína (g)	0,1	Tr
Cinza (g)	NR	0,1
Cálcio (mg)	28	9
Fósforo (mg)	38	5
Ferro (mg)	2,3	0,8
Potássio (mg)	NR	18
Cobre (mg)	NR	0,01
Zinco (mg)	NR	0,1
Magnésio (mg)	NR	12
Manganês (mg)	NR	0,2
Tiamina (mg)	0,005	NR
Riboflavina (mg)	0,04	NR
Niacina (mg)	1,12	Tr.
Vitamina C (mg)	5,9	2,8

Fonte: **A**(Franco, 2002). **B**, (Universidade de Campinas. UNICAMP, 2006).

NR: Não reportado. **Tr:** Traço

A composição de um meio de cultura para um organismo deve possuir todos os componentes requeridos para a geração de energia e biossíntese celular. Por este motivo, no desenvolvimento de um meio de cultura, deve-se garantir que todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do micro-organismo estejam sendo fornecidos. As exigências nutricionais podem variar de um micro-organismo para outro. No entanto, um meio de cultura deve conter elementos como C, H, O, N, S. P, K, Mg, Fe, Ca, Mn, elementos traço como Zn, Co, Cu e Mo. Observa-se na composição do caldo de cana-de-açúcar (Tabela 3), a riqueza justamente de elementos básicos de um meio de cultura. Nota-se também a carência do nitrogênio, elemento essencial para o desenvolvimento de um micro-organismo.

2.6. Otimização e planejamento experimental multivariado

Grandes desafios estão associados à otimização de um processo de fermentação, que pode ser laborioso e custoso em termos de consumo de tempo e reagentes, além de envolver uma grande quantidade de experimentos. Na indústria de bioprocessos é normalmente necessário realizar otimizações porque novos mutantes são continuamente introduzidos. Em processos fermentativos diferentes combinações de condições do processo e componentes do meio de cultura devem ser avaliados para determinar a condição que produz a biomassa com as melhores características para a formação do produto (Panda et al., 2007).

O Planejamento Experimental (em inglês Design of Experiments, DOE) é uma técnica utilizada para planejar experimentos, ou seja, para definir quantos experimentos, quais dados e em que quantidade e condições eles devem ser coletados durante um determinado experimento, buscando, basicamente, satisfazer dois grandes objetivos: a maior precisão estatística possível na resposta e o menor custo (Montgomery, 1997)

Em um planejamento experimental, os ensaios devem ser realizados sequencialmente. O primeiro deles, chamado experimento de peneiramento (screen experiment), é usado para determinar quais as variáveis que são importantes (variáveis críticas) ao processo. Os ensaios subsequentes são usados

para definir os níveis das variáveis críticas identificadas anteriormente, que resultam em um melhor desempenho do processo (Montgomery, 1997).

Em suma, o objetivo é obter um modelo matemático apropriado para descrever um determinado fenômeno, utilizando o mínimo possível de experimentos. O planejamento experimental multivariado permite eficiência e economia no processo experimental, e o uso de métodos estatísticos na análise dos dados obtidos resulta em objetividade científica nas conclusões. Existem diversos métodos de planejamento, tais como tratamento em pares, tratamento em blocos, quadrado latino, planejamentos fatoriais, planejamento Plackett & Burman, delineamento composto central e superfície de resposta.

2.6.1. Metodologia Plackett & Burman (Plackett and Burman, 1946)

A metodologia Placket & Burman envolve o desenho experimental para dois níveis, sendo geralmente utilizado para identificar os fatores importantes em um determinado processo (Kennedy and Krouse, 1999). Esta técnica permite a avaliação de n variáveis por n+1 experimentos. Porém, n+1 tem de ser múltiplo de 4 (4, 8, 12, etc.) Na prática, é recomendável trabalhar com um mínimo de 4 graus de liberdade, ou seja, para n fatores devem ser realizados n+4 experimentos (Rodrigues and Iemma, 2009).

2.6.2. Delineamento composto central (DCC)

O delineamento composto central (em inglês CCD) é realizado a partir de delineamentos fatoriais de dois níveis com adição de pontos suficientes para estimar a curvatura e os efeitos de interação (Kennedy and Krouse, 1999). O número de experimentos é incrementado exponencialmente pelo número de fatores. É normalmente utilizado em conjunto com a metodologia de superfícies de resposta para otimização de processos (Panda et al., 2007).

2.6.3. Metodologia de superfície de resposta (RSM)

RSM é a metodologia utilizada para identificar e otimizar fatores significativos com o propósito de determinar quais os níveis dos fatores que

maximizam a resposta. A RSM utiliza delineamentos experimentais como o DCC para a obtenção de modelos empíricos que expliquem a resposta e que matematicamente descrevam as relações existentes entre as variáveis dependentes e as variáveis independentes no processo estudado. Curvas de contorno de uma superfície de resposta otimizada mostram respostas idênticas. Uma resposta significa o resultado de um experimento realizado em um valor determinado de uma variável estudada (Panda et al., 2007)

O planejamento experimental, baseado nos fundamentos estatísticos, é sem dúvida, uma ferramenta poderosa para se chegar às condições ótimas de um processo.

3. Objetivos

O projeto tem com objetivo principal a otimização da fermentação para a produção de ácido propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* utilizando xarope de cana-de-açúcar.

Objetivos específicos

1) Seleção de uma linhagem de *P. acidipropionici* com melhor desempenho fermentativo.
2) Seleção de fatores significativos na fermentação através de um delineamento experimental Plackett & Burman
3) Otimização do processo, obtenção da superfície de resposta e validação do modelo estatístico através de um delineamento central composto rotacional (DCCR).

Além disso, será avaliado o perfil de produção de *P. acidipropionici* em condições aeróbias.

4. Materiais e métodos

4.1. Equipamentos

- Espectrofotômetro UV/Visível ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech)
- Biorreator de 2,5 L de volume util, Labfors (Infors HT)
- Cromatógrafo Alliance HT (Waters)

- Centrífuga 5804 R (Eppendorf)
- Balança semianalitica Adventurer (OHAUS)
- Autoclave (Electrolab)
- pHmetro (Hanna)
- Estufa (Fabber Primar)

4.2. Reagentes e soluções

Meios de Cultura:

No preparo dos meios de cultura foi utilizada água destilada.

Extrato de levedura, Himedia.

Peptona bacteriológica, Himedia.

Soluções:

No preparo de soluções foi utilizada água purificada em sistema Milli-Q (resistividade 18,2 mΩ/cm).

Os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.3. Preparação da matéria-prima

4.3.1. Caldo de cana-de-açúcar

O caldo de cana-de-açúcar foi obtido em pontos de venda na região de Barão Geraldo, distrito de Campinas-SP. Antes de ser utilizado como substrato, o caldo-de cana foi tratado. O tratamento foi realizado em três etapas: primeiro o caldo de cana-de-açúcar foi filtrado em um filtro de algodão de várias camadas para remoção do material fibroso e de partículas em suspensão. O caldo foi então autoclavado para facilitar a decantação da toda a fibra suspensa. Após a decantação o caldo de cana-de-açúcar livre de fibra foi transferido para outra garrafa utilizando-se uma bomba peristáltica. Por último o caldo de cana-de-açúcar foi autoclavado (121 ^{o}C, 1 atm por 20 min) e estocado a 4 °C para posterior utilização. O caldo de cana-de-açúcar foi caracterizado e quantificado quanto ao seu teor de sacarose, glicose e frutose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.3.2. Xarope de cana-de-açúcar

O xarope de cana-de-açúcar foi obtido da Usina Costa Pinto (Piracicaba, SP). O xarope foi coletado após o terceiro efeito de evaporação na linha de produção de açúcar. O xarope foi autoclavado (121 ^{o}C, 1 bar por 20 minutos) e estocado a 4 °C para posterior utilização. O xarope foi caracterizado e quantificado quanto ao seu teor de sacarose, glicose e frutose por HPLC. Utilizou-se xarope de cana-de-açúcar nos delineamentos experimentais em substituição ao caldo de cana devido à facilidade de manuseio e estocagem. Considerando que o xarope é o caldo de cana-de-açúcar concentrado, entende-se que as propriedades químicas mais representativas, como o conteúdo de açúcares totais e de micronutrientes são equivalentes.

4.4. Meios de cultura e soluções.

4.4.1. Meio de conservação

O meio de conservação é o meio de cultura utilizado para propagação dos micro-organismos. Composição: 10 g/L de glicose, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 1 g/L de KH_2PO_4, 2 g/L de $(NH_4)_2HPO_4$, 1 mL/L das soluções 1 e 2 de micronutrientes. (Modificado de Coral et al., 2008). Antes de ser autoclavado, o pH do meio de conservação foi ajustado a 7,0 mediante a adição de solução aquosa de NaOH 4 mol/L ou HCL 1 mol/L.

4.4.2. Meio de crioconservação

O meio de crioconservação é utilizado para conservação das linhagens de *P. acidipropionici* a -84 °C. Composição: 200 g/L de glicerol, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 1 g/L de KH_2PO_4, 2 g/L de $(NH_4)_2HPO_4$, 1 mL/L das soluções 1 e 2 de micronutrientes. Antes de ser autoclavado, o pH do meio de crioconservação foi ajustado a 7,0 mediante a adição de solução aquosa de NaOH 4 mol/L ou HCL 1 mol/L.

4.4.3. Soluções de micronutrientes

Solução 1: 1% de $MgSO_4.7H_2O$, 0,25% de $MnSO_4.H_2O$, 0,5% de $ZnSO_4.7H_2O$ e 0,5% de $FeSO_2.7H_2O$.z

Solução 2: 1% de $CaCl_2.2H_2O$ e 1% de $CoCl_2.6H_2O$.

4.5. Micro-organismos

As linhagens de *Propionibacterium acidipropionici* foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC). As linhagens de *P. acidipropionici* ATCC 4875, ATCC 25562 e ATCC 4965 foram reativadas em meio de conservação e propagadas e estocadas a -84 °C em meio de crioconservação.

4.6. Seleção de linhagens de *Propionibacterium acidipropionici*

4.6.1. Meio de cultura

O meio de cultura contém 20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH_2PO_4, 2g/l de $(NH_4)_2HPO_4$, 1 mL/L das soluções 1 e 2. Este meio foi utilizado para a preparação do inóculo e para a cultura no biorreator.

4.6.2. Reativação e preparação do inóculo

As culturas permanentes de *P. acidipropionici ATTC 4875, ATCC 25562 e ATTC 4965* foram reativadas em tubos estéreis de polipropileno com base cônica e tampa rosqueada (tubo tipo falcon) de 15 mL contendo 12 mL de meio de conservação e 1 mL da cultura permanente. Os tubos, adequadamente tampados, foram incubados em estufa a 30 °C. Após 24 horas inoculou-se dois tubos tipo falcon de 50 mL, contendo 45 mL de meio de cultura de conservação com 5 mL da cultura reativada. Os tubos foram incubados em estufa a 30 °C por 40 horas. Nesta etapa a densidade óptica foi monitorada (OD, Optical Density) no comprimento de onda de 600 nm. Os dois tubos falcon, contendo as culturas, foram centrifugados a 10400 x g por 20 minutos e ressuspendidas em 100 mL de meio sem fonte de carbono.

4.6.3. Cultivo no biorreator

Em uma garrafa de 1 L foram preparados 900 mL de meio de cultura descrito no meio 4.6.1 sem a fonte de carbono. O bioreator com volume de

trabalho de 2,5 L foi preparado com 800 mL deste meio de cultura. O biorreator foi, então, esterilizado em autoclave a 121 ^{o}C, 1 atm por 20 minutos. Os 100 mL restantes foram transferidos para uma garrafa de 250 mL e também foram autoclavados. A fonte de carbono foi dissolvida em 100 mL de água destilada e autoclavada em uma garrafa de 250 mL. Após a autoclavagem os 100 mL contendo a fonte de carbono foram transferidos para o biorreator. O inóculo foi preparado a partir das células obtidas por centrifugação no item no cultivo descrito no item 4.6.2. As células foram ressupendidas nos 100 mL de meio sem fonte de carbono e imediatamente inoculadas no biorreator. O pH foi mantido constante durante o crescimento celular em 6,5 pela adição automática de solução aquosa de NaOH 6 mol/L. A temperatura e a velocidade de agitação foram mantidas constantes em 30 ^{o}C e 150 rpm respectivamente. Para garantir o estado de anaerobiose, antes da inoculação, o meio de cultivo e a atmosfera do biorreator foram saturados com um fluxo de nitrogênio gasoso de 3 LN/min (litros normais por minuto) durante 10 minutos. . Duas amostras de 1,5 mL foram coletadas, em intervalos aproximados de 8 horas. Uma amostra foi utilizada para medir a OD, enquanto que a outra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e mantida congelada a -20 ^{o}C para posterior análise por cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC).

4.7. Análise comparativa entre os meios de cultura contendo extrato de levedura e peptona como fontes de nitrogênio

4.7.1. Meio de cultura

Os meios de cultura são detalhados na Tabela 4.

Tabela 4: Composição dos meios de cultivo utilizados para a comparação das fontes de nitrogênio.

	Meio Sintético (MS)	Meio Xarope completo. (XC)	Meio Xarope extrato levedura. (XYE)	Meio Caldo de cana completo (CC)	Meio Caldo de cana extrato de levedura. (CYE)
Sacarose g/L	60	-	-	-	-
Xarope de cana-de-açúcar g/L[1]	-	60	60	-	-
Caldo de cana g/L[1]	-	-	-	60	60
Extrato de levedura g/L	5	5	10	5	10
Peptona g/L	5	5	-	5	-
Fosfatos e soluções de micronutrientes[2]	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

[1] concentração equivalente em g/L de sacarose considerando também a glicose e a frutose contidos no xarope ou no caldo de cana-de-açúcar. [2] 1 g/L de KH_2PO_4 e 2 g/L de $(NH_4)_2HPO_4$. Soluções de micronutrientes 1 e 2 (Item 4.4.3)

A reativação, a preparação do inóculo e cultura no biorreator foram realizadas segundo os itens 4.6.2 e 4.6.3.

4.8. Preparação e adequação do método de quantificação do xarope e do caldo de cana-de-açúcar para utilização nos delineamentos experimentais

O xarope previamente autoclavado (item 4.3) foi dividido em 8 garrafas de 1 L. Três garrafas, nomeadas C1 a C3, foram destinadas para a utilização nos ensaios dos delineamentos experimentais. As garrafas destinadas para a preparação do inóculo para cada ensaio dos delineamentos experimentais foram nomeadas I1 a I5. Assim foi garantido que tanto o xarope de cana-de-açúcar para

cada inóculo quanto para as culturas dos delineamentos foram do mesmo lote e apresentaram a mesma concentração de açúcar e demais componentes. De cada garrafa foram retiradas amostras para a quantificação da sacarose, glicose e frutose por HPLC. Posteriormente, de acordo com a concentração dos açúcares encontrados na quantificação, o xarope, foi aliquotado em tubos tipo falcon de 50 mL com o volume necessario para atingir a concentração de substrato desejada no respectivo experimento (segundo as Tabelas 6 e 8).

A quantificação dos açúcares foi realizada por cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC). As oito amostras foram analisadas por HPLC-RI utilizando a coluna de cromatografia de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300mm x 7.8mm, BioRad) aquecida em um forno a 35 ^{o}C, H_2SO_4 2 mM (pH 2,3) como fase móvel e fluxo de 0,6 mL/min. Um teste para validar a quantificação dos açúcares foi realizada utilizando o mesmo sistema de cromatografia, mas com a coluna de carboidratos Aminex Carbohydrate HPX-87C (250mm x 4mm, BioRad) aquecida 60 ^{o}C e com fluxo de 0.6 mL/min e água deionizada como fase móvel (pH 7). As amostras de xarope de cana-de-açúcar foram diluídas, filtradas e analisadas. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de sacarose e outra para glicose e frutose foram também analisadas. As concentrações dos açúcares nas amostras foram determinadas por comparação das áreas dos picos cromatográficos obtidos com as curvas de calibração. Tanto as amostras como os padrões para calibração foram corridos nos dois sistemas cromatográficos.

4.9. Delineamento experimental Plackett & Burman (PB)

Para a otimização do processo de fermentação realizou-se primeiramente um delineamento experimental para selecionar as variáveis com maior importância no processo. As oito variáveis avaliadas são mostradas na Tabela 5. Para tal intuito foi realizado o delineamento desenvolvido por **Plackett & Burman** (Plackett and Burman, 1946) para 8 variáveis (fatores) independentes .

Tabela 5. Variáveis selecionadas para a sua avaliação no processo.

Variável	**Abreviatura**[1]	**Descrição**
Temperatura,	Temp.	-
pH	pH	-
Concentração de substrato[2]	[Substrato]	Fonte de carbono. Concentração do açúcar total expressado em g/L de sacarose.
Concentração extrato de levedura[3]	[EL]	Fonte de nitrogênio
Concentração de inóculo	[Inoc]	Concentração da massa úmida das células centrifugadas e inoculadas no inicio de cada ensaio.
Velocidade de agitação	Agit.	Velocidade de agitação no biorreator expresso em revoluções por minuto (rpm) utilizando impulsores tipo Rushton.
Concentração de micronutrientes	[MicroN]	Concentração de micronutrientes de 1 mL da solução 1 e 1 mL da solução 2.
Concentração de fosfato de potássio monobásico.	[KH2PO4]	Fonte de fósforo.

[1], as abreviaturas listadas serão utilizadas nas tabelas de análise dos efeitos do delineamento Plackett & Burman e do DCCR. [2], concentração de açúcar total expressado em sacarose considerando também a glicose e a frutose contidos no xarope de cana-de-açúcar. [3],foi utilizado mesmo lote de extrato de levedura para todos os ensaios do delineamento PB.

Os fatores foram codificados para possuírem a mesma ponderação quando estas forem analisadas. A codificação foi realizada segundo a equação 3:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (3)$$

Na qual:

x_i: valor da variável (fator) independente codificada

X_i: valor real da variável (fator) independente.

X_0: valor real da variável (fator) independente no nível central

Cada variável foi avaliada em 3 níveis inferior (-1), central (0), superior (1) como é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Codificação, valor do nível codificado e valor real dos fatores selecionados para o delineamento Plackett & Burman.

Fator	Código [1]	Níveis (*)		
		-1	0	1
Temperatura, ^{0}C	**x1**	25	30	35
pH	**x2**	6	6,5	7
Concentração de substrato, g/L[2]	**x3**	40	50	60
Concentração extrato de levedura, g/L	**x4**	5	10	15
Concentração de inóculo, g/L	**x5**	20	30	40
Agitação, RPM	**x6**	100	200	300
Concentração de micronutrientes, mL/L	**x7**	0	2	4
Concentração de fosfato de potássio monobásico, g/L	**x8**	0	2	4

[1] A mesma codificação será utilizada na tabela 7 para o delineamento Plackett & Burman.
[2], Concentração de açúcar total expresso em sacarose considerando também a glicose e a frutose contidos no xarope de cana-de-açúcar.

Devido ao número de experimentos, o tempo necessário para cada experimento (4-8 dias) e os equipamentos disponíveis para a realização dos ensaios, cada experimento foi realizado sem réplica experimental. Entretanto para poder avaliar as variações experimentais foram adicionados 3 réplicas experimentais no ponto central dos níveis para cada fator, totalizando assim 15 ensaios. Na Tabela 7, são mostradas as combinações segundo a metodologia Plackett & Burman.

Tabela 7. Combinações das variáveis segundo a metodologia de Packett & Burman (Plackett and Burman, 1946) e 3 réplicas no nível central de cada fator.

Ensaios	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8
PB1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
PB2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
PB3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
PB4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
PB5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
PB6	1	1	1	-1	1	1	-1	1
PB7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
PB8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
PB9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
PB10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
PB11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
PB12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
PB13	0	0	0	0	0	0	0	0
PB14	0	0	0	0	0	0	0	0
PB15	0	0	0	0	0	0	0	0

4.9.1. Reativação e pre-inóculo

As culturas permanentes de *P. acidipropionici ATTC 4875* foram reativadas em quatro tubos tubo tipo falcon de 15 mL contendo 12 mL de meio de conservação e 1 mL da cultura permanente (para cada tubo). Os tubos foram adequadamente tampados e incubados em estufa a 30 °C. Após 24 horas, 5 mL das culturas reativadas foram transferidos para oito tubos tipo falcon de 50 mL,

contendo 45 mL de meio de cultura. Os tubos foram incubados a 30 °C por 40 horas. Nesta etapa a densidade óptica foi monitorada (OD, Optical Density) em um comprimento de onda de 600 nm. Os oito tubos falcon, contendo as culturas, foram centrifugados a 10400 x g por 20 minutos e ressuspendidas em 400 mL de meio sem fonte de carbono.

4.9.2. Preparação do inóculo

O biorreator com volume de trabalho de 7L foi preparado com 3200 mL de meio de cultura sem a fonte de carbono e esterilizado em autoclave a 121 ^{o}C, 1 atm por 20 minutos. Em uma garrafa de 500 mL foi preparada uma solução de xarope concentrada suficiente para preparar 4 L de meio de cultura a uma concentração final de 60 g/L de açúcar equivalente em sacarose. Após a autoclavagem a fonte de carbono foi transferida para o biorreator que foi imediatamente inoculado. O inóculo foi preparado através da ressuspensão de células (item anterior) em 400 mL de meio de cultura estéril. O pH foi mantido constante em 6,5 pela adição automática de solução aquosa de NaOH 6 mol/L. A temperatura e a velocidade de agitação foram mantidas em 30 ^{o}C e 200 rpm respectivamente. Aplicou-se um fluxo de nitrogênio gasoso de 3 LN/min durante 10 minutos antes da inoculação para desoxigenar o meio de cultura. Após 44 horas, o cultivo foi parado e as células foram centrifugadas e pesadas para serem inoculadas no ensaio do delineamento experimental (PB ou DCCR) correspondente.

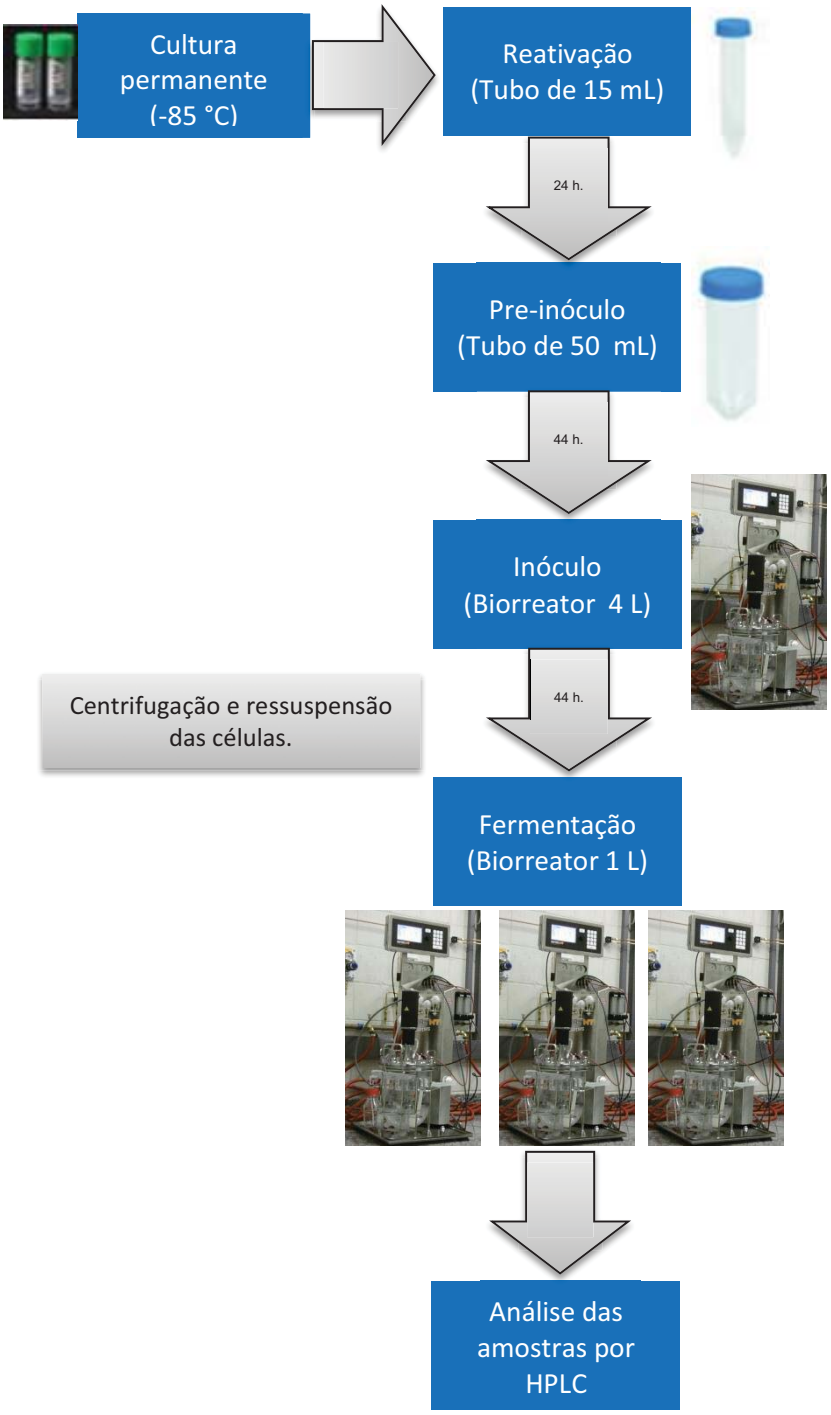

Figura 3: Fluxograma da metodologia para a realização dos delineamentos experimentais.

4.9.3. Cultura no biorreator

O biorreator Labfors (Infors HT) com volume de trabalho de 2,5 L foi preparado com 400 mL de meio de cultura sem a fonte de carbono. O xarope de cana-de-açúcar aliquotado anteriormente em tubos tipo falcon de 50 mL foi

descongelado e diluído em meio de cultura previamente autoclavado para obter 200 mL. Em uma garrafa de 1L, 400 mL do meio de cultura foram autoclavados e foram utilizados para a ressuspensão das células centrifugadas no item 4.9.2. Assim, para iniciar a cultura, 200 mL do xarope de cana-de-açúcar foram transferidos ao biorreator que imediatamente foi inoculado com 400 mL de células ressuspendidas, totalizando assim 1L de cultura. O pH foi mantido constante segundo o ensaio do delineamento pela adição automática mediante a adição de solução aquosa de NaOH 6 mol/L. A temperatura e a velocidade de agitação foram mantidas constantes de acordo com o ensaio respectivo. Antes da inoculação, aplicou-se um fluxo de nitrogênio gasoso de 3 LN/min (litros normais por minuto) durante 30 minutos para retirar o O_2 dissolvido do meio de cultivo e garantir o estado de anaerobiose da cultura. Duas amostras de 1,5 mL cada uma foram retiradas no inicio e no final da cultura para monitorar crescimento pela medição da OD. No final da fermentação, foram aliquotados três amostras em tubos tipo falcon (previamente pesados) com 50 mL de caldo fermentado, seguidamente foram centrifugados, descartou-se o sobrenadante e o pellet de células de cada tubo foi seco em estufa à 55 ^{o}C até peso constante (7 dias). Na Figura 3 é mostrado um fluxograma geral da metodologia para utilizada para os delineamentos experimentais.

4.10. Realização do delineamento central composto rotacional (DCCR):

Depois de analisados os dados do delineamento PB descrito no item anterior selecionou-se 3 fatores dos 8 inicialmente avaliados (temperatura, concentração de extrato de levedura e concentração de xarope). Na Tabela 8 são mostrados a codificação, os valores codificados e o respectivo valor real para cada fator avaliado. A codificação foi realizada segundo a equação 3 no item 4.9.

Tabela 8. Variáveis selecionadas, códigos e níveis.

Variável	Código [1]	Níveis (*)				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (^{0}C)	x1	30	31,6	34	36,4	38
Concentração de extrato de levedura (g/L) [2]	x2	10	13	17,5	22	25
Concentração de substrato (g/L)	x3	47	54	64	74	81

[1] A mesma codificação é utilizada na tabela 9 do DCCR. [2] Foi utilizado mesmo lote de extrato de levedura para todo o delineamento DCCR. [3] Concentração de açúcar total equivalente em sacarose considerando também a glicose e a frutose contidos no xarope de cana-de-açúcar.

.

Para a avaliação destes fatores e a posterior construção da superfície de resposta foi utilizada uma função polinomial de segunda ordem. Para isto foram necessários 17 experimentos expressos na Tabela 9, 8 pontos fatorais, 6 pontos axiais e 3 pontos no nível central de cada fator. Da mesma maneira que no item anterior as réplicas dos níveis centrais foram utilizadas para avaliar o erro experimental. Este delineamento foi utilizado segundo recomendações de Rodrigues e Iemma (Rodrigues and Iemma, 2009).

Tabela 9. Combinações dos fatores segundo a metodologia do delineamento composto central rotacional e 3 réplicas no nível central (DCCR)

Ensaios	x1	x2	x3	T	YE	Substrato
1	-1	-1	-1	31,6	13	54
2	1	-1	-1	36,4	13	54
3	-1	1	-1	31,6	22	54
4	1	1	-1	36,4	22	54
5	-1	-1	1	31,6	13	74
6	1	-1	1	36,4	13	74
7	-1	1	1	31,6	22	74
8	1	1	1	36,4	22	74
9	-1,68	0	0	30	17,5	64
10	1,68	0	0	38	17,5	64
11	0	-1,68	0	34	10	64
12	0	1,68	0	34	25	64
13	0	0	-1,68	34	17,5	47
14	0	0	1,68	34	17,5	81
15	0	0	0	34	17,5	64
16	0	0	0	34	17,5	64
17	0	0	0	34	17,5	64

A reativação, o pre-inóculo, o inóculo e a fermentação no biorreator foram realizados segundo os itens 4.9.1 a 4.9.3.

4.11. Culturas de *P. acidipropionici* na presença de oxigênio dissolvido.

4.11.1. Avaliação de efeito do oxigênio no perfil produtivo de *Propionibacterium acidipropionici*

O meio de cultura, o inóculo e a fermentação foram realizadas segundo o item 4.6, mas ao invés de aplicar nitrogênio gasoso no início da cultura foi suprido ar sintético em uma vazão constante de 1,5 LN/min para 1 L de cultura (1,5 vvm)

durante toda a cultura. Este experimento foi realizado no fermentador e em triplicata. Amostras foram coletadas para quantificação no HPLC e identificação do ácido láctico por LC-MS.

4.11.2. Identificação do ácido láctico por de UPLC–MS/MS (MRM)

A solução padrão de ácido lático (≥98%) foi preparada por diluição em acetonitrila (ACN) a uma concentração de 100 ppm. As amostras foram diluídas em acetonitrila na razão 1:50 (v/v). As análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido Waters Acquity UPLC (Ultra performance liquid chromatography) acoplado a um espectrômetro de massas Waters Acquity TQD com geometria triplo-quadrupolo (QqQ), equipado com fonte de ionização do tipo ESI (Electrospray ionization).

Condições do cromatógrafo a líquido: A separação foi realizada em uma coluna analítica de fase reversa Acquity BEH Amide (2,1 × 100 mm, partículas de 1,7 μm), mantida a 50°C. Como fase móvel, foram empregadas misturas em gradiente dos solventes A (acetato de amônio 10 mM em 50:50 ACN/H_2O, pH 9,0) e B (acetato de amônio 10 mM em 95:50 ACN/H_2O, pH 9,0), a um fluxo de 600 μL min^{-1}. O gradiente linear de solventes A e B foi o segundo a Tabela 10.

Um volume de 7,5 μL de cada amostra foi injetado por meio de um auto-injetor, para cada análise. Foi empregada solução 95:5 ACN/H_2O como Weak Needle Wash e Strong Needle Wash.

Tabela 10. Gradiente linear de solventes A e B para a identificação do ácido láctico.

Tempo (min)	% A	% B
Inicial	0,1	99,9
0,40	0,1	99,9
0,50	40,0	60,0
2,00	70,0	30,0
2,01	0,1	99,9
5,00	0,1	99,9

Condições do espectrômetro de massas: Os compostos eluídos pela coluna foram continuamente ionizados por ESI(−) e analisados por um método de SRM (*Single Reaction Monitoring*) ao longo dos 5 min de corrida. Foi monitorada a transição *m/z* 89,08 > 43,15 do ácido lático empregando-se para a mesma uma energia de colisão de 10 eV. Os demais parâmetros instrumentais empregados foram Capillary 4,0 kV, Cone 30 V, Extractor 3 V, RF Lens 0,1 V, Source Temperature 130°C, Desolvation Temperature 350 °C, Cone Gas Flow 0 L h^{-1}, Desolvation Gas Flow 650 L h^{-1}, Collision gas flow 0,1 mL min^{-1} LM1 Res 15, HM1 Res 15, Entrance 2 V, Exit 0,5 V, LM2 Res 15, HM2 Res 15 e Multiplier 650 V.

4.12. Quantificação dos produtos da fermentação

A quantificação da sacarose, glicose, frutose, ácido propiônico, ácido acético, ácido succínico foram realizados por cromatografia liquida de alta eficiência HPLC e utilizando o cromatógrafo Alliance HT (Waters) com detector de índice de refração (Waters 2414). As corridas foram realizadas utilizando uma coluna HPX-87H (BioRad) mantida a 35 ^{o}C, com ácido sulfúrico 4 mM como fase móvel e um fluxo de 0,6 mL/min. Na Figura 4, é apresentado o perfil

cromatógrafico de separação dos ácidos orgânicos analisados. As amostras retiradas da fermentação foram centrifugadas, filtradas e analisadas. Curvas de calibração para cada um dos produtos foram utilizadas para a quantificação.

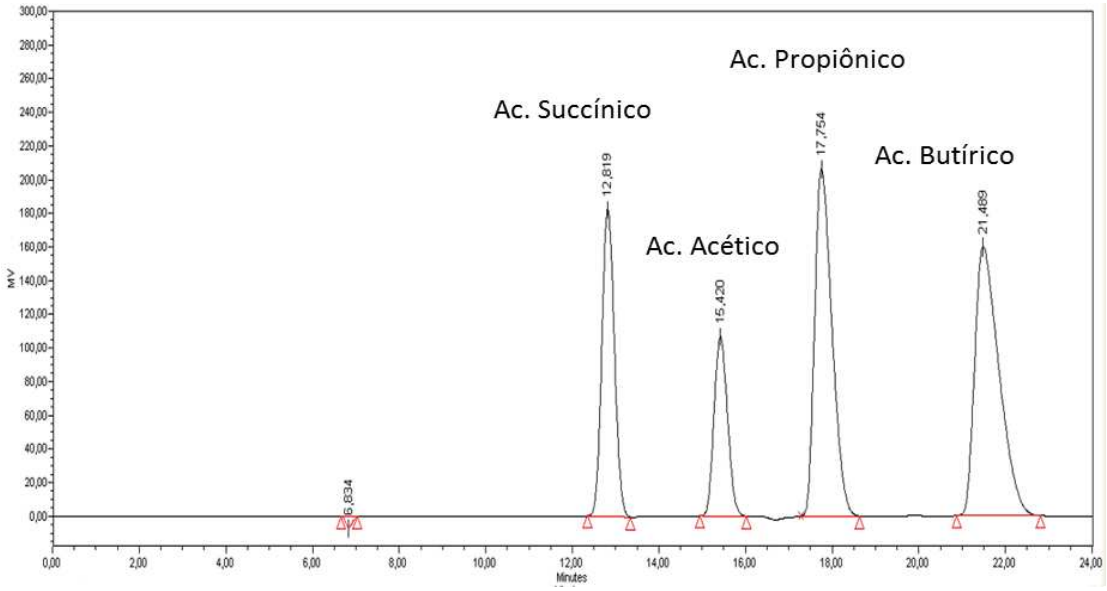

Figura 4: Perfil cromatográfico de separação dos ácidos orgânicos analisados. Cromatograma correspondente a um padrão da curva de calibração contendo uma solução em água contendo ácido succínico, ácido ácetico, ácido propiônico e ácido butírico.

4.13. Cálculo das respostas (parâmetros de desempenho fermentativo) nos delineamentos experimentais multivariados.

Existem diversos tipos de parâmetros que quantificam o desempenho de um processo. Neste caso, foram utilizados os seguintes parâmetros como respostas nos delineamentos.

a) **Rendimento:** massa de produto formado por unidade de massa consumida (Doran, 1995).

$$\textbf{Rendimento}\ \% \left(\mathbf{^m/_m}\right) = \frac{\textbf{MF produto} - \textbf{MI produto}}{\textbf{MI subtrato} - \textbf{MF subtrato}} . \mathbf{100}\ \% \quad (4)$$

Na qual:

Rendimento: rendimento expresso em massa do ácido propiônico formado e

dividido pela massa dos açúcares consumidos do xarope de cana-de-açúcar.

MF produto: massa final expresso em gramas.

MI produto: massa inicial expresso em gramas.

MF substrato: massa residual do substrato expresso em gramas**.**

MI substrato: massa inicial do substrato expresso em gramas.

O substrato é a somatória da sacarose com a glicose e a frutose (subtraindo o 0,05% de massa na soma da glicose e frutose) nas amostras que contém xarope ou caldo de cana-de-açúcar. Para o cálculo do rendimento a massa do substrato é expressa em gramas de açúcar equivalentes em sacarose.

b) **Produtividade Volumétrica:** massa de produto formado por unidade de volume e por unidade de tempo (Doran, 1995). Foi calculado segundo a equação 5.

$$\textbf{Produtividade volumétrica}\left(^{\mathbf{g}}/_{\mathbf{L.h}}\right) = \frac{\textbf{MF produto} - \textbf{MI produto}}{\textbf{V.t}} \quad (5)$$

Na qual:

Produtividade volumétrica: expresso em gramas de ácido propiônico produzido dividido pelo tempo e pelo volume.

V: volume no final da fermentação expresso em litros (L)

t: tempo da cultura.

c) **Resposta de Menor produção de ácido succínico, RMS %:** unidade menos o carbono utilizado para formar ácido succínico dividido pela somatória do carbono utilizado para formar o ácido propiônico, o ácido acético e o ácido succínico.

$$\textbf{RMS}\ \%\ (\mathbf{C}) = \left(\mathbf{1} - \left(\frac{\frac{\mathbf{Sn}}{\mathbf{cS}}}{\frac{\mathbf{nP}}{\mathbf{cP}} + \frac{\mathbf{nA}}{\mathbf{cA}} + \frac{\mathbf{nS}}{\mathbf{cS}}}\right)\right) * \mathbf{100}\% \qquad (6)$$

Na qual:

RMS: resposta de menor produção de ácido succínico expresso em porcentagem de carbono (C) utilizado para formar ácido propiônico e ácido acético.

nP, nA e nS: número de mols formados no final da fermentação. nP, número de mols de ácido propiônico. nA, número de mols de ácido acético. nS, número de mols de ácido succínico

cP, cA e cS: número de átomos de carbono para cada composto. cP, número de átomos carbono no ácido propiônico. cA, número de átomos de carbono de ácido acético. cS, número de átomos de carbono ácido succínico.

d) **Rendimento de biomassa, Yx/s:** massa de biomassa produzida por unidade de massa de substrato consumida. O cálculo é realizado segundo a equação 7:

$$\boldsymbol{Yx/s}\ \%\ (\boldsymbol{m/m}) = \frac{X_f - X_o}{\textbf{MI subtrato} - \textbf{MF subtrato}} . \mathbf{100}\ \% \qquad (7)$$

Na qual:

Yx/s: rendimento de biomassa expresso em porcentagem de massa.

X_f: massa seca de biomassa final.

X_o: massa seca inicial

A biomassa inicial foi calculada utilizando a relação: Concentração de massa seca (g/L)= 0,3*OD + 0,6. A massa seca final foi calculada segundo o item 4.9.3.

4.14. Análise estatística.

A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica 8.0. Os comparativos entre duas médias foram realizados pelo teste t-student e os comparativos entre mais de duas médias foram analisados pelo teste de Tukey utilizando o software Action.

5. Resultados e discussão

5.1. Adequação de um método para quantificação dos açúcares no xarope e no caldo de cana-de-açúcar

A qualidade da quantificação dos substratos e produtos formados durante o cultivo garante a autenticidade e reprodutibilidade dos resultados, principalmente quando se trata de parâmetros de desempenho da produção como a produtividade e o rendimento. É necessário, também, levar em consideração a praticidade da análise, assim como a facilidade de tratamento das amostras, uma vez que estes não devem ser demorados nem trabalhosos, permitindo a análise das amostras no menor tempo possível.

A coluna Aminex HPX-87H (Biorad) foi selecionada para a quantificação dos substratos e produtos durante o cultivo, pois permite quantificar ácidos orgânicos, álcoois e açúcares numa mesma corrida (quando acoplada a um detector de índice de refração). Porém, durante o desenvolvimento do trabalho foi observado um problema na quantificação das amostras que continham sacarose e/ou a mistura de açúcares de sacarose, glicose e frutose. Na Figura 5 é apresentado o perfil cromatográfico de uma amostra de sacarose para melhor visualização do problema.

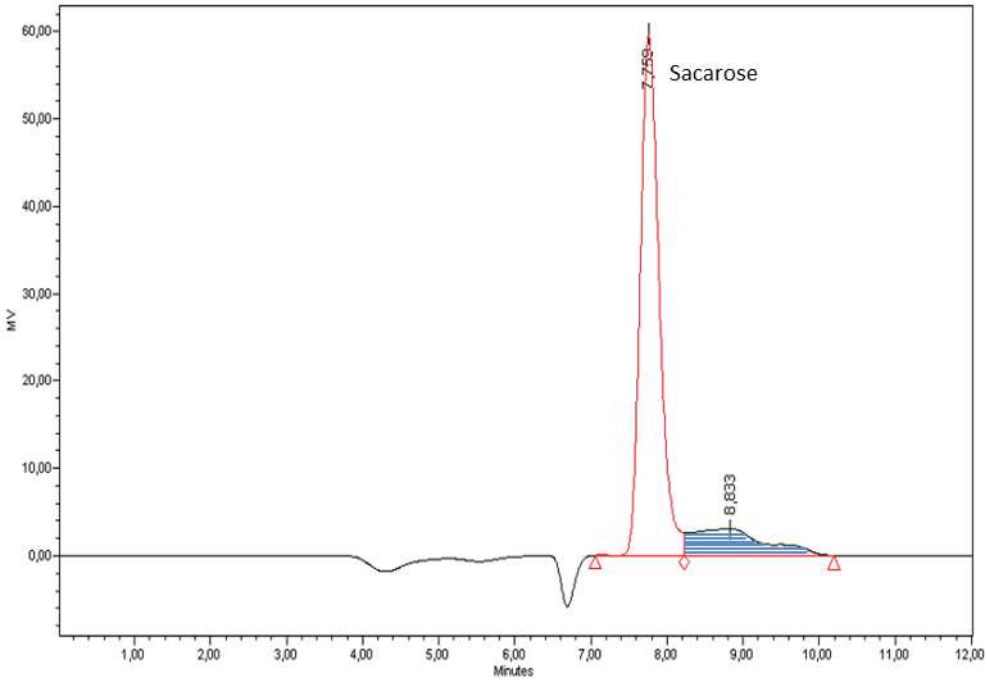

Figura 5: Perfil cromatográfico de uma solução de sacarose na coluna HPX-87H. Fase móvel H_2SO_4 2mM, pH 2,3. Pico em vermelho: Sacarose. Picos hachurados em azul: glicose e frutose como produtos da inversão.

Pode-se observar pelo menos 3 picos no cromatograma. O pico de maior intensidade (em vermelho) corresponde à sacarose. Já os picos menores e com menor definição correspondem, provavelmente, à glicose e à frutose resultantes da inversão da sacarose. Esta inversão acontece porque a ligação α-glicosídica da sacarose é instável em pH ácido (a fase móvel utilizada para a coluna HPX-87H é uma solução de H_2SO_4 2 mM com pH de 2,3) (Hurst et al., 1979). Outro motivo da inversão seria a natureza catiônica (baseada em $H^{+)}$ da coluna utilizada, onde a estaria sendo realizada a conhecida como inversão heterogênea (Rodrigues et al., 2000). Assim a concentração do padrão de sacarose não será diretamente proporcional à área observada no cromatograma, pois esta foi diminuída como consequência da perda da sacarose pela inversão.

Uma solução para este problema seria a quantificação da glicose e da frutose em cada ponto dos padrões da sacarose e a subtração desses valores da concentração inicial. No entanto, os picos correspondentes à glicose e à frutose no padrão de sacarose apresentam uma baixa definição e uma modificação no tempo de retenção (Figura 6).

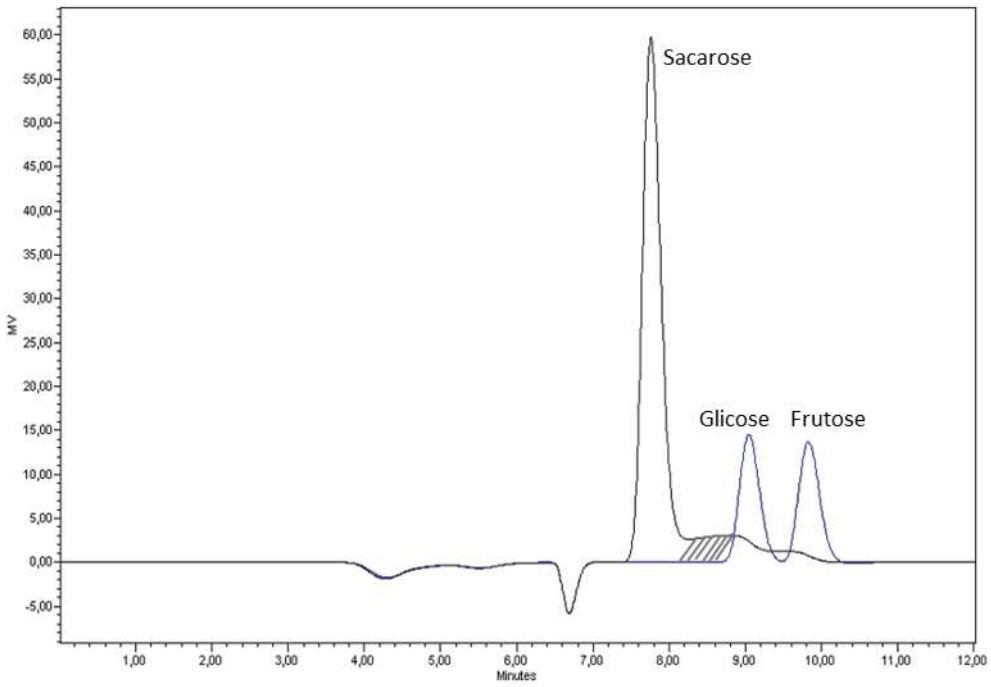

Figura 6: Perfil cromatográfico sobreposto de 2 cromatogramas. Linha preta, cromatograma de uma amostra de sacarose. Linha azul, cromatograma de um padrão contendo glicose e frutose.

Área hachurada, área com tempo de retenção diferente a sacarose, glicose e frutose. Coluna HPX-87H, fase móvel H_2SO_4 2mM - pH 2,3.

Observa-se que a região hachurada (Figura 6) não corresponde a nenhum dos compostos injetados nos padrões, pois os tempos de retenção são claramente diferentes aos da glicose e frutose (picos em azul). Entretanto, essa área corresponde à glicose e/ou à frutose, produtos da inversão da sacarose. Porém, devido à reação de inversão que acontece paralelamente à separação, estes produtos não estão sendo adequadamente separados, causando baixa resolução dos picos e a alteração no tempo de retenção. Este fenômeno impede a adequada integração dos picos e, portanto, a construção da curva de calibração para a sacarose nessas condições.

Para solucionar este problema poderia ser feita a substituição da coluna de cromatografia, o que também implicaria a modificação do método estabelecido para a análise dos outros compostos da fermentação, como os ácidos orgânicos e álcoois. Outra possibilidade seria realizar a análise em duas corridas de cromatografia separadamente: uma para a quantificação dos açúcares e outra para a quantificação dos ácidos orgânicos e álcoois. Qualquer uma destas duas alternativas seria muito laboriosa devido à necessidade de desenvolvimento de um novo método ou a necessidade de realização das análises utilizando métodos e colunas distintas. Visando a otimização de tempo, foi estabelecido um método de integração dos picos da glicose e da frutose nos padrões de sacarose e nas amostras como é mostrado na Figura 7.

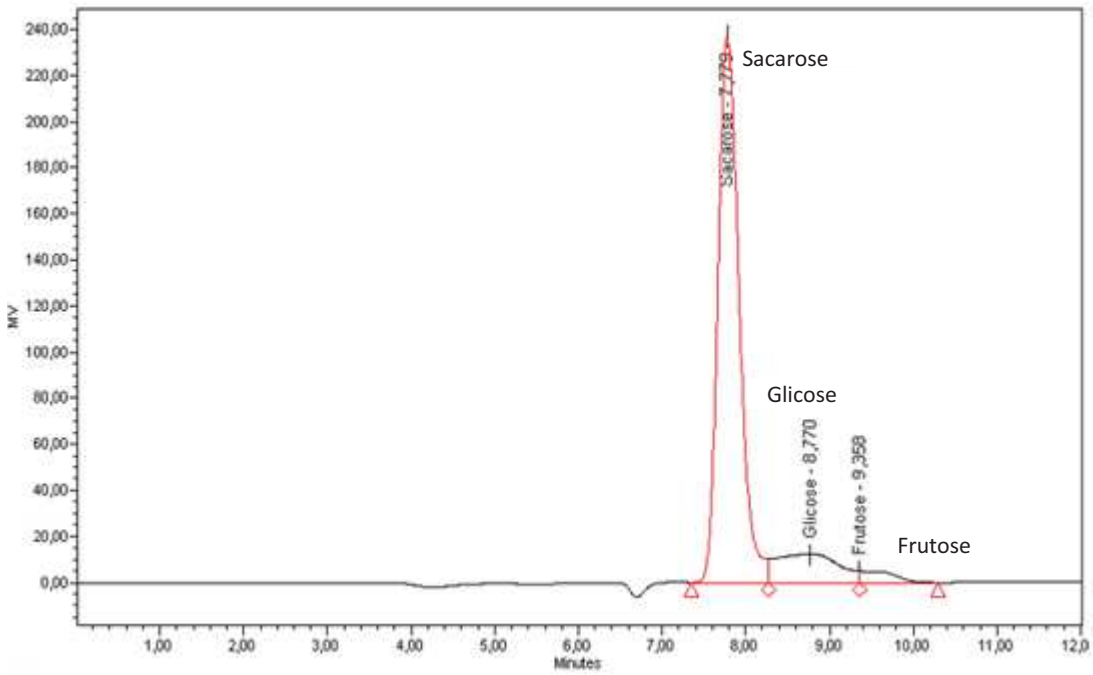

Figura 7: Cromatograma com o modo de integração modificado para sacarose na coluna HPX-87H. Fase móvel H_2SO_4 2mM, pH 2.3.

Este método de integração leva em consideração:

- A relação da área com a concentração da glicose e a área com a concentração da frutose são iguais ou muito próximas.
- Tanto nos padrões de sacarose como nas amostras que contenham xarope de cana-de-açúcar, os picos pouco definidos correspondem apenas à glicose e à frutose, produtos da inversão da sacarose.
- Os tempos de retenção da glicose e da frutose não variam significativamente entre cada corrida, mesmo para os produtos da inversão da sacarose durante a corrida.

Desta forma, para o novo método de integração para mistura de açúcares foi estabelecido que a glicose fosse integrada entre os tempos 8,77 e 9,35 minutos, enquanto que a frutose seria integrada entre os tempos 9,35 e 10,50 minutos. A sacarose foi integrada normalmente.

Para a validação desta estratégia de integração e, consequentemente, da quantificação dos açúcares totais, foi realizada uma comparação da quantificação dos açúcares no xarope de cana-de-açúcar utilizando duas colunas diferentes, a

HPX-87H (normalmente utilizada para quantificação de produtos de fermentação) e a HPX-87C (utilizada para quantificação de açúcares). A coluna HPX-87C utiliza uma fase móvel neutra (água) e permite a separação de açúcares. Entretanto esta coluna não permite a separação de ácidos orgânicos ou álcoois. Na Figura 8 pode ser observado o perfil cromatográfico de um padrão de sacarose. Nota-se que no cromatograma aparece um único pico correspondente à sacarose sem a inversão durante a corrida.

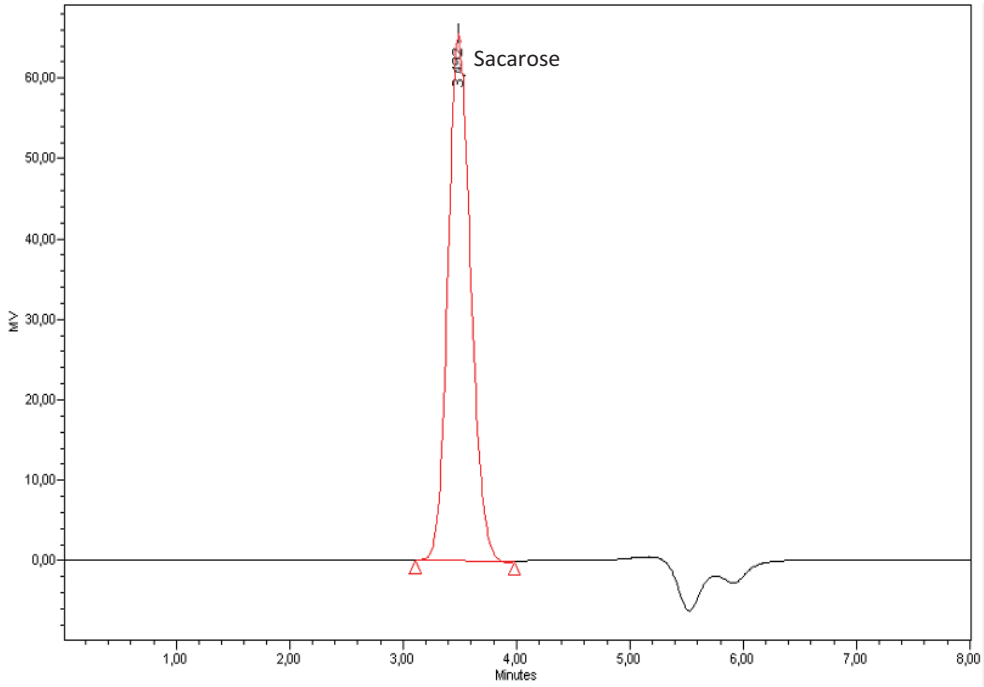

Figura 8: Perfil cromatográfico de uma solução de sacarose na coluna HPX-87C. Fase móvel H_2O, pH 7. Pico em vermelho: Sacarose.

O método foi testado pela comparação de quatro médias amostrais do xarope de cana-de-açúcar. Este xarope de cana-de-açúcar foi o mesmo utilizado para a realização dos delineamentos experimentais Plackett & Burman (PB) e o delineamento composto central rotacional (DCCR) segundo o item 4.8. A comparação das médias é apresentada na Tabela 11.

Tabela 11: Comparação da quantificação dos açúcares totais no xarope de cana-de-açúcar utilizando a coluna HPX-87H (fase móvel com pH ácido) e a coluna HPX-87C (fase móvel com pH neutro)

Delineamento experimental	Amostra	HPX-87H		HPX87-C	
		Concentração de açúcar total (g/L)	Desvio padrão	Concentração de açúcar total (g/L)	Desvio padrão
PB	I1-I5[A]	638,1	18,4	636,5	17,3
	C1-C3[B]	617,7	10,4	617,1	13,9
DCCR	I1-I5[C]	630,5	16,6	622,8	18,9
	C1-C3[D]	606,5	27,1	600,2	34,8

Amostras comparadas pelo teste estatístico t-student com uma significância de 5%. : A, t=0.13 e n=10. B, t=0,06 e n=6. C, t=0,68 e n=10. D, t=0,25.e n=6. $t_{(4;0,05)}$=2,78. $t_{(8;0,05)}$=2,31

Pela Tabela 11 pode ser observado que não há diferença estatística significativa entre a quantificação com o método de integração para mistura de açúcares na coluna HPX-87H e o método de integração normal na coluna HPX-87C.

Desta forma foi adequado um método de quantificação de açúcares totais para amostras com mistura de açúcares como caldo de cana-de-açúcar ou xarope de cana-de-açúcar (considerando para este trabalho como mistura de açúcares a mistura de sacarose, glicose e frutose unicamente). Este método foi utilizado para quantificação de açúcares do xarope de cana-de-açúcar e caldo de cana-de-açúcar.

5.2. Seleção de linhagens de *Propionibacterium acidipropionici*

O ácido propiônico pode ser produzido por diferentes micro-organismos, destacando-se a espécie *P. acidipropionici* (Colomban et al., 1993; Himmi et al., 2000). Entretanto, na literatura podem ser encontrados estudos com 3 linhagens de *P. acidipropionici: P. acidipropionici ATCC 4875* (Suwannakham et al., 2006; Zhang and Yang, 2009a), *P. acidipropionici ATCC 25562* (Barbirato et al., 1997;

Himmi et al., 2000) e *P. acidipropionici ATCC 4965* (Colomban et al., 1993; Coral et al., 2008). No entanto, pouco é explicado sobre as diferenças de desempenho que existem entre estas linhagens. Por isso, foi necessário avaliar experimentalmente as diferenças entre estas linhagens para escolher aquela que apresenta o melhor perfil fermentativo para produção de ácido propiônico.

As linhagens *P. acidipropionici ATCC 4875, P. acidipropionici ATCC 25562 e P. acidipropionici ATCC 4965* foram comparadas através de cultivos em fermentador utilizando meio cultura e condições de controle intermediárias, segundo a literatura (Coral et al., 2008; Himmi et al., 2000; Suwannakham and Yang, 2005). Como é mostrado na Tabela 12, parâmetros da fermentação foram calculados e comparados. Foram encontradas basicamente três diferenças entre as linhagens: no rendimento, na produtividade volumétrica e no crescimento celular (expresso em concentração de massa seca final).

A linhagem *P. acidipropionici* 4875 apresentou um rendimento de 45% (m/m), o maior dentre as linhagens. Este rendimento foi significativamente maior do que a linhagem *P. acidipropionici 25562,* que apresentou um rendimento médio de 42% (m/m). Já a *P. acidipropionici* 4965 não apresentou diferença estatisticamente significativa com as outras duas linhagens em estudo. Na Figura 9 podem ser melhor visualizadas estas diferenças.

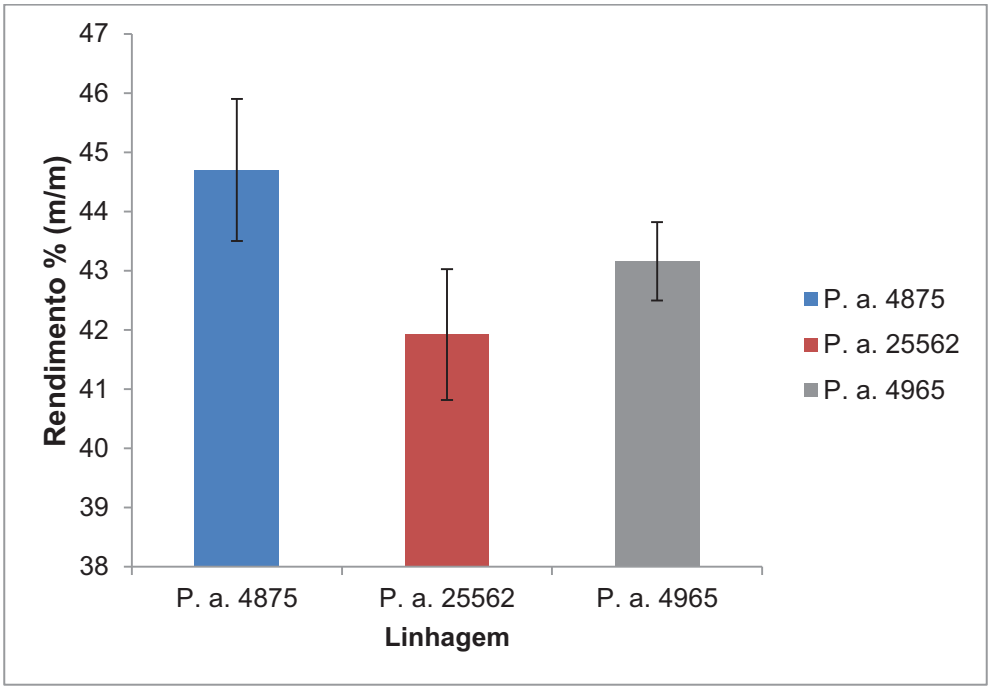

Figura 9: Comparação do rendimento do ácido propiônico de três linhagens de *P. acidipropionici.*

Para a produtividade volumétrica, a linhagem *P. acidipropionici 4875,* apresentou um valor de 0,19 g/L.h, valor que representa 12% de diferença com os 0,17 g/L.h obtidos para a *P. acidipropionici 4965* e 58% de diferença com 0,12 g/L.h da linhagem *P. acidipropionici 25562*. Assim pode ser notada a significativa diferença entre as linhagens, principalmente, da linhagem *P. acidipropionici 4875* com a linhagem *P. acidipropionici 25562*. Novamente, a linhagem *P. acidipropionici 25562* apresentou desempenho inferior. Estas diferenças podem ser visualizadas na Figura 10.

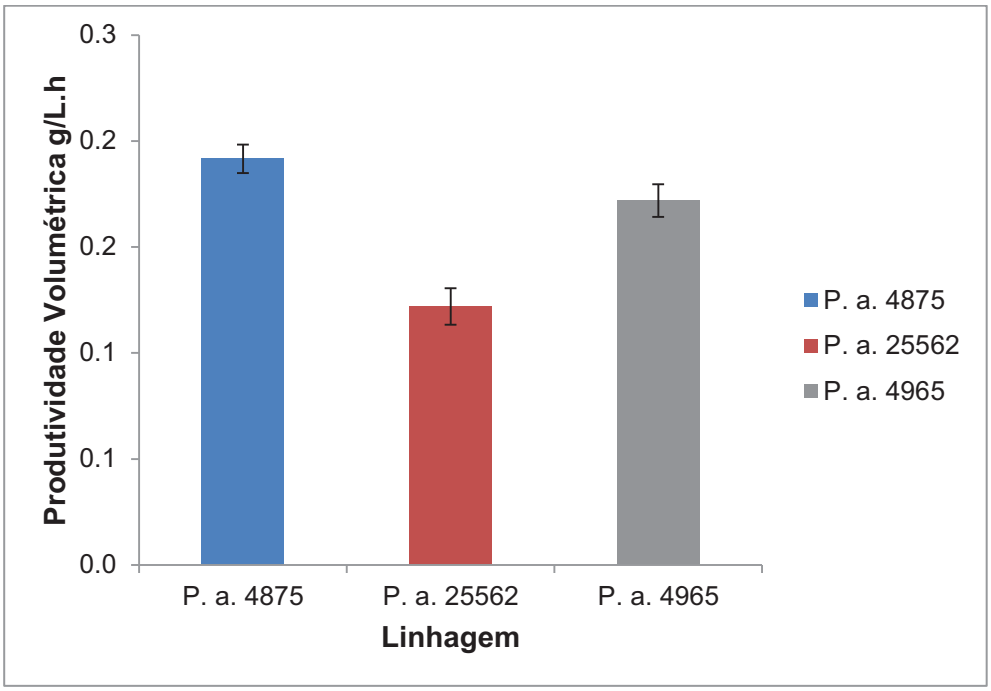

Figura 10: Comparação da produtividade volumétrica do ácido propiônico de três linhagens de *P. acidipropionici*

Um fenômeno interessante foi observado quando se comparou o crescimento celular. A linhagem 4965 apresentou um crescimento muito superior às outras linhagens. Isto foi observado primeiramente na curva de crescimento (Figura 11-A) quando a densidade óptica desta linhagem atingiu um valor de 13,4, enquanto que as linhagens *P. acidipropionici* 25562 e 4875 atingiram apenas 8,4 e 8,2, respectivamente. Pela concentração de massa seca final (Figura 11-B)

confirmou-se essa observação. Uma concentração celular de 7 g/L para *P. acidipropionici* 4965 contra 5 g/L e 4 g/L das linhagens *P. acidipropionici* 25562 e 4875, respectivamente. Este valor representa um crescimento até 76% maior quando comparado com as outras duas linhagens estudadas. É importante salientar o fato de que esta linhagem foi capaz de crescer muito mais do que as outras linhagens sem afetar o rendimento. Em alguns casos envolvendo diferentes micro-organismos, o maior crescimento celular é indiretamente proporcional ao rendimento, pois o microrganismo desvia o carbono disponível para a formação de biomassa, diminuindo a formação do produto de interesse. Neste caso, para a linhagem *P. acidipropionici 4965*, isto não aconteceu.

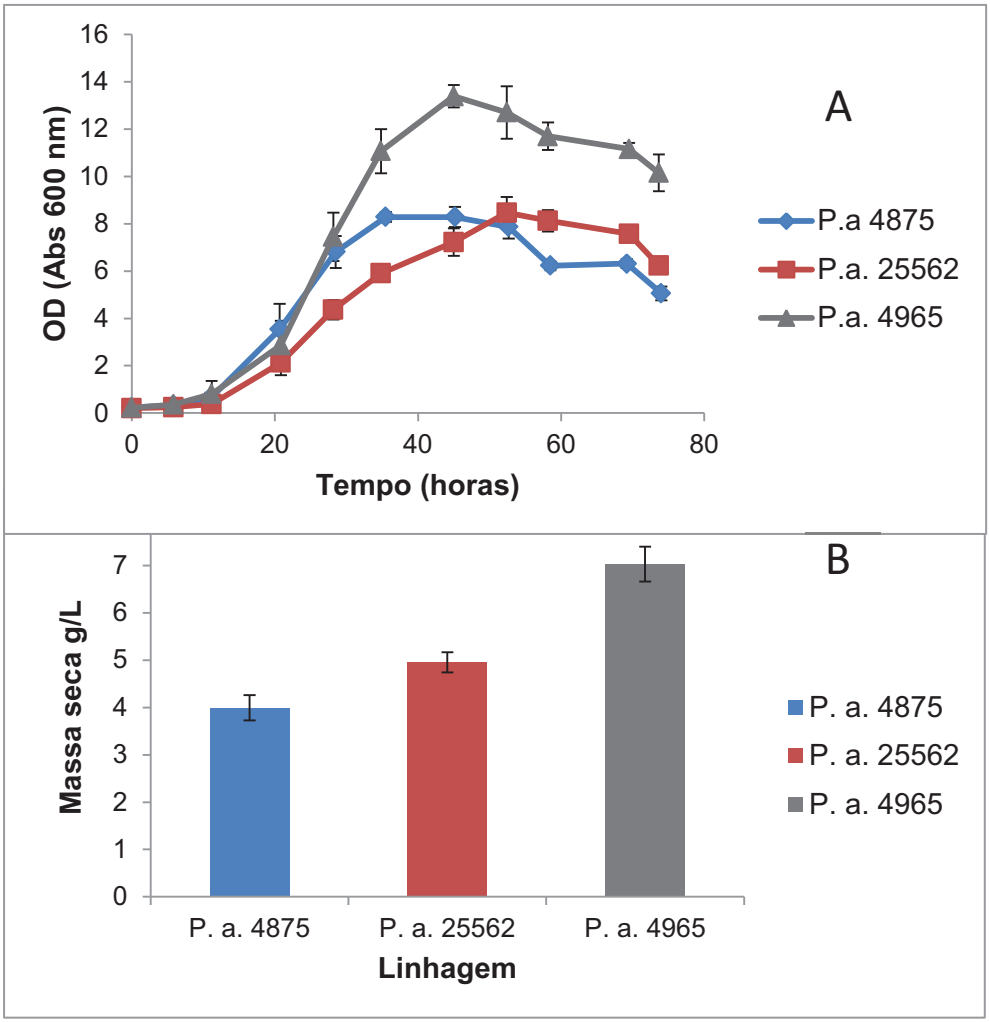

Figura 11: Comparação do crescimento celular das 3 linhagens. A, comparação das curvas de crescimento expressadas em densidade óptica (OD). B, comparação da concentração de massa

seca g/L.

Na Tabela 12 são mostrados todos os parâmetros avaliados neste experimento comparativo. Observa-se que a relação molar P:A (ácido propiônico:ácido acético), não apresentou diferenças entre as linhagens e foi na média de 2,7:1, um valor superior à relação molar teórica (2:1) relatada na literatura (Barbirato et al., 1997; Himmi et al., 2000). Entretanto a relação molar P/S (ácido propiônico/ácido succínico) apresentou uma média de 44:1.

Tabela 12. Comparação do desempenho produtivo entre as linhagens *P. acidipropionici* 4875, 25562 e 4965.

Linhagem	Substrato (g)	Ac. Propiônico (g)	Ac. Acético (g)	Ac, Succínico (g)	Relação P:A[o]	Relação P:S[o]	Rendimento, % (m/m) [1o*]	Produtividade volumétrica (g/L.h) [2o*]	Massa seca (g/L) [3o*]
***P. a.* 4875**	19,87 ± 0,43	8,88 ± 0,34	2,68 ± 0,12	0,40 ± 0,02	2,69 ± 0,13	35,35 ± 1,46	44,7 ± 1,19	0,19 ± 0,00	3,99 ± 0,26
***P. a.* 25562**	19,41 ± 0,79	8,14 ± 0,47	2,43 ± 0,20	0,30 ± 0,06	2,72 ± 0,07	44,20 ± 8,62	41,92 ± 1,10	0,12 ± 0,00	4,95 ± 0,21
***P. a.* 4965**	20,06 ± 0,55	8,66 ± 0,36	2,61 ± 0,18	0,27 ± 0,08	2,69 ± 0,07	53,61 ± 12,14	43,16 ± 0,66	0,17 ± 0,00	7,03 ± 0,36

[o] Avaliados estatisticamente pelo teste de Tukey com um nível de significância de 0,05. *Pelo teste de Tukey foram encontrados como diferentes com 0,05 de significância. [1] Parâmetros diferentes significativamente mas só nas linhagens P. a. 4875 e P. a. 25562. [2,3] Para estes parâmetros todas as linhagens apresentaram diferença significativa.

Desta forma, após a análise dos resultados, pode-se perceber que apesar de serem micro-organismos da mesma espécie, existem notáveis diferenças entre as suas linhagens. Uma vez que se procura atingir altos níveis de desempenho fermentativo, o primeiro passo é escolher a linhagem que apresente melhor perfil produtivo. Baseado na comparação do rendimento e da produtividade volumétrica, a linhagem *P. acidipropionici* 4875, foi a que apresentou um melhor desempenho fermentativo. Logo, essa linhagem foi selecionada para as próximas etapas do trabalho.

Já a linhagem *P. acidipropionici* 25565 foi a que apresentou os menores valores nos parâmetros estudados. A diferença mais importante foi na produtividade volumétrica que foi 58% menor em relação à linhagem mais produtiva. Isto indica que, nas condições testadas, esta linhagem é menos eficaz para realizar a conversão do substrato no produto.

Um resultado interessante foi o observado no crescimento celular da linhagem *P. acidipropionici* 4965. Esta linhagem apresentou uma leve diminuição na produtividade volumétrica (12%) em relação a *P. acidipropionici* 4875, mas em contrapartida apresentou um crescimento celular muito superior (76%). Isto sugere uma maior eficiência no aproveitamento do carbono disponível, pois isto aconteceu sem uma diminuição significativa no rendimento. Embora esta característica não tenha causado efeito positivo no desempenho da fermentação, sem dúvida pode ser considerada como uma vantagem quando o objetivo é a produção de biomassa.

Finalmente, é importante mencionar a relação P:A encontrada nestes experimentos. A relação molar teórica de P:A é de 2:1 a partir de glicose, no entanto, foi observada uma relação de 2,7:1 a qual indica que essa relação pode variar em função da concentração do substrato. Provavelmente para concentrações menores de substrato a relação poderia ser superior já que normalmente, em concentrações maiores de substrato a relação P:A se ajusta ou fica bastante próxima à relação teórica (2:1).

5.3. Análise comparativa de meio de cultura contendo extrato de levedura e

peptona como fontes de nitrogênio

A fonte de nitrogênio é um importante componente na formulação de um meio de cultura. Para produção de ácido propiônico, na literatura, são utilizadas diferentes fontes de nitrogênio. A maioria dos autores utiliza fontes de nitrogênio orgânicas em diferentes concentrações como extrato de levedura, triptona, peptona e $(NH_4)_2HPO_4$ (Barbirato et al., 1997; Coral et al., 2008; Ramsay, 1998). Em bactérias do gênero *Propionibacterium* é descrito que o nitrogênio orgânico no meio de cultura melhora o crescimento, pois este é mais rapidamente incorporado nas vias de formação de proteínas. (Vorobjeva, 1999). Por tal motivo, a estratégia escolhida para obter respostas superiores no desempenho fermentativo, foi a utilização de fontes orgânicas de nitrogênio no meio de cultura. Assim, uma vez determinados pontos ótimos no desempenho fermentativo utilizando fontes de nitrogênio orgânico, estas podem, em um trabalho futuro, ser reduzidas ou substituídas por outras fontes de nitrogênio alternativas de menor custo para melhorar a viabilidade econômica do processo sem alterar o desempenho da fermentação.

Geralmente utiliza-se extrato de levedura, peptona e triptona em concentrações que variam desde 5g/L até 15 g/L (Barbirato et al., 1997; Coral et al., 2008) . Alguns trabalhos utilizam combinações de extrato de levedura (10 g/L) e triptona (5 g/L) (Barbirato et al., 1997; Himmi et al., 2000; Suwannakham et al., 2006), extrato de levedura (2.5 g/L) e peptona (5 g/L) (Ramsay, 1998) ou mesmo combinações de extrato de levedura (10 g/L) e $(NH_4)_2HPO_4$ (2,5 g/L) (Coral et al., 2008). No entanto para simplificar a composição do meio de cultura e evitar adicionar novas variáveis ao processo foi necessário escolher apenas uma fonte de nitrogênio. Neste sentido o extrato de levedura foi escolhido pelo menor custo e por apresentar dentro da sua composição outros micronutrientes, tais como a vitamina B5 e B1, os quais enriquecem o meio de cultura. Entretanto, na literatura as fontes de nitrogênio são utilizadas em combinações e em diferentes concentrações, porém nenhuma referência justifica a utilização do extrato de levedura e peptona ou apenas um deles nos meios de cultura. Sendo assim, com este experimento procurou-se responder se a utilização da peptona resultaria em

alguma diferença no rendimento e na produtividade volumétrica, que são os principais parâmetros indicadores de desempenho fermentativo.

A comparação foi realizada utilizando cinco meios: o meio sintético (MS), o caldo de cana completo (CC), o xarope completo (XC), o xarope com extrato de levedura (XYC) e o caldo de cana com extrato de levedura (CYC). O meio sintético (MS) representa um meio de cultura normal com a mistura de fontes de nitrogênio. O cultivo nesse meio foi realizado em triplicata para avaliar a reprodutibilidade experimental. O caldo de cana completo (CC) e o xarope completo (XC) diferem do meio MS por não possuírem sacarose comercial como fonte de carbono, e sim uma mistura de açúcares procedentes do caldo de cana-de-açúcar e do xarope de cana-de-açúcar respectivamente. Os meios de xarope com extrato de levedura (XYC) e caldo de cana com extrato de levedura (CYC) possuem em sua composição apenas extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Na Figura 12 é apresentado o perfil de crescimento das culturas avaliadas. Pelas curvas de crescimento celular pode ser observado que as culturas CC e CYC, assim como as XC e XYC, não apresentam diferença significativa aparente. Ambas as culturas CC e CYC alcançaram uma concentração de massa seca igual a 10,86 g/L, enquanto que as culturas XC e XYC alcançaram 9,56 g/L e 9,44 g/L, respectivamente. Assim poder ser inferido, pelo crescimento, que não apresentaram diferença significativa. Um ponto interessante deste experimento é que apesar de ter aproximadamente a mesma concentração de açúcar disponível assim como todos os outros componentes do meio de cultura, aqueles meios que contem caldo e xarope de cana apresentaram um maior crescimento celular. Provavelmente os micronutrientes contidos nestes substratos favorecem o crescimento.

.

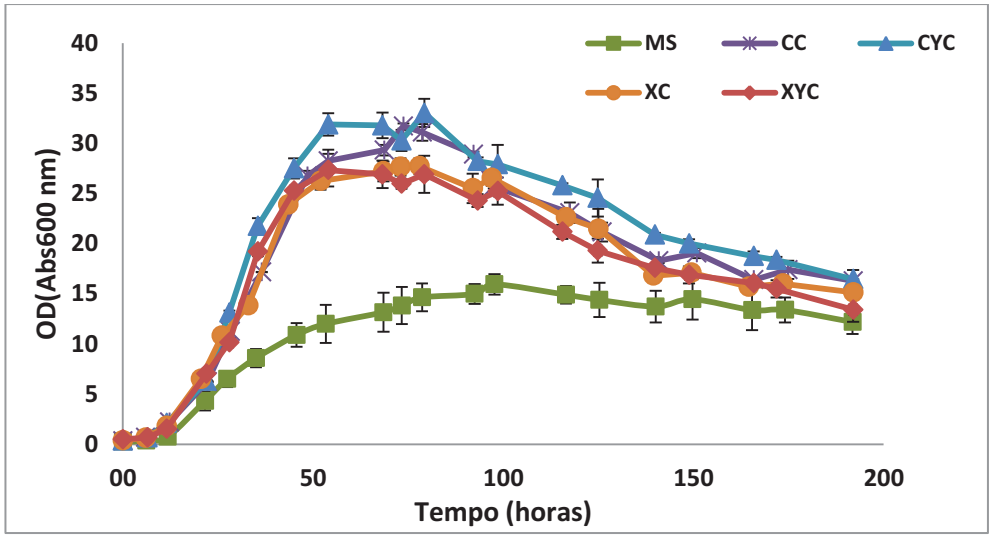

Figura 12: Comparativo do perfil de crescimento das culturas contendo peptona e extrato de levedura ou só extrato de levedura. MS, meio sintético. CC, meio caldo de cana completo contendo extrato de levedura e peptona. XC, meio xarope de cana completo contendo extrato de levedura e peptona. CYC, meio caldo de cana completo contendo apenas extrato de levedura. XYC, meio xarope de cana completo contendo apenas extrato de levedura.

Na Tabela 13 são mostrados em detalhes os parâmetros dos cultivos. Observa-se que o rendimento para o ácido propiônico não apresentou diferença significativa entre os meios de cultura, indicando que a eficiência na transformação de substrato no produto não é afetada quando são utilizados peptona e extrato de levedura ou apenas extrato de levedura.

Uma situação similar é o caso da produtividade volumétrica para os meios CC, CYC, XC e XYC. Para todos estes, a produtividade volumétrica apresentou um valor constante de 0,22 g/L.h. Isto permite inferir que a velocidade na transformação do substrato no produto, pelo micro-organismo, não é afetada pelas diferenças nas fontes de nitrogênio. Para o meio MS, a produtividade volumétrica apresentou-se levemente menor do que para os outros meios avaliados. Isto, assim como o crescimento celular, indica vantagens dos meios baseados em caldo e xarope de cana-de-açúcar sobre o meio sintético. Outro fato interessante é a diferença observada no crescimento celular expressa em densidade óptica (OD) entre os meios com caldo de cana e os meios com xarope de cana. Como pode ser observado na Figura 12, os meios que contem caldo de cana apresentaram

um crescimento maior do que os meios que contem xarope de cana. Esse resultado também é verificado pela massa seca final das culturas (Tabela 13), que atingiu 11,28 g/L nos meios com caldo de cana e 9,56 g/L nos cultivos com xarope de cana. . Isso pode ser devido à presença de inibidores como o hidroximetilfurfural (HMF), subproduto que pode ser gerado quando o caldo de cana é submetido a altas temperaturas nos evaporadores para concentração (gerando o xarope). O HMF é descrito na produção de etanol por *S. cerevisiae* como responsável por diminuir a produtividade volumétrica, o rendimento e o crescimento celular da levedura (Almeida et al., 2007).

Assim foi estabelecido que, nas condições avaliadas, o extrato de levedura suporta o crescimento celular e principalmente a produção de ácido propiônico. Em função deste resultado, nas próximas etapas de otimização, foi utilizado apenas extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Tabela 13: Comparativo do efeito da utilização da fonte de nitrogênio. MS, cultura realizada em meio sintético e em triplicata. A triplicata foi realizada para avaliar a reprodutibilidade experimental. Todos os parâmetros apresentaram uma variação inferior aos 5%, exceto para o Ac. succínico. 10%. CC e XC, culturas realizadas utilizando caldo de cana-de-açúcar e xarope de cana-de-açúcar com peptona e extrato de levedura. CYC e XYC, culturas realizadas utilizando caldo de cana-de-açúcar e xarope de cana-de-açúcar com extrato de levedura.

Cultura	Açúcar consumido (g)	Ac. Propiônico (g)	Ac. Acético (g)	Ac. Succínico (g)	Rendimento % (m/m)	Produtividade volumétrica (g/L.h)	Massa seca (g/L)
MS	60,95 ± 1,37	23,70 ± 0,36	9,13 ± 0,18	6,54 ± 0,59	38,51 ± 0,79	0,19 ± 0,009	5,96 ± 0,14
CC	56,94	20,92	8,84	6,46	36,75	0,22	10,86
CYC	56,08	21,04	7,84	4,03	37,52	0,22	11,28
XC	52,51	20,58	7,00	3,67	39,19	0,22	9,56
XYC	54,22	21,18	7,74	2,89	39,07	0,22	9,44

5.4. Seleção de fatores que influenciam o processo de produção de ácido propiônico. Planejamento Experimental Plackett & Burman (PB)

Em um sistema podem existir múltiplas variáveis e/ou fatores que influenciam o seu comportamento ou funcionamento. Da mesma forma para o processo de produção de ácido propiônico existem múltiplas variáveis que podem gerar alterações positivas ou negativas no desempenho do processo. Quando são conhecidos todos os fatores de um determinado processo é possível maximizar, minimizar ou combinar efeitos dos fatores para conseguir uma determinada resposta de interesse. Entretanto, em sistemas ou processos muito complexos como os bioprocessos, é muito difícil encontrar, conhecer ou controlar todos os fatores que os afetam, porém é possível delimitar a procura e escolher, com critério cientifico e empírico, fatores com maior possibilidade de afetarem significativamente o processo. Assim para o processo de produção de ácido propiônico, foram estudados 8 fatores: pH, temperatura, concentração de açúcar total no xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono, concentração de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, concentração de fosfato, concentração de micronutrientes, velocidade de agitação e concentração de inóculo. Para a triagem destes 8 fatores, a determinação da sua significância e dos seus respectivos efeitos no processo de produção de ácido propiônico foi aplicada a metodologia de Plackett & Burman (Plackett and Burman, 1946).

Como é explicado no item 4.9.3, todas as culturas foram monitoradas periodicamente em intervalos de 8 horas aproximadamente, gerando curvas completas da cinética de cada uma das culturas realizadas. Consumo dos substratos (sacarose, glicose e frutose), produção dos produtos da fermentação (ácido propiônico, ácido acético e ácido succínico) e o crescimento celular (densidade óptica) foram monitorados. Como exemplo, na Figura 13 é apresentada a cinética de um dos ensaios realizados no delineamento PB.

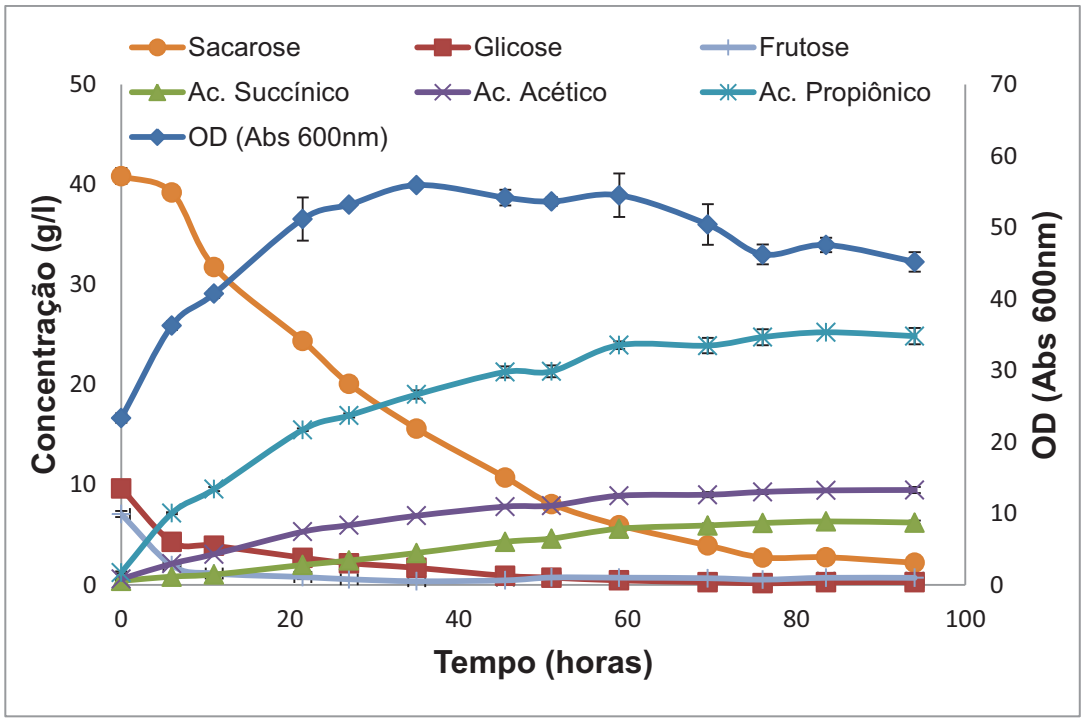

Figura 13. Ensaio PB15. Cinética de uma fermentação. Em todas as culturas foi monitorado o consumo da sacarose, glicose e frutose e a produção do ácido propiônico, ácido acético e ácido succínico.

5.4.1. Análise da reprodutibilidade

Segundo o item 4.9 foram realizados 12 experimentos para avaliação dos efeitos de cada um dos 8 fatores selecionados. Além disso, foram realizados 3 experimentos em triplicata no nível central do delineamento experimental. O intuito das réplicas, neste delineamento, é calcular a reprodutibilidade experimental. A triplicata experimental é importante, pois permite a avaliação da variação experimental das respostas. Esta avaliação é utilizada como referencia da reprodutibilidade para os outros experimentos que são realizados sem réplicas experimentais. Na Tabela 14 são apresentadas as respostas no nível central dos fatores avaliados no delineamento experimental PB.

Tabela 14: Análise da reprodutibilidade experimental utilizando a triplicata experimental nos níveis centrais do delineamento PB.

	Rendimento % (m/m)	Produtividade Volumétrica g/L.h	RMS %
Média	44,24	0,30	86,94
Desvio padrão	0,54	0,01	0,59
CV %	1,23	4,61	0,68

CV%: Coeficiente de variação. n=3.

Observa-se que o coeficiente de variação para as três respostas é inferior a 5%, indicando uma baixa dispersão das respostas em relação às médias. Este valor foi utilizado como referência quando foram analisadas as respostas dos ensaios realizados sem réplica experimental. Portanto, qualquer valor das respostas dos ensaios deste delineamento experimental, cuja variação for inferior à variação encontrada para as respostas do ensaio com réplica experimental, não foi considerado como significativo.

Neste tipo de análise é fundamental garantir a reprodutibilidade experimental, pois isso permite uma análise confiável e garante a veracidade dos resultados. A Figura 14 ajuda na visualização da reprodutibilidade experimental, na qual é mostrada a distribuição de carbono nos ácidos produzidos no final dos ensaios repetidos no nível central do delineamento. As porcentagens dos três ácidos produzidos no final da fermentação apresentam-se constantes nos 3 ensaios. Nota-se claramente a repetitividade para os três ensaios.

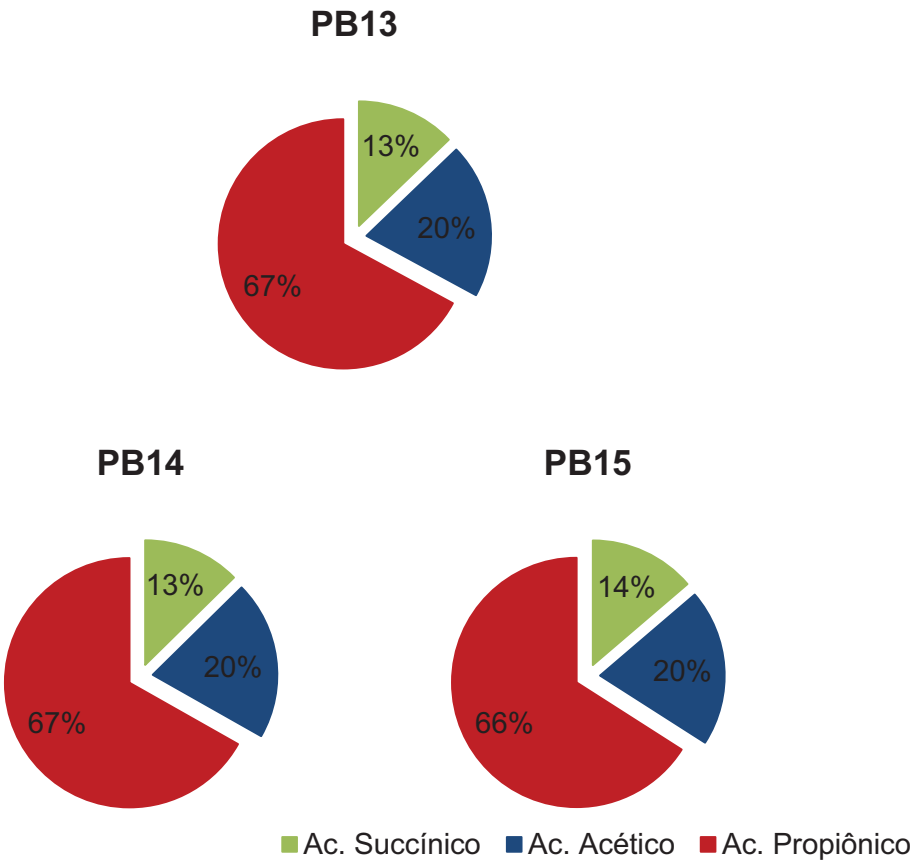

Figura 14: Distribuição do carbono nos ácidos produzidos no ensaio realizado em triplicata. A reprodutibilidade experimental é evidenciada na distribuição do carbono para cada produto da fermentação.

5.4.2. Análise do delineamento experimental PB

O delineamento experimental Plackett & Burman é uma ferramenta utilizada para determinar a significância dos efeitos de múltiplos fatores em um determinado processo. No processo de produção de ácido propiônico existem diversos fatores que afetam o processo e a aplicação desta ferramenta permite a determinação sobre quais os fatores que deverão ser avaliados mais exaustivamente no processo e quais são os que deverão ser fixados por não apresentarem efeito significativo. A seguir são apresentadas as respostas obtidas para cada ensaio do delineamento PB e os 3 experimentos no nível central dos fatores. As respostas avaliadas foram: rendimento, produtividade volumétrica e menor formação de ácido succínico (RMS). Na Tabela 15 podem ser observadas

as diferenças obtidas no delineamento. Para o rendimento, os valores da resposta variaram entre 40% e 48%, para a produtividade volumétrica variaram entre 0,12 g/L.h e 0,47 g/L.h e para a resposta de menor formação de ácido succínico (RMS) variaram entre 77% e 94%. Estes valores contrastantes são um indicador de que os fatores escolhidos para serem avaliados apresentam influência importante no processo. A seguir serão discutidos os efeitos obtidos para cada fator avaliado no delineamento PB. Todos os fatores foram avaliados em nível de significância de 0,1 ou em um nível de confiança de 90% segundo as recomendações de Rodrigues e Iemma (Rodrigues and Iemma, 2009).

Tabela 15: Respostas obtidas para cada ensaio segundo o delineamento experimental Plackett e Burman. 12 ensaios únicos e 3 réplicas no nível central.

Ensaios	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	Rendimento, % (m/m)	Produtividade Volumétrica (g/L.h)	RMS, %
PB1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	45,69	0,12	84,07
PB2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	48,12	0,47	94,38
PB3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	42,67	0,13	85,13
PB4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	44,10	0,33	88,52
PB5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	47,36	0,47	93,85
PB6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	44,86	0,24	88,94
PB7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	46,18	0,23	88,97
PB8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	41,15	0,18	84,44
PB9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	45,96	0,26	87,34
PB10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	48,51	0,24	89,15
PB11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	40,21	0,15	79,79
PB12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	40,86	0,12	84,07
PB13	0	0	0	0	0	0	0	0	44,59	0,28	87,18
PB14	0	0	0	0	0	0	0	0	43,61	0,31	87,37
PB15	0	0	0	0	0	0	0	0	44,51	0,31	86,26

5.4.2.1. Análise: resposta rendimento

O rendimento pode ser definido como a eficiência da conversão do substrato no produto, ou seja, que massa de produto é produzida a partir de uma determinada massa de substrato ou fonte de carbono. Na Tabela 16 são apresentados a média e os efeitos encontrados para cada fator estudado.

Tabela 16: Efeitos estimados de cada fator para a resposta rendimento.

	Efeitos	Erro Padrão.	t(6)	p - valor
Média	44,69	0,66	68,07	0,00
Curvatura	0,45	2,63	0,17	0,87
Temp.*	3,49	1,31	2,66	0,04
pH	-0,03	1,31	-0,03	0,98
[Substrato]	-1,61	1,31	-1,23	0,27
[EL]	1,13	1,31	0,86	0,42
[Inoc]	0,78	1,31	0,60	0,57
Agit.	0,11	1,31	0,08	0,94
[MicroN]	-0,13	1,31	-0,10	0,92
[KH2PO4]	-0,73	1,31	-0,55	0,60

p<0.1. * Efeito estatisticamente significativo.

Pode ser observado, na Tabela 16, que o único fator estatisticamente significativo para a resposta rendimento é a temperatura, indicando a importância deste fator no rendimento. A temperatura exerce um papel importante no crescimento dos micro-organismos. À medida que se aumenta a temperatura as reações químicas e enzimáticas das células poderiam ser mais rápidas e o crescimento seria acelerado (Madigan et al., 2002). O efeito positivo da temperatura permite inferir uma relação diretamente proporcional do rendimento em ácido propiônico com a temperatura (maior temperatura maior rendimento em ácido propiônico).

5.4.2.2. Análise: resposta produtividade volumétrica

Em um processo, a velocidade de produção, é um fator determinante para a viabilização econômica do mesmo. A produtividade volumétrica é uma forma de expressar a velocidade em que o produto é formado. Esta resposta juntamente ao

rendimento são dois dos mais importantes parâmetros utilizados para determinar o desempenho de um processo. Em um bioprocesso, a produtividade volumétrica está diretamente relacionada ao micro-organismo, ao meio e ao tipo de cultivo. Na Tabela 17 são apresentados os efeitos calculados para esta resposta.

Tabela 17: Efeitos estimados de cada fator para a produtividade volumétrica.

	Efeitos	Erro Padrão.	t(6)	p – valor
Média	0,24	0,00	66,35	0,00
Curvatura	0,11	0,02	6,78	0,00
Temp.*	0,13	0,01	17,59	0,00
pH*	0,07	0,01	9,69	0,00
[Substrato]*	-0,08	0,01	-10,88	0,00
[EL]*	0,16	0,01	21,05	0,00
[Inoc]*	0,01	0,01	2,02	0,10
Agit.	-0,01	0,01	-1,25	0,27
[MicroN]*	-0,03	0,01	-3,77	0,01
[KH2PO4]*	-0,02	0,01	-2,59	0,05

p<0.1. * Efeito estatisticamente significativo

Para esta resposta, 7 dos 8 efeitos avaliados, são estatisticamente significativos. A temperatura apresentou-se como fator importante no processo, desta vez especificamente na velocidade de produção de ácido propiônico e com um efeito positivo. O pH apresentou um efeito positivo inferindo que o pH próximo ao nível superior avaliado poderia induzir melhorias na produtividade. Por outro lado o fator concentração de substrato, como era esperado, apresentou um efeito negativo na produtividade, pois quanto maior a concentração de substrato disponível maior será o tempo para que este seja consumido. A concentração de extrato de levedura apresentou um efeito positivo para a produtividade volumétrica demonstrando a importância da fonte de nitrogênio para este parâmetro. A concentração de inóculo apresentou também um efeito positivo, evidentemente porque quanto maior concentração de micro-organismos menor será o tempo de consumo de todo o substrato. Finalmente a concentração de micronutrientes e a concentração de fosfato de potássio apresentaram também um efeito significativo,

porém estes foram negativos para ambos os fatores. Isto permite inferir que provavelmente o xarope de cana-de-açúcar possui na sua composição, a concentração suficiente de fósforo e micronutrientes para suportar a cultura. A velocidade de agitação, nas faixas estudadas, não apresentou efeito estatisticamente significativo.

5.4.2.3. Análise: resposta de menor produção de ácido succínico (RMS)

No processo de produção de ácido propiônico por *P. acidipropionici* são também formados principalmente dois subprodutos, o ácido acético e o ácido succínico. Estes subprodutos podem ser responsáveis pela diminuição do rendimento do produto de interesse. O ácido succínico é um composto intermediário na via metabólica para a formação de ácido propiônico na *P. acidipropionici* e, portanto, poderia influenciar diretamente no rendimento final de ácido propiônico. Além disso, a presença de subprodutos no meio fermentado dificulta as etapas de separação e purificação do ácido propiônico. Na Tabela 18 são apresentados os efeitos de cada fator avaliado na RMS.

Tabela 18: Efeitos estimados de cada fator para a RMS.

	Efeitos	Erro Padrão.	t(6)	p – valor
Média	87,39	0,60	146,01	0,00
Curvatura	-0,90	2,68	-0,34	0,75
Temp.*	4,86	1,20	4,06	0,01
pH	2,25	1,20	1,88	0,12
[Substrato]	-1,42	1,20	-1,18	0,29
[EL]*	4,39	1,20	3,67	0,01
[Inoc]	1,51	1,20	1,26	0,26
Agit.	-0,54	1,20	-0,45	0,67
[MicroN]	-1,35	1,20	-1,13	0,31
[KH2PO4]	-1,79	1,20	-1,49	0,20

p<0.1. * Efeito estatisticamente significativo

Como pode ser visualizado para a RMS, a temperatura e a concentração de extrato de levedura são fatores estatisticamente significativos. A temperatura confirma nesta terceira resposta a importância no processo e também para esta

resposta resultou em um efeito positivo. A concentração de extrato de levedura também resultou em um efeito positivo, possivelmente porque na composição do extrato de levedura, além do nitrogênio, existem algumas vitaminas como o ácido pantotênico. O ácido pantotênico (vitamina B5) é precursor da Coenzima A, cofator fundamental para a conversão de ácido succínico em succinil-CoA e de propionil-CoA em ácido propiônico (Figura 1). Em *P. acidipropionici 4875,* não foram encontradas as enzimas necessárias para a síntese do ácido pantotênico (Parizzi et al., 2012, Artigo submetido), portanto, a adição desta vitamina ao meio de cultura é fundamental. Desta maneira, a carência ou limitação do ácido pantotênico poderia causar a acumulação do ácido succínico na fermentação.

5.4.3. Análise global e fatores para o próximo delineamento experimental

Demonstrou-se que a temperatura é um fator estatisticamente significativo para todas as respostas e em todas as respostas apresentou-se com um efeito positivo o qual favorece a otimização das três respostas simultaneamente sem antagonismos entre elas. Portanto este fator será estudado no próximo delineamento. Considerando o efeito positivo da temperatura, a faixa de trabalho estabelecida para o próximo delineamento foi entre 30^{o} C e 38 ^{o}C.

A concentração do extrato de levedura é um fator estatisticamente significativo com um efeito positivo para a produtividade volumétrica e para a RSM. Este fator foi também selecionado para a seguinte etapa. Considerando o efeito positivo, as faixas estabelecidas para o próximo delineamento, foram entre 10 e 25 g/L.

A concentração de substrato é um fator estatisticamente significativo só para a produtividade volumétrica. Apesar de ter apresentado um efeito negativo, a faixa de trabalho para o próximo delineamento foi estabelecida entre 47 g/L – 81 g/L. O motivo para manter este fator e ainda elevar a faixa foi de ordem técnica, pois ao trabalhar com concentrações de substrato baixas as concentrações de produto também seriam baixas. Industrialmente a concentração final do produto é de importante consideração, pois quanto maior a concentração do produto de interesse no meio fermentado mais barato será a purificação do produto. Portanto realizar o estudo em baixas concentrações de substrato poderia ser pouco

aplicável para um futuro escalonamento. Assim foi considerado que estudar o comportamento do micro-organismo em maiores concentrações de substrato traria informações mais úteis ao projeto.

O pH foi encontrado como significativo só para a produtividade volumétrica mas como a faixa estudada já foi bastante restrita, o pH não será estudado no próximo delineamento. Como este exerceu um efeito positivo para a produtividade volumétrica, o valor será fixado em 7 no próximo delineamento.

A concentração de inóculo na faixa estudada também apresentou um efeito significativo para a produtividade volumétrica. Este foi um efeito esperado, pois quanto maior concentração de bactéria maior será a velocidade de consumo de substrato e mais rápida a formação do produto. Como este fator não apresentou efeito para o rendimento nem a RMS, a concentração do inóculo foi fixada no valor do nível central, 30 g/L, para o próximo delineamento.

Os fatores concentração de micronutrientes e concentração de fosfato de potássio não serão estudados no próximo delineamento. Estes apresentaram efeito negativo na produtividade volumétrica e não apresentaram efeito estaticamente significativo para as outras duas respostas. As baixas concentrações necessárias destes componentes para a cultura devem estar sendo supridas pelo xarope de cana-de-açúcar industrial utilizado nos ensaios.

Finalmente a velocidade de agitação, na faixa estudada, não apresentou efeito estatisticamente significativo para nenhuma resposta. Este fator foi fixado no nível central para o próximo delineamento, em 200 rpm.

5.5. Estudo de otimização para a produção de ácido propiônico. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Como resultado do delineamento Plackett & Burman, descrito no item anterior, concluiu-se que a temperatura, a concentração de extrato de levedura e a concentração de substrato (xarope de cana-de-açúcar) exercem efeito significativo nas respostas avaliadas. Desta forma, realizou-se o delineamento composto central rotacional (DCCR), visando encontrar ou aproximar aos níveis ótimos de cada fator para que fosse construído um modelo matemático para as respostas

avaliadas. Neste delineamento foi também avaliada a resposta Yx/s que quantifica o rendimento da biomassa produzida em função do substrato.

5.5.1. Análise da reprodutibilidade

Da mesma maneira que para o delineamento anterior, a reprodutibilidade experimental foi avaliada através de réplicas experimentais no nível central dos fatores avaliados. Na Tabela 19, são mostradas as respostas para as réplicas no nível central.

Tabela 19: Análise da reprodutibilidade experimental utilizando as réplicas experimentais nos níveis centrais do DCCR

	Rendimento, % (m/m)	Produtividade Volumétrica (g/L.h)	RMS (%)	Yx/s (%)
Média	47,94	0,55	93,94	17,65
Desvio padrão	0,16	0,01	0,55	0,52
CV %	0,33	2,32	0,58	2,94

CV%: Coeficiente de variação. n=3.

Pode-se notar, mais uma vez, que para todas as respostas os coeficientes de variação são inferiores a 5%, caracterizando assim uma aceitável reprodutibilidade experimental.

Diferente do delineamento Plackett & Burman, as respostas para o delineamento DCCR foram menos contrastantes. Observa-se na Tabela 20 que para todas as respostas foram encontrados valores superiores quando comparados com os valores das respostas do delineamento anterior (PB). Este é um indicador de que as faixas para os fatores foram reparametrizadas adequadamente para que se aproximassem dos níveis ótimos dos fatores conseguindo assim respostas superiores.

Tabela 20: Respostas obtidas para cada ensaio do DCCR.

Ensaios	x1	x2	x3	Rendimento, % (m/m)	Produtividade volumétrica (g/L.h)	RMS (%)	Yx/s (%)
1	-1	-1	-1	45,14	0,54	93,19	15,98
2	1	-1	-1	46,92	0,57	93,55	10,14
3	-1	1	-1	46,64	0,72	92,98	23,86
4	1	1	-1	47,15	0,92	93,97	14,12
5	-1	-1	1	44,69	0,27	89,71	17,64
6	1	-1	1	46,05	0,35	89,60	12,65
7	-1	1	1	44,78	0,45	91,34	22,15
8	1	1	1	46,84	0,58	89,73	16,82
9	-1,68	0	0	43,88	0,40	94,07	18,66
10	1,68	0	0	45,77	0,49	90,41	11,68
11	0	-1,68	0	46,02	0,30	90,64	12,97
12	0	1,68	0	47,37	0,81	93,90	21,84
13	0	0	-1,68	49,25	0,78	94,86	17,39
14	0	0	1,68	48,23	0,30	88,15	17,43
15	0	0	0	47,93	0,55	93,42	17,09
16	0	0	0	48,10	0,57	94,52	18,12
17	0	0	0	47,78	0,54	93,88	17,74

5.5.2. Análise do delineamento composto central rotacional (DCCR)

5.5.2.1. Análise: resposta rendimento

O rendimento é um parâmetro importante que pode caracterizar um determinado processo para ser escalonado a nível industrial. Para a produção de ácido propiônico, após realizar o DCCR foram obtidos rendimentos que variam entre 44% e 49% (m/m), tendo como media 47%. Na Tabela 21 são apresentados os coeficientes de regressão para esta resposta

Tabela 21: Coeficientes de regressão estimados para a resposta rendimento.

	Coef. de regressão	Erro Padrão,	t(7)	p - valor
Média	47,98	0,31	153,26	0,00
(x1) Temp.*	0,65	0,15	4,43	0,00
Temp. (Q)*	-1,25	0,16	-7,70	0,00
(x2) [EL]*	0,36	0,15	2,43	0,05
[EL](Q)*	-0,59	0,16	-3,62	0,01
(x3) [Substrato]*	-0,38	0,15	-2,61	0,04
[Substrato](Q)	0,14	0,16	0,85	0,42
x1.x2	-0,07	0,19	-0,37	0,72
x1.x3	0,14	0,19	0,73	0,49
x3.x2	-0,11	0,19	-0,56	0,60

p<0,05. * Coeficiente estatisticamente significativo.

Nota-se que os três fatores exercem efeito significativo na variável. Para a temperatura e o extrato de levedura, este efeito é positivo, no entanto, o sinal negativo no termo quadrático indica que existe uma inflexão, ou seja, o aumento no valor do fator é diretamente proporcional ao incremento na resposta até um ponto determinado, além do qual um aumento no fator poderia acarrear um efeito negativo na resposta. Observa-se também que 5 dos 9 coeficientes são significativos estatisticamente. O modelo apresentado abaixo considera apenas os coeficientes significativos.

$$Rendimento\ \%\ \left(\frac{m}{m}\right) = 48{,}16 + 0{,}65(X1) - 1{,}25(X1)^2 + 0{,}36(X2) - 0{,}62(X2)^2 - 0{,}38(X3) \quad (8)$$

O modelo apresentado tem um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9242, o que indica que 92,42% da variabilidade na curva pode ser explicada pelo modelo. Para verificar a significância do modelo foi realizada também a análise de variância da regressão (ANOVA), apresentada na Tabela 22.

Tabela 22: Análise de variância (ANOVA) para o rendimento considerando o modelo com os coeficientes estatisticamente significativos (p-valor<0,05).

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F cal	p-valor
Regressão	31,41	5,00	6,28	26,86	<0,0001
Resíduos	2,57	11,00	0,23		
Total	33,98	16,00			

R^2=92,43%. $F_{5;11;0,05}$= 3,2.

Como é observado, o teste ANOVA confirma que o modelo se ajusta satisfatoriamente aos dados experimentais e explica adequadamente o comportamento do rendimento quando este é influenciado pelos fatores avaliados nas faixas estudadas. Em seguida são mostrados, na Figura 15, os gráficos de superfície de resposta e as curvas de contorno para melhor visualização dos efeitos dos fatores no rendimento.

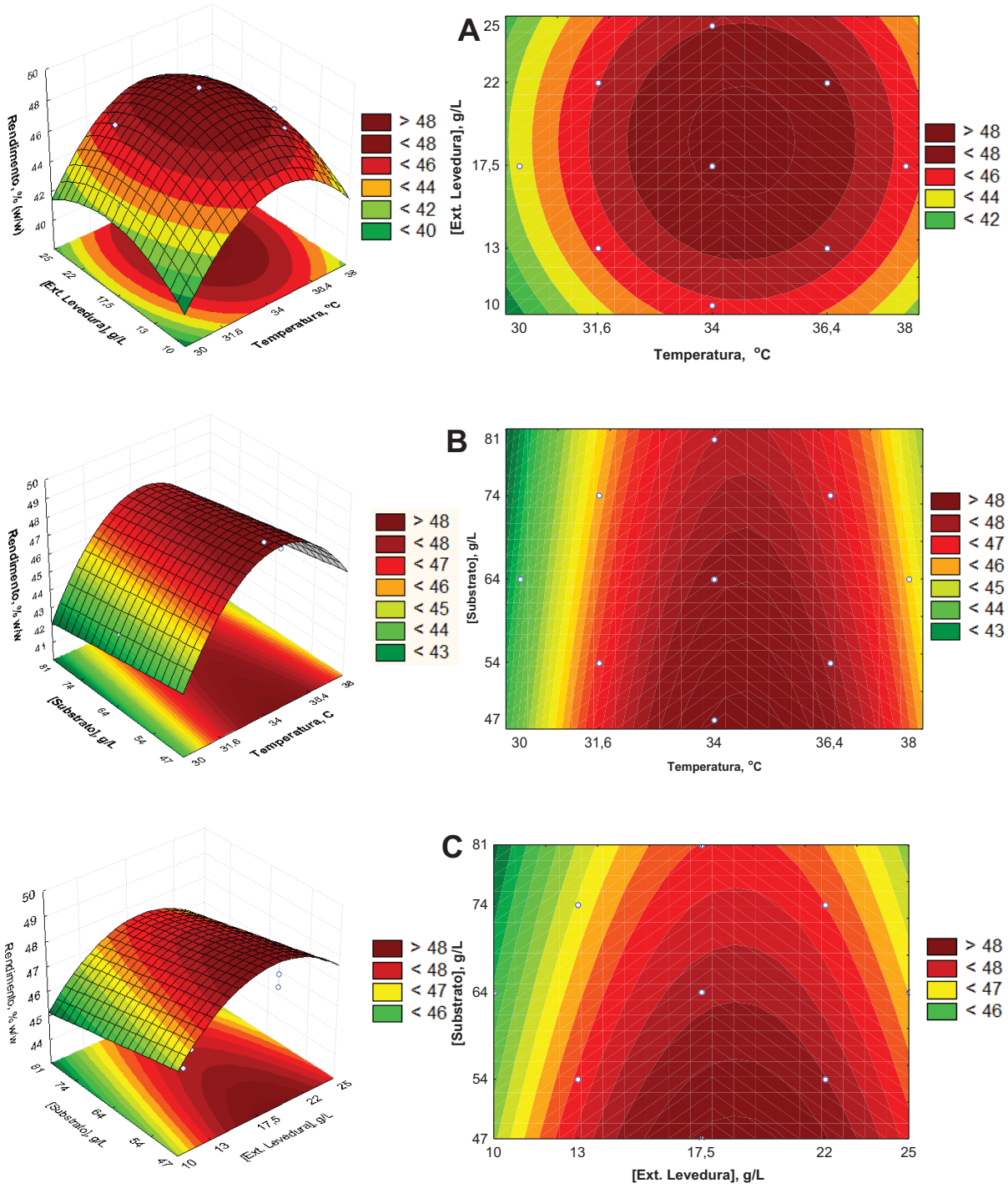

Figura 15: Superfícies de resposta e curvas de contorno para o Rendimento % (m/m). A, rendimento em função da temperatura e a concentração de extrato de levedura. B, Rendimento em função da temperatura e a concentração do xarope de cana-de-açúcar (açúcares). C, Rendimento em função da concentração do extrato de levedura e a concentração do substrato.

Na Figura 15 (A e C) é possível observar que o rendimento máximo poderia ser atingido ao redor do ponto central da temperatura e da concentração de extrato de levedura, aproximadamente entre 35 ^{o}C e 17,5 g/L respectivamente. Como é demostrado pelo efeito positivo no modelo, o rendimento é favorecido quando a temperatura é aumentada, porém quando se trabalha em temperaturas próximas de 38 ^{o}C o rendimento parece ser afetado negativamente. A concentração do extrato de levedura também apresentou um efeito positivo e significativo, mostrando a importância da abundancia de nitrogênio para esta resposta. Por outro lado, a concentração do xarope de cana-de-açúcar, mostrou ter um efeito negativo, mas é importante ressaltar que em níveis adequados de temperatura e extrato de levedura (≥34 ^{o}C e ≥17,5 g/L respectivamente), a concentração do xarope de cana-de-açúcar pode ser aumentada até 81 g/L sem gerar um grande impacto negativo no rendimento (Figura 15B e C). Isto é importante uma vez que trabalhar com maiores concentrações de xarope de cana-de-açúcar traz vantagens como maior concentração de ácido propiônico no final da fermentação e menor consumo de água para a diluição do xarope no início da fermentação.

5.5.2.2. Análise: resposta produtividade volumétrica

A produtividade volumétrica apresentou os maiores contrastes nas respostas do DCCR. Na Tabela 23 são apresentados os coeficientes de regressão.

Tabela 23: Coeficientes de regressão para a resposta Produtividade volumétrica.

	Coef. de regressão	Erro Padrão,	t(7)	p - valor
Média	0,55	0,03	21,49	0,00
(x1) Temp.*	0,04	0,01	3,54	0,01
Temp. (Q)*	-0,03	0,01	-2,17	0,07
(x2) [EL]*	0,13	0,01	11,02	0,00
[EL](Q)	0,01	0,01	0,79	0,46
(x3) [Substrato]*	-0,14	0,01	-11,68	0,00
[Substrato](Q)	0,00	0,01	0,26	0,80
x1.x2	0,03	0,02	1,66	0,14
x1.x3	0,00	0,02	-0,08	0,94
x3.x2	-0,02	0,02	-1,02	0,34

p<0,1 * Coeficiente estatisticamente significativo

Nota-se que para a produtividade volumétrica foram encontrados como estatisticamente significativos a temperatura (termo linear e quadrático), a concentração de extrato de levedura e, principalmente, a concentração de xarope de cana-de-açúcar. Assim a equação a seguir descreve a produtividade volumétrica prevista pelo modelo em função dos fatores avaliados e considerando apenas os termos estatisticamente significativos.

$$Produtividade\ volumétrica \frac{g}{L.h} = 0{,}56 + 0{,}04(x1) - 0{,}03(x1)^2 + 0{,}13(x2) - 0{,}14(x3) \quad (9)$$

Para confirmar a significância do modelo é apresentado, na Tabela 24, o teste ANOVA.

Tabela 24: Análise de variância (ANOVA) para a produtividade volumétrica considerando o modelo com os coeficientes estatisticamente significativos (p-valor<0,1).

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F cal	p-valor
Regressão	0,54	4,00	0,14	72,82	<0,0001
Resíduos	0,02	12,00	0,00		
Total	0,57	16,00			

R^2=96,04%. $F_{4;12;0,1}$= 3,18.

Analisando a Tabela 23, para a resposta produtividade volumétrica, verificamos que a regressão foi altamente significativa (p<0,0001). Além disso, o coeficiente de determinação para o modelo apresentado é 0,9604 indicando que 96,04 % da variabilidade da produtividade volumétrica pode ser explicada pelo modelo. A seguir, na Figura 16 são apresentados os gráficos de superfície de resposta e as curvas de contorno para melhor análise dos efeitos dos fatores estudados.

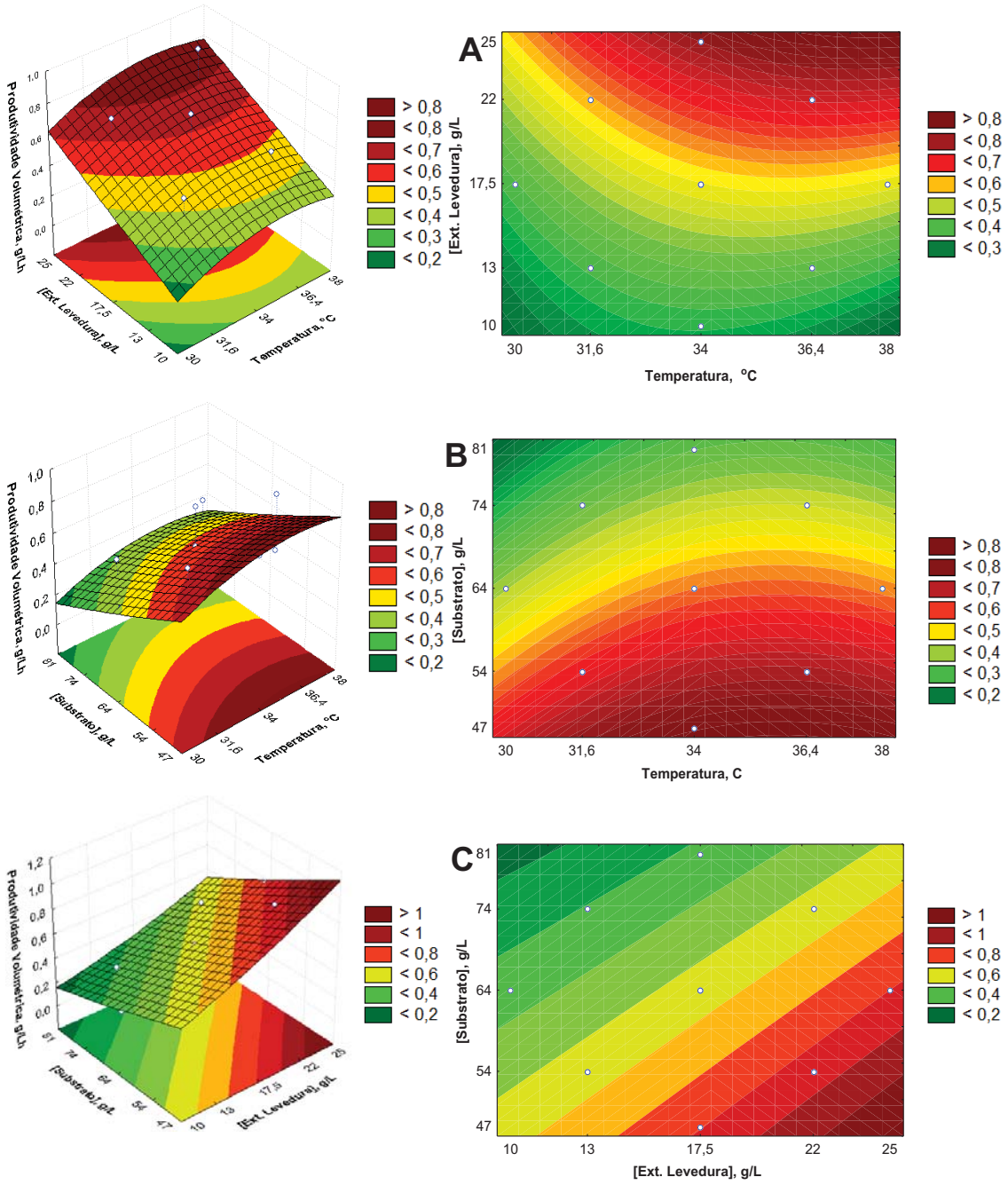

Figura 16: Superfícies de resposta (esquerda) e curvas de contorno (direita) para a produtividade volumétrica. A, produtividade volumétrica em função da temperatura e a concentração de extrato de levedura. B, produtividade volumétrica em função da temperatura e a concentração do xarope de cana-de-açúcar (açúcar total). C, produtividade volumétrica em função da concentração do extrato de levedura e a concentração do substrato.

Na Figura 16 (A e B) pode ser observado que a produtividade volumétrica é influenciada positivamente em maiores temperaturas. Os melhores valores para produtividade volumétrica, como pode ser observado no gráfico, podem ser obtidos a partir de 34 ^{o}C. Este efeito é bastante relevante porque não foi reportado nenhum resultado na literatura que afirme, infira ou demostre que a produtividade de *P. acidipropionici* 4875 para a produção de ácido propiônico é melhorada quando a temperatura é elevada.

Analisando a Figura 16 (A e C) nota-se que a produtividade volumétrica é significativamente aumentada com a concentração de extrato de levedura. Possivelmente, as concentrações adequadas e facilmente disponíveis de nitrogênio e vitaminas contidos no extrato de levedura favorecem o rápido metabolismo da bactéria, consumindo a fonte de carbono e produzindo o ácido propiônico. Para este caso as melhores respostas foram encontradas quando a concentração de extrato de levedura foi maior ou igual a 22 g/L.

O fator que apresentou o efeito com maior significância estatística foi a concentração de xarope. A concentração do xarope apresentou um efeito fortemente negativo na produtividade volumétrica. Este efeito era esperado, pois, como foi mencionado anteriormente, quanto maior a quantidade de fonte de carbono disponível maior será o tempo necessário para o micro-organismo consumi-lo. Na Figura 16 (B e C) pode ser observado que as melhores repostas são obtidas quando os valores da concentração de xarope são menores ou iguais a 54 g/L de açúcar total.

5.5.2.3. Análise: resposta menor produção de ácido succínico (RMS)

A RMS apresentou baixa variação entre os ensaios nas faixas estudadas no DCCR, no entanto foi possível determinar um modelo inclusive para esta baixa variação. Na Tabela 25 são apresentados os coeficientes de regressão.

Tabela 25: Coeficientes estimados de cada fator para a RMS.

	Efeitos	Erro Padrão.	t(7)	p - valor
Média	93,95	0,57	164,21	0,00
(x1) Temp.	-0,95	0,54	-1,78	0,12
Temp. (Q)*	-1,26	0,59	-2,13	0,07
(x2) [EL]*	1,09	0,54	2,03	0,08
[EL](Q)*	-1,24	0,59	-2,09	0,07
(x3) [Substrato]*	-3,60	0,54	-6,71	0,00
[Substrato](Q)*	-1,78	0,59	-3,01	0,02
x1.x2	-0,22	0,70	-0,31	0,76
x1.x3	-0,77	0,70	-1,09	0,31
x3.x2	0,39	0,70	0,55	0,60

p<0,1. * Efeito estatisticamente significativo

Pode-se observar que para esta resposta o principal efeito é dado pela concentração de xarope. A concentração de extrato de levedura também apresenta efeito significativo. A temperatura mostrou-se significativo no termo quadrático. A equação 10 representa o modelo para a resposta de menor formação de ácido succínico RMS % com os termos significativos da regressão.

$$RMS\ \% = 93{,}95 - 0{,}63(x1)^2 + 0{,}54(x2) - 0{,}62(x2)^2 - 1{,}80(x3) - 0{,}89(x3)^2 \quad (10)$$

Para conferir a significância estatística do modelo foi realizada o teste ANOVA (Tabela 26).

Tabela 26: Análise de variância (ANOVA) para o rendimento considerando o modelo com os coeficientes estatisticamente significativos (p-valor<0,1).

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F cal	p-valor
Regressão	59,95	5	11,99	11,39	<0,0001
Resíduos	11,58	11	1,05		
Total	71,53	16			

R^2=83,81%. F 5;11;0,1= 3,2.

Como pode ser visualizado, 83,81% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo proposto. O valor de R^2 foi baixo quando comparado com os coeficientes de determinação anteriores e é possivelmente devido à baixa variabilidade das respostas. O erro puro (erro das réplicas) acaba sendo mais significativo e é mais difícil encontrar uma tendência nas respostas. Para melhor entendimento são apresentadas, na Figura 17, as superfícies de resposta e as curvas de contorno.

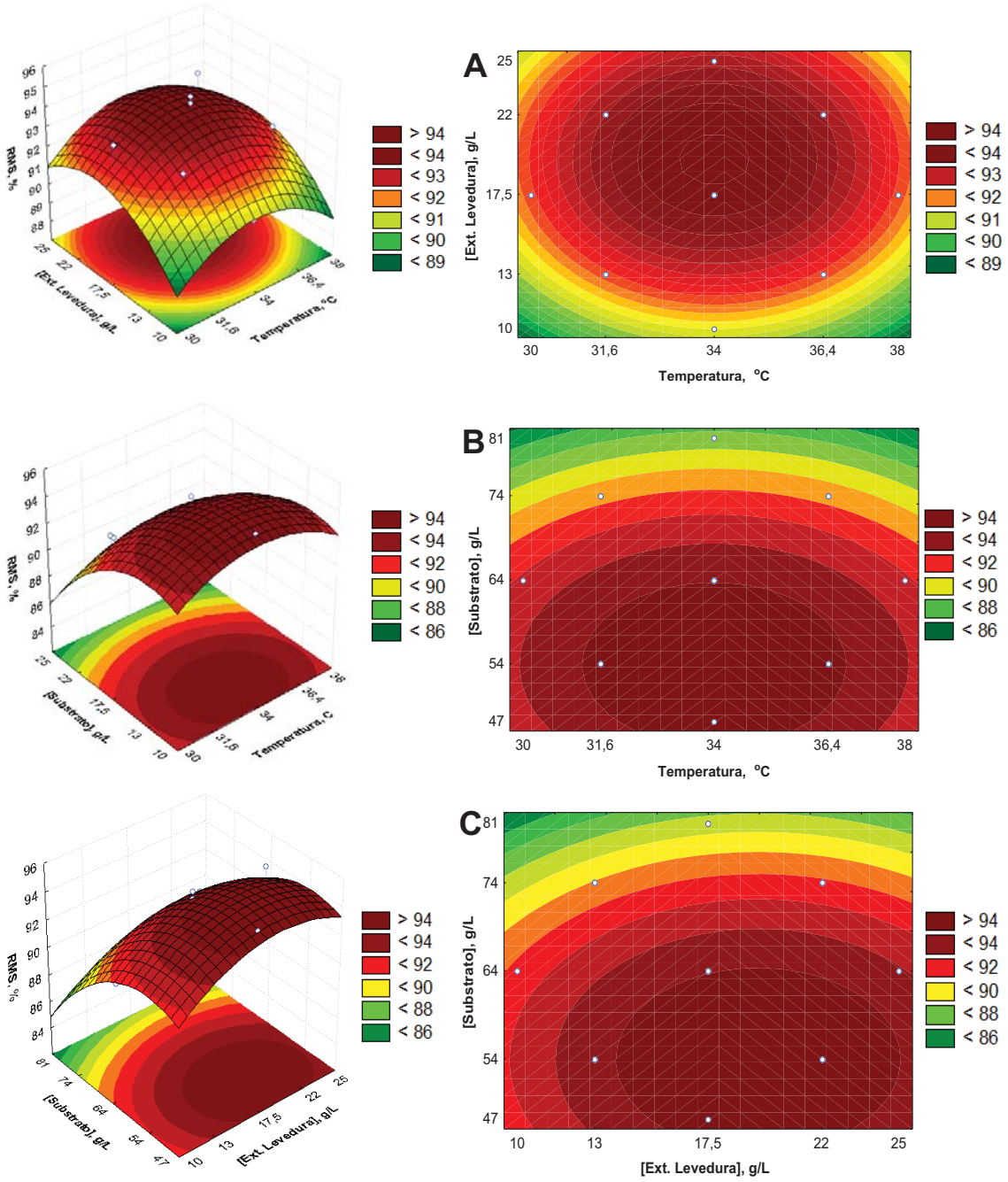

Figura 17: Superfícies de resposta (esquerda) e curvas de contorno (direita) para a produtividade volumétrica. A, RMS em função da temperatura e a concentração de extrato de levedura. B, RMS em função da temperatura e a concentração do xarope de cana-de-açúcar (açúcar total). C, RMS em função da concentração do extrato de levedura e a concentração do substrato.

Analisando a Figura 17 (A e B), a temperatura apresenta um efeito pouco importante na RMS. Observa-se que a região de melhor RMS estende-se ao longo do eixo da temperatura, indicando que o efeito é mínimo. Isso é verificado pelos

coeficientes de regressão anteriormente apresentados para esta resposta. O extrato de levedura, por outro lado, apresenta um efeito mais relevante e estatisticamente significativo, embora também baixo. Julgando pela Figura 17 (A e C), o extrato de levedura tem um efeito importante quando utilizado em baixas concentrações (abaixo de 13 g/L). Acima desta concentração, o efeito parece ser menos importante na RMS, indicando que 13 g/L de extrato de levedura sejam suficientes para a produção de ácido propiônico. Como mencionado anteriormente, o efeito do extrato de levedura na acumulação do ácido succínico possivelmente é causado pela concentração do ácido pantotênico (vitamina B5).

A concentração de xarope de cana-de-açúcar foi o fator que gerou maior efeito na resposta de formação de ácido succínico. Uma vez que a maior concentração de fonte de carbono gera maior concentração de ácido propiônico, altas concentrações de ácido propiônico poderiam causar inibição na enzima propionil CoA: succinato-CoA transferase (Schweiger and Buckel, 1984). Esta enzima catalisa a conversão de succinato para succinil-CoA e propionil-CoA para propionato, conforme apresentado na Figura 1. Assim, elevadas concentrações de ácido propiônico poderiam causar acumulação de ácido succínico por inibição da enzima mencionada. Este efeito poderia ter causado a menor RMS observada no delineamento experimental. Quando se trabalhou com 81 g/L de substrato (Figura 17B-C), a resposta diminuiu para 88%. Nota-se também que em concentrações acima de 64 g/L de substrato, a RMS é afetada negativamente. Nas condições estudadas, 64 g/L de substrato correspondem aproximadamente a 29 g/L de ácido propiônico, indicando que esta concentração poderia ser crítica para acumulação de ácido succínico na fermentação.

5.5.2.4. Análise: rendimento em biomassa

Ao avaliar a biomassa pelo peso seco final das células no final de fermentação foi possível também obter um modelo que explique os efeitos da temperatura, concentração de extrato de levedura e concentração de xarope no rendimento de biomassa (Yx/s). Na Tabela 27 são apresentados os coeficientes de regressão para Yx/s.

Tabela 27: Efeitos estimados para a resposta rendimento de biomassa, Yx/s.

	Efeitos	Erro Padrão.	t(7)	p - valor
Média	17,65	0,61	28,72	0,00
(x1) Temp.*	-2,76	0,29	-9,55	0,00
Temp. (Q)*	-0,86	0,32	-2,71	0,03
(x2) [EL]*	2,60	0,29	9,00	0,00
[EL](Q)	-0,07	0,32	-0,23	0,83
(x3) [Substrato]	0,38	0,29	1,33	0,23
[Substrato](Q)	-0,07	0,32	-0,22	0,83
x1.x2	-0,53	0,38	-1,41	0,20
x1.x3	0,66	0,38	1,74	0,12
x3.x2	-0,40	0,38	-1,06	0,33

p<0,05. * Efeito estatisticamente significativo

É observado que a temperatura e o extrato de levedura apresentam efeitos bastante relevantes e estatisticamente significativos no Yx/s. Utilizando os termos significativos foi formulada a seguinte equação que caracteriza a Yx/s.

$$\boldsymbol{Ys/x}, \% = 17{,}51 - 2{,}76(x1) - 0{,}82(x1)^2 + 2{,}56(x2) \quad (11)$$

O modelo foi também avaliado pela análise de variância mostrada na Tabela 28.

Tabela 28. Análise de variância (ANOVA) para o Yx/s considerando o modelo com os coeficientes estatisticamente significativos (p-valor<0,05).

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F cal	p-valor
Regressão	204,78	3	68,26	52,11	<0,0001
Resíduos	17,03	13	1,31		
Total	221,81	16			

R^2=92,32%. $F_{3;13;0,05}$= 3,41.

A ANOVA novamente garante que a regressão é estatisticamente significativa. O R^2 de 0,9232 garante o 92,32% da variabilidade estaria explicada pelo modelo proposto. Na Figura 18, são apresentados, a superfície de resposta e curva de contorno para está resposta.

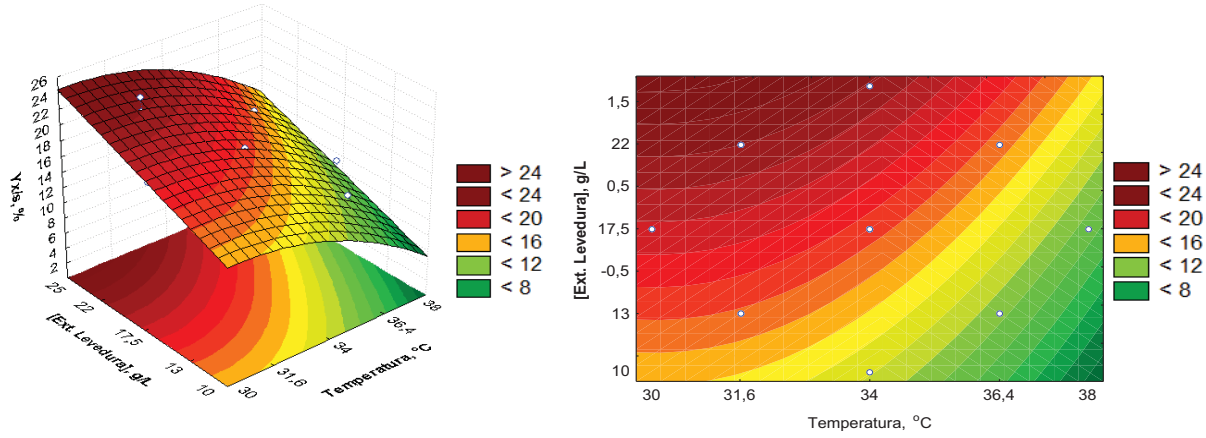

Figura 18: Superfícies de resposta (esquerda) e curva de contorno (direita) para o rendimento de biomassa (Yx/s). Ys/x em função da temperatura e a concentração de extrato de levedura.

Como pode ser visualizado, a temperatura, ao contrário do observado para o rendimento e principalmente para a produtividade volumétrica, apresenta um efeito negativo para Yx/s. Os melhores valores do Yx/s (m/m) (entre 20 e 24 %) foram encontrados em temperaturas inferiores a 34 °C. Entretanto, a concentração do extrato de levedura apresentou um efeito positivo, sendo que em concentrações maiores a 17,5 g/L podem ser obtidos os melhores rendimentos em biomassa. Assim este resultado, embora não seja benéfico para a produção de ácido propiônico, pode ser útil em trabalhos de transformação genética, onde o crescimento rápido e abundante é importante para favorecer a obtenção de transformantes.

5.5.3. Análise global e validação

Cada parâmetro foi avaliado visando o melhor desempenho na fermentação para a produção de ácido propiônico por *P acidipropionici* e utilizando o xarope de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Para cada parâmetro foram encontrados faixas ótimas de trabalho mostradas na Tabela 29. As faixas para cada resposta

foram montadas segundo a análise das superfícies de resposta e os gráficos de contorno.

Tabela 29: Análise global das faixas ótimas para as respostas avaliadas visando a produção ácido propiônico.

Reposta	Temperatura, °C	Concentração de extrato de levedura, g/L	Concentração de xarope de cana-de-açúcar, g/L
Rendimento	34 - 36,4	17– 22	≤74
Produtividade volumétrica	34 - 36,4	22– 25	≤54
RMS	31,6 - 36,4	≥13	≤64
Condição proposta	35	22	54

Como pode ser observado, uma condição intermediária de consenso foi proposta, na qual espera-se encontrar um resposta ótima para os três parâmetros avaliados, ou seja, obter alto rendimento, alta produtividade volumétrica e um alto valor de RMS. Os resultados do experimento de validação são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30. Comparação dos parâmetros obtidos pelo experimento de validação e os valores previstos pelos modelos.

Resposta	Validação (obtido) [1]	Previstos[2]	Erro relativo, %[3]
Rendimento, % (m/m)	46,84 ± 0,15	48,27	- 2,97
Produtividade volumétrica (g/L.h)	0,89 ± 0,01	0,85	4,86
RMS (%)	94,09 ± 0,46	94,63	- 0,57

[1], Experimento de validação realizado em triplicata. [2], Valores das respostas previstos pelos respectivos modelos reparametrizados e apresentados anteriormente. [3], Erro relativo em função do valor previsto e valor experimental.

Como pode ser observado na Tabela 30, os resultados validam os modelos apresentados anteriormente para as respostas avaliadas. O erro relativo é mostrado para quantificar a variação entre o valor real do experimento de validação e o valor previsto pelos respectivos modelos. Observa-se que o erro é inferior a 5% para todos os parâmetros.

A otimização para processo de produção de ácido propiônico a partir de xarope de cana-de-açúcar, utilizando *P. acidipropionici,* foi realizada satisfatoriamente e para melhor visualização da melhora obtida nas respostas avaliadas em relação ao processo não otimizado é apresentada a Tabela 31.

Tabela 31: Comparação dos parâmetros entre a fermentação antes e depois da otimização

	Condições e meio de cultura padrão[1]	Condições e meio de controle otimizadas[2]	Melhoria[3], %
Rendimento, % (m/m)	44,24 ± 0,54	46,84 ± 0,15	4,52
Rendimento hexoses[4] (%)	42,03	44,49	5,8
Produtividade volumétrica (g/L.h)	0,3 ± 0,01	0,89 ± 0,01	196,67
RMS (%)	86,94 ± 0,59	94,09 ± 0,46	8,22

[1] Fermentação em triplicata PB13-15. [2],Fermentação de validação realizada em triplicata. [3] Melhoria expressa em relação à fermentação com condições e meio de cultura padrão. [4] Rendimento expresso em função da massa do ácido propiônico e a massa equivamente em hexoses totais do açúcar no xarope.

Pela análise da Tabela 31 fica evidente o ganho no rendimento, na produtividade e na RMS depois da otimização desenvolvida no presente trabalho. Com a utilização do xarope de cana-de-açúcar o rendimento obtido foi de 47% (m/m), o qual é 4,52% superior do que a condição inicial e aproximadamente 4% superior ao rendimento (45% m/m) obtido por Quesada-Chanto (Quesada-Chanto et al., 1994b) em um trabalho que utilizou sacarose como substrato.

Para a produtividade volumétrica, o incremento foi altamente significativo. Obteve-se um aumento de aproximadamente 200%. Esta alta produtividade volumétrica não foi reportada anteriormente para nenhum processo em batelada simples. O valor de 0,89 g/L.h obtido neste trabalho é comparável aos valores de produtividade obtidos em fermentações contínuas. Goswami e Srivastava (Goswami and Srivastava, 2001) obtiveram uma produtividade de 0,9 g/L.h em uma fermentação continua com retenção de células "in situ" (CFCR).

Para a resposta de menor formação de ácido succínico (RMS) encontrou-se uma melhoria de 8%. Isso quer dizer que 8% menos carbono do xarope de cana-de-açúcar foram destinados para o ácido succínico. Estes valores são superiores

aos dados na literatura. Por exemplo, Goswami e Srivastava (Goswami and Srivastava, 2001) utilizando 50 g/L de lactato como substrato, atingiram concentrações de 22 g/L de ácido propiônico em batelada com uma relação de P:S de 4:1. Neste trabalho utilizando 54 g/L de xarope de cana-de-açúcar e atingindo 25 g/L de ácido propiônico foi obtido uma relação molar de P:S de 16:1. Assim o valor obtido é 4 vezes maior do que os obtidos em literatura. Esta diminuição pode contribuir para posteriores etapas de separação e purificação dos produtos

Os trabalhos que visam a produção de ácido propiônico normalmente trabalham na temperatura de 30-32 ^{o}C. De acordo com os delineamentos experimentais foi comprovado que temperaturas acima de 32 ^{o}C (34-36 ^{o}C) favorecem significativamente o aumento no desempenho da fermentação. O extrato de levedura foi testado e comprovou-se que com esta fonte de nitrogênio é possível atingir altos desempenhos sem a necessidade de adicionar outras fontes como peptona ou triptona. Apesar de o extrato de levedura ser um substrato caro para uso industrial, seria possível, nas etapas seguintes de otimização, a substituição progressiva desta fonte por fontes alternativas de menor custo sem afetar o alto rendimento atingido. Estas fontes de nitrogênio poderiam ser a água de maceração de milho ou a levedura seca (excedente da fermentação alcoólica).

5.6. Avaliação do perfil de *P. acidipropionici* em condições aeróbias

Como foi revisado na literatura algumas espécies de *P. acidipropionici* são capazes de crescer na presença de oxigênio em meio liquido. No entanto não existem relatos de avaliações concretas sobre o perfil de produção de *P. acidipropionici* nestas condições. Assim, neste trabalho, a linhagem *P. acidipropionici 4875* foi avaliado em termos de produção em biorreator e em triplicata. Na Figura 19 é apresentada a cinética do consumo do substrato e a formação dos produtos.

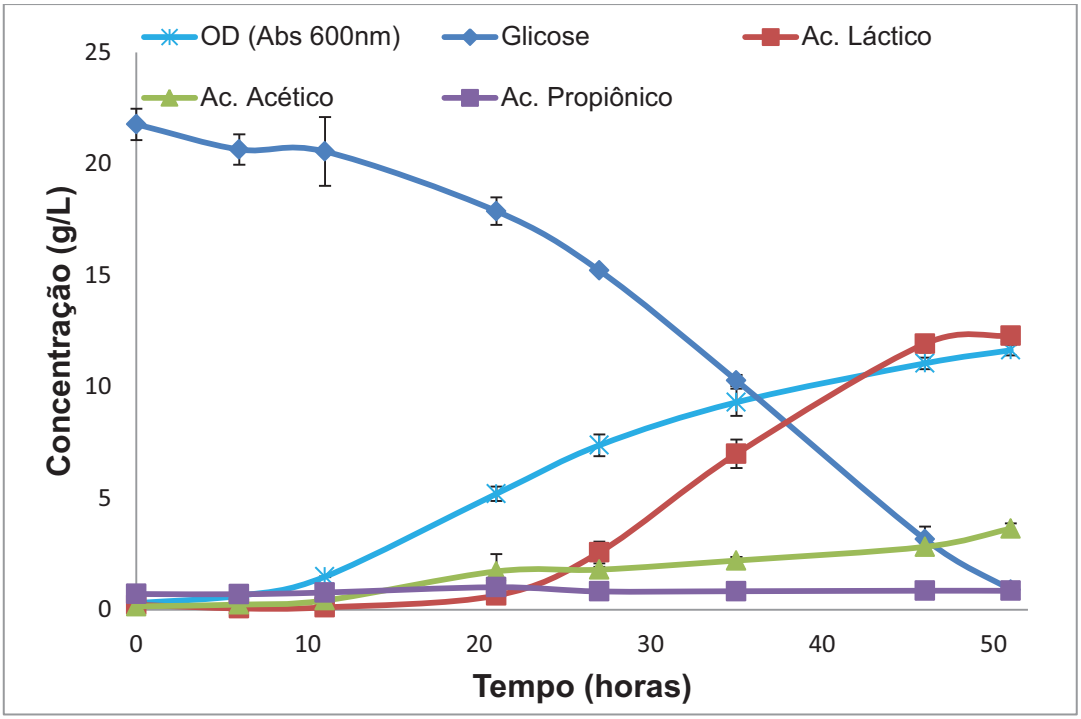

Figura 19: Perfil de produção de *P. acidipropionici* 4875 em condições aeróbias. Cada curva corresponde a média de 3 culturas.

Como pode ser visualizado na Figura 19, o principal produto observado nesta cultura é o ácido láctico, contrariamente ao perfil de produção em condições anaeróbias onde o principal produto é o ácido propiônico. Nesse caso, não há a produção de ácido propiônico, que, durante o cultivo, se mantém em concentrações inferiores a 1 g/L. Outro produto de importância neste perfil é o ácido acético que também é produzido ao longo de todo o processo. Não foi observada a presença de ácido succínico durante o cultivo.. Para melhor avaliação e em termos numéricos, na Tabela 32, é mostrada uma comparação entre a cultura aeróbia e uma cultura anaeróbia com a mesma linhagem.

Tabela 32. Comparação do desempenho produtivo entre as linhagens *P. acidipropionici* 4875

***P. a.* 4875**	**Glicose (g)**	**Ac. Propiônico (g)**	**Ac. Láctico (g)**	**Ac. Acético (g) º ***	**Ac. Succínico (g)**	**Rendimento % (w/w)**	**Rendimento % (c/c) º**	**Produtividade volumétrica (g/Lh) º***	**Massa seca (g/L) º***
Aeróbia	19,90 ± 0,81	0,07 ± 0,02	10,48 ± 0,23	3.01 ± 0,15	-	52,68 ± 2.00	52,71 ± 2.00	0,23 ± 0,00	3,67 ± 0,07
Anaeróbia[1]	19,87 ± 0,43	8,88 ± 0,34	-	2,68 ± 0,12	0,40 ± 0,02	44,7 ± 1,19	54,41 ± 1,45	0,19 ± 0,00	3,99 ± 0,26

º, Avaliados estatisticamente pelo teste t-student com um nível de significância de 0,05. *, parâmetros estatisticamente diferentes com 0,05 de significância.

Na Tabela 32, observa-se que foram produzidos 10,48 g de ácido láctico para a cultura aeróbia e 8,88 g de ácido propiônico para a cultura anaeróbia, resultando assim, em um rendimento de em massa de 52,7% em ácido láctico e 44,7% para o ácido propiônico nas respectivas culturas. Esta diferença pode ser enganosa devido à diferença na massa molecular dos compostos. Uma avaliação mais precisa é o rendimento expresso em rendimento de carbono ou aproveitamento do carbono da glicose utilizada para formar os respectivos produtos. Observa-se que neste parâmetro o aproveitamento do carbono não apresenta diferença estatisticamente significativa, indicando que, apesar do produto principal ser diferente para cada cultura, o aproveitamento do carbono não é alterado (nas condições avaliadas).

O ácido acético produzido, também apresentou diferença significativa entre ambas as culturas. Na cultura aeróbia a quantidade de ácido acético produzido foi maior do que na cultura anaeróbia. Outra diferença importante foi a produtividade volumétrica. Mesmo sem uma adaptação previa do inóculo, a velocidade de produção do ácido láctico foi maior na cultura aeróbia do que a velocidade de produção do ácido propiônico na cultura anaeróbia. Para a concentração de massa seca, a cultura aeróbia apresentou valores menores do que a cultura anaeróbia indicando provavelmente que a presença de oxigênio diminui o crescimento celular.

A produção de ácido láctico por *P. acidipropionici* 4875 nunca foi reportada anteriormente por tal motivo foi realizada a identificação do ácido láctico produzido no meio de cultura por cromatografia liquida (UPLC) e espectrometria de massas (MS). A Figura 20 abaixo mostra os cromatogramas de UPLC-MS/MS (SRM) obtidos para um branco de solvente (Figura 20A), o padrão de ácido lático (Figura 20B) e uma amostra representativa da cultura realizada em condições de aerobiose (Figura 20C).

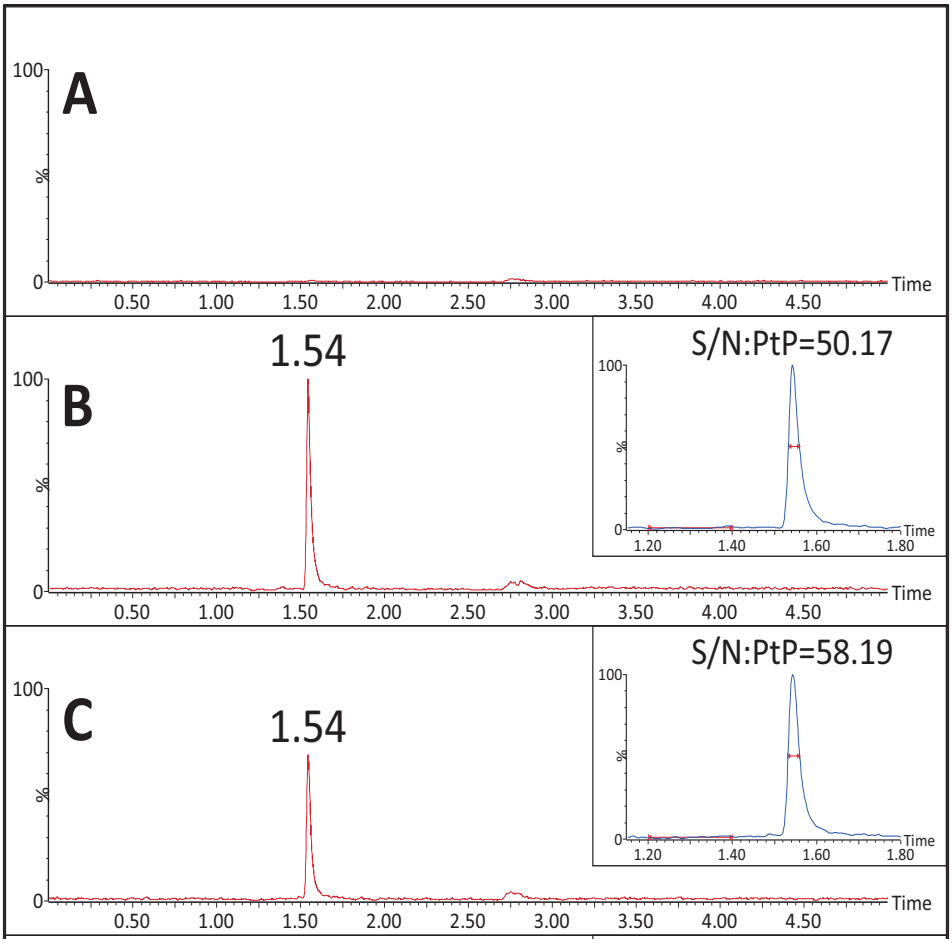

Figura 20. Cromatogramas de UPLC-MS/MS (SRM) obtidos para **A)** branco de solvente (ACN); **B)** solução padrão de ácido lático 100 ppm em ACN; **C)** amostra representativa

No cromatograma obtido na análise do padrão (Figura 20B) pode ser observado apenas um pico de tempo de retenção 1,54 min e relação sinal/ruído (S/N) de aproximadamente 50:1, atribuído ao ácido lático. Na Figura 20C pode ser observada a presença de ácido láctico na amostra extraída da cultura aeróbia, pois o pico tem exatamente o mesmo tempo de retenção do que o padrão. A Tabela 33 a seguir mostra, por sua vez, as áreas dos picos de ácido lático (t_R 1,54 min) e suas relações S/N para 3 amostras analisadas extraídas da cultura aeróbia.

Tabela 33. Áreas e relações sinal/ruído para os picos de ácido lático (1,54 min).

Amostra	Área do Pico (t_R 1,54 min)	Relação S/N
Padrão 100 ppm	2079	50
AR 10	6921	317
AR 11	6909	325
AR 12	7605	292

Pelos valores acima obtidos, podemos constatar a presença de ácido lático em todas as amostras analisadas. Assim, o ácido láctico é confirmado como produto no meio após o cultivo. .

Desta forma fica estabelecido que em condições aeróbias, a *P. acidipropionici* 4875, é capaz de crescer e produzir ácido láctico como principal produto, mudando assim drasticamente o clássico perfil metabólico em anaerobiose. Diversos trabalhos já mostraram a mudança no perfil de produção de espécies de *Propionibacterium* em condições aeróbias (Quesada-Chanto et al., 1998; De Vries et al., 1972; Ye et al., 1996b), no entanto, não tinha sido reportada anteriormente a produção de ácido láctico como principal produto. Quesada-Chanto a partir de 20 g/L de glicose(Quesada-Chanto et al., 1998) reportou a produção de 2 g/l de ácido láctico utilizando *P. shermani* em uma cultura cujo principal produto foi o ácido acético. Neste trabalho atingiu-se uma concentração de 12 g/L de ácido láctico partindo da mesma concentração de glicose.

Em *Propionibacterium,* a capacidade de crescer na presença de oxigênio, pode ser atribuído à existência de citocromos que participariam da cadeia transportadora de elétrons e que permitiriam a oxidação do NADH produzido na via glicolítica (Pritchard et al., 1977; Sone, 1972; De Vries et al., 1972). Na *P. acidipropionici 4875,* provavelmente a regeneração de NADH estaria sendo

realizada pela ativação de proteínas responsáveis pelo transporte de elétrons até o oxigênio, concomitantemente, esta regeneração possivelmente estaria sendo auxiliada pela produção de ácido láctico. A produção de ácido láctico pode ser catalisada por 4 enzimas que foram encontradas no genoma da *P. acidipropionici 4875*: duas L-Lactato desidrogenases dependentes de NAD(P) e duas D-Lactato desidrogenases putativas dependentes do citocromo C (Parizzi et al., 2012). No genoma de *P. acidipropionici 4875* também foram encontradas proteínas que participariam no transporte de elétrons: o citocromo bd e a citocromo C oxidase (Parizzi et al., 2012. Paper submetido).

Sem duvida, o desenvolvimento da cultura e a mudança do perfil de metabolitos produzidos por *P. acidipropionici 4875* em condições aeróbias mostra uma interessante capacidade de adaptação deste micro-organismo à presença de concentrações de oxigênio em meio liquido, no entanto, são necessários mais estudos para desvendar os mecanismos moleculares que permitem esta mudança.

6. Conclusões

Para quantificação dos açúcares do xarope de cana-de-açúcar foi realizada a adequação de um método de quantificação por HPLC. Este método permitiu a análise de todos os compostos consumidos e formados durante a fermentação em apenas uma corrida por amostra.

Visando a otimização de ácido propiônico foi realizada uma seleção prévia para três linhagens de *P. acidipropionici.* A linhagem *P. acidipropionici* ATCC 4875 foi determinada como a linhagem que apresentou melhor desempenho na fermentação para produzir ácido propiônico nas condições e meio de cultura testados. A linhagem *P. acidipropionici* ATCC 4875 apresentou um rendimento de 45% (m/m) e uma produtividade volumétrica de 0,20 g/L.h contra 43% (m/m) e 0,12 g/L.h de rendimento e produtividade volumétrica da linhagem com menor desempenho fermentativo.

Foi demostrado experimentalmente que o extrato de levedura é capaz de suportar tanto o crescimento quanto a produção em culturas de *P. acidipropionici ATTC 4875.* Isto permitiu a utilização de apenas uma fonte de nitrogênio no meio de cultura simplificando e reduzindo o número de fatores posteriormente estudados nos delineamentos experimentais.

Utilizando um delineamento experimental Plackett & Burman foi realizada uma triagem de 8 fatores no processo. Deste delineamento foi possível determinar que, nas faixas de trabalho estudadas, a temperatura, a concentração de extrato de levedura e a concentração de substrato apresentaram efeito relevante e estatisticamente significativo para o rendimento, a produtividade volumétrica e a resposta de menor formação de ácido succínico (RMS). A partir deste delineamento foi possível também reestabelecer faixas de trabalho para os 8 fatores estudados.

A otimização foi realizada com sucesso para as três respostas avaliadas. As condições de cultura otimizadas foram 34 ^{o}C para temperatura, 22 g/L de extrato de levedura e 54 g/L de açucares do xarope de cana-de-açúcar. Obtendo-se assim, 47% (m/m) de rendimento, 0,89 g/L.h de produtividade volumétrica e 94% de RMS. Estes valores representam 5%, 196% e 8% de incremento para o

rendimento, a produtividade volumétrica e a RMS, respectivamente, quando comparadas com uma fermentação com condições e meio de cultura sem otimizar.

Além disso, foram obtidos modelos matemáticos que explicam satisfatoriamente e com significância estatística, a variação do rendimento, da produtividade volumétrica, da RMS e do rendimento de biomassa (Yx/s) quando afetados pela temperatura, concentração de extrato de levedura e concentração de xarope de cana-de-açúcar nas faixas estudas.

Foi comprovado que o perfil de *P. acidipropionici 4875* muda drasticamente quando o cultivo é realizado em condições aeróbias, produzindo ácido láctico como principal produto.

7. Perspectivas para trabalhos futuros

Otimizadas as condições de fermentação para a produção de ácido propiônico em batelada utilizando xarope de cana-de-açúcar, os trabalhos futuros podem focar na otimização da fermentação em outros tipos de cultivo como batelada alimentada, continua ou utilizando suportes para imobilização de células.

.

Visando a redução de custos, estudos com outras fontes alternativas de nitrogênio como levedura seca (excedente da fermentação alcoólica) ou água de maceração de milho podem ser avaliados na fermentação propiônica.

Podem ser realizados estudos mais aprofundados sobre os mecanismos moleculares que promovem a formação de ácido láctico em condições aeróbias em *P. acidipropionici 4875 e* avaliação do comportamento das outras linhagens de *P. acidipropionici* visando obter micro-organismos versáteis capazes de produzir distintos compostos com alta eficiência e segundo as necessidades do mercado.

8. Referências bibliográficas

Almeida JR, Modig T, Petersson A, Hähn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 82:340–349. http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1676.

Anderson TM, Bodie EA, Goodman N, Schwartz RD. 1986. Inhibitory Effect of Autoclaving Whey-Based Medium on Propionic Acid Production by Propionibacterium shermanii. *Applied and environmental microbiology* 51:427–428. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16346998.

Balamurugan K, Venkata Dasu V, Panda T. 1999. Propionic acid production by whole cells of Propionibacterium freudenreichii. *Bioprocess Engineering* 20:109–116. http://www.springerlink.com/index/10.1007/PL00009039.

Barbirato F, Chedaille D, Bories A. 1997. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47:441–446.

Bizzari SN, Gubler R. 2010. Propionic acid. Ed. SRI Consulting.

Boyaval P, Corre C. 1987. Continuous fermentation of sweet whey permeate for propionic acid production in a CSTR with UF recycle. *Biotechnology Letters* 9:801–806. http://dx.doi.org/10.1007/BF01028287.

Boyaval P, Corre C. 1995. Production of propionic acid. *Le Lait* 75:453–461. http://www.edpsciences.org/10.1051/lait:19954-535.

Colomban A, Roger L, Boyaval P. 1993. Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling. *Biotechnology and bioengineering* 42:1091–8. http://www3.interscience.wiley.com/journal/107623750/abstract.

Coral J, Karp SG, Vandenberghe De Souza PL, Parada JL, Pandey A, Soccol CR. 2008. Batch Fermentation Model of Propionic Acid Production by Propionibacterium acidipropionici in Different Carbon Sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151:333–341.

Doran PM. 1995. Bioprocess Engineering Principles. London: Academic Press Limited.

Eastman. 2012. Eastman increases Propionic Acid prices on April 01. http://www.eastman.com/Company/News_Center/2012/Pages/Eastman_increases_Propionic_Acid_prices_on_April_01.aspx.

Franco G. 2002. Tabela de composição química dos alimentos. Ed. Atheneu 9th ed. São Paulo.

Gardner N, Champagne CP. 2005. Production of Propionibacterium shermanii biomass and vitamin B12 on spent media. *Journal of applied microbiology* 99:1236–45. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16238755.

Goswami V, Srivastava AK. 2001. Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:676–680. http://www.springerlink.com/content/jt0knnmuvall49f0.

Goswami V, Srivastava AK. 2000. Batch Kinetics and Modelling of Propionic Acid Fermentation. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 78:522–528. http://www3.interscience.wiley.com/journal/122290001/abstract.

Gu Z, Glatz BA, Glatz CE. 1998. Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 22:13–18.

Himmi EH, Bories A, Boussaid A, Hassani L. 2000. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by Propionibacterium acidipropionici and Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii. *Applied microbiology and biotechnology* 53:435–40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803900.

Hurst WJ, Martin RA, Zoumas BL. 1979. Application of HPLC to characterization of individual carbohydrates in foods. *Journal of Food Science* 44:892–895. http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1979.tb08529.x.

Kennedy M, Krouse D. 1999. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23:456–475. http://www.springerlink.com/Index/10.1038/sj.jim.2900755.

Lambert RJ, Stratford M. 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of applied microbiology* 86:157–64. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10030018.

Liang Z-X, Li L, Li S, Cai Y-H, Yang S-T, Wang J-F. 2012. Enhanced propionic acid production from Jerusalem artichoke hydrolysate by immobilized Propionibacterium acidipropionici in a fibrous-bed bioreactor. *Bioprocess and biosystems engineering*:1–7. http://www.springerlink.com/content/j3437g8110l5k10p/.

Liu L, Zhu Y, Li J, Wang M, Lee P, Du G, Chen J. 2012. Microbial production of propionic acid from propionibacteria: Current state, challenges and perspectives. *Critical reviews in biotechnology*. http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07388551.2011.651428.

Liu Y, Zhang Y-G, Zhang R-B, Zhang F, Zhu J. 2011. Glycerol/glucose co-fermentation: one more proficient process to produce propionic acid by Propionibacterium acidipropionici. *Current microbiology* 62:152–8. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3005122&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2002. Brock Biology of Microorganisms, 10th edition 10th ed.

Martínez-Campo R, De La Torre M. 2002. Production of propionate by fed-batch fermentation of Propionibacterium acidipropionici using mixed feed of lactate and glucose. *Biotechnology Letters* 24:427–431.

Montgomery DC. 1997. Introduction to statistical quality control 3rd ed. New York: Wiley.

Nagata Y, Chu KH. 2003. Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms. *Biotechnology Letters* 25:1827–1842. dx.doi.org/10.1023/A:1026225526558.

Panda BP, Ali M, Saleem J. 2007. Fermentation Process Optimization. *Research Journal of Microbiology* 2:201–208. http://www.scialert.net/abstract/?doi=jm.2007.201.208.

Paranhos SB. 1987. Cana-de-açucar. Cultivo e utilização Vol 1. Ed. Fundação Cargill. Campinas.

Parizzi LP, Grassi MCB, Llerena LA, F MC, Queiroz VL, Lunardi I, Zeidler AF, Teixeira PJ, Mieczkowski P, Rincones J, Pereira GA. 2012. The genome sequence of Propionibacterium acidipropionici provides insights into its biotechnological and industrial potential. *Submetido para BMC Genomics*.

Pinto EDSL. 1965. Cana-de-açucar. Ed. Ministerio De Agricultura, Serviço De Informação Agricola. Rio de Janeiro.

Piveteau P. 1999. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Le Lait* 79:23–41.

Plackett RL, Burman JP. 1946. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika* 33:305–325.

Pritchard GG, Wimpenny JWT, Morris HA, Lewis MWA, Hughes DE. 1977. Effects of Oxygen on Propionibacterium shermanii Grown in Continuous Culture. *Journal of General Microbiology* 102:223–233. http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00221287-102-2-223.

Quesada-Chanto A, Fschar AS, Wagner F. 1994a. Optimization of a Propionibacterium acidipropionici continuous culture utilizing sucrose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42:16–21.

Quesada-Chanto A, S. Afschar A, Wagner F. 1994b. Microbial production of propionic acid and vitamin B12 using molasses or sugar. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41:378–383. http://www.springerlink.com/content/l31471x608820vr5/.

Quesada-Chanto A, Silveira MM, Schmid-Meyer AC, Schroeder AG, da Costa JPCL, López J, Carvalho-Jonas MF, Artolozaga MJ, Jonas R. 1998. Effect of the oxygen supply on pattern of growth and corrinoid and organic acid production of Propionibacterium shermanii. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49:732–736. http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s002530051239.

Ramsay J. 1998. Biological conversion of hemicellulose to propionic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 22:292–295. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022997001968.

Rodrigues MI, Iemma AF. 2009. Planejamento de Experimentos e otimização de Processos. Ed. Casa do Espíritu Amigo Fraternidade Fé e Amor 2nd ed. Campinas.

Rodrigues MVN, Rodrigues RAF, Serra GE, Andrietta SR, Franco TT. 2000. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 20:103–109. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612000000100020&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

Schweiger G, Buckel W. 1984. On the dehydration of (R)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by Clostridium propionicum. *FEBS Letters* 171:79–84. http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(84)80463-9.

Sone N. 1972. The Redox Reactions in Propionic Acid Fermentation. *Journal of Biochemistry* 71:931–940. http://jb.oxfordjournals.org/content/71/6/931.abstract.

Suwannakham S, Huang Y, Yang S-T. 2006. Construction and characterization of ack knock-out mutants of Propionibacterium acidipropionici for enhanced propionic acid fermentation. *Biotechnology and bioengineering* 94:383–95. http://www3.interscience.wiley.com/journal/112468808/abstract.

Suwannakham S, Yang S. 2005. Enhanced Propionic Acid Fermentation by Propionibacterium acidipropionici Mutant Obtained by Adaptation in a Fibrous-Bed Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 91:325–337.

UNICA. 2012. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/.

Universidade de Campinas. UNICAMP. 2006. Tabela brasileira de composição de alimentos. http://www.unicamp.br/nepa/taco.

Vorobjeva LI. 1999. Propionibacteria 1st ed. Moscow: Kluwer Academic Publishers. Dordrecht,The Netherlands.

De Vries W, Van Wijck-Kapteijn WMC, Stouthamer AH. 1972. Influence of Oxygen on Growth, Cytochrome Synthesis and Fermentation Pattern in Propionic Acid Bacteria. *Microbiology* 71:515–524. http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00221287-71-3-515.

Woskow SA, Glatz BA. 1991. Propionic Acid Production by a Propionic Acid-Tolerant Strain of Propionibacterium acidipropionici in Batch and Semicontinuous Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2821–2828.

Ye K, Shijo M, Jin S, Shimizu K. 1996a. Efficient production of vitamin B12 from propionic acid bacteria under periodic variation of dissolved oxygen concentration. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82:484–491. http://dx.doi.org/10.1016/S0922-338X(97)86988-7.

Ye K, Shijo M, Jin S, Shimizu K. 1996b. Efficient Production of Vitamin from Propionic Acid Bacteria under Periodic Variation of Dissolved Oxygen Concentration. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 82:484–491.

Ye K, Shijo M, Miyano K, Shimizu K. 1999. Metabolic Pathway of Propionibacterium Growing with Oxygen: Enzymes, 13C NMR Analysis, and Its Application for Vitamin B12 Production with Periodic Fermentation. *Biotechnology Progress* 15:201–207.

Zhang A, Yang S-T. 2009a. Engineering Propionibacterium acidipropionici for enhanced propionic acid tolerance and fermentation. *Biotechnology and bioengineering* 104:766–73. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19530125.

Zhang A, Yang S. 2009b. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered Propionibacterium acidipropionici. *Process Biochemistry* 44:1346–1351. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511309002360.

9. Anexos

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "**Estudo de otimização das condições da fermentação para produção de ácido propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* utilizando xarope de cana-de-açúcar**"

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2011/03, Instituição: Instituto de Biologia (IB/UNICAMP).

( ) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

* *Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Aluno: Luige Armando Llerena Calderon

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura