

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO**

**DEPARTAMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

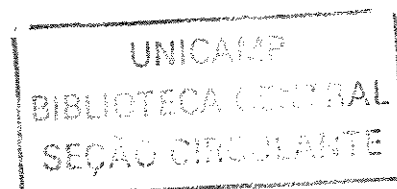
**Contribuição para o Estudo da Otimização da Fermentação  
Alcoólica operando em Batelada-Alimentada**

**Érica Ferreira**

**Orientador: Prof.Dr.Sílvio Roberto Andrietta**

Dissertação de mestrado apresentada  
à Faculdade de Engenharia Química  
como parte dos requisitos exigidos  
para a obtenção do título de Mestre  
em Engenharia Química.

**Campinas – São Paulo  
Maio 2005**



UNIDADE	80
Nº CHAMADA	UNICAMP
	F413c
V	EX
TOMBO BC/	65064
PROC.	16-86-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	4-18-05
% CPD	80-1-1359834

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

F413c Ferreira, Érica  
Contribuição para o estudo da otimização da fermentação  
alcoólica operando em batelada-alimentada / Érica Ferreira.--  
Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Sílvio Roberto Andrietta  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação. 2. Álcool. 3. Cinética. 4. Planejamento  
experimental. 5. Modelamento matemático. I. Andrietta,  
Sílvio Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Dissertação de Mestrado defendida por Érica Ferreira e aprovada em 20 de maio de 2005 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Orientador: Prof.Dr.Sílvio Roberto Andrietta



Prof.Dr. Francisco Maugeri Filho



Prof.ª Dr.ª. Maria da Graça Stupiello Andrietta

200516047

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Andrietta', with a long horizontal flourish extending to the right.

---

Prof. Dr. Sílvio Roberto Andrietta

*Aos meus pais Valdir e Elisabete,  
aos meus irmãos Mariele e Anthony  
que sempre permitiram  
e incentivaram o meu crescimento pessoal  
e profissional, pela dedicação, compreensão  
e amor de todos eles, sempre  
presentes em minha vida.  
Ao Fernando, pelo amor, apoio e  
incentivo em todos os momentos.*

## Agradecimentos

- Ao meu orientador Dr.Sílvio Roberto Andrietta pela confiança, dedicação, paciência e grande contribuição na realização deste trabalho.
- Aos amigos do laboratório Graça, Cláudia, Lia, Gisele, Klauss, Milene, Érika, Gabriel e Frederico pelo apoio e principalmente pelos momentos curtidos e vividos.
- Aos amigos do curso Érika, Sheila, Arlete, Moisés, Ivana entre outros.
- À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química possibilitarem a complementação da minha formação.
- Ao CPQBA, por proporcionar todas as condições necessárias para o desenvolvimento da minha pesquisa.
- À CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.
- A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**“Grandes realizações são possíveis quando se dá importância aos pequenos  
começos.”**

**(Lao Tsé)**

## Resumo

Este trabalho teve por objetivo estudar o processo de fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada, analisando o efeito da forma de alimentação do reator, da temperatura e da concentração de inóculo sobre o rendimento fermentativo, a produtividade e a cinética do sistema, encontrando a forma mais adequada de operação das unidades que trabalham com esse tipo de processo. Os ensaios foram realizados em reator de bancada utilizando meio sintético a base de sacarose e extrato de levedura. O microrganismo utilizado foi a cepa de levedura Y904 (*Saccharomyces cerevisiae*). As concentrações de substrato e etanol foram determinadas pelo método colorimétrico em espectrofotômetro, e as concentrações de células foram determinadas pelo método gravimétrico. Para avaliação cinética, utilizou-se um modelo proposto por LEE et. al. 1983 modificado e os parâmetros cinéticos foram ajustados por um programa computacional desenvolvido em Delphi. Através de uma análise estatística realizada no Software Statistica 5.0 foi possível determinar quais parâmetros cinéticos apresentaram variação significativa em relação às variáveis estudadas. Como resultado, observou-se que nas condições estudadas, o rendimento em etanol obteve significância com a temperatura e a concentração de inóculo, sendo que valores elevados foram obtidos em temperaturas extremas e altas concentrações de inóculo. O rendimento em células foi afetado pela temperatura, obtendo valores elevados a baixa temperatura. A produtividade obteve significância com todas as variáveis, atingindo valores elevados com temperaturas médias, altas concentrações de inóculo e enchimento rápido. E apenas o parâmetro  $X_m$  obteve significância com uma das variáveis estudadas, sendo esta a concentração de inóculo. Assim, foi elaborado um modelo que descreve o processo em toda a faixa estudada, relacionando os parâmetros cinéticos com as variáveis estudadas. Foi observado que utilizando condições de temperatura a 34°C, 3 horas de enchimento e 46,8% de concentração de inóculo, obteve-se um valor de produtividade de 9,35g/Lh. Através da validação do ponto ótimo da produtividade foi encontrado temperatura de 38°C, 2 horas de enchimento e 40% de concentração de inóculo.

**Palavras-Chaves:** fermentação alcoólica, álcool, cinética, batelada-alimentada.



## Abstract

Many fermentative processes industrial are realized in the fed-batch way, where the feeding containing substract and/or nutrients are fed in the bioreactor.

This work has as objective to study the process of alcoholic fermentation operating in fed-batch, analysing the effect of feeding way the bioreactor, temperature and concentration of yeast about the fermentative yield, the productivity and the kinetic of the system, finding the more appropriate way of operating the units that work with this kind of process. The essays were realized in the bench bioreactor using synthetic substract with sucrose and yeast extract. The microorganism used is the strain of yeast Y904 (*Saccharomyces cerevisae*). The concentration of substract and ethanol were determined by metric color method in espectrofotometer, and the concentrations of biomass were determined by gravity methody. For the kinetic evaluation was used the proposed model by LEE et.al. 1983 modified and kinetics parameters were adjusted by a software developed in Delphi. Through a statistica analyse in the Software Statistica 5.0 it was possible to determine the kinetic parameters that presented significant variation regarding the variables studied. As a result, it was notice that in the conditions studied, the yield of ethanol obtained significant with the temperature and concentration of yeast, considering that high values were obtained in extreme temperature and high concentration of yeast. The yield of biomass was affected by temperature, obtaining high values in down temperature. The productivity obtained significant with all the variables, reaching high values with medium temperatures, high concentration of yeast and fast filling. And only the parameter  $X_m$  obtained significant with a variable among all the variable studied. So, a model that describes the process in all the zone studied was prepared, relating the kinetics parameters with the variables studied. It was noticed that using conditions of temperature of 34°C, 3 hours of filling of bioreactor, and 46,8% of concentration of yeast, obtained a value of productivity of 9,35g/Lh. Through the validation of the excellent point of the productivity was found temperature of 38°C, 2 hours of filling of bioreactor, and 40% of concentration of yeast.

**Key-words:** alcoholic fermentation, alcohol, kinetic, fed-batch.

## Sumário

<b>Resumo.....</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>viii</b>
<b>Nomenclatura.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Revisão da Literatura.....</b>	<b>4</b>
3.1. Histórico.....	4
3.2. Processos.....	5
3.2.1. Processo Batelada.....	5
3.2.2. Processo Batelada Alimentada.....	6
3.2.3. Processo Contínuo.....	8
3.3. Característica Bioquímica da Fermentação Alcoólica.....	9
3.4. Cinética da Fermentação Alcoólica.....	10
3.4.1. Modelos cinéticos.....	12
3.5. O efeito da temperatura na fermentação alcoólica.....	18
3.6. Planejamento Fatorial.....	19
<b>4. Materiais e Métodos.....</b>	<b>21</b>
4.1. Microrganismos.....	21
4.2. Preparo do Inóculo.....	21
4.3. Preparo do substrato de alimentação.....	21
4.4. Descrição do reator.....	22
4.5. Condução dos ensaios.....	22
4.6. Metodologia Analítica.....	25
4.6.1. Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART) – Método do DNS.....	25

4.6.1.1 Análise da Amostra.....	25
4.6.2. Determinação do Etanol – Método do Dicromato.....	25
4.6.2.1. Análise da Amostra.....	26
4.6.3. Determinação da massa seca ( Método gravimétrico).....	26
4.6.4. Determinação do Brix.....	26
4.7. Planejamento Fatorial.....	27
4.8. Cálculos dos rendimentos em etanol, células e produtividade.....	28
4.9. Modelagem matemática.....	28
4.10. Ajuste dos Parâmetros.....	29
4.11. Efeito das variáveis.....	30
4.12. Validação do Modelo.....	30
<b>5. Resultados e Discussões.....</b>	<b>31</b>
5.1. Perfil Fermentativo.....	31
5.2. Produtividade e Rendimentos.....	33
5.3. Efeito das variáveis em relação aos rendimentos e produtividade.....	35
5.4. Ajuste dos Parâmetros Cinéticos considerando uma única fonte de substrato (ART).....	49
5.5. Efeito das variáveis em relação aos parâmetros cinético.....	53
5.6. Grupo dos parâmetros cinéticos ajustados para descrever toda a região estudada.....	57
5.7. Validação do modelo.....	61
5.8. Validação do ponto ótimo da Produtividade.....	63
<b>6. Conclusões e Sugestões.....</b>	<b>69</b>
6.1. Conclusões finais.....	69
6.2. Sugestões para trabalhos futuros.....	70
<b>7. Bibliografia.....</b>	<b>71</b>
<b>Anexo A.....</b>	<b>77</b>

## Nomenclatura

ART	Açúcares Redutores Totais
CI	Concentração de inóculo
$F_0$	Vazão volumétrica de alimentação
F	Concentração de frutose
G	Concentração de glicose
$K_i$	Constante de inibição pelo substrato
$K_s$	Constante de Monod que depende do microrganismo e das condições da cultura
$K_4$	Constante de inibição pelo substrato
$K_{I,S}$	Constante de inibição pelo substrato
$K_{S,X}$	Constante de Monod
$K_1$	Constante de inibição empírica
$K_2$	Constante de inibição empírica
$K_{S,X}$	Constante de Monod
$K_{I,Px}$	Constante de inibição pelo produto
$K_{Px}$	Constante de inibição pelo produto
$M_p$	Massa de produto
M	Expoente da equação de inibição pela biomassa
N	Expoente da equação de inibição pelo produto
P	Concentração de etanol
$P_{máx.}$	Concentração limite do produto
$P_{X,max}$	Constante limite do produto inibidor
S	Concentração de substrato limitante

$S_0$	Concentração de substrato inicial no reator
$S_f$	Concentração de substrato final
$S_{S,max}$	Concentração limite do substrato inibidor
$t$	tempo
$t_f$	Tempo final de fermentação
$T$	Temperatura
$TE$	Tempo de Enchimento do reator
$TF$	Tempo de Fermentação
$V$	Volume de meio
$V_i$	Volume inicial
$V_f$	Volume final
$X$	Concentração celular no reator
$X_0$	Concentração celular inicial no reator
$X_{máx.}$	Concentração celular máxima no reator
$Y_{P/S}$	Rendimento do processo (etanol)
$Y_{X/S}$	Produção de células

### **Letras Gregas**

$\mu$	Velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )
$\mu_{máx.}$	Velocidade máxima específica de crescimento

## 1.Introdução

O Programa Brasileiro do Álcool Combustível lançado em novembro de 1975, demonstrou benefícios na utilização do etanol em relação aos derivados do petróleo. O primeiro refere-se ao desenvolvimento tecnológico e à estratégia de abastecimento; o segundo relaciona-se com o desempenho da economia e o nível do emprego e o terceiro é de ordem ambiental.

Graças a esse programa, o Brasil conquistou essa tecnologia para utilização em larga escala de um combustível renovável que independe do mercado internacional do petróleo.

Hoje, o Brasil dispõe de um “combustível verde”, auto-suficiente e neutro em relação ao efeito estufa, que reduz em 50% a emissão de monóxido de carbono dos motores de veículos e que promoveu a substituição do chumbo tetraetila que era misturado à gasolina.

Nos últimos anos, as indústrias sucroalcooleira vinham priorizando a produção de açúcar, devido a diminuição do consumo de etanol causado pela diminuição do número de carros movidos a álcool. Este fato vinha causando sérias modificações nas condições operacionais das unidades fermentativas, principalmente na matéria prima utilizada.

Em abril de 2003, a Volkswagen entregou suas primeiras unidades do Novo Gol Total Flex, que pode ser abastecido com álcool hidratado, gasolina ou gasolina misturada com álcool em qualquer proporção.

Com o surgimento dos carros equipados com motor bicombustível, com a desvalorização do real e o aumento no preço internacional do petróleo, o panorama do álcool melhorou, mas ainda existe muito trabalho a ser feito para minimizar o custo de produção deste combustível, buscando torná-lo cada vez mais atrativo economicamente, faz-se necessário realizar estudos que permitam entender melhor o comportamento do processo. A partir daí, pode-se então projetar unidades mais eficientes e que exijam menor investimento inicial e consumam no decorrer do processo fermentativo menos insumo que conseqüentemente causam uma redução no custo de processamento.

Uma grande parte dos processos fermentativos industriais são conduzidos em batelada alimentada, já que este é o modo de operação mais efetivo para se lidar com problemas como inibição pelo substrato, repressão catabólica, etc. Assim, a habilidade de se controlarem estes processos é de extrema importância, no sentido de se obterem produtividades mais altas, melhora na uniformidade dos produtos e redução dos custos operacionais. (COSTA *et.al.*, 1996).

No Brasil, as destilarias que realizam o modo batelada-alimentada utilizam a vazão de alimentação dos reatores de maneira constante durante o enchimento da dorna até seu volume máximo, devido a dependência da moagem que produz o caldo, assim neste trabalho realizou-se a alimentação do biorreator de maneira constante.

## 2. Objetivos

Encontrar a forma mais adequada de operação das unidades de fermentação alcoólica que trabalham com processo batelada alimentada, estudando o efeito:

- da forma de alimentação destes biorreatores;
- da temperatura;
- da concentração do inóculo.

A partir dos efeitos desses fatores estudar:

- o rendimento fermentativo;
- a produtividade do sistema;
- a cinética do processo.



### 3.Revisão da Literatura

#### 3.1.Histórico

A fermentação alcoólica é conhecida pelo homem desde a antigüidade. A causa do fenômeno fermentativo não era conhecida, mas seu produto era utilizado como bebida. As primeiras idéias a respeito desse fenômeno apareceram no século XIV e XV. Em 1857, foi reconhecido através dos trabalhos de Paster , que o etanol obtido durante a fermentação era produto do metabolismo da levedura (OLIVEIRA,1960).

No Brasil, as indústrias de açúcar e de álcool estiveram sempre intimamente ligadas, desde o tempo do descobrimento. Deduz-se que a produção de álcool iniciou-se na Capitania de São Vicente, porque nela foi montado o primeiro engenho de açúcar do país em 1532. Assim, transformava-se o melaço residual da fabricação do açúcar em cachaça e, diretamente da garapa fermentada produzia-se aguardente.

A indústria de álcool desenvolveu-se na Europa no século XIX e no final deste século iniciou-se a produção de etanol no Brasil. A França e a Alemanha contribuíram para o desenvolvimento das técnicas de fermentação alcoólica, com construção de aparelhos de destilação.

O etanol era utilizado para produtos farmacêuticos, para produção de alguns produtos químicos, para bebidas e para combustão.

No século XX, utilizou-se o álcool como combustível líquido em motores de explosão, devido a falta de petróleo causada pela Primeira Guerra Mundial (1914/1918), o que contribuiu para o desenvolvimento da produção em grande escala deste produto (LIMA *et. al.*, 1975).

Em 1929 a grande crise internacional colocou em xeque a economia de todos os países e, no Brasil, a indústria açucareira não ficou a salvo. Sobrava açúcar e cana e faltava divisas para aquisição de combustível líquido. A primeira destilaria de álcool anidro foi instalada e o Governo Federal, em 1931, estabeleceu a obrigatoriedade da mistura de 5% de etanol à gasolina como medida de

economia na importação de combustível e para amparar a lavoura canavieira (LIMA *et. al.*, 1975).

A primeira destilaria de álcool no Brasil foi montada em Piracicaba, onde o processo de fermentação utilizado era batelada. O fermento utilizado era desenvolvido a partir da multiplicação do mesmo para cada batelada. Nesta época havia dois tipos de fermentação: a utilizada para produção de álcool nas usinas de açúcar e a desenvolvida para produção de aguardente (LIMA, 1985).

Segundo ALMEIDA (1960) citado por MIGLIARI (2001) um grande avanço ocorreu na produção de etanol, quando surgiu o método de Melle- Boinot, na França nos anos 30. Esse processo resumidamente consiste no reaproveitamento da levedura já utilizada em um processo fermentativo. Esse processo possui algumas vantagens como economia de açúcar devido a menor reprodução celular, elevado rendimento de etanol, eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho fermentado, fermentação menos contaminada devido ao tratamento do leite de levedura (tratamento ácido), menor complexidade das operações.

No Brasil, até os anos 60 o etanol era produzido por processo batelada simples. Quando o Proálcool foi implantado, as novas destilarias foram montadas baseadas no processo Melle- Boinot, pois este processo é conveniente e satisfatório em relação à operação e eficiência da produção de álcool (ZARPELLON *et.al.* 1992).

### **3.2.Processos**

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a maneira através da qual o substrato é adicionado e o produto retirado.

A fermentação alcoólica passa por uma evolução natural como ocorre com todos os processos. Inicia-se com o processo em batelada passando pelo processo em batelada – alimentada e finalizando com o processo contínuo.

#### **3.2.1.Processo Batelada**

Este processo também conhecido por processo descontínuo, vem sendo utilizado pelo homem desde a Antigüidade e ainda hoje são empregados para obtenção de vários produtos fermentado.

Neste processo, o mosto a ser fermentado é inoculado por parte da dorna em estágio final de fermentação (corte) ou por uma cultura nova, recém ativada em laboratório. A fermentação é considerada concluída quando cessa a atividade da levedura por falta de substrato ou excesso de produto inibidor (etanol). O etanol é recuperado por destilação e o reator é sanitizado para nova batelada.

Segundo MAIORELLA *et. al.*, 1981 o processo descontínuo é lento, uma vez que o reator deve ser limpo e preparado, o mosto e o inóculo carregado ao sistema.

### 3.2.2. Processo Batelada Alimentada

O processo batelada alimentada é conhecido desde 1900 sendo utilizado para regulação do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (CARVALHO *et. al.* 1975). Também conhecido por “cultura por processo descontínuo alimentado”, para se referirem a uma fermentação descontínua continuamente alimentada por nutrientes. Segundo LESSMANN (1993) o processo batelada-alimentada pode ser observado como a técnica em que um processo fermentativo na qual um ou mais nutrientes são fornecidos gradualmente ao bioreator durante o cultivo e no qual os produtos permanecem no mesmo até o final do processo. Esse processo é utilizado quando se procura diminuir o efeito inibitório causado pelo excesso de substrato podendo ser controlado pela vazão.

No Brasil, houve um aumento significativo da capacidade da produção de etanol nas indústrias, o que conseqüentemente forçou o aumento da capacidade volumétrica e do número de fermentadores (CARVALHO *et. al.* 1975). Grande parte das instalações industriais trabalhavam com processo batelada, não sendo possível mantê-lo devido a formação de espuma e devido a inibição pelo substrato, ocorrida quando atinge-se altas concentrações de substrato no meio de fermentação. Assim, nos anos 60, o processo batelada alimentada, também conhecido por Melle-Boinot, começa a ser utilizado.

O processo se baseia na alimentação contínua e crescente do substrato à dorna (sem purga até o volume máximo) e na reciclagem do fermento. O fermento é multiplicado utilizando mosto, enche-se as dornas, depois de fermentadas são

centrifugadas. Após ser separada do vinho, a massa celular é submetida a tratamento adequado e encaminhado para a dorna como inóculo de um novo ciclo. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo (KELLER, *et. al.*, 1978a) e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente.

Vantagens do processo Melle- Boinot : economia de açúcar devido a menor reprodução celular elevando o rendimento em etanol; eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho (separação de células de levedura), fermentação mais pura devido ao tratamento de leite de levedura ( tratamento ácido); eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do pé-de-cuba, prática exigida no processo clássico, diminuindo portando a complexidade das operações da planta. ALMEIDA(1960) citado por MIGLIARI (2001).

Durante o enchimento da dorna, a concentração celular não depende somente da massa de microrganismos, mas também do volume da adição de mosto à dorna. Cada condição leva a diferentes perfis de concentração de substrato, de células e produto. Após o enchimento da dorna o processo passa a ter características de processo batelada, ou seja, sem entrada ou saída de fluido da dorna. (Figura 01) (CARVALHO *et. al.* 1975). A fermentação termina quando a concentração do produto permanece constante.

Segundo CARVALHO *et. al.* (1975) o processo descontínuo-alimentado pode ser dividido em dois grupos, diferenciando apenas no controle do mecanismo de alimentação, sendo elas:

- Processo descontínuo-alimentado repetitivo onde em intervalos de tempo fixos retira-se uma fração de volume constante.
- Processo descontínuo-alimentado estendido onde a concentração de substrato limitante é mantida constante no meio de fermentação pelo suprimento contínuo do nutriente.

A Figura 01 mostra os perfis típicos de substrato, do produto e do volume de um processo batelada-alimentada.

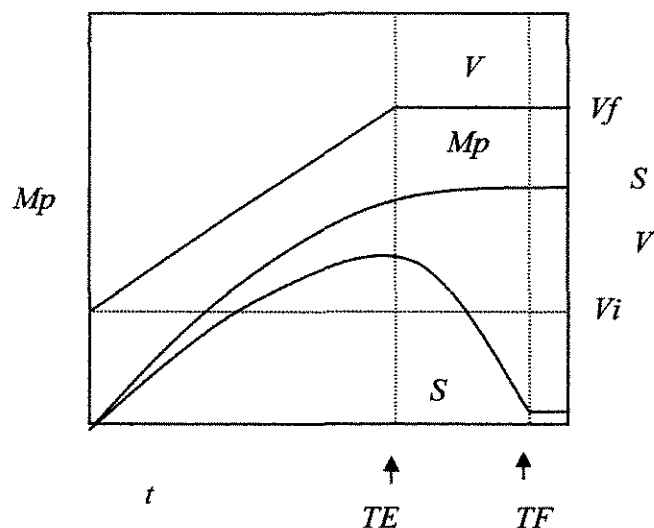


Figura 01. Gráfico do volume de meio ( $V$ ), concentração de substrato ( $S$ ) e massa de produto ( $Mp$ ) em função do tempo em um processo descontínuo - alimentado, com vazão de alimentação constante. Onde  $TE$  é o tempo de enchimento do fermentador em horas ( $h$ ) e  $TF$  é o tempo de fermentação em horas ( $h$ ).

### 3.2.3. Processo contínuo

Esse processo consiste na retirada contínua do produto a uma vazão igual à da alimentação, permitindo um fluxo contínuo, diminuindo assim, o efeito inibitório do etanol e do substrato. A levedura proveniente do tratamento ácido, é adicionada ao processo de forma contínua.

O processo contínuo caracteriza-se por ser um sistema que pode operar por longos períodos de tempo em estado estacionário. A manutenção de volume constante no reator significa a necessidade de se contar com vazões idênticas de alimentação e de retirada do meio. (FACCIOTTI, 2001).

O processo de fermentação contínua tem início em um processo descontínuo, ou seja, carrega-se inicialmente o reator com meio de cultura, procede-se à inoculação com o microrganismo, após algum período de operação descontínua, inicia-se a alimentação de meio de cultura e retirada de caldo, dando início ao processo contínuo. (FACCIOTTI, 2001).

Segundo RODRIGUES et al.(1992) citado por MIGLIARI (2001) esse processo tem apresentado uma maior produtividade, com um aumento que às vezes pode atingir 100% em relação à batelada alimentada.

### 3.3.Características Bioquímicas da Fermentação Alcoólica

Segundo AMORIN et.al (1996) a levedura realiza a fermentação dos açúcares com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas um subproduto desse processo. Se o homem pretende se submeter a essa habilidade metabólica, ele deve buscar conhecimentos que propiciem as leveduras, condições ideais para que elas trabalhem a seu favor, isto é, com maior eficiência na produção de etanol. A célula de levedura possui compartimentos para a adequação de sua atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicose anaeróbica) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação do açúcar (respiração), se dá na mitocôndria.

O álcool só é formado pelas leveduras a partir de monossacarídeos, sendo portanto necessário decompor a sacarose  $C_{12}H_{22}O_{11}$  em d-glicose e d-frutose. Na fermentação alcoólica por leveduras, estes microrganismos fornecem um catalisador orgânico, ou enzima, a invertase, que efetua a hidrólise. A reação da inversão é demonstrada abaixo:

Equação da inversão

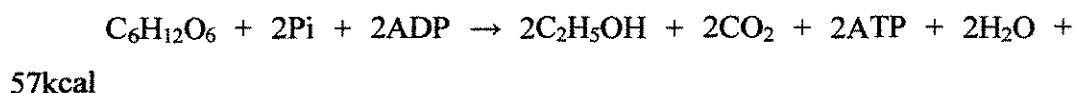


Dois ciclos distintos definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação da levedura. Um deles é a glicólise, que tem a função de “quebrar” a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas, que se situam na parede celular e no interior da célula. Na ausência de oxigênio há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. A equação de Gay-Lussac faz um balanço desta etapa.

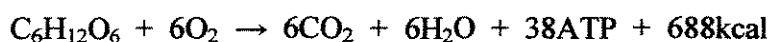
Na presença de oxigênio há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, onde este será oxidado a dióxido de carbono e água.

O balanço global dos dois ciclos resumido pelas equações:

Equação de Gay-Lussac



Ciclo de Krebs



O rendimento teórico ( $Y_{P/S}$ ) para a produção de etanol é de 0,511g/g. Na prática, segundo OURA (1974), este valor não é observado devido a utilização de parte da glicose para a produção de glicerol e álcoois superiores, substâncias necessárias para síntese de material celular e manutenção da levedura.

Frente a um número elevado de reações catalisadas enzimaticamente no metabolismo celular, fatores como pH, temperatura, pressão, concentração de reagentes, concentração de micronutrientes, etc. afetam os parâmetros cinéticos que definem as taxas de reprodução celular, consumo de substrato e produção de etanol.

As leveduras são hoje o mais importante grupo de microrganismo explorado comercialmente. Esse microrganismo tem sido utilizado na produção de produtos químicos, combustíveis e proteínas microbianas para uso alimentar (ROSE & HARRISON, 1987).

### 3.4. Cinética da fermentação alcoólica

Segundo ANDRIETTA (1994), o conhecimento da cinética do processo de fermentação alcoólica é imprescindível não somente para a correção de falhas, mas também para elaborar uma estratégia de controle eficiente para as unidades industriais de produção de etanol, visando sobretudo, maximizar suas eficiências.

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste na análise dos valores de concentração de componentes em função do tempo de fermentação, podendo quantificar a taxa de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados.

A cinética possibilita também a comparação quantitativa entre as condições de cultivo (pH, temperatura, composição do meio, etc), por variáveis como: velocidades de transformação e os fatores de conversão, obtidos pelas curvas de ajuste.

Valores experimentais de X, P e S, isto é, concentração do microrganismo, do produto e do substrato existente no meio de cultura respectivamente, quando representados em função do tempo, permitem traçados das curvas de ajuste (Figura 2). Esta figura mostra um perfil comumente encontrado para processos descontínuos para as concentrações de S, P e X.

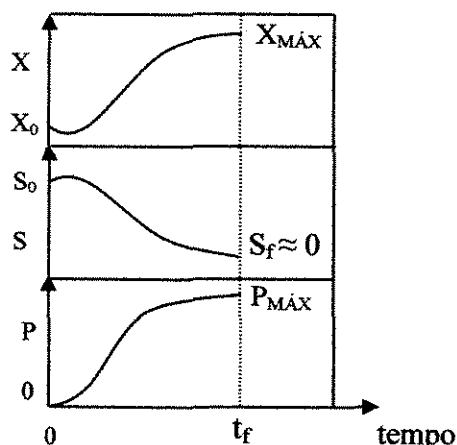


Figura 02. Esboço de curvas de ajuste de uma experiência idealizada de fermentação (HISS, 2001).

A população microbiana aumenta em um cultivo descontínuo, aumentando a concentração do complexo enzimático responsável pela transformação do substrato (S) em produto (P).

Os modelos cinéticos de processos fermentativos podem ser classificados quanto ao número de componentes usados na representação celular, em dois tipos, conforme se detalha a seguir.



Modelos não estruturados: o material celular é representado por uma única variável, por exemplo, a massa celular ou o número de células, sem considerar variações de componentes intracelulares, ou usar tais variações na previsão do comportamento cinético do processo;

Modelos estruturados: as células são descritas com maiores detalhes, considerando, por exemplo, componentes intracelulares, permitindo descrever o estado das células e sua adaptação às mudanças do meio ambiente.

Quanto à heterogeneidade da população microbiana, os modelos cinéticos também são classificados em duas categorias, descritas a seguir.

Modelos não segregados: a população celular é considerada homogênea, isto é, todas as células apresentam o mesmo comportamento;

Modelos segregados: as células são consideradas discretas, como indivíduos de uma população heterogênea, com distribuição de idade, de tamanho e de propriedades celulares.

Obviamente, os modelos segregados e estruturados oferecem uma descrição mais detalhada do comportamento cinético do processo fermentativo que os não segregados e os não estruturados, mas à custa de maior complexidade e maior esforço computacional requerido – em muitos casos a qualidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos não justificam a complexidade e a perda de generalidade introduzida (BONOMI et.al.1975).

#### **3.4.1.Modelos cinéticos**

O estudo cinético de processos de fermentação alcoólica não é recente. MONOD (1949) relacionou a velocidade específica de crescimento de microrganismo com a concentração de substrato. Segundo MOULIN et al (1980) a cinética da fermentação alcoólica é complexa. A taxa de fermentação muda continuamente com o desaparecimento do substrato e formação do produto.

Segundo ANDRIETTA (1994), os modelos não- estruturados e não-segregados, em sua maioria, baseiam-se na determinação da velocidade específica de crescimento do microrganismo ( $\mu$ ) ou da produção de etanol pelo decréscimo da velocidade específica máxima ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) através de alguns termos de inibição.

A equação mais simples para se determinar a velocidade específica de crescimento de microrganismos ( $\mu$ ) é a de Monod, apresentada na equação 1 :

$$\mu = \mu_{MAX} \cdot \frac{S}{S + K_S} \quad (1)$$

Onde:

$\mu$  : velocidade específica de crescimento.

$\mu_{max}$  : velocidade específica máxima de crescimento.

$S$  : concentração de substrato limitante.

$K_S$  : constante de Monod que depende do microrganismo e das condições da cultura.

Esta equação é válida para sistemas onde não há interferências significativas de inibidores, como, baixas concentrações de etanol no meio de fermentação.

Diferentes modelos que descrevem o comportamento da fermentação alcoólica estão disponíveis na literatura. ANDRIETTA (1994) cita DAUGULIS & SWAINE (1987) e THATIPAMALA (1992), que consideram como fatores relevantes a inibição pelo substrato e pelo etanol, desprezando o efeito do substrato limitante. HOPPE & HANSFORD (1982) e MOMBOUQUETE (1986), assumem inibição pelo produto e o substrato limitante como fatores de interferência. CHATTAWAY *et.al.* (1988), consideram esses fatores como sendo a inibição pelo produto e pela concentração de células. Modelos complexos foram estudados por LEE *et.al.* (1983), JARZEBSKI *et.al.* (1989) e MOMBOUQUETE (1992), levam em consideração as inibições pelo produto, pela concentração celular e pelo efeito do substrato limitante.

KELLER & DUNN (1978b), DAUGULIS & SWAINE (1987) E DOURADO *et.al.* (1987), propuseram o modelo descrito na equação 2 para representar o termo de inibição pelo substrato.

$$\mu = \mu_{M\acute{A}X} \cdot \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_4}} \quad (2)$$

$K_4$  é a constante de inibição pelo substrato.

Os modelos citados por BIROL et.al. (1998) levando em consideração a inibição pelo substrato são observados nas equações 3 a 5.

Modelo proposto por:

ANDREWS e NOACK:

$$\mu = \mu_{M\acute{A}X} \cdot \frac{S}{1 + \frac{K_{S,X}}{S} + \frac{S}{K_{I,S}}} \quad (3)$$

AIBA:

$$\mu = \mu_{M\acute{A}X} \cdot \left( \frac{S}{K_{S,X} + S} \right) \exp \left( \frac{-S}{K_{I,S}} \right) \quad (4)$$

LUONG:

$$\mu = \mu_{M\acute{A}X} \cdot \left( \frac{S}{K_{S,X} + S} \right) \left( \frac{1-S}{S_{S,M\acute{A}X}} \right)^N \quad (5)$$

Onde:

$K_{S,X}$  = constante de Monod

$K_{I,S}$  = constante de inibição pelo substrato

$S_{S,m\acute{a}x}$  = concentração limite do substrato inibidor

THATIPAMALA (1992) utiliza o modelo da equação 6:

$$\mu = \mu_{M\acute{A}X} \cdot \left( \frac{S_{M\acute{A}X} - S}{S_{M\acute{A}X} - S_{MIN}} \right) \quad (6)$$

Onde:

$S_{MÁX.}$  = máxima concentração de substrato onde não há crescimento celular

$S_{MIN.}$  = concentração onde se inicia o efeito de inibição.

Os modelos citados por BIROL et.al.(1998) que levam em consideração a inibição pelo produto são observados nas equações 7 e 8.

JERUSALIMSKY:

$$\mu = \mu_{MÁX.} \left( \frac{S}{K_{S,X} + S} \right) \left( \frac{K_{I,Px}}{K_{I,Px} + P} \right) \quad (7)$$

HINSHELWOOD:

$$\mu = \mu_{MÁX.} \left( \frac{S}{K_{S,X} + S} \right) (1 - K_{Px} P) \quad (8)$$

Onde  $K_{S,X}$  é a constante de Monod e  $K_{I,Px}$  é a constante de inibição pelo produto.

GHOSE e THYAGI:

$$\mu = \mu_{MÁX.} \left( 1 - \frac{P}{P_{X,MÁX.}} \right) \quad (9)$$

Onde  $P_{X,máx}$  = concentração limite do produto inibidor.

LUONG (1985) e GROOT et.al. (1992) descreveram o modelo descrito na equação 10 e 11, demonstrando a inibição pelo produto:

$$\mu = \mu_{MÁX.} \left[ \left( 1 - \frac{P}{P_{MÁX.}} \right) \right] \quad (10)$$

$$\mu = \mu_{MÁX.} \left[ \left( 1 - \frac{P}{P_{MÁX.}} \right)^N \right] \quad (11)$$

LEVENSPIEL (1980) e WARREN et.al. (1994) revisaram e generalizaram uma equação matemática com um termo de inibição pelo produto para velocidade específica de crescimento destacada na equação 12:

$$\mu = \mu_{M\acute{A}X.} \left( 1 - \frac{P}{P_{M\acute{A}X.}} \right)^N \left( \frac{S}{K_S + S} \right) \quad (12)$$

LEVENSPIEL (1980) demonstrou que para uma concentração de P bem menor que o valor de  $P_{m\acute{a}x.}$ , a equação 12 se reduz à equação 1, que é a cinética de Monod.

CHATTAWAY et.al. (1988), descreveram um modelo para o termo de inibição pela concentração celular observado na equação 13:

$$\mu = \mu_{M\acute{A}X.} \left( 1 - \frac{X}{X_{M\acute{A}X.}} \right) \quad (13)$$

LEE et.al. (1983), JARZEBSKI et.al. (1989) e MOMBOUQUETE (1992) utilizaram a equação 14 para demonstrar o termo de inibição pela concentração celular:

$$\mu = \mu_{M\acute{A}X.} \left( 1 - \frac{X}{X_{M\acute{A}X.}} \right)^M \quad (14)$$

DOURADO et al.(1987) apresentaram modelos cinéticos para fermentação alcoólica, levando em conta o termo de inibição pelo substrato e pelo produto. Os modelos estão descritos nas equações 15 a 17.

GHOSE & THYAGI (1979):

$$\mu = \mu_{M\acute{A}X.} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \left( 1 - \frac{P}{P_L} \right) \quad (15)$$

SEVELY et.al. (1981):

$$\mu = \mu_M \frac{S}{K_S + S} \frac{K_P}{P + K_P} \left( 1 - \frac{P}{P_M} \right) \quad (16)$$

JIN,CHIANG e WANG (1981):

$$\mu = \mu_{MAX} \cdot e^{(-K_1 P)(-K_2 S)} \frac{S}{K_S + S} \quad (17)$$

O modelo desenvolvido por TOSETTO & ANDRIETTA(2002), leva em consideração a presença de duas fontes de substrato (glicose e frutose). Para glicose, este modelo é baseado no proposto por GHOSE & TYAGI (1979) onde o valor expoente do termo de inibição pelo produto pode assumir valores diferentes de 1. (equação 18).

$$\mu = \mu_{MAX} \cdot \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \left(1 - \frac{P}{P_{MAX}}\right)^N \quad (18)$$

Para a frutose, este modelo tem um termo que leva em consideração o fenômeno da Diauxia como mostrado na equação 19.

$$\mu = \mu_{MAX} \cdot \left(1 - \frac{G}{F}\right) \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \left(1 - \frac{P}{P_{MAX}}\right)^N \quad (19)$$

Onde:

$\left(1 - \frac{G}{F}\right)$  é o termo de diauxia,

G é a concentração de glicose

F é a concentração de frutose

LEE et.al. (1983) citado por ANDRIETTA & MAUGERI (1994) propuseram um modelo, demonstrada na equação 20, que levou em consideração o termo de inibição pelo produto, limitação pelo substrato e pela concentração celular.

$$\mu = \mu_{M\acute{A}X} \cdot \frac{S}{K_S + S} \left( 1 - \frac{P}{P_{M\acute{A}X}} \right)^N \left( 1 - \frac{X}{X_{M\acute{A}X}} \right)^M \quad (20)$$

### 3.5. O efeito da temperatura na fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é uma combinação de interações complexas envolvendo muitas variedades, como a microbiológica e a tecnologia de fabricação. Alguns fatores afetam fortemente a fermentação alcoólica. A temperatura da fermentação, a composição do mosto, a concentração do inóculo. Um desses fatores, a temperatura, afeta diretamente a ecologia microbiana e as reações bioquímicas da levedura (TORIJA *et. al.*, 2003). A temperatura exerce um efeito em todos os aspectos do crescimento, metabolismo, viabilidade e fermentescibilidade das leveduras. A escolha da temperatura de operação na fermentação alcoólica é influenciada por fatores fisiológicos como por problemas físicos, tais como a perda do etanol por evaporação e a grande formação de espumas a temperaturas elevadas.

As várias atividades metabólicas de células possuem temperaturas máxima, mínima e ótima em valores distintos, e a temperatura ótima para fermentação normalmente é maior do que a temperatura ótima para o crescimento.

A fermentação industrial de etanol é operada tipicamente na faixa de 25-35°C, sendo temperaturas próximas de 40°C tem um efeito adverso.

Segundo OLIVEIRA (1988) a *S. cerevisiae*, a temperaturas elevadas, afeta o metabolismo da levedura acarretando diminuição da tolerância ao etanol e formação de metabólitos secundários como o glicerol.

A temperatura tem forte influência no valor da velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo. Segundo DALE *et al.* (1990) a equação de Arrhenius descreve esta dependência.

O comportamento a tolerância ao etanol da *S. cerevisiae* muda drasticamente em relação a temperatura. Temperaturas entre 12°C e 28°C a tolerância ao etanol se mantém constante. Acima de 28°C e abaixo de 12°C ocorre uma queda da

tolerância ao etanol. Segundo VAN UDEN (1985) citado por ANDRIETTA (1994) a tolerância ao etanol pode estar associada aos valores do parâmetro  $P_{m\acute{a}x}$ .

### 3.6.Planejamento Fatorial

Segundo NETO et.al.(2003) utilizando o planejamento fatorial baseado em princípios estatísticos, pode-se extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos.

O método de otimização tem como fundamento o método de planejamento fatorial, e consiste em um grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas (por exemplo, rendimento e produtividade) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas (temperatura, concentração de inóculo e tempo de enchimento do reator).

Para aplicar o método é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada. Então executam-se experimentos com todas possíveis combinações. A primeira etapa é usualmente um planejamento fatorial com dois níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim, para  $n$  variáveis envolvidas, o número de experimentos deve ser realizado para investigar todas as combinações é  $2^n$ . Para estimativa do erro experimental associado aos ensaios, são realizados 3 ensaios no ponto central correspondente às condições intermediárias (BOX et al. 1978) citado por (VIEGAS, 1999).

Neste trabalho, foram realizados os estudos do efeito da temperatura, da concentração do inóculo e da velocidade de enchimento, assim foram realizados  $2^3$  ensaios para verificação de um modelo, três ensaios para o ponto central e mais 6 ensaios distribuídos rotacionalmente (pontos axiais) a uma distância  $\alpha$  da condição do ponto central, sendo  $\alpha$  definido pela equação(21).

$$\alpha = \sqrt[n]{2^N} \quad (21)$$

onde  $n$  é o número de variáveis independentes.



Para avaliar o modelo quadrático em questão tem-se  $\alpha = 1,682$ , portanto para o modelo quadrático são incluídos os níveis  $-1,682$  e  $+1,682$ .

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1.Microrganismos

O microrganismo utilizado nos ensaios da fermentação em batelada alimentada foi a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 produzida pela Mauri do Brasil na forma seca. Esta cepa de levedura é oriunda de processos fermentativos na Índia e é comercializada no Brasil para partidas de plantas industriais de fermentação alcoólica.

### 4.2.Preparo do Inóculo

Foram preparados 2,0 litros de inóculo, hidratando-se o fermento seco, em água destilada a 40°C resultando em uma suspensão de células. A suspensão é agitada por 30 minutos. Em seguida, adiciona-se 63,2g de etanol ao fermento para atingir a concentração de 4,0 GL e agita-se novamente. Esta adição foi feita para que as condições dos ensaios sejam similares às condições industriais. Após a adição do etanol, o pH da suspensão deve ser ajustado a 2,4 através de adição de ácido sulfúrico diluído.

### 4.3.Preparo do substrato de alimentação

A composição do meio utilizado está descrita na Tabela 01.

Tabela 01.Composição do meio sintético.

Componente	Concentração (g/L)
Sacarose	180
Extrato de levedura	6
Cloreto de amônio	5
Fosfato monobásico de potássio	5
Sulfato de magnésio heptahidratado	1
Cloreto de potássio	1

#### 4.4.Descrição do reator

Os ensaios foram realizados em um reator de mistura feito de vidro com 6,0L de capacidade sob agitação mecânica e temperatura controlada através da circulação de água proveniente do banho termostatzado pela serpentina do mesmo. A alimentação do reator foi realizada através de uma bomba peristáltica com vazão controlada. A Figura 03 mostra o esquema do sistema utilizado para fermentação e a alimentação contínua do mosto ao reator.

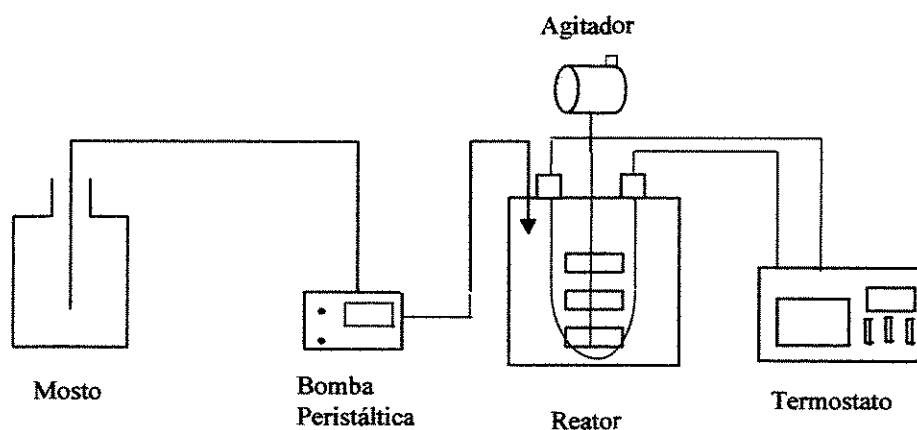


Figura 03. Esquema do sistema utilizado na fermentação e processo de alimentação do mosto ao reator.

#### 4.5.Condução dos ensaios

Após a hidratação do inóculo, 1,5L do mesmo foi transferido para o reator. Este permaneceu em agitação e temperatura controlada até o início da alimentação.

A alimentação do reator foi realizada através de uma bomba peristáltica com vazão controlada até o volume total de aproximadamente 5,0L. Foram recolhidas 50mL de amostra no tempo 0 (antes do início da alimentação) e de hora em hora durante 10 horas de fermentação. Foram imediatamente centrifugadas 20mL da amostra a 4500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido para análise de ART (Açúcares Redutores Totais) e o precipitado foi utilizado para a determinação de massa celular. Para análise de etanol, destilou-se 25mL do vinho fermentado e recolheu-se 50mL em balão volumétrico (garantia que todo etanol foi destilado), o etanol foi recolhido para análise.

Para o cálculo do balanço de massa de cada ensaio realizado, foram obtidos os seguintes dados: o peso do béquer contendo o mosto a ser alimentado, o peso do béquer contendo o mosto depois do tempo de alimentação, o peso do béquer contendo o inóculo, o peso do béquer contendo o inóculo após a adição no reator, o peso de cada amostra retirada e a densidade do mosto.

A Figura 04 representa o esquema geral para condução do ensaio.

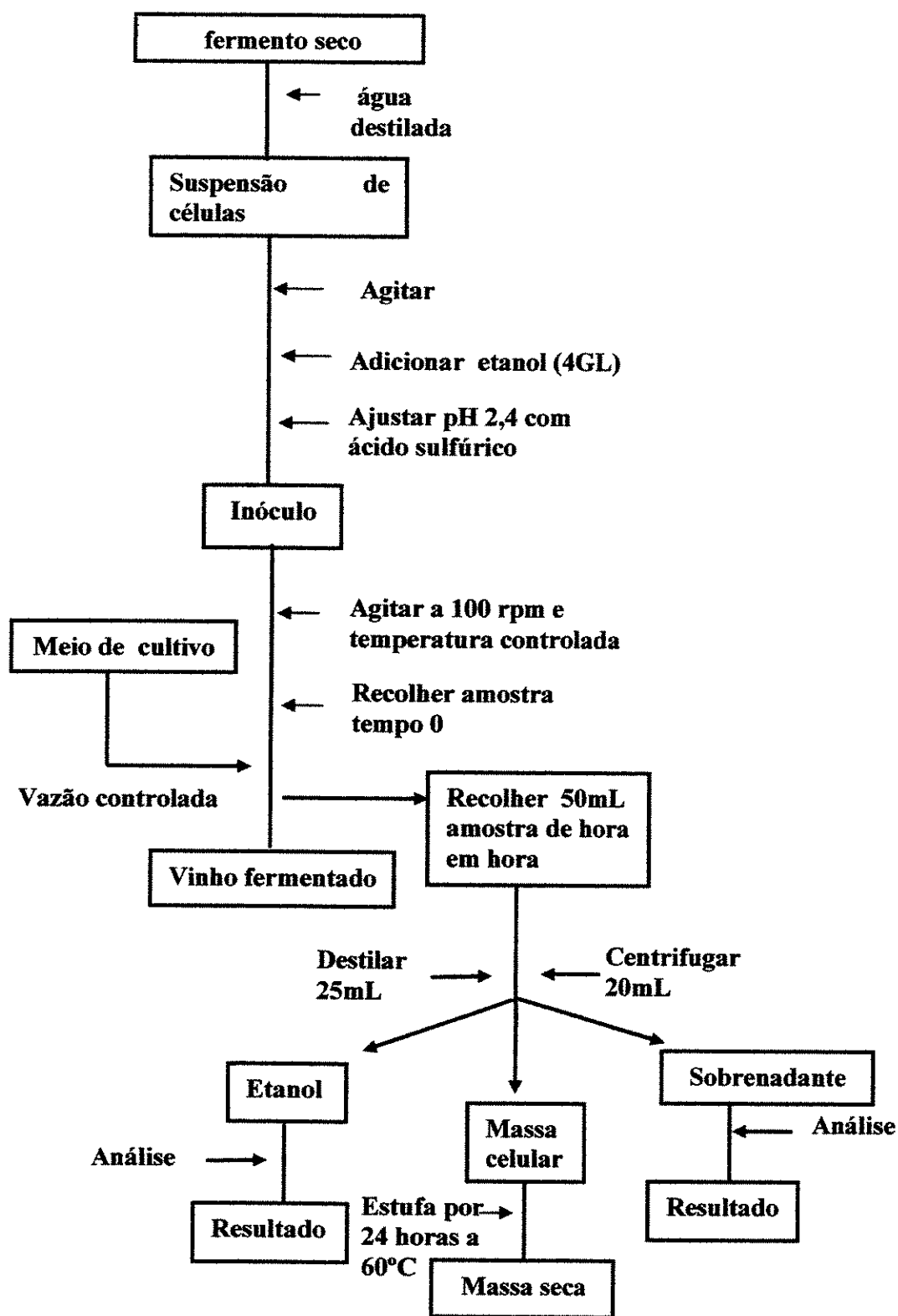


Figura 04. Esquema geral da condução do ensaio.

#### **4.6. Metodologia Analítica**

##### **4.6.1. Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART) – Método do DNS**

Para determinação dos açúcares redutores totais das amostras de fermentação foi utilizado o método do Ácido Dinitro-Salicílico (DNS), descrito por MILLER, 1959.

Como o substrato utilizado nos ensaios foi a sacarose, esta determinação foi procedida de uma inversão ácida, para que esta seja transformada em açúcares redutores.

Foi preparada a curva padrão utilizando concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L de glicose.

##### **4.6.1.1. Análise da amostra**

O sobrenadante recolhido a partir da centrifugação da amostra de fermentação é recolhido para análise de açúcares redutores totais.

No método colorimétrico com reagente DNS é feita a prévia hidrólise da sacarose onde são adicionados em tubos de ensaio 2mL da amostra e 2mL de ácido clorídrico, leva-se ao banho-maria, após resfriamento em banho de gelo, adiciona-se 2mL de hidróxido de sódio. As amostras são diluídas conforme a concentração de ART, mantendo-a na faixa das concentrações de ART da curva padrão. Das amostras preparadas são transferidas 1mL para outro tubo de ensaio e adiciona-se 1mL do reagente DNS. As amostras são levadas ao banho-maria em ebulição, após o resfriamento, adiciona-se água destilada. As absorbâncias das amostras são lidas pelo espectrofotômetro FEMTO 600S a 546 nm.

##### **4.6.2. Determinação do Etanol – Método do Dicromato**

O método espectrofotométrico foi utilizado para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. O método se baseia na oxidação do etanol a ácido acético, através da reação com dicromato de potássio em meio ácido. A

solução adquire um tom castanho proporcional a concentração de álcool na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro a 600nm.

Foi preparada a curva padrão utilizando concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0°GL de etanol.

#### **4.6.2.1. Análise da amostra**

O método colorimétrico com dicromato é realizado da seguinte maneira: as amostras destiladas são diluídas (na proporção de 1:25) e 5mL destas são colocadas em tubos de ensaio, são adicionados 2mL de água em cada tubo e 2mL de reagente dicromato, os tubos são colocados em banho-maria a 60°C durante 30 minutos e resfriados. São lidas as absorbâncias das amostras pelo espectrofotômetro FEMTO 600S a 600 nm.

#### **4.6.3. Determinação da massa seca ( Método gravimétrico)**

Para determinar a massa celular produzida na fermentação foi utilizado o método gravimétrico, que consiste na pesagem do material seco. Primeiramente, pesou-se placas Petri previamente secas, e com o auxílio de uma pipeta volumétrica, transferiu-se 20mL da amostra de vinho fermentado para um tubo de centrífuga. Centrifugou-se a mesma a 4500rpm por 5 minutos. O precipitado é lavado 3 vezes com água destilada e transferido para a placa Petri. Em seguida, esta é seca em estufa com circulação forçada de ar a temperatura de 60 °C por 24 horas e então pesadas novamente. A concentração de massa seca será dada pela diferença de peso dividida pelo volume total de amostra centrifugada.

#### **4.6.4. Determinação do Brix**

Consiste em analisar a porcentagem em peso de sólidos solúveis de cada mosto em refratômetro ótico marca American Optical ABBE Refractometer.

#### 4.7. Planejamento Fatorial

Foram realizados ensaios segundo o método de planejamento experimental de 2 níveis completos e configuração estrela onde as variáveis estudadas foram temperatura, tempo de enchimento do reator e concentração de inóculo e as variáveis resposta, parâmetros cinéticos, rendimento em células e etanol e produtividade.

Na Tabela 02 são apresentados as condições de cada ensaio realizado. Os valores do ponto central para as variáveis estudadas foram escolhidos em função das condições operacionais das destilarias brasileiras.

Tabela 02. Condições dos ensaios realizados.

Ensaio	Valores Codificados			Valores Decodificados			Ordem dos ensaios
	T	TE	CI	T(°C)	TE (horas)	CI (%)	
1	-1	-1	-1	30	1	20	9
2	+1	-1	-1	38	1	20	16
3	-1	+1	-1	30	5	20	13
4	+1	+1	-1	38	5	20	3
5	-1	-1	+1	30	1	40	7
6	+1	-1	+1	38	1	40	14
7	-1	+1	+1	30	5	40	5
8	+1	+1	+1	38	5	40	17
9	-1,682	0	0	27,3	3	30	12
10	+1,682	0	0	40,7	3	30	1
11	0	-1,682	0	34	0	30	10
12	0	+1,682	0	34	6	30	2
13	0	0	-1,682	34	3	13,2	4
14	0	0	+1,682	34	3	46,8	15
15	0	0	0	34	3	30	6
16	0	0	0	34	3	30	11
17	0	0	0	34	3	30	8



Os ensaios foram realizados aleatoriamente, para evitar distorções estatística nos resultados, isto é, para impedir que desvios atípicos sejam associados a determinadas combinações de níveis (NETO *et.al.* 2003).

Os oito primeiros ensaios correspondem ao modelo linear ( $2^3$ ), seguidos por três repetições no ponto central para que o erro experimental fosse estimado e foram realizados seis ensaios que completam o modelo quadrático.

#### 4.8. Cálculo dos rendimentos em etanol, células e produtividade

$$\text{-Rendimento em etanol } (Y_{p/s}) = \frac{\text{Etanol produzido}}{\text{ART consumido}}$$

$$\text{-Rendimento em células } (Y_{x/s}) = \frac{\text{Células produzidas}}{\text{ART consumido}}$$

$$\text{-Produtividade} = \frac{\text{Etanol produzido}}{(\text{Tempo de fermentação} \times \text{Volume de meio de Fermentação})}$$

#### 4.9. Modelagem matemática

Considerando as dornas de fermentação como reatores de mistura perfeita e a densidade do meio de alimentação similar ao do vinho em fermentação e esta constante durante todo o processo, as equações 22 a 25 descrevem o comportamento do processo batelada alimentada.

$$\frac{dV}{dt} = F_0 \quad (22)$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = F_0 S_0 - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot X \cdot V \quad (23)$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot X \cdot V \quad (24)$$

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu \cdot X \cdot V \quad (25)$$

$\mu$  é obtido da seguinte maneira:

$$\mu = \mu_{MAX} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_1}} \left(1 - \frac{P}{P_{MAX}}\right)^N \left(1 - \frac{X}{X_{MAX}}\right)^M \quad (26)$$

Os parâmetros  $\mu_{MAX}$ ,  $K_S$ ,  $K_1$ ,  $P_{MAX}$ ,  $X_{MAX}$ ,  $N$  e  $M$  foram ajustados tendo como base os dados levantados nos ensaios realizados no laboratório.

#### 4.10. Ajuste dos Parâmetros

Os parâmetros cinéticos foram ajustados a partir de uma rotina de ajuste desenvolvido em DELPHI 5.0 por pesquisadores da Divisão de Biotecnologia e Processos do CPQBA/UNICAMP. Foi utilizado para o ajuste dos parâmetros o modelo proposto por LEE et.al. (1983) (equação 26) modificado para este trabalho com a adição de um termo de inibição pelo substrato. O ajuste dos parâmetros são realizados através da minimização do desvio entre os valores experimentais e os obtidos pelo modelo, determinado através da somatória do quadrado das diferenças obtidas para cada ponto (mínimo quadrado).

#### 4.11.Efeito das variáveis

De posse dos parâmetros ajustados  $\mu_{MAX}$ ,  $K_S$ ,  $K_I$ ,  $P_{MAX}$ ,  $X_{MAX}$ ,  $N$  e  $M$  para cada ensaio, utilizou-se o Software- Statistica 5.0 para determinar os parâmetros cinéticos que apresentaram variação significativa em relação às variáveis estudadas. Os modelos fornecidos pelo Software- Statistica 5.0, que relacionam cada parâmetro cinético com as variáveis estudadas foram utilizados para formar o modelo válido para toda a faixa estudada.

#### 4.12.Validação do Modelo

Foram realizados quatro ensaios para validação do modelo, a Tabela 03 mostra as condições dos ensaios realizados.

Tabela 03. Condições dos ensaios de validação.

Ensaio	T (°C)	TE (horas)	CI (%)
1	32	2	25
2	36	4	35
3	39	2	35
4	29	4	43

## 5. Resultados e Discussões

### 5.1. Perfil Fermentativo

As Figuras 05 a 13 mostram a concentração de células, etanol e ART em função do tempo para todos os ensaios realizados.

As concentrações de ART, etanol e células obtidas para cada ensaio fermentativo estão contidas nas tabelas do Anexo A.

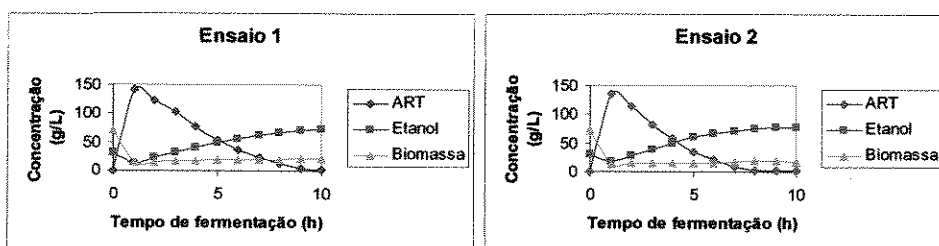


Figura 05. Perfil fermentativo do Ensaio 1 e 2 respectivamente.

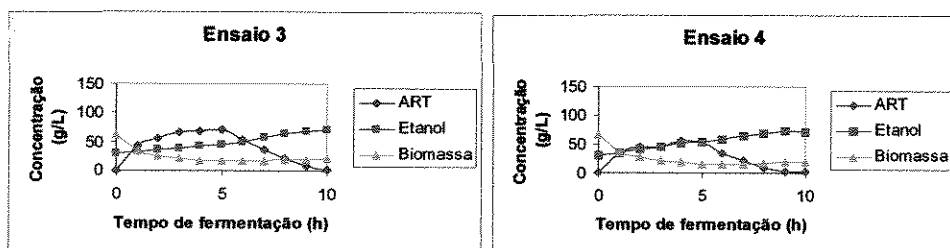


Figura 06. Perfil fermentativo do Ensaio 3 e 4 respectivamente.

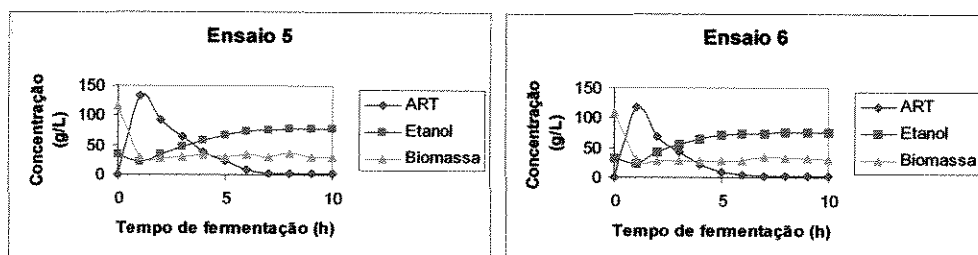


Figura 07. Perfil fermentativo do Ensaio 5 e 6 respectivamente.

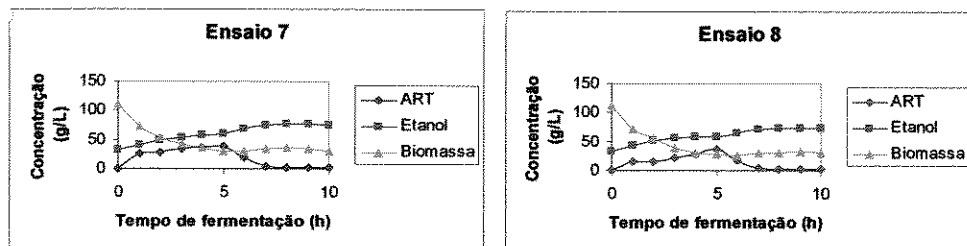


Figura 08. Perfil fermentativo do Ensaio 7 e 8 respectivamente.

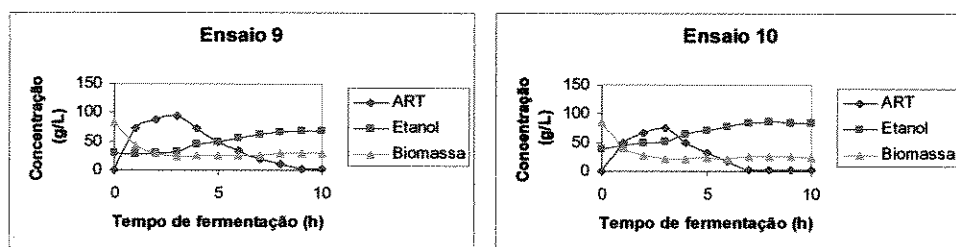


Figura 09. Perfil fermentativo do Ensaio 9 e 10 respectivamente.

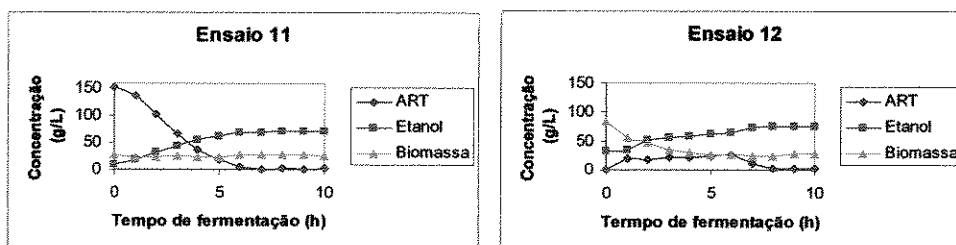


Figura 10. Perfil fermentativo do Ensaio 11 e 12 respectivamente.

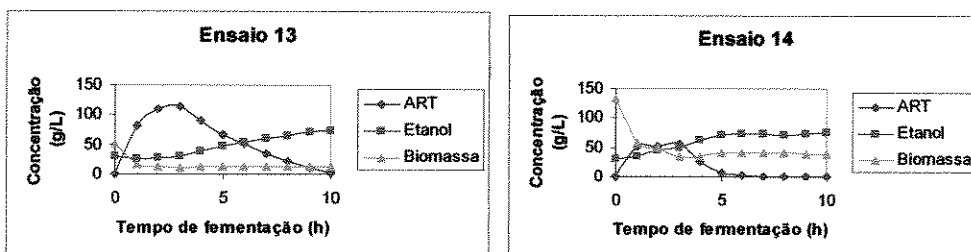


Figura 11. Perfil fermentativo do Ensaio 13 e 14 respectivamente.

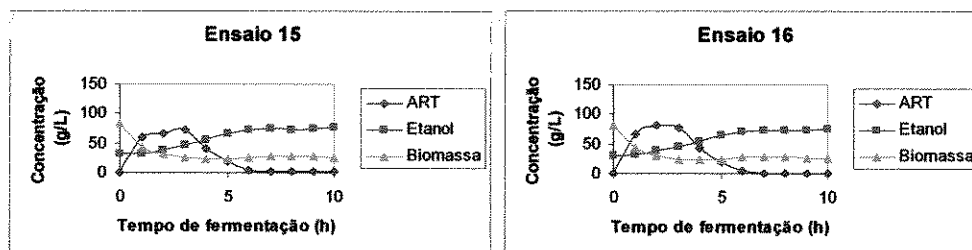


Figura 12. Perfil fermentativo do Ensaio 15 e 16 respectivamente

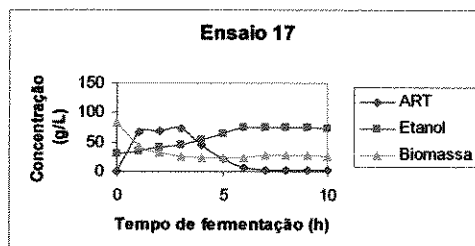


Figura 13. Perfil fermentativo do Ensaio 17.

Observa-se pelas Figuras 05 a 13 que os perfis de ART, produto e células variaram significativamente para cada condição estudada. Desta forma, o modelo cinético a ser aplicado deve ser bastante flexível para descrever corretamente toda a faixa de valores atribuídas as variáveis estudadas. Verifica-se através dos perfis dos ensaios que o tempo de enchimento influencia significativamente o comportamento da curva de concentração de ART, chegando em torno de 140g/L quando o enchimento é realizado em 1 hora, como pode ser observado nos ensaios 1,2,5 e 6.

## 5.2. Produtividade e Rendimentos

A Tabela 04 mostra os dados dos rendimentos e produtividade de cada ensaio realizado.

Tabela 04. Produtividade e rendimentos em células e produto de cada ensaio.

Ensaio	T(°C)	TE(h)	CI(%)	Produtividade (g/Lh)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$
1	30	1	20	6,32	0,023	0,42
2	38	1	20	6,70	0,02	0,42
3	30	5	20	6,23	0,022	0,45
4	38	5	20	6,27	0,017	0,43
5	30	1	40	8,34	0,025	0,45
6	38	1	40	9,26	0,019	0,46
7	30	5	40	7,42	0,025	0,45
8	38	5	40	7,00	0,026	0,46
9	27,3	3	30	5,97	0,029	0,46
10	40,7	3	30	8,07	0,015	0,46
11	34	0	30	8,82	0,022	0,41
12	34	6	30	7,32	0,019	0,41
13	34	3	13,2	6,46	0,019	0,41
14	34	3	46,8	9,35	0,023	0,43
15	34	3	30	9,6	0,019	0,44
16	34	3	30	9,24	0,015	0,46
17	34	3	30	8,03	0,018	0,44

Onde  $Y_{X/S}$ ,  $Y_{P/S}$  e Produtividade foram calculados através do balanço de massa (equações do item IV.8)

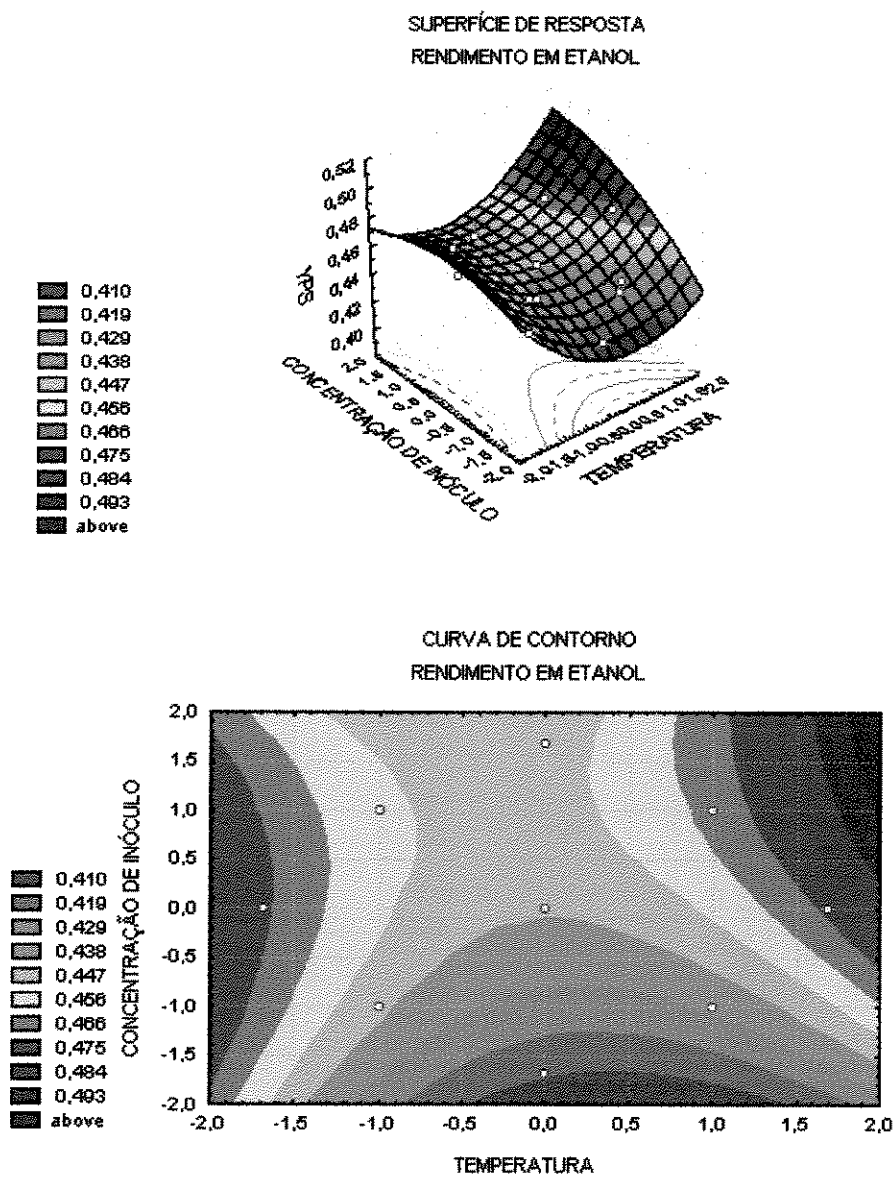
Observa-se pelos resultados contidos na Tabela 04 que nos ensaios, onde o valor da variável concentração de inóculo assumiu valores baixos (20% e 13,2%) obteve-se valores de produtividade baixa, mostrando uma forte dependência entre estas variáveis, também para valores de temperatura baixa (27,3°C) como no ensaio 9, a produtividade obtida foi baixa. Observa-se ainda que em alguns ensaios

obteve-se alto rendimento em etanol e baixa produtividade (ensaio 3 e 9) e alta produtividade e baixo rendimento em etanol (ensaio 11 e 15), mostrando um comportamento antagônico entre as duas variáveis.

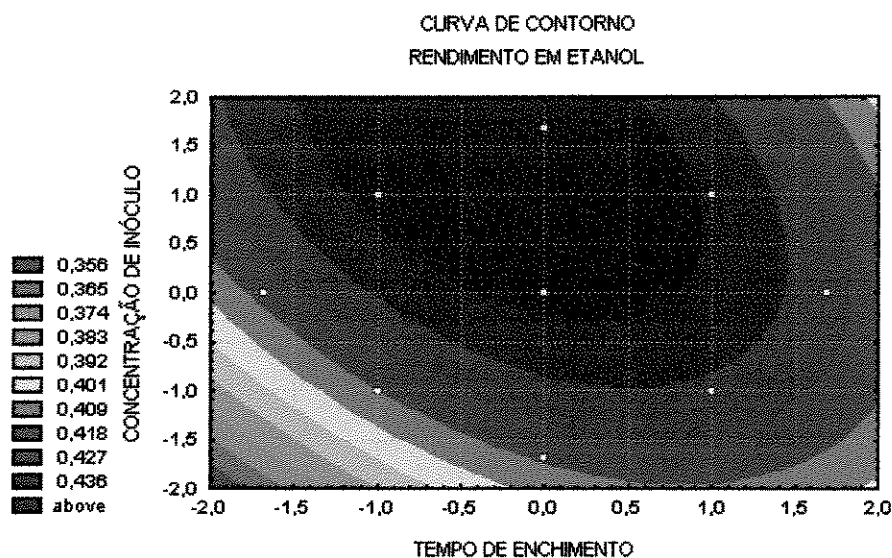
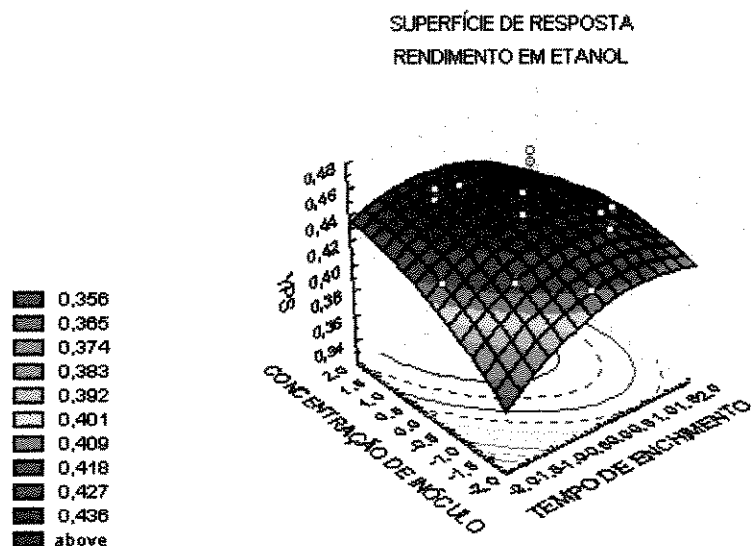
### **5.3. Efeito das variáveis em relação aos rendimentos e produtividade**

Utilizando o “Software Statistica 5.0” obteve-se os efeitos de cada variável em relação ao rendimento em etanol e em células e a produtividade, a análise de variância do modelo, as superfícies de resposta e a curva de contorno. As Figuras 14 a 16 apresentam as superfícies de resposta (a) e as curvas de contorno (b) para o rendimento em etanol que obtiveram significância em relação as variáveis. As Figuras apresentam o rendimento em etanol em função da concentração de inóculo e da temperatura, do tempo de enchimento e da concentração de inóculo e da temperatura e do tempo de enchimento, respectivamente (apresentados com os valores codificados).

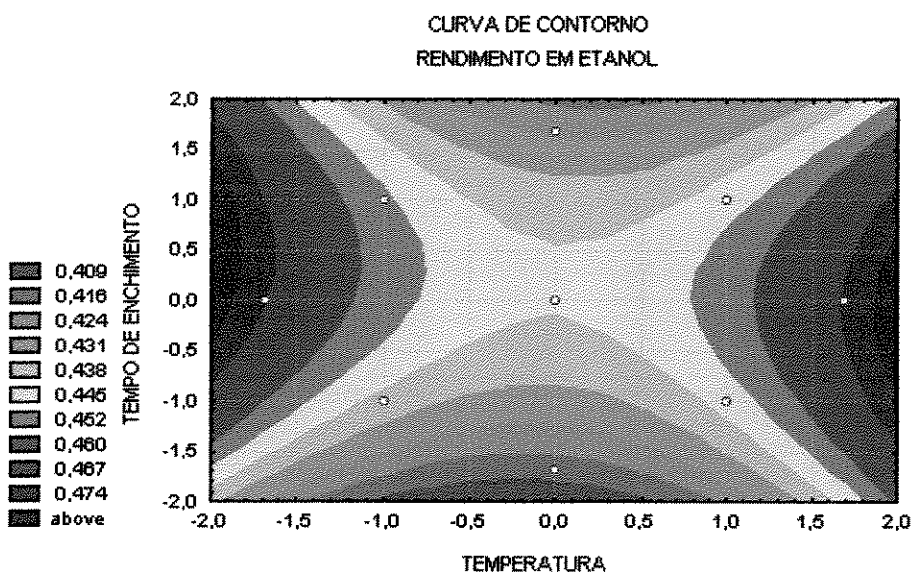
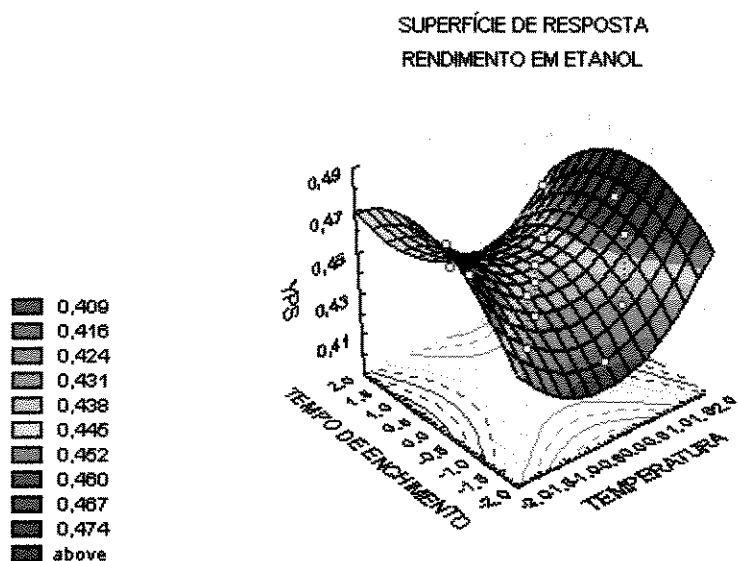




Figuras 14a e 14b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno –  $Y_p/s$ , para as variáveis concentração de inóculo e temperatura.



Figuras 15a e 15b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno –  $Y_p/s$ , para as variáveis concentração de inóculo e tempo de enchimento.



Figuras 16a e 16b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno –  $Y_p/s$ , para as variáveis tempo de enchimento e temperatura.

Através das Figuras 14 e 16 verifica-se que o rendimento em etanol varia significativamente com a temperatura, sendo que o rendimento em etanol obtido nos ensaios é alto quando o valor da variável temperatura assume valores extremos (27,3°C e 38°C). Este resultado para temperaturas elevadas não era esperado, no entanto, como se trata de células com um único ciclo, estas temperaturas extremas podem possuir algum efeito positivo nas células, já que a temperatura de

fermentação é sempre superior ao do crescimento celular. (OLIVEIRA,1988). Através da Figura 15 verifica-se que o rendimento em etanol também obteve significância com a concentração de inóculo, quanto maior a concentração de inóculo maior  $Y_{p/s}$ .

A equação 27 mostra matematicamente a relação do rendimento em etanol ( $Y_{p/s}$ ) com as variáveis estudadas.

$$Y_{p/s} = 0,438735 + 0,010124 * T^2 + 0,002929 * TE - 0,007554 * TE^2 + 0,009785 * XI - 0,004018 * XI^2$$

(27)

A Tabela 05 faz uma avaliação do desempenho do modelo obtido, onde a percentagem de variação explicada ( $R^2$ ) é dada pela equação:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T}$$

Onde:

$SQ_R$ : soma quadrática da regressão

$SQ_T$ : soma quadrática total

No modelo em estudo obteve-se um valor de  $R^2$  igual a 0,851, o que significa que 85,1% das variações nos resultados podem ser explicadas pelo modelo.

Tabela 05. ANOVA para o rendimento em etanol. (SS= Soma quadrática, df= número de graus de liberdade, MS= média quadrática).

Fator	SS	df	MS	F	p
Temperatura (L)	0,00000	1	0,00000	0,00000	1,00000
Temperatura (Q)	<b>0,000950</b>	<b>1</b>	<b>0,000950</b>	<b>6,933893</b>	<b>0,038891</b>
Tempo de Enchimento (L)	0,000117	1	0,000117	0,855507	0,390683
Tempo de Enchimento (Q)	0,000529	1	0,000529	3,859727	0,097072
Concentração de inóculo (L)	<b>0,001308</b>	<b>1</b>	<b>0,001308</b>	<b>9,548814</b>	<b>0,021385</b>
Concentração de inóculo (Q)	0,000150	1	0,000150	1,092128	0,336264
1L por 2L	0,000050	1	0,000050	0,365110	0,567811
1L por 3L	0,000200	1	0,000200	1,460441	0,272322
2L por 3L	0,000200	1	0,000200	1,460441	0,272322
Lack of Fit	0,000822	5	0,000164		
Erro	0,000822	6	0,000137		
Total SS	0,005500	15			

$$F_{2,13} = 3,81 \text{ (nível de confiança de 95\%)}$$

Onde:

L : linear

Q : quadrático

Na tabela 05, os valores em **negrito** indicam os fatores em que o rendimento em etanol obteve significância.

A precisão adequada do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 17 onde são apresentados os valores residuais (valores observados experimentalmente) versus os valores previstos pelo modelo.

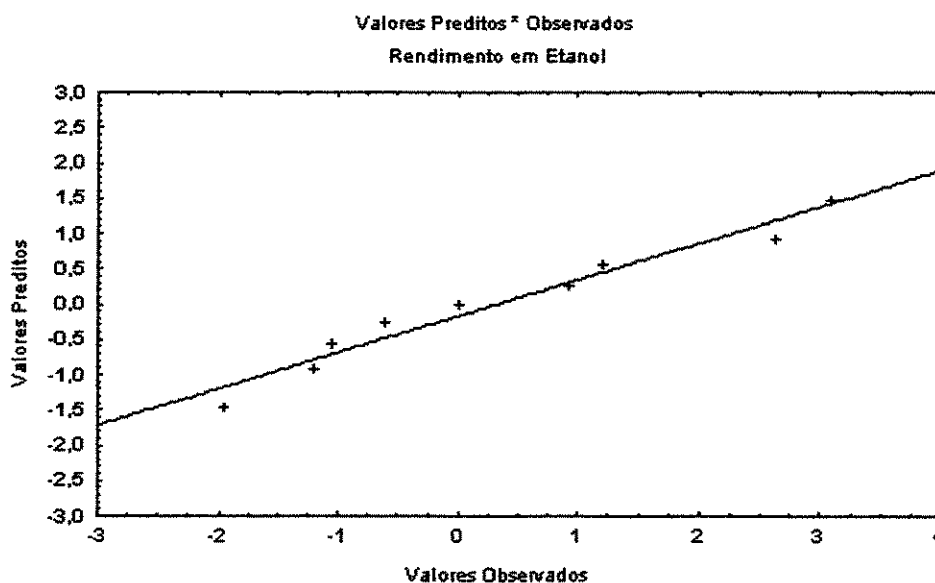
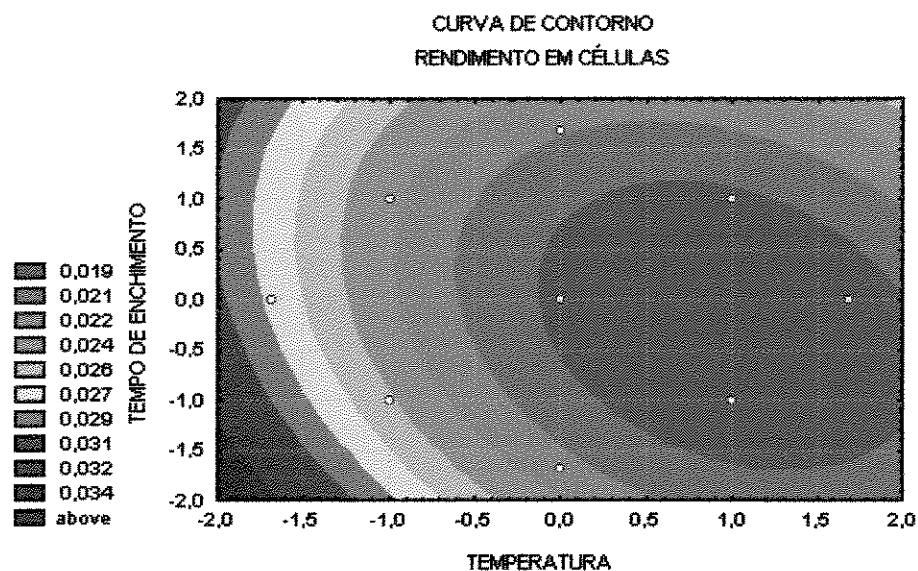
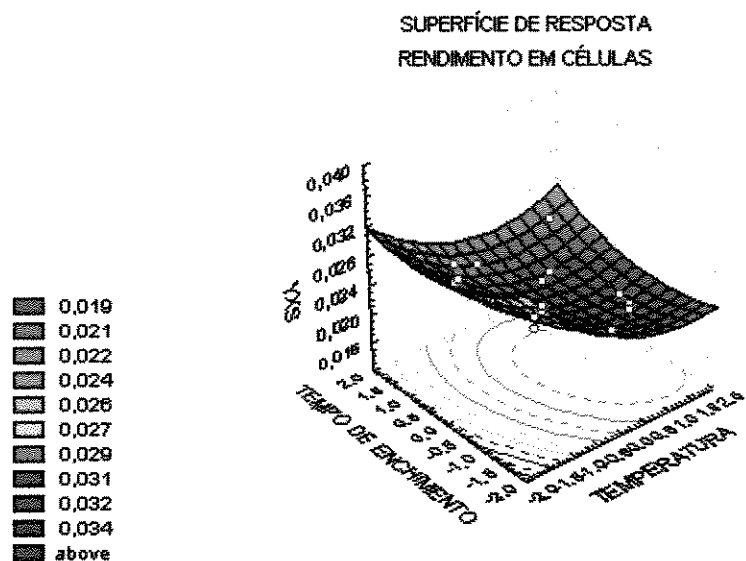


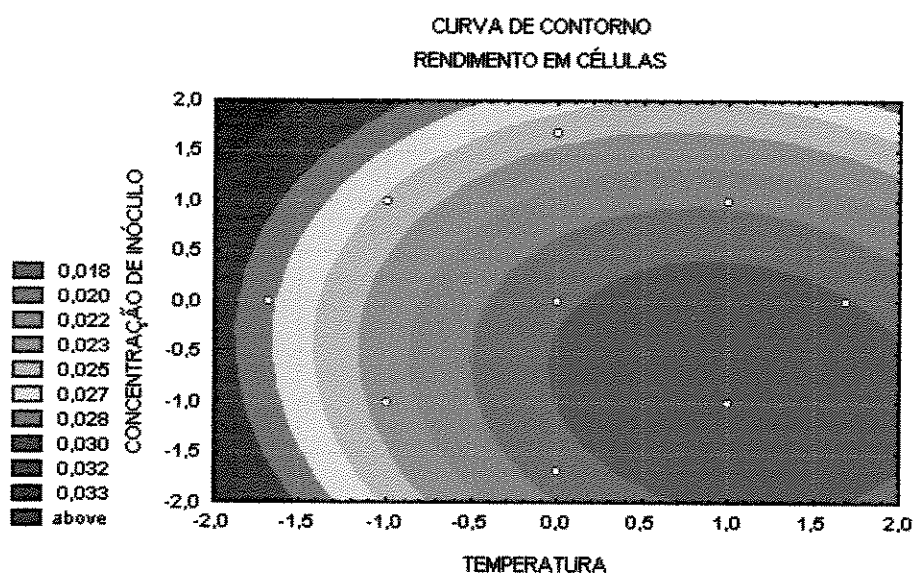
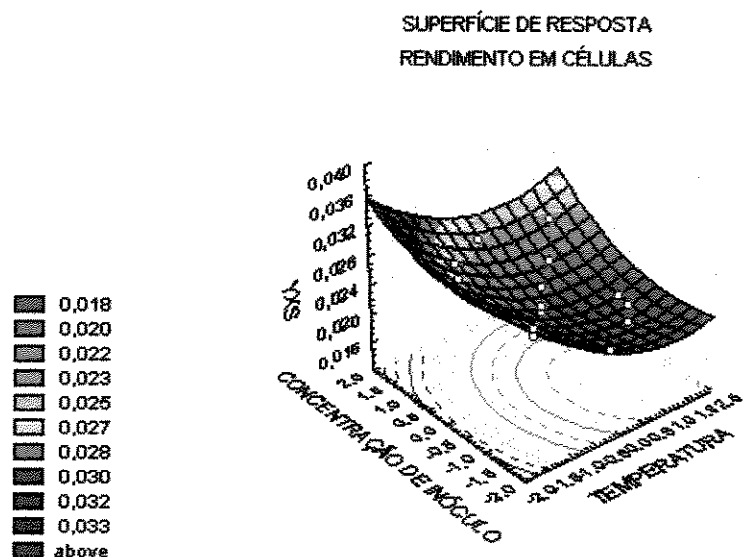
Figura 17. Valores residuais vs. Valores preditos do planejamento completo do rendimento em etanol.

Observa-se pela Figura 17 que houve um bom ajuste dos dados experimentais e ajustes obtidos pelo modelo.

As Figuras 18 e 19 apresentam as superfícies de resposta (a) e as curvas de contorno (b) para o rendimento em células que obtiveram significância em relação as variáveis. As Figuras apresentam o rendimento em células em função do tempo de enchimento e da temperatura e da concentração de inóculo e da temperatura, respectivamente (apresentados com os valores codificados).



Figuras 18a e 18b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno –  $Y_{x/s}$ , para as variáveis tempo de enchimento e temperatura.



Figuras 19a e 19b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno –  $Y_{x/s}$ , para as variáveis concentração de inóculo e temperatura.

Através destas figuras verifica-se que o rendimento em células obteve significância com a temperatura, quanto menor a temperatura, maior  $Y_{x/s}$ , resultado esperado já que a temperatura de crescimento celular é menor que a temperatura de fermentação.

Através dessas relações foi determinada uma equação (equação 28) que relaciona  $Y_{x/s}$  com as variáveis estudadas.

$$Y_{x/s} = 0,018423 - 0,002676 * T + 0,001423 * T^2 - 0,00015 * TE + 0,000893 * TE^2 + 0,001444 * XI + 0,001069 * XI^2 \quad (28)$$

A Tabela 06 faz uma avaliação do desempenho do modelo obtido. No modelo em estudo obteve-se um valor de  $R^2$  igual a 0,807, o que significa que 80,7% das variações nos resultados podem ser explicadas pelo modelo.

Tabela 06. ANOVA para o rendimento em células. (SS= Soma quadrática, df= número de graus de liberdade, MS= média quadrática)

Fator	SS	df	MS	F	p
Temperatura (L)	<b>0,000098</b>	<b>1</b>	<b>0,000098</b>	<b>14,69701</b>	<b>0,008622</b>
Temperatura (Q)	0,000019	1	0,000019	2,81924	0,144145
Tempo de Enchimento (L)	0,000000	1	0,000000	0,04604	0,837213
Tempo de Enchimento (Q)	0,000007	1	0,000007	1,10943	0,332763
Concentração de inóculo (L)	0,000028	1	0,000028	4,28253	0,083954
Concentração de inóculo (Q)	0,000011	1	0,000011	1,59235	0,253825
1L por 2L	0,000003	1	0,000003	0,46965	0,518735
1L por 3L	0,000001	1	0,000001	0,16907	0,695220
2L por 3L	0,000015	1	0,000015	2,27309	0,182362
Lack of Fit	0,000039	5	0,000008	15,7695	0,188797
Erro	0,000040	6	0,000007		
Total SS	0,000207	15			

$$F_{2,13} = 3,81 \text{ (nível de confiança de 95\%)}$$

Onde:

L : linear

Q : quadrático

Na Tabela 06, os valores em destaque indicam os fatores em que o rendimento em células obteve significância.

Na Figura 20 são mostrados os valores residuais ( valores observados ) e os valores previstos do planejamento completo, e através dela pode-se visualizar de uma maneira mais clara o desvio ocorrido entre esses valores.



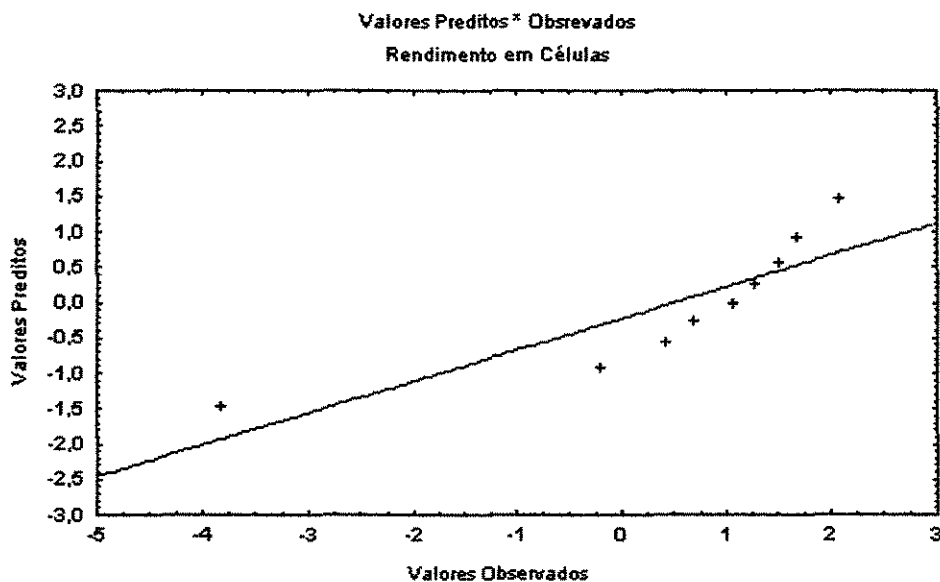


Figura 20. Valores residuais vs. Valores preditos do planejamento completo do rendimento em células.

As Figuras 21 a 23 apresentam as superfícies de resposta (a) e as curvas de contorno (b) para a produtividade que obtiveram significância em relação as variáveis. As Figuras apresentam a produtividade em função do tempo de enchimento e da temperatura, da concentração de inóculo e da temperatura e da concentração de inóculo e do tempo de enchimento, respectivamente (apresentados com os valores codificados).

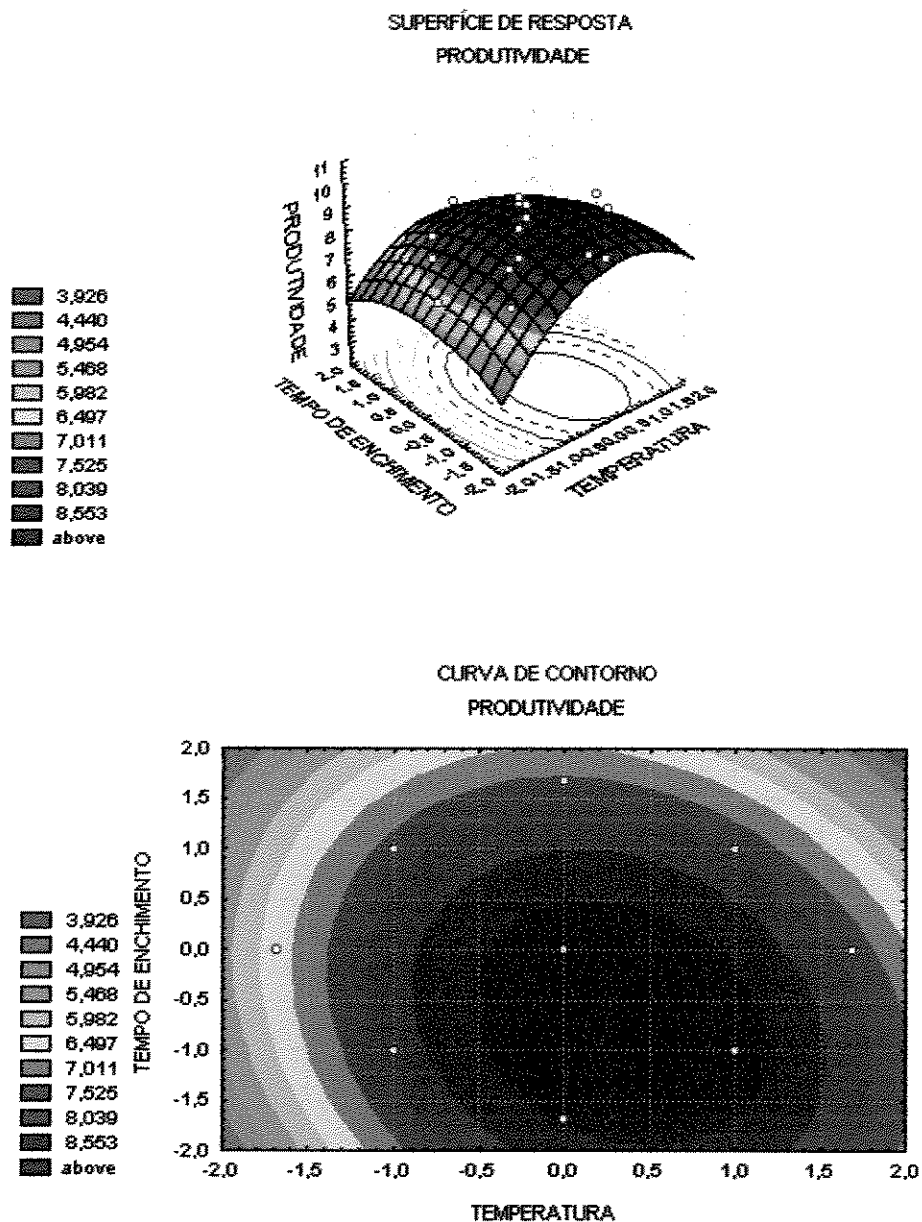


Figura 21a e 21b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno – Produtividade, para as variáveis tempo de enchimento e temperatura.

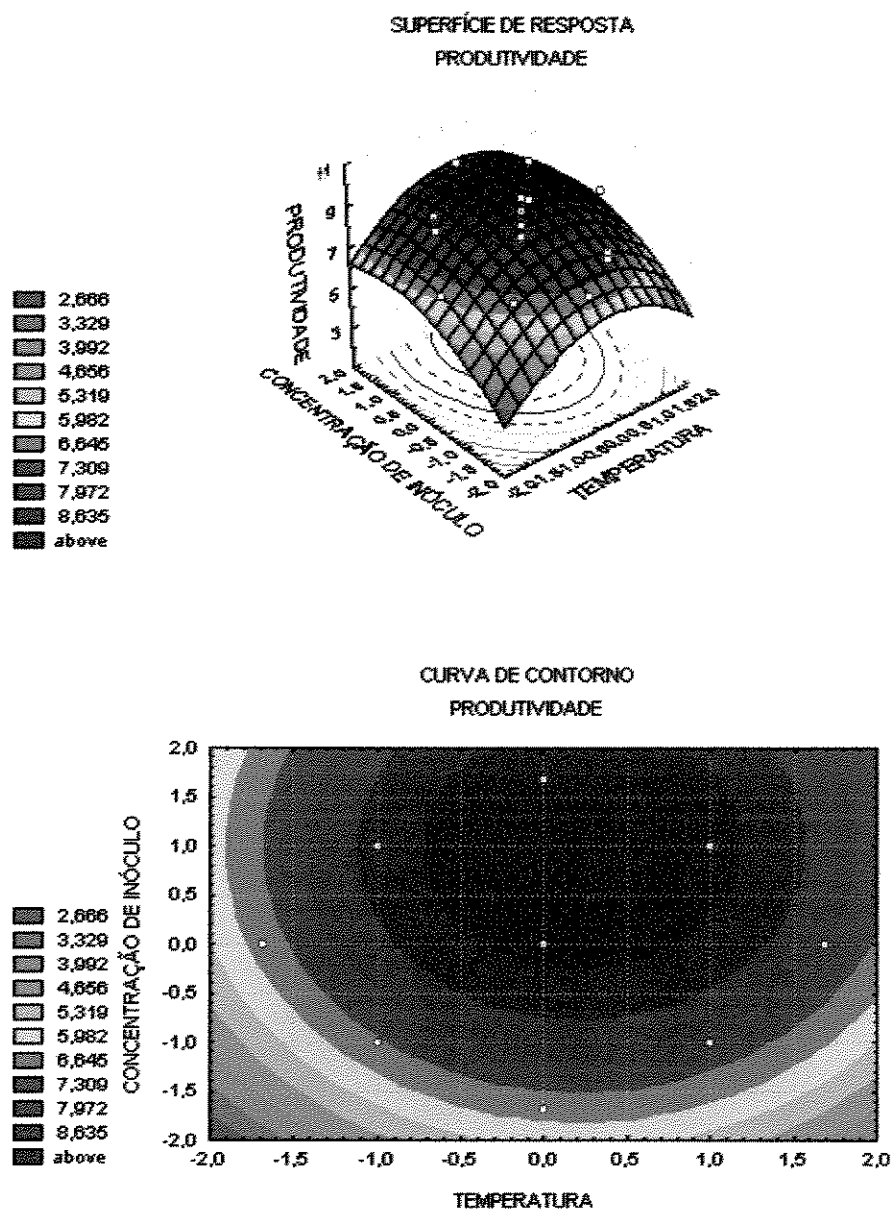


Figura 22a e 22b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno – Produtividade, para as variáveis concentração de inóculo e temperatura.

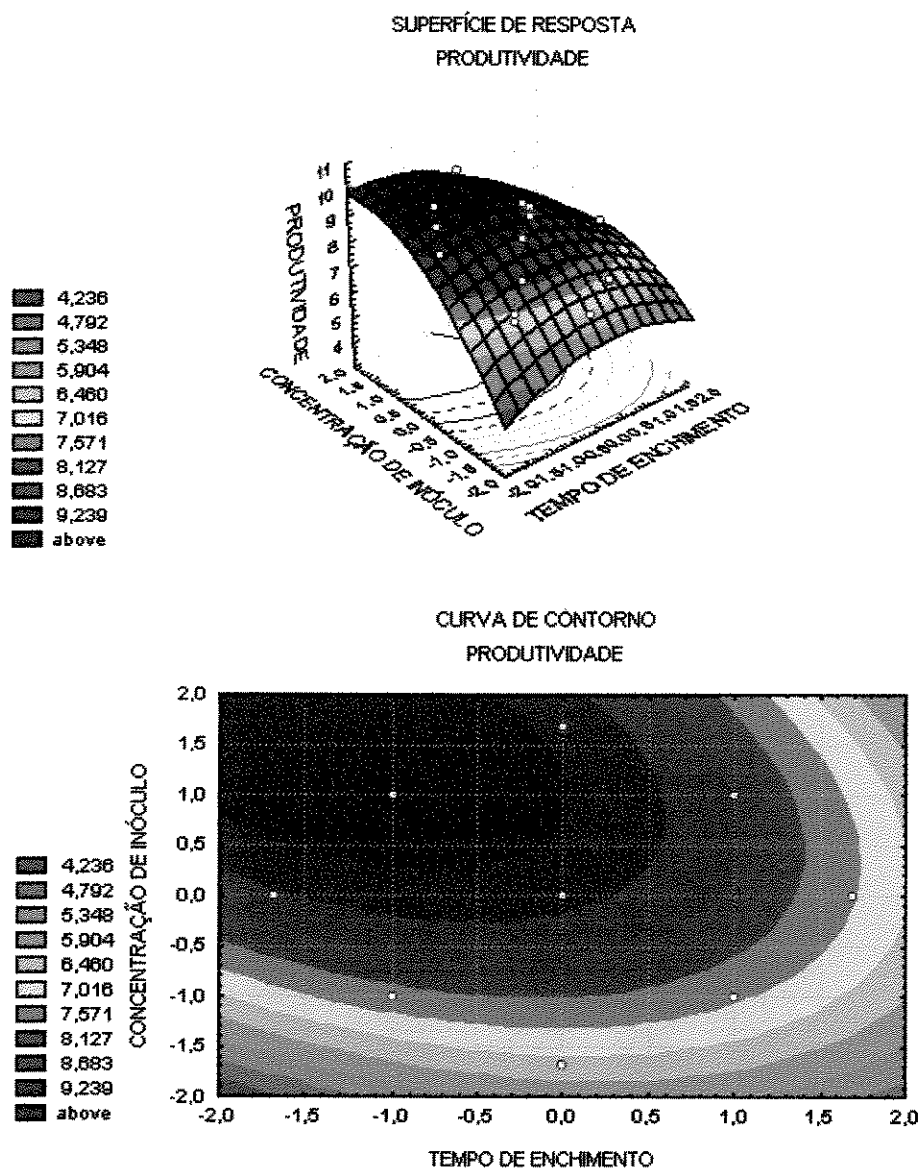


Figura 23a e 23b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno – Produtividade, para as variáveis concentração de inóculo e tempo de enchimento.

Através destas figuras verifica-se que a produtividade obteve significância com a temperatura, com a concentração de inóculo e com o tempo de enchimento. Quanto maior a concentração de inóculo maior a produtividade, baixo tempo de enchimento do bioreator, aumenta a produtividade e quando a temperatura assume valores extremos a produtividade diminui. O modelo é apresentado pela equação 29 e correlaciona a produtividade com o tempo de enchimento, concentração de inóculo e temperatura.

$$Prod. = 8,674913 - 0,667348 * T^2 - 0,455646 * TE + 0,831845 * XI \quad (29)$$

A Tabela 07 faz uma avaliação do desempenho do modelo obtido. No modelo em estudo obteve-se um valor de  $R^2$  igual a 0,894, o que significa que 89,4% das variações nos resultados podem ser explicadas pelo modelo.

Tabela 07. ANOVA para o produtividade. (SS= Soma quadrática, df= número de graus de liberdade, MS= média quadrática).

Fator	SS	df	MS	F	p
Temperatura (L)	1,45115	1	1,451155	3,83702	0,097854
Temperatura (Q)	<b>4,12581</b>	<b>1</b>	<b>4,125813</b>	<b>10,90912</b>	<b>0,016349</b>
Tempo de Enchimento (L)	<b>2,83534</b>	<b>1</b>	<b>2,835343</b>	<b>7,49697</b>	<b>0,033823</b>
Tempo de Enchimento (Q)	0,81233	1	0,812328	2,14789	0,193119
Concentração de inóculo (L)	<b>9,45007</b>	<b>1</b>	<b>9,450073</b>	<b>24,98707</b>	<b>0,002456</b>
Concentração de inóculo (Q)	1,16392	1	1,163919	3,07753	0,129917
1L por 2L	0,35280	1	0,352800	0,93284	0,371425
1L por 3L	0,00080	1	0,000800	0,00212	0,964809
2L por 3L	0,88445	1	0,884450	2,33859	0,177073
Lack of Fit	1,50878	5	0,301756	0,244843	0,900751
Erro	2,26919	6	0,378198		
Total SS	21,43100	15			

$F_{2,13} = 3,81$  (nível de confiança de 95%)

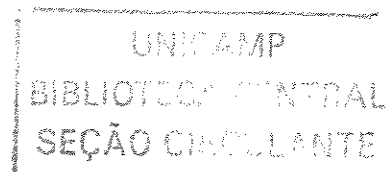
Onde:

L : linear

Q : quadrático

Na Tabela 07, os valores em destaque indicam os fatores em que a produtividade obteve significância.

Através da Figura 24 é possível ter uma visualização do desvio ocorrido.



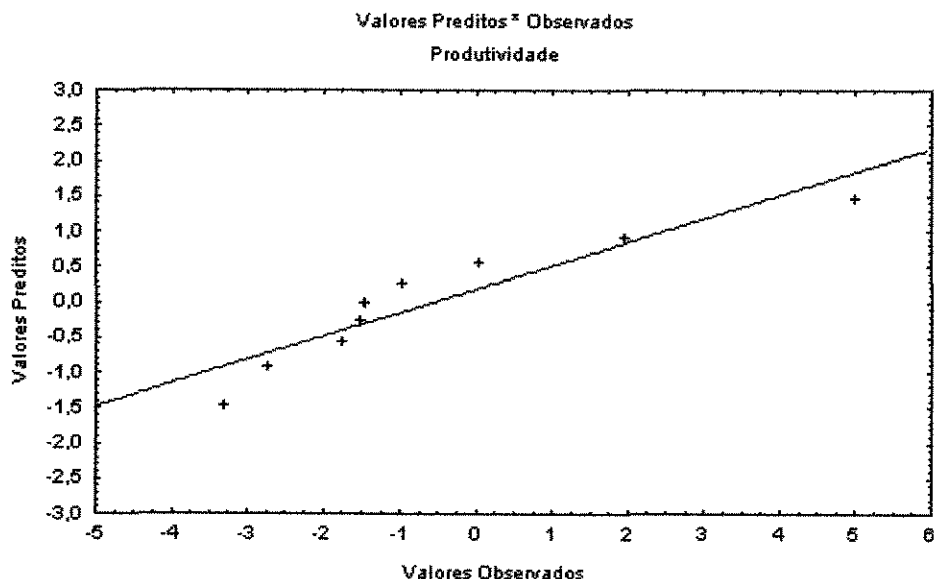


Figura 24. Valores observados vs. Valores preditos do planejamento completo da produtividade.

Através das Figuras 17, 20 e 24 pode-se verificar que o desvio apresentado entre esses valores obteve variações pequenas, indicando um bom ajuste do modelo.

#### 5.4. Ajuste dos Parâmetros Cinéticos considerando uma única fonte de substrato (ART)

No Anexo A estão as tabelas contendo os resultados experimentais obtidos em cada fermentação, as quais foram utilizadas como base para determinação dos parâmetros cinéticos. Para a realização do ajuste dos parâmetros cinéticos foi utilizado o modelo de LEE (1983) modificado apresentado na equação 26.

As Figuras 25 a 33 mostram os ajustes obtidos para cada ensaio realizado.

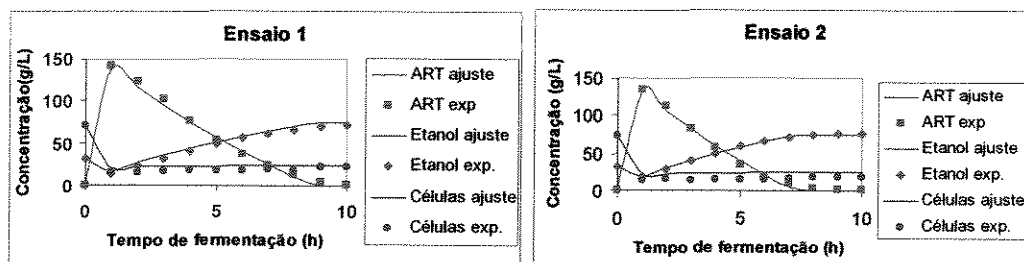


Figura 25. Ajustes aos dados experimentais do Ensaio 1 e do Ensaio 2.

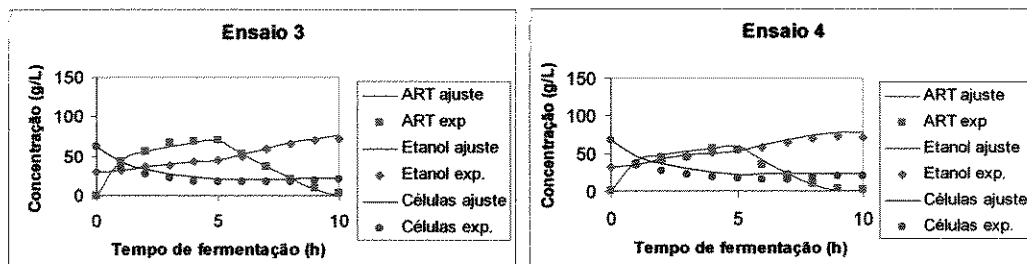


Figura 26. Ajustes aos dados experimentais do Ensaio 3 e do Ensaio 4 .

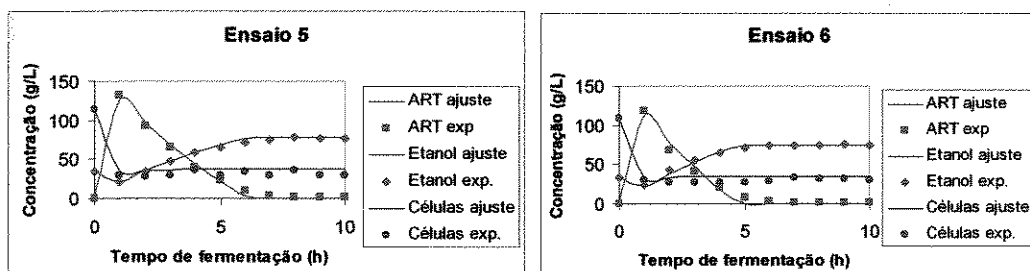


Figura 27. Ajustes aos dados experimentais do Ensaio 5 e do Ensaio 6 .

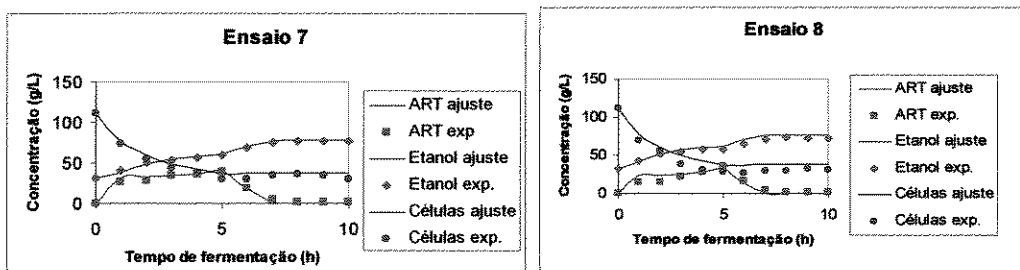


Figura 28. Ajustes aos dados experimentais do Ensaio 7 e do Ensaio 8 .

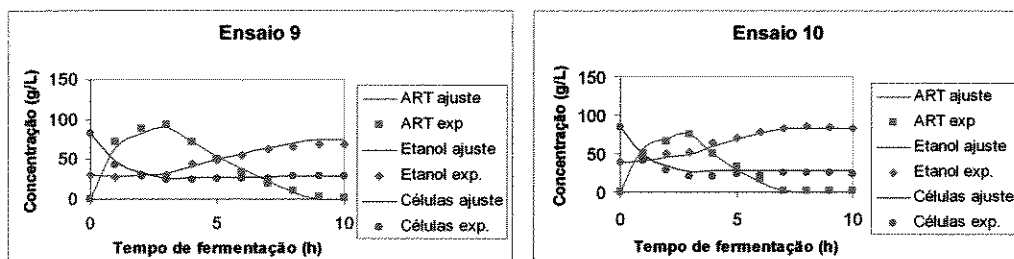


Figura 29. Ajustes aos dados experimentais do Ensaio 9 e do Ensaio 10.

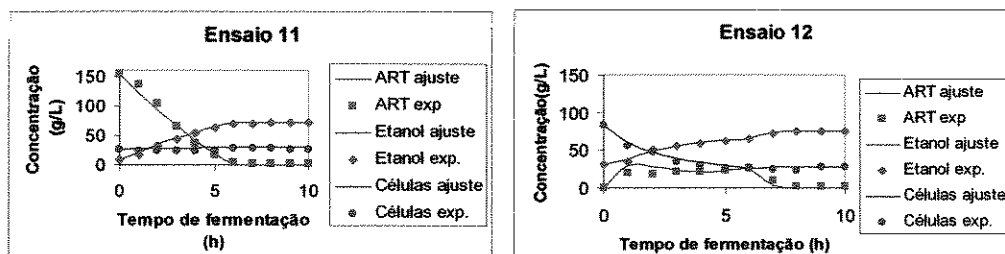


Figura 30. Ajustes aos dados experimentais do Ensaio 11 e do Ensaio 12.

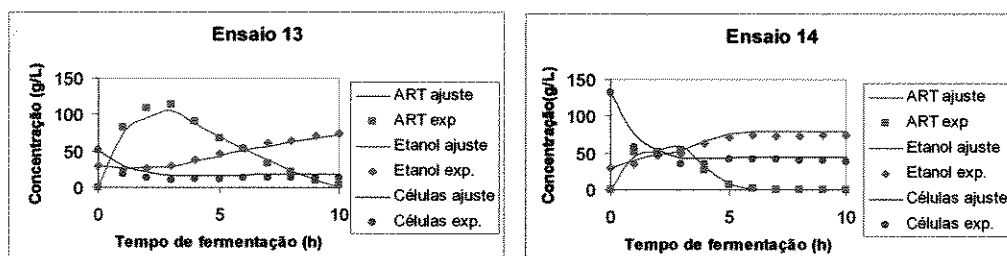


Figura 31. Ajustes aos dados experimentais do Ensaio 13 e do Ensaio 14.

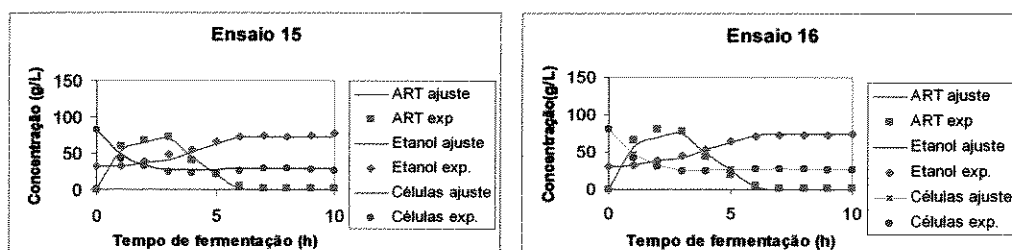


Figura 32. Ajustes aos dados experimentais do Ensaio 15 e do Ensaio 16.

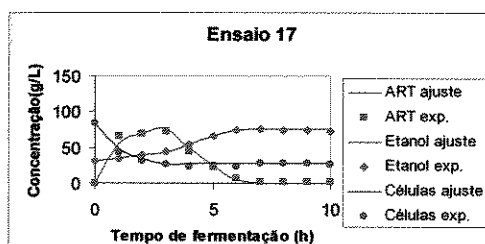


Figura 33. Ajustes aos dados experimentais do Ensaio 17.

Observa-se por estas figuras que os perfis de consumo de substrato, produção de etanol e células apresentaram ajustes satisfatórios aos dados experimentais, mostrando que o modelo é adequado para descrever este processo.

Observa-se ainda, que os ajustes obtidos para ensaios realizados a altas temperaturas (38 e 40,7°C) obtiveram pequenos desvios em relação à concentração



de células. Este fato pode estar ligado ao acúmulo de etanol intracelular, devido a alteração na estrutura da membrana celular afetando assim o seu crescimento. (TORIJA *et.al.*2003).

A Tabela 08 contém os valores dos parâmetros cinéticos ajustados através do modelo utilizado para os diferentes ensaios.

Tabela 08 -Resultados dos parâmetros cinéticos segundo o modelo de LEE (1983).

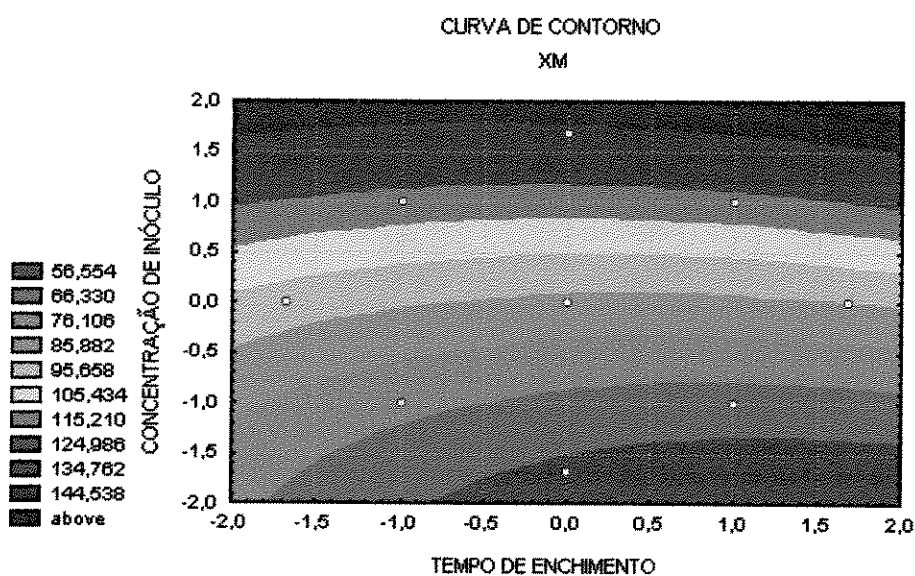
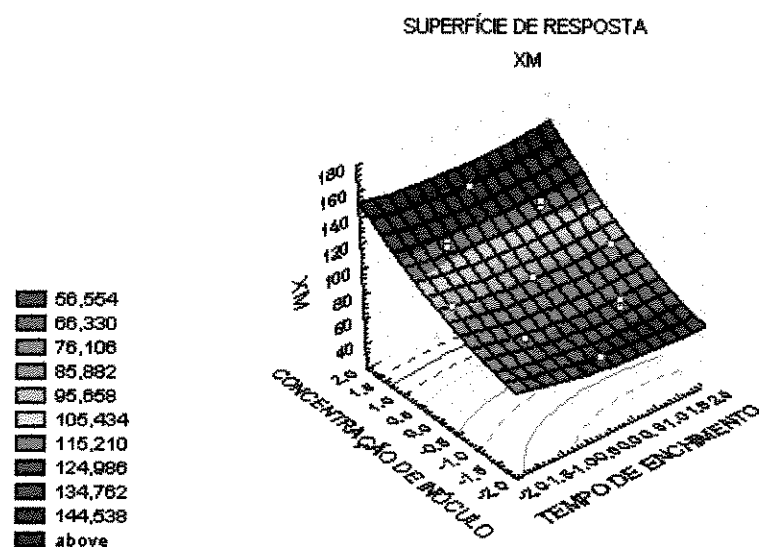
Ensaio	T(°C)	TE(h)	CI(%)	Ks	Ki	Pm	Yn	Ym	Xm	Desvio
1	30	1	20	2	19	99	2	1,1	71	217
2	38	1	20	2	20	101	2,1	1,1	72	244
3	30	5	20	2	19	101	2	1,1	62	168
4	38	5	20	1,5	19	95	1,9	1,1	68	122
5	30	1	40	2	17	98	1,8	1,1	115	73
6	38	1	40	2	14	96	1,7	1,2	109	28
7	30	5	40	2	18	96	1,8	1,1	111	154
8	38	5	40	1	20	100	2,1	1,1	115	197
9	27,3	3	30	2	19	101	2,1	1,1	83	165
10	40,7	3	30	2	20	101	2,1	1,1	86	292
11	34	0	30	2	20	95	1,9	1,2	91	94
12	34	6	30	2	20	103	2,1	1,1	84	270
13	34	3	13,2	2	20	99	2,1	1,1	51	407
14	34	3	46,8	2	21	101	2,1	1,1	133	80
15	34	3	30	2	19	101	2,1	1,1	83	330
16	34	3	30	2	19	103	2,1	1,1	81	111
17	34	3	30	2	19	103	2,1	1,1	85	143

Observa-se pelos dados contidos na Tabela 08 que os valores do parâmetro Xm foram os que obtiveram maiores variações em relação aos ensaios realizados.

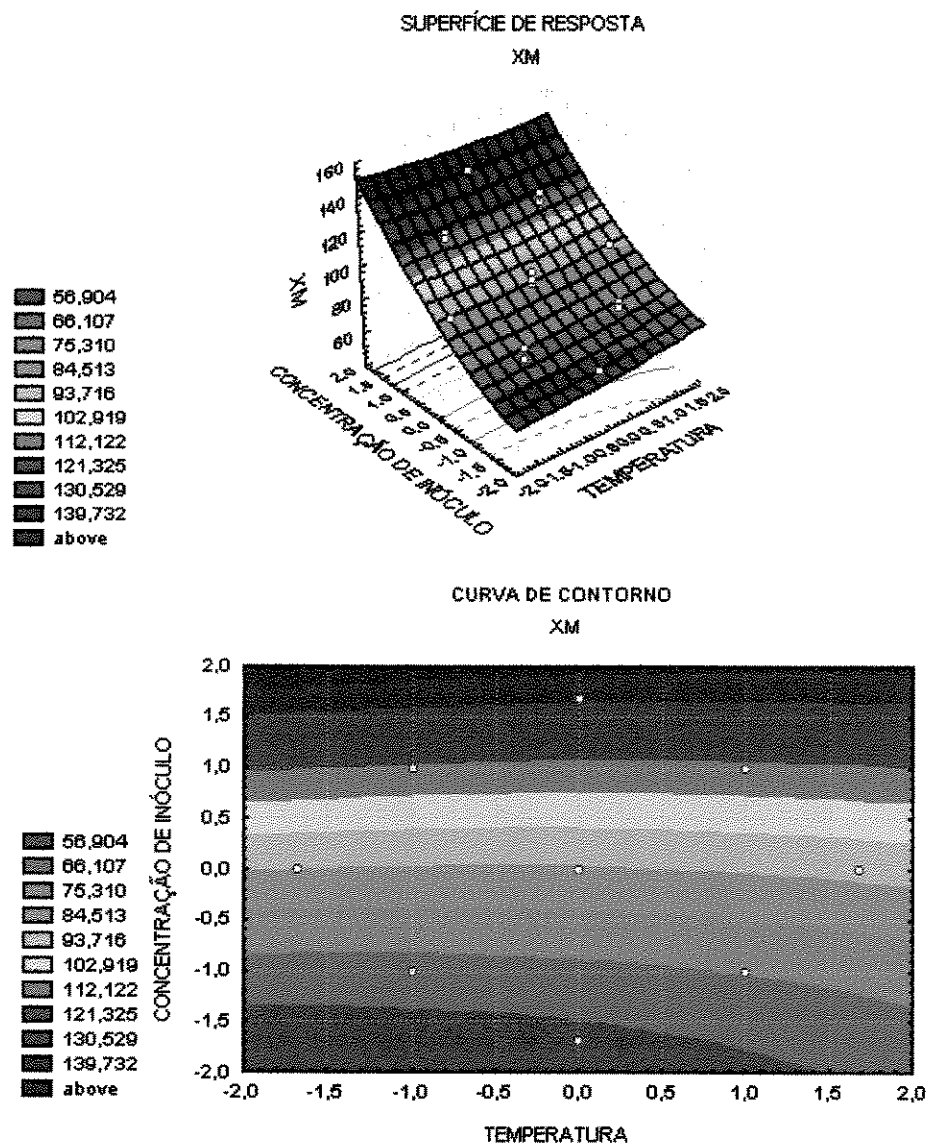
Pode-se verificar um bom ajuste do modelo aos dados experimentais pelos valores dos desvios obtidos para cada ensaio.

### **5.5.Efeito das variáveis em relação aos parâmetros cinético**

Utilizando o “Software Statistica 5.0” obteve-se os efeitos de cada variável em relação aos parâmetros cinéticos, a análise de variância do modelo, as superfícies de resposta e a curva de contorno. Dos parâmetros cinéticos, somente  $X_m$  mostrou variação significativa às oscilações dos valores das variáveis estudadas. As Figuras 34 e 35 mostram as superfícies de resposta (a) e a curva de contorno (b) para  $X_m$  em função da concentração de inóculo e do tempo de enchimento e da concentração de inóculo e da temperatura, respectivamente (apresentados com os valores codificados).



Figuras 34a e 34b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno – X<sub>M</sub>, para as variáveis concentração de inóculo e temperatura.



Figuras 35a e 35b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno – Xm, para as variáveis concentração de inóculo e temperatura.

Através destas figuras verifica-se que Xm obteve significância com a concentração de inóculo. Quanto maior a concentração de inóculo maior o valor de Xm. Desta forma foi possível obter uma equação que relaciona o valor de Xm em função da concentração de inóculo. A equação 30 mostra matematicamente esta relação.

$$X_{m\max} = 1,0086 * XI - 0,0285 \quad (30)$$

Os parâmetro  $K_s$ ,  $P_{máx}$ ,  $K_i$ ,  $Y_n$  e  $Y_m$  não foram afetados significativamente pelas variáveis estudadas, sendo a média destes suficiente para descrever satisfatoriamente o comportamento do processo.

A Tabela 09 traz uma avaliação do desempenho do modelo obtido para a relação de  $X_m$  com as variáveis estudadas. No modelo em estudo obteve-se um valor de  $R^2$  igual a 0,994, o que significa que 99,4% das variações nos resultados podem ser explicadas pelo modelo.

Tabela 09. ANOVA para o parâmetro. (SS= Soma quadrática, df= número de graus de liberdade, MS= média quadrática).

Fator	SS	df	MS	F	p
Temperatura (L)	7,389	1	7,389	1,019	35,1675
Temperatura (Q)	9,505	1	9,505	1,311	0,295810
Tempo de Enchimento (L)	37,973	1	37,973	5,238	0,062061
Tempo de Enchimento (Q)	39,833	1	39,833	5,494	0,057527
Concentração de inóculo (L)	<b>7261,293</b>	<b>1</b>	<b>7261,293</b>	<b>1001,589</b>	<b>0,000000</b>
Concentração de inóculo (Q)	<b>124,409</b>	<b>1</b>	<b>124,409</b>	<b>17,160</b>	<b>0,006062</b>
1L por 2L	28,125	1	28,125	3,879	0,096400
1L por 3L	10,125	1	10,125	1,397	0,282005
2L por 3L	28,125	1	28,125	3,879	0,096400
Lack of Fit	36,310	5	7,262	3,631	0,377844
Erro	43,499	6	7,250		
Total SS	7549,938	15			

$F_{2,13} = 3,81$  (nível de confiança de 95%)

Onde:

L : linear

Q : quadrático

Na tabela 09, os valores em destaque indicam os fatores em que o parâmetro  $X_m$  obteve significância.

Na Figura 36 são mostrados os valores residuais (valores observados) e os valores previstos do planejamento, e através dela pode-se visualizar o desvio ocorrido entre esses valores.

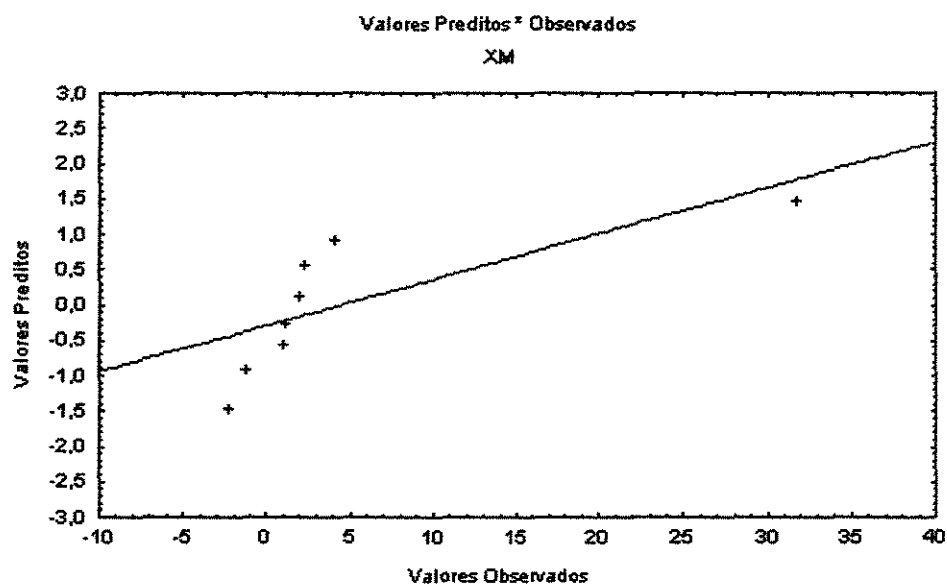


Figura 36. Valores observados vs. Valores preditos do planejamento completo do parâmetro  $X_m$ .

#### 5.6. Grupo dos parâmetros cinéticos ajustados para descrever toda a região estudada

Através da análise estatística determinou-se que o único parâmetro cinético que apresentou variação significativa em relação às variáveis estudadas foi o parâmetro  $X_m$  que sofreu influência da variável concentração de inóculo. Assim, foi encontrada a equação (30) que relaciona este parâmetro com a variável concentração de inóculo. A Tabela 10 mostra os valores médios dos parâmetros utilizados para descrever o processo em toda a faixa estudada.

Tabela 10. Valores dos parâmetros utilizados para o programa computacional.

Parâmetro	Valores
$K_s$	1,65
$P_{máx}$	100
$K_I$	19
$Y_n$	2,1
$Y_m$	1,1

As variáveis rendimento em células e etanol também mostraram variação significativa com as variáveis estudadas, cuja relação estão descritas pelas equações 27 e 28.

As Figuras 37 a 44 mostram os ajustes obtidos para cada ensaio realizado com os valores dos parâmetros contidos na Tabela 10 e os valores de  $X_m$ ,  $Y_{p/s}$  e  $Y_{x/s}$  obtida pelas equações 27, 28 e 30. Observa-se por estas figuras que os perfis de consumo de substrato, produção de etanol e células se ajustaram satisfatoriamente aos dados experimentais. Com isso obteve-se um grupo de parâmetros que tornou o modelo cinético preciso o suficiente para descrever este processo em toda a faixa estudada.

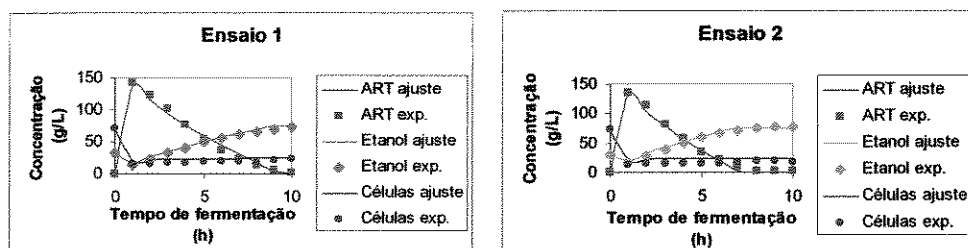


Figura 37. Ajuste aos dados experimentais do Ensaio 1 e do Ensaio 2 através do programa computacional.

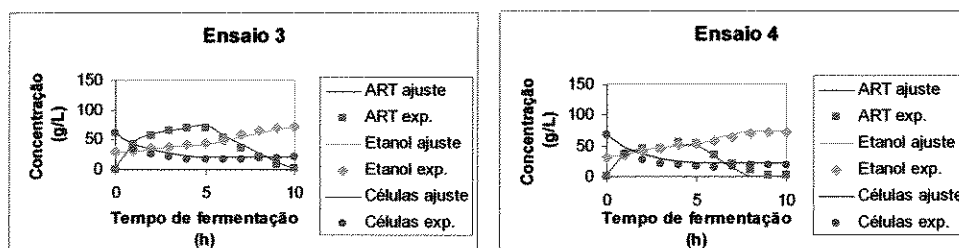


Figura 38. Ajuste aos dados experimentais do Ensaio 3 e do Ensaio 4 através do programa computacional.

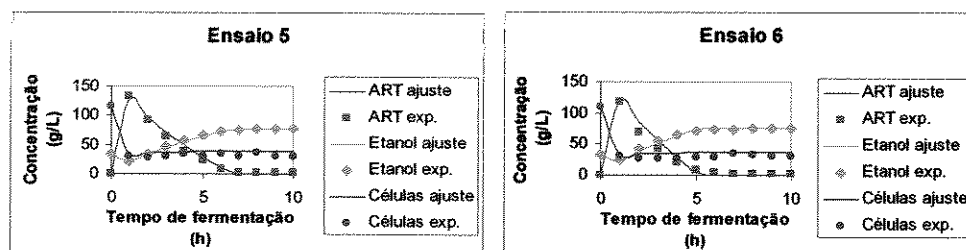


Figura 39. Ajuste aos dados experimentais do Ensaio 5 e do Ensaio 6 através do programa computacional.

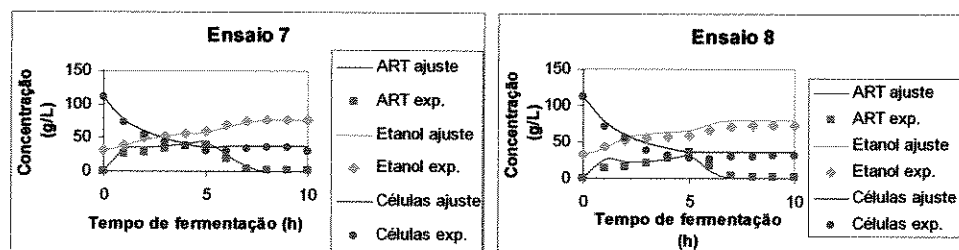


Figura 40. Ajuste aos dados experimentais do Ensaio 7 e do Ensaio 8 através do programa computacional.

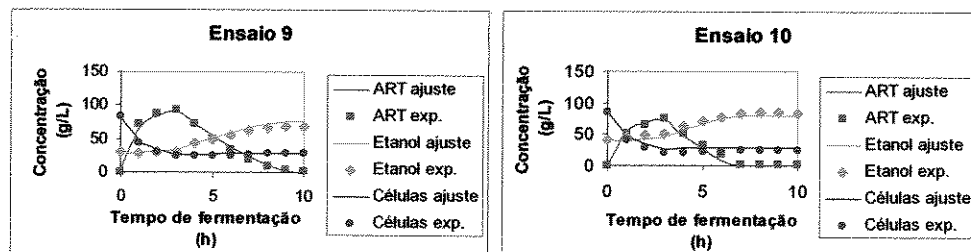


Figura 41. Ajuste aos dados experimentais do Ensaio 9 e do Ensaio 10 através do programa computacional.

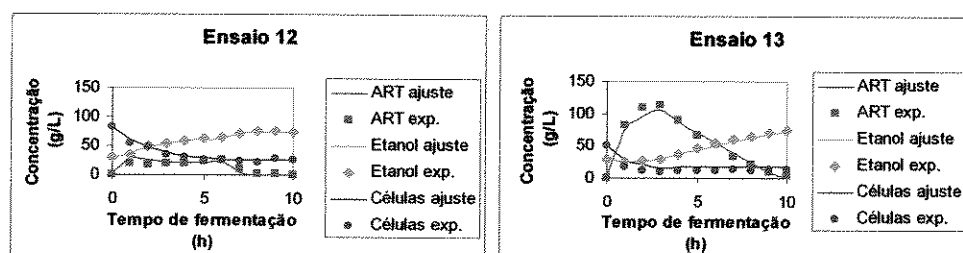


Figura 42. Ajuste aos dados experimentais do Ensaio 12 e do Ensaio 13 através do programa computacional.



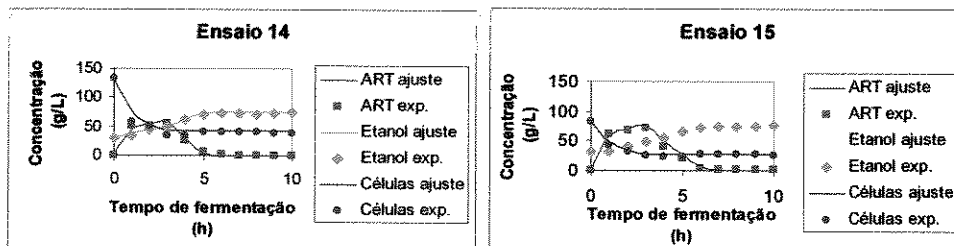


Figura 43. Ajuste aos dados experimentais do Ensaio 14 e do Ensaio 15 através do programa computacional.

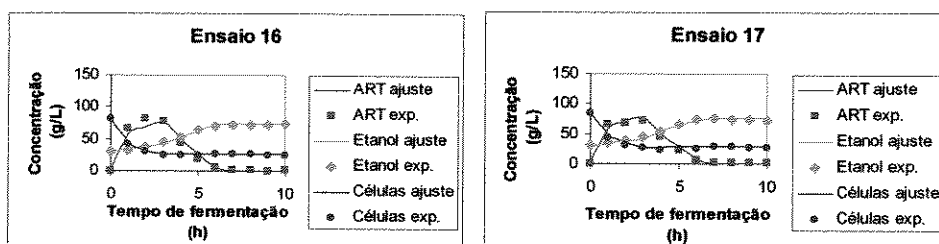


Figura 44. Ajuste aos dados experimentais do Ensaio 16 e do Ensaio 17 através do programa computacional.

Observa-se que o modelo com este grupo de parâmetros foi capaz de descrever adequadamente todas as condições do processo.

A Tabela 11 mostra os valores dos desvios dos ensaios ajustados através do programa computacional.

Tabela 11. Desvios dos ensaios ajustados através do programa computacional.

Ensaio	Desvio
1	275,4
2	314,9
3	102,7
4	340
5	242,6
6	271,3
7	242,6
8	252,8
9	153
10	160
12	201
13	429
14	74
15	193,2
16	329,7
17	223,1

Observa-se na Tabela 11 que os valores dos desvios são da mesma ordem de grandeza daqueles obtidos no ajuste dos parâmetros para cada ensaio individualmente. Desta forma, o modelo cinético pode ser aplicado para toda a faixa estudada, utilizando estes parâmetros cinéticos.

### 5.7. Validação do Modelo

Foram realizados quatro ensaios para validar o modelo com o grupo de parâmetros ajustados em condições distintas dos ensaios anteriores, sendo que os

valores das variáveis estudadas se encontram dentro da faixa estudada, as figuras 45 e 46 mostram os ajustes dos dados experimentais aos obtidos pelo modelo.

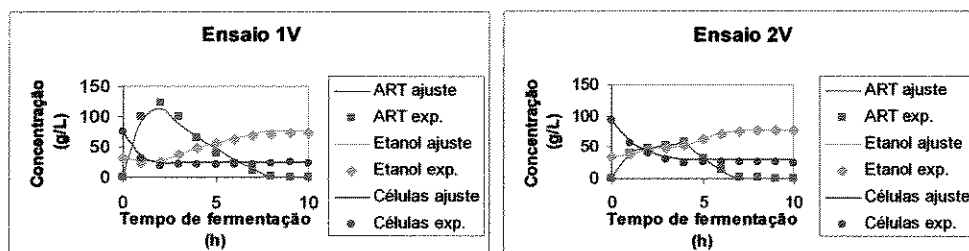


Figura 45. Ajuste dos ensaios de validação 1V e 2V através do programa computacional.

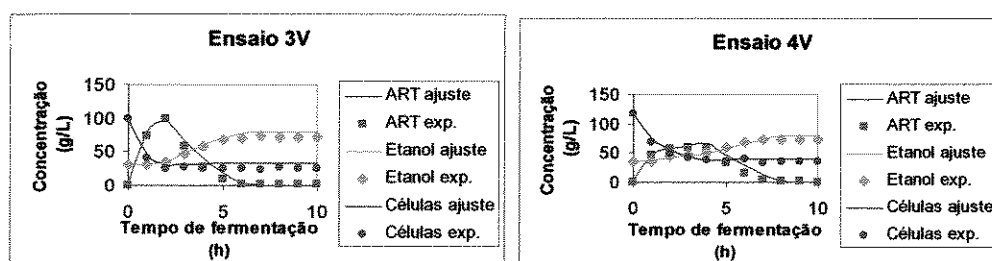


Figura 46. Ajuste dos ensaios de validação 3V e 4V através do programa computacional.

Através das Figuras 45 e 46 observa-se que os ensaios de validação mostraram um ótimo ajuste ao modelo cinético, indicando que o mesmo pode ser utilizado para descrever processos fermentativos em toda a faixa estudada. A Tabela 12 mostra os valores dos desvios dos ajustes realizados nos ensaios de validação.

Tabela 12. Condições e desvios dos ajustes realizados nos ensaios de validação.

Ensaio	T (°C)	TE (horas)	CI (%)	Desvio
1	32	2	25	464,7
2	36	4	35	23,5
3	39	2	35	350,6
4	29	4	43	170

Observa-se através da Tabela 12 que os valores dos desvios são baixos indicando que o modelo cinético é adequado para descrever os processos fermentativos na faixa estudada.

#### **5.8. Validação do ponto ótimo da Produtividade**

Para avaliar a produtividade, levando-se em conta somente o efeito das variáveis: tempo de enchimento, concentração de inóculo e temperatura, foi realizado o mesmo planejamento experimental descrito no item IV.7, determinando a produtividade utilizando-se o modelo ajustado. Isto foi realizado como objetivo de se eliminar o efeito das variáveis experimentais de algumas variáveis tais como: concentração de ART na alimentação.

A Tabela 13 mostra as condições dos ensaios e sua respectiva produtividade variando apenas o tempo de fermentação, a temperatura, a concentração de inóculo e o tempo de enchimento de cada ensaio determinando assim o ponto ótimo.

Tabela 13. Condições e valor da produtividade de cada ensaio.

Ensaio	T(°C)	TE(h)	CI(%)	Produtividade (g/Lh)
1	30	1	20	7,785
2	38	1	20	9,960
3	30	5	20	7,012
4	38	5	20	8,724
5	30	1	40	11,275
6	38	1	40	13,622
7	30	5	40	10,071
8	38	5	40	11,912
9	27.3	3	30	8,124
10	40.7	3	30	11,502
11	34	0	30	10,105
12	34	6	30	9,814
13	34	3	13,2	6,074
14	34	3	46,8	11,598
15	34	3	30	11,807
16	34	3	30	11,807
17	34	3	30	11,807

Observa-se na Tabela 13 que as condições do ensaio 6 ( 38°C, 1 hora de enchimento e 40% de inóculo) apresentou maior produtividade. Enquanto que no ensaio 13, utilizando-se baixa concentração de inóculo (13,2%), 3 horas de enchimento e 34°C a produtividade é baixa.

As Figuras 47 a 49 apresentam a superfície de resposta (a) e as curvas de contorno (b) para a produtividade em função do tempo de enchimento e da

temperatura, da concentração de inóculo e da temperatura e do tempo de enchimento e da concentração de inóculo, respectivamente (apresentados com os valores codificados).

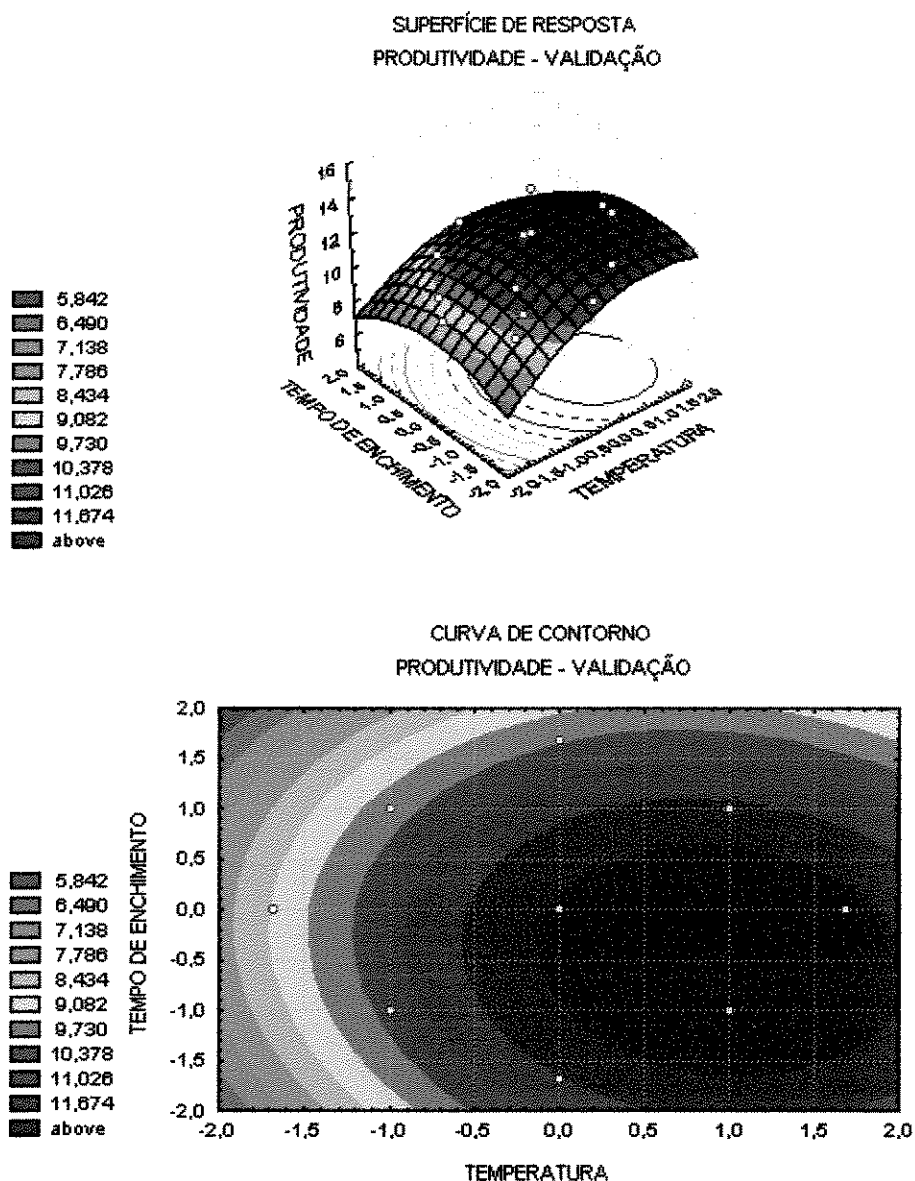


Figura 47a e 47b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno – Validação do ponto ótimo da produtividade, para as variáveis tempo de enchimento e temperatura.

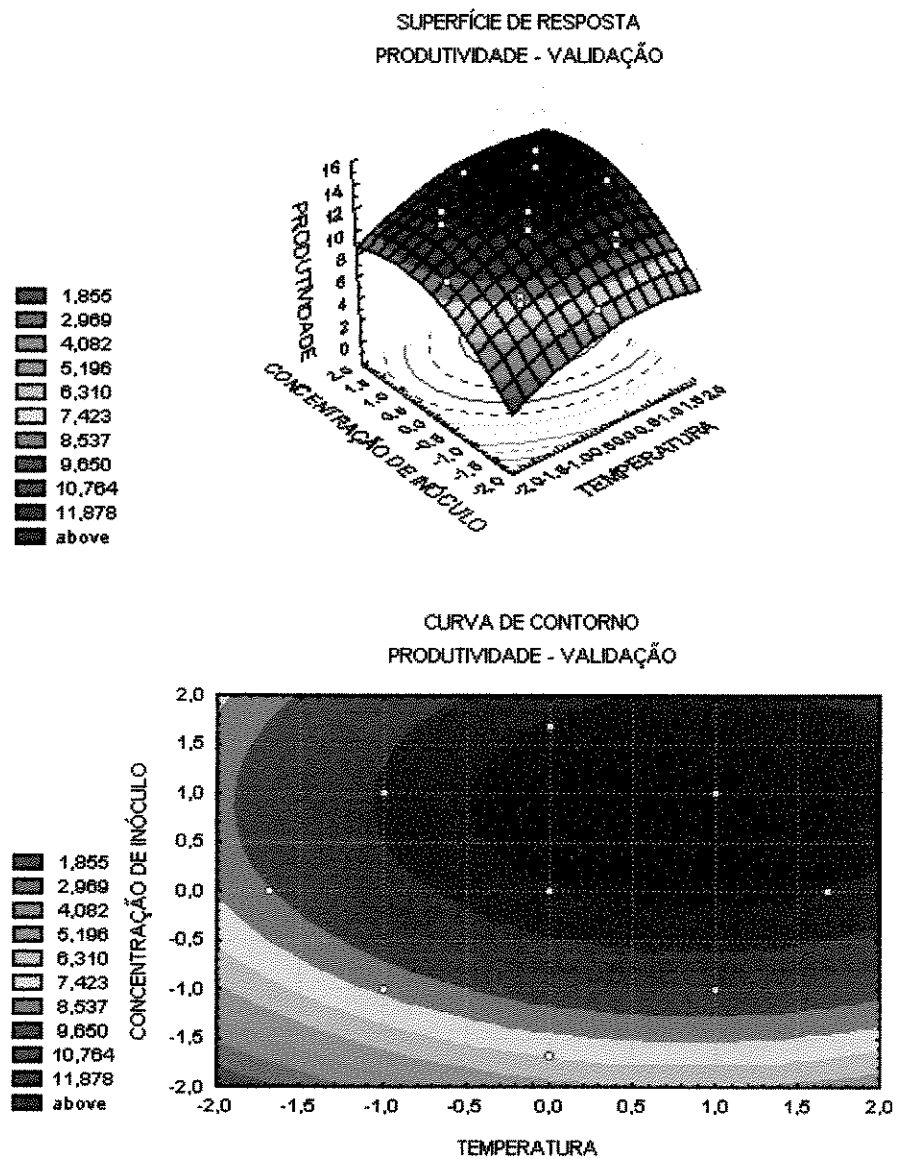


Figura 48a e 48b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno – Validação do ponto ótimo da produtividade, para as variáveis concentração de inóculo e temperatura.

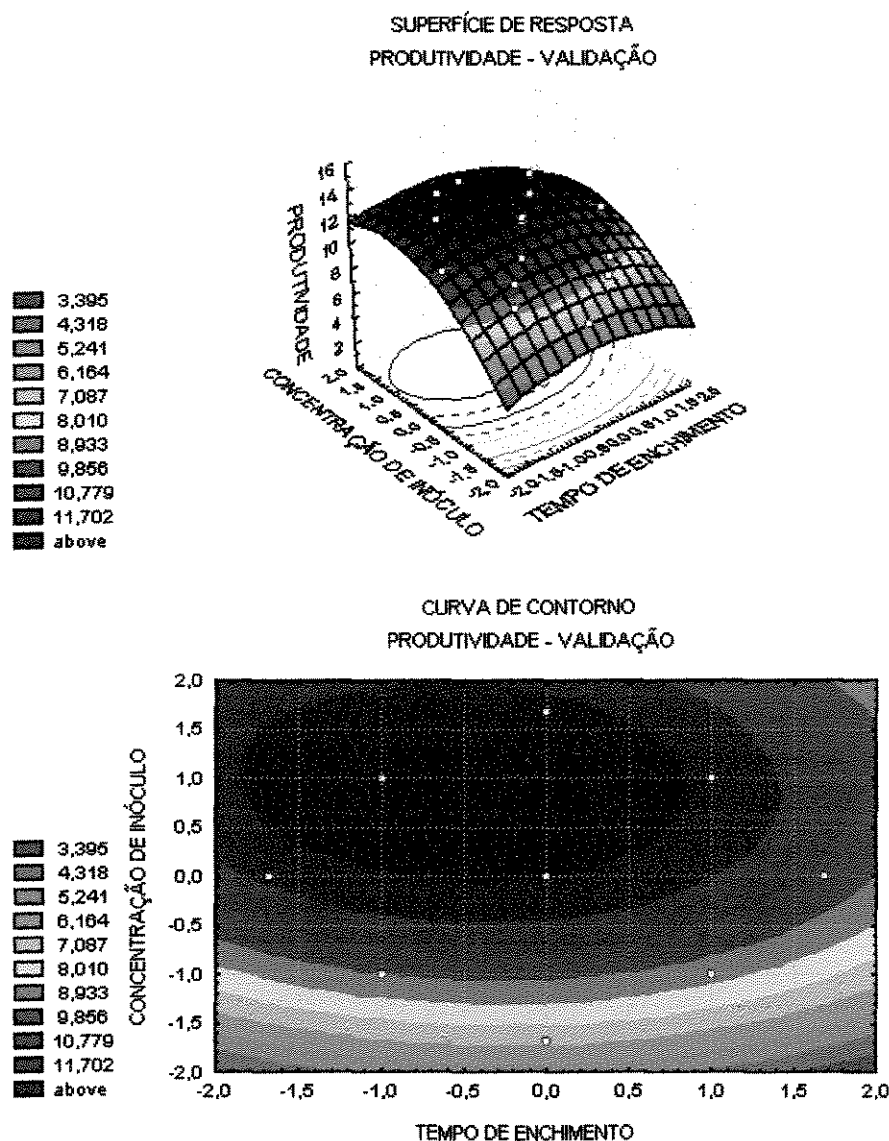
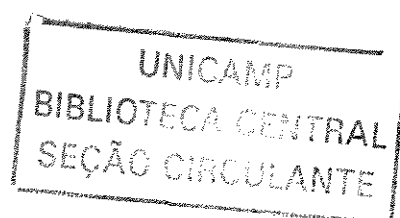


Figura 49a e 49b. Superfície de Resposta e Curvas de contorno – Validação do ponto ótimo da produtividade, para as variáveis concentração de inóculo e tempo de enchimento.

Através destas figuras verifica-se que a produtividade aumenta utilizando alta temperatura, alta concentração de inóculo e baixo tempo de enchimento. Observa-se que o ponto ótimo da produtividade utilizando os resultados experimentais possuem as mesmas condições da produtividade utilizando os dados de entrada, exceto a temperatura. A produtividade calculada através dos resultados



experimentais é baixa utilizando a temperatura em seus valores extremos, já utilizando alta temperatura a produtividade calculada pelos dados de entrada é alta. Observa-se que o ponto ótimo da produtividade determinado pela análise estatística é temperatura de 38°C, tempo de enchimento de 2 horas e concentração de inóculo 40%.



## 6. Conclusões e Sugestões

### 6.1. Conclusões finais

- O modelo proposto foi capaz de descrever o processo fermentativo em toda a faixa estudada. Foi verificado através dos ensaios de validação em que foi utilizado condições distintas das estudadas anteriormente mostrando um bom ajuste aos dados experimentais.
- Também foi possível determinar que a temperatura e a concentração de inóculo afetaram os valores do rendimento em etanol. Alto rendimento em etanol de 0,46 foi obtido por vários ensaios que utilizaram condições de temperatura extrema e alta concentração de inóculo.
- Verificou-se também pela análise estatística que somente a temperatura afeta o rendimento em células. Utilizando baixa temperatura o rendimento em células aumenta, observado através do ensaio 9 em que foi utilizado temperatura de 27,3°C, 3 horas de enchimento e 30% de concentração de inóculo, obtendo um rendimento de 0,029.
- Todas as variáveis estudadas influenciaram no valor da produtividade. Foi observado que utilizando condições de temperatura extrema diminui a produtividade, enquanto que a altas concentrações de inóculo aumenta a produtividade e quanto mais rápido o tempo de enchimento maior a produtividade. A maior produtividade obtida foi de 9,35g/Lh utilizando condições de temperatura a 34°C, 3 horas de enchimento e 46,8% de concentração de inóculo.
- Concluiu-se através da validação do ponto ótimo da produtividade que aumentando a temperatura a produtividade é maior, não mostrando a desativação celular durante a fermentação.
- O ponto ótimo da produtividade determinado pela análise estatística utilizando apenas o efeito das variáveis é temperatura de 38°C, tempo de enchimento de 2 horas e concentração de inóculo 40%.
- Através da validação do ponto ótimo da produtividade, foi concluído que a produtividade aumenta utilizando alta temperatura, alta concentração de inóculo e baixo tempo de enchimento do reator, comparando com o ponto ótimo da

produtividade calculada pelos dados experimentais, diferencia-se apenas na variável temperatura em que utilizando valores extremos, a produtividade é baixa.

- Através da análise estatística, verificou-se que o único parâmetro cinético a sofrer influência das variáveis estudadas foi  $X_m$  que obteve significância apenas com a concentração de inóculo.

## **6.2.Sugestões para trabalhos futuros**

Visando a continuidade deste trabalho, seria interessante desenvolver o controle do perfil ótimo de temperatura dos ensaios de fermentação alcoólica, utilizando diferentes valores desta variável em um mesmo ensaio.

## 7. Referências Bibliográficas

AIBA,S.; SHODA,M.; NAGATAMI,M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*.v.10,p.845-864,1968.

AMORIM,H.V.; BASSO,L.C.;ALVES,D.M.G. Processo de Produção de Alcool – controle e monitoramento. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP.Piracicaba,1996.

ANDRIETTA, S.R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994. Tese (Doutorado).

BIROL,G.;DORUKER,B.;ÖNSAN,ZI.;GULGEN,K. Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccaromyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*,v.33,n7,p.763-771,1998.

BONOMI, A.; SCHMIDELL,W. Engenharia Bioquímica. In: Borzani, W.; Lima,U.A.; Aquaroni, E., 1975. V.3, Cap. 7: Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos, p.123-177.

CARVALHO, J.C.M.; SATO,S. Engenharia Bioquímica. In: Borzani, W.; Lima,U.A.; Aquaroni, E., 1975. Vol.3, Cap. 10: Fermentação descontínua alimentada, p.205-211.

CARVALHO,J.C.M.;SATO,S. Engenharia Bioquímica. In: Borzani, W.; Lima,U.A.; Aquaroni, E., 1975. Vol.3, Cap. 9: Fermentação descontínua, p. 105-11.

CHATTAWAY,T.;GOMA,G.;RENAUD,P.Y. Modeling ethanol and secondary inhibitions of ethanol fermentation in a multistage reactor. *Biotechnology and Bioengineering*,v.32,n.3,p.271-27, 1988.

COSTA,A.C.; LIMA,E.L. ALVES,T.L.M., Otimização de processos fermentativos em batelada alimentada através da Teoria de Controle Singular. In XI Sinaferm – Simpósio Nacional de Fermentações, 1996, vol.1.

DALE,M.C.; CHEN,C.;OKOS,M.R. Cell growth and death rates as factors in the long-term performance, modeling and desing of immobilized cell reactor. *Biotechnol and Bioeng.*, v.36,p. 983-92, 1990.

- DAUGULIS,A.J.; SWAINE, D.E. Examination of substrate and product inhibition kinetics on the production of ethanol by suspended and immobilized cell reactor. *Biotechnology and Bioengineering*,v.29,p.639-45,1987.
- DOMIANO,D.;CHIN,C.S.;JU,N.;WANG,S.S. Performance, kinetics and substrate utilization in a continuous yeast fermentation with cell recycle by ultrafiltration membranes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,v.21,p.69-77,1985.
- DOURADO,A.;GOMA,G.;ALBUQUERQUE,U.;SEVELY,Y. Modeling and statistic optimization of the ethanol production in a cascade reactor.1. Modeling. *Biotechnology and Bioengineering*,v.29,n.2,p.187-194,1987.
- EDWARDS,V.H.;GOTTSCHALK,M.J.;NOOJIW,A.Y.;TUTHILL,L.B.;TANNA HILL,A.L.Extended culture: The growth of *Candida utilis* at. Controlled acetate concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*,;vol.12, p.975-99,1970.
- FACCIOTTI, M.C.R. *Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. In: Schimidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. Borzani, W. 2001. Vol.2, Cap. 12: Fermentação contínua, p.223-225.
- GHOSE,T.K.; TYAGI,R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysat. I. Batch versus continuous systems. *Biotechnology and Bioengineering*,v.21, n.8 , p.1387-1400,1979.
- GROOT,W.J.;SIKKENK,C.M.;WALDRAM,R.H.;VANERLANS,R.G.J.M.;LUY BEN,K.C.A.M. Kinetics of ethanol production by baker's yeast in na integrated process of fermentation and microfiltration. *Bioprocess Eng.*,v.8, p.39-47,1992.
- HISS,H. *Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. In: Schimidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. Borzani, W. 2001. Vol.2, Cap. 6: Cinética de processos fermentativos, p.93-99.
- HOPPE,G.K. & HANSFORD,G.S. Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. *Biotechnology letters*, v.4,n.1,p.39-44,1982.
- KELLER,R. DUNN,I.J. Fed-batch microbial culture: Models, errors and aplications. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology Abstracts*, vol.28,p.508-14, 1978a.

- KELLER,R.;DUNN,J. Computer of biomass production rate of cyclic fed batch continuous culture. J. Appl. Chem.Biotechnol,v.28,p.784-790,1978b.
- JARZEBSKI,A.B.; MALINOWSKI,J.J.;GOMA,G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations. Biotechnology and Bioengineering, v.34,n9,p.1225-1230,1989.
- JIN,C.K.;CHIANG,H.L.; WANG,S.S. Steady-state analysis of enhancement in ethanol productivity of a continuous fermentation process employing a protein-phospholipid complex as a protecting agent. Enzyme and Microbial Technology,v.3,n.3,p.249-257,1981.
- LEE,J.M.; POLLARD,J.F.; COULMAN,G.A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. Biotechnology and Bioengineering, v.25,n.2,p.497-511,1983.
- LESSMANN,W.F. Estudo do processo descontínuo alimentado para a produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL3112 para concentrações de polissacarídeo de 40 e 80 g/L. São Paulo: Escola Politécnica, Universidade de São Paulo,1993. Tese (Mestrado).
- LEVENSPIEL,O. Monod equation : a revised and generalization to product inhibition situations. Biotechnology and Bioengineering,v.22,n.8,p.1671-1687,1980.
- LIMA,U.A., Evolução dos Processos Fermentativos no Brasil. In: Semana da Fermentação Alcoólica,1, 1985, Piracicaba, p.1-6.
- LIMA,U.A.;BASSO,L.C.AMORINA,H.V., Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos In: Schimidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. Borzani, W. 1975. Vol.1, Cap. 1: Produção de etanol, p.1-43.
- LUONG,J.H.T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering, v.27,n3,p.285,1985.
- MAIORELLA, B.L.; BLANCH,H.W.;WILKE,C.R., Alcohol Production and Recivery. In: Flechter, A., Advances in Biochemical Engineering. Heildelberg: Spring Verlag, v.20, p.41-73, 1981.

MIGLIARI, P. C., Classificação das Cepas de Leveduras Dominantes de Processos Fermentativos utilizando parâmetros fermentativos e taxonomia numérica. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. Tese (mestrado).

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* 31: 426-428, 1959.

MOMBOUQUETE, G.H. Models for high cell density bioreactors must consider biomass volume fraction. Cell recycle example. *Biotechnology and Bioengineering*, v.29, n.9, p.1075-1080, 1986.

MOMBOUQUETE, G.H. Modeling high-biomass-density cell recycle fermenters. *Biotechnology and Bioengineering*, v.39, n.5, p.498-503, 1992.

MONOD, J. The growth of bacterial culture. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.3, p.371-394, 1949.

MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, v.22, p.2375-2381, 1980.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E., Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003, 399p.

OLIVEIRA, E.R. Histórico da Fermentação Alcoólica. In: Semana da Fermentação Alcoólica, 1, 1960, Piracicaba, Anais, p.196-205.

OLIVEIRA, E.S., Efeito da adição de suplementos nutricionais na fermentação alcoólica de melaço de cana de açúcar em diferentes temperaturas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1988. 63p. Tese (mestrado).

OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I factors affecting the type of metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, v.26, n.6, p.1197-1212, 1974.

RODRIGUES, M.I., ANDRIETTA, S.R.; MAUGERI, F.F., Simulação da produtividade e rendimento em fermentação alcoólica contínua, para reatores em

fermentação contínua, para reatores operando em condições ideais e não ideais de mistura. Stab. Açúcar Álcool e Subprodutos, v.10, n.5, p.35-47, 1992.

ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. Biology of yeast. London, Academic Press, p.1-4, 1987.

SEVELY, Y.; PORCIEL, J.P.; RAUZY, G.R.; BABANS, J.P. Paper presented at the 8<sup>th</sup> IFAC Trienal Congress, Kyoto, Japan, Aug., 1981.

THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G.A. Effects of high product and substrate inhibition on the kinetics in biomass and product yields during ethanol batch fermentation. Biotechnology and Bioengineering, v.40, p.289-297, 1992.

TORIIA, M.J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLÒN, J.M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, vol.80, p.47-53, 2003.

TOSETTO, G.; ANDRIETTA, S.R. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. In: VII Seminar on Enzymatic hidrolisis of biomass – SHEB, Maringá, 2002.

VAN UDEN, N. Etanol toxicity and etanol tolerance in yeasts. Use of extracelular acidification for the rapid testing of ethanol tolerance. Biotechnol. And Bioeng., v.28 p. 1596-1598, 1985.

VIEGAS, M.C. Desenvolvimento de um reator de bancada de leito fluidizado para produção de etanol utilizando linhagens de leveduras floculantes. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. Tese (Mestrado).

WARREN, R.K.; HILL, G.A.; MACDONALD, D.G. Continuous cell recycle fermentation to produce ethanol. Trans.I.Chem.E.72, part C, p.149-157, 1994.

YAMANE, T.; HIBINO, W.; ISHIHARA, K.; KADOTANI, Y.; KOMINAMI, M. Fed-batch culture automated by uses of continuously measured cell concentration and culture volume. Biotechnology and Bioengineering, vol.39, p.550-5, 1992.



YOSHIDA,F.;YAMANE,T.; NAKAMOTO,K.I., Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. Biotechnology and Bioengineering, vol.15,p.257-70, 1973.

ZARPELLON,F. & ANDRIETTA,S.R. Fermentação contínua para produção de álcool. Stab. Açúcar,Álcool e Sub-produtos. 10(4) 23-28, 1992.

**ANEXO A**  
**Resultados das Fermentações**

Tabela A.1 - Resultados da fermentação do ensaio 1.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	70,29	31,81	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	221,86
<b>0 h</b>	70,29	31,81	0
<b>1 h</b>	15	13,78	141,89
<b>2 h</b>	15,69	22,67	122,44
<b>3 h</b>	16,86	31,81	102,06
<b>4 h</b>	17,74	40,7	76,29
<b>5 h</b>	18,32	49,84	53,44
<b>6 h</b>	18,59	56,7	37,42
<b>7 h</b>	19,12	61,77	23,56
<b>8 h</b>	18,25	65,84	12,92
<b>9 h</b>	21,89	69,9	4,85
<b>10 h</b>	22,2	72,69	1,45

Tabela A.2 - Resultados da fermentação do ensaio 2.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	71,97	31,03	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	220,05
<b>0 h</b>	71,97	31,03	0
<b>1 h</b>	13,73	17,82	135,74
<b>2 h</b>	14,2	27,66	112,66
<b>3 h</b>	15,06	38,8	82,1
<b>4 h</b>	15,23	49,16	57,12
<b>5 h</b>	15,34	59	35,18
<b>6 h</b>	15,35	65,74	20,42
<b>7 h</b>	17,52	71,18	9,36
<b>8 h</b>	18,62	74,54	2,82
<b>9 h</b>	18,72	76,1	1,45
<b>10 h</b>	18,15	76,1	1,24

Tabela A.3 - Resultados da fermentação do ensaio 3.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	61,64	30,39	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	213
<b>0 h</b>	61,64	30,39	0
<b>1 h</b>	34	31,18	43
<b>2 h</b>	26,34	35,95	56,06
<b>3 h</b>	21,92	38,87	66,29
<b>4 h</b>	17,75	42,31	69,12
<b>5 h</b>	17,01	44,17	70,14
<b>6 h</b>	17,85	48,93	53,24
<b>7 h</b>	17,6	58,47	36,96
<b>8 h</b>	18,27	64,83	21,09
<b>9 h</b>	18,38	69,6	9,32
<b>10 h</b>	20,92	71,19	2,77

Tabela A.4 - Resultados da fermentação do ensaio 4.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	67,41	30,92	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	215
<b>0 h</b>	67,41	30,92	0
<b>1 h</b>	36,14	34,42	34,62
<b>2 h</b>	27,04	40,16	44,22
<b>3 h</b>	21,3	45,4	44,86
<b>4 h</b>	18,32	51,39	55,76
<b>5 h</b>	15,98	54,39	53,68
<b>6 h</b>	14,81	57,39	34,48
<b>7 h</b>	15,42	63,88	21,39
<b>8 h</b>	18,09	69,37	9,59
<b>9 h</b>	19,01	72,37	2,64
<b>10 h</b>	19,07	71,37	1,09

Tabela A.5 - Resultados da fermentação do ensaio 5.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	114,72	34,15	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	213
<b>0 h</b>	114,72	34,15	0
<b>1 h</b>	29,31	20,60	132,56
<b>2 h</b>	28,07	34,90	93,17
<b>3 h</b>	29,35	46,95	65,32
<b>4 h</b>	35,18	57,99	38,42
<b>5 h</b>	29,77	66,02	22,57
<b>6 h</b>	34,15	71,80	9,36
<b>7 h</b>	29,92	74,81	2,69
<b>8 h</b>	35,59	77,57	1,44
<b>9 h</b>	29,56	77,07	1,82
<b>10 h</b>	29,24	76,31	1,82

Tabela A.6 - Resultados da fermentação do ensaio 6.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	108,49	32,4	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	213
<b>0 h</b>	108,49	32,4	0
<b>1 h</b>	30,22	24,2	117,64
<b>2 h</b>	27,23	42,38	68,31
<b>3 h</b>	27,34	55,18	41,83
<b>4 h</b>	27,08	64,66	20,41
<b>5 h</b>	27,42	71,32	7,67
<b>6 h</b>	28,12	73,88	3,42
<b>7 h</b>	33,84	73,88	1,57
<b>8 h</b>	32,34	74,65	1,57
<b>9 h</b>	31,21	75,16	1,57
<b>10 h</b>	30,25	74,39	1,57

Tabela A.7 - Resultados da fermentação do ensaio 7.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	110,52	31,52	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	215
<b>0 h</b>	110,52	31,52	0
<b>1 h</b>	72,84	40,07	26,08
<b>2 h</b>	53,91	49,86	28,08
<b>3 h</b>	43,15	53,38	34,34
<b>4 h</b>	37,16	56,89	36,63
<b>5 h</b>	29,35	59,91	39,64
<b>6 h</b>	29,91	68,45	19,32
<b>7 h</b>	34,1	74,23	4,52
<b>8 h</b>	36,23	76,24	1,42
<b>9 h</b>	34,78	76,24	1,12
<b>10 h</b>	30,06	75,99	1,32

Tabela A.8 - Resultados da fermentação do ensaio 8.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	111,49	32,49	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	220
<b>0 h</b>	111,49	32,49	0
<b>1 h</b>	69,85	43,36	14,26
<b>2 h</b>	55,3	51,19	15,33
<b>3 h</b>	38,4	54,98	21,47
<b>4 h</b>	30,8	57,26	28,4
<b>5 h</b>	27,33	57,76	35,99
<b>6 h</b>	26,12	65,34	16,4
<b>7 h</b>	30,11	70,14	4,21
<b>8 h</b>	29,51	72,92	1,76
<b>9 h</b>	31,65	71,91	1,65
<b>10 h</b>	30,58	72,67	1,65

**Tabela A.9 - Resultados da fermentação do ensaio 9.**

	<b>Massa Seca (g/L)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>ART(g/L)</b>
<b>Inóculo</b>	82,63	30,84	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	208
<b>0 h</b>	82,63	30,84	0
<b>1 h</b>	43,45	27,85	72,39
<b>2 h</b>	30,04	29,84	88,2
<b>3 h</b>	23,94	31,09	93,47
<b>4 h</b>	25,23	44,02	71,86
<b>5 h</b>	25,43	49,24	50,16
<b>6 h</b>	25,29	55,46	33,56
<b>7 h</b>	26,29	62,42	19,86
<b>8 h</b>	29,18	66,15	10,05
<b>9 h</b>	29,22	68,89	2,99
<b>10 h</b>	29,07	69,14	1,2

**Tabela A.10 - Resultados da fermentação do ensaio 10.**

	<b>Massa Seca (g/L)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>ART(g/L)</b>
<b>Inóculo</b>	85,04	39,53	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	205
<b>0 h</b>	85,04	39,53	0
<b>1 h</b>	40,69	43,94	50,15
<b>2 h</b>	28,11	49,6	65,51
<b>3 h</b>	20,87	51,18	74,44
<b>4 h</b>	20,38	63,76	50,15
<b>5 h</b>	22,91	70,37	32,26
<b>6 h</b>	21,29	77,92	17,86
<b>7 h</b>	24,76	83,59	1,52
<b>8 h</b>	25,04	85,79	1,6
<b>9 h</b>	24,92	84,53	1,21
<b>10 h</b>	23,49	83,59	1,21

Tabela A.11 - Resultados da fermentação do ensaio 11.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	26,38	9,05	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	226
<b>0 h</b>	26,38	9,05	154
<b>1 h</b>	23,1	18,05	136,74
<b>2 h</b>	23,42	31,88	103,22
<b>3 h</b>	24,01	43,28	65,67
<b>4 h</b>	23,75	54,68	35,93
<b>5 h</b>	23,43	61,95	17,69
<b>6 h</b>	27,14	68,5	5,25
<b>7 h</b>	27,36	69,23	1,13
<b>8 h</b>	28,1	70,69	1,24
<b>9 h</b>	27,01	70,69	1,13
<b>10 h</b>	26,07	70,69	1,34

Tabela A.12 - Resultados da fermentação do ensaio 12.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	83,63	31,5	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	213
<b>0 h</b>	83,63	31,5	0
<b>1 h</b>	55	34,86	19,06
<b>2 h</b>	47,56	50,86	17,58
<b>3 h</b>	34,22	54,73	20,44
<b>4 h</b>	29,72	58,34	20,44
<b>5 h</b>	26,4	62,47	23,35
<b>6 h</b>	26,46	64,54	25,46
<b>7 h</b>	24,45	72,02	9,88
<b>8 h</b>	22,67	75,12	1,95
<b>9 h</b>	28,24	75,37	1,21
<b>10 h</b>	25,09	74,02	1



**Tabela A.13 - Resultados da fermentação do ensaio 13.**

	<b>Massa Seca (g/L)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>ART(g/L)</b>
<b>Inóculo</b>	50,89	29,58	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	220
<b>0 h</b>	50,89	29,58	0
<b>1 h</b>	18,2	25,2	82,31
<b>2 h</b>	12,56	26,91	108,6
<b>3 h</b>	10,48	29,34	112,98
<b>4 h</b>	11,95	37,98	90,1
<b>5 h</b>	12,27	46,62	67,2
<b>6 h</b>	12,72	53,92	52,11
<b>7 h</b>	12,99	60,25	33,37
<b>8 h</b>	12,62	64,88	22,17
<b>9 h</b>	12,87	70,23	10,49
<b>10 h</b>	13,19	73,4	2,95

**Tabela A.14 - Resultados da fermentação do ensaio 14.**

	<b>Massa Seca (g/L)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>ART(g/L)</b>
<b>Inóculo</b>	132,08	30,25	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	211
<b>0 h</b>	132,08	30,25	0
<b>1 h</b>	57,4	34,6	51,18
<b>2 h</b>	48,4	45,61	50,66
<b>3 h</b>	34,88	49,45	54,98
<b>4 h</b>	33,95	62,25	25,69
<b>5 h</b>	41,32	70,44	5,86
<b>6 h</b>	40,98	73,52	2,25
<b>7 h</b>	40,99	73,26	1
<b>8 h</b>	40,16	71,72	1
<b>9 h</b>	38,88	73,52	1
<b>10 h</b>	37,84	74,54	1

Tabela A.15 - Resultados da fermentação do ensaio 15.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	83,01	31,73	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	216
<b>0 h</b>	83,01	31,73	0
<b>1 h</b>	42,19	32,23	60,36
<b>2 h</b>	31,93	39,34	67,01
<b>3 h</b>	24,69	48,21	72,03
<b>4 h</b>	23,06	55,57	41,04
<b>5 h</b>	22,98	65,46	20,21
<b>6 h</b>	26,49	72,56	4,67
<b>7 h</b>	28,31	74,08	1,15
<b>8 h</b>	28,27	73,07	1,26
<b>9 h</b>	27	74,33	1,26
<b>10 h</b>	25,9	76,87	1,46

Tabela A.16 - Resultados da fermentação do ensaio 16.

	Massa Seca (g/L)	Etanol (g/L)	ART(g/L)
<b>Inóculo</b>	80,93	30,74	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	214
<b>0 h</b>	80,93	30,74	0
<b>1 h</b>	42,48	31,74	65,91
<b>2 h</b>	30,86	38,74	80,99
<b>3 h</b>	24,46	44,75	77,32
<b>4 h</b>	24,17	54	43,38
<b>5 h</b>	24,11	63,76	19,8
<b>6 h</b>	26,91	71,02	4,88
<b>7 h</b>	27,42	72,52	1
<b>8 h</b>	27,08	72,77	1
<b>9 h</b>	25,3	72,52	0,9
<b>10 h</b>	25,09	74,02	1

**Tabela A.17** - Resultados da fermentação do ensaio 17.

	<b>Massa Seca (g/L)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>ART(g/L)</b>
<b>Inóculo</b>	84,09	30,65	xx
<b>Mosto</b>	xx	xx	219
<b>0 h</b>	84,09	30,65	0
<b>1 h</b>	43,09	34,64	66,5
<b>2 h</b>	31,38	39,69	68,56
<b>3 h</b>	25,79	45,27	72,16
<b>4 h</b>	22,66	54,31	44,59
<b>5 h</b>	24,24	65,21	22,42
<b>6 h</b>	23,69	73,98	6,8
<b>7 h</b>	28,22	75,58	1,44
<b>8 h</b>	28,13	74,25	1,34
<b>9 h</b>	27,37	74,25	1,34
<b>10 h</b>	26,28	72,12	1,34