INFLUÊNCIA DE DOIS NÍVEIS DE TEMPERATURA E,
RECICLO DE CÉLULAS NA
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

TADEU ALCIDES MARQUES
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. JORGE HORII

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Marques, Tadeu Alcides

M357i Influência de dois níveis de temperatura e reciclo
de células na fermentação alcoólica. Piracicaba, 1991
164p. il.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar - Produto derivado - Fermentação
2. Fermentação alcoólica - Reciclagem celular - Efei
to 3. Fermentação alcoólica - Temperatura - Efeito 4.
Levedura - Reciclagem celular - Efeito 5. Levedura -
Temperatura - Efeito 6. Mosto de melaço de cana-de-
açúcar - Fermentação

CDD 663.13

INFLUÊNCIA DE DOIS NÍVEIS DE TEMPERATURA E,
RECICLO DE CÉLULAS NA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

TADEU ALCIDES MARQUES

Aprovada em: 18 de Dezembro de 1991

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Jorge Horii

ESALQ/USP

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra

FEA/UNICAMP

Prof. Dr. José Paulo Stupiello

ESALQ/USP

Prof. Dr. JORGE HORII
Orientador

OFEREÇO

À minha família,

**Que mostrou o caminho a seguir
e sempre me deu forças para que
pudesse alcançar meus objetivos,
a procura da felicidade e da
auto-realização**

e aos meus sobrinhos, em ordem de chegada:

Aline, Gustavo, Diogo e Taisa.

DEDICO

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof.Dr. Jorge Horii, por ter dado a oportunidade para a elaboração deste trabalho, orientando-nos com seus elevados conhecimentos e com sua sólida amizade e rígida responsabilidade.

Ao Prof.Dr. Antônio Joaquim de Oliveira, por ter ajudado na confecção do summary, e também por sua valiosa amizade.

À minha nora Patricia Angélica Alves, por ter me ajudado e muito, na elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Afrânio Antônio Delgado por ter-nos conduzido aos caminhos da Tecnologia Rural, e ter-nos ensinado muito.

- Aos meus Pais Alcides e Ruth e à minha irmã Márcia e em especial ao meu irmão Marcos por tudo que sou.

- Aos professores e aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

- Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em especial a Zelinda Aguiar Jordão, Regina Helena Gonçalves, sem as quais o presente trabalho seria muito mais doloroso de ser realizado.

- Ao amigo Eng. Agro. Luis Roberto Martin pela ajuda na elaboração dos desenhos.

- A CAPES, pelo auxílio concedido em forma de bolsa de estudos.

- Ao amigo e "irmão", Plínio Pinto de Mendonça Uchoa Jr., pela tolerância, trabalho e "força", durante a construção dos equipamentos, treinos e adaptações das análises, durante toda a parte experimental e construção e tabulação dos resultados obtidos.

- À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xv
SUMARY	xvii
 1. INTRODUÇÃO	 01
 2. REVISÃO DE LITERATURA	 03
2.1. Temperatura em fermentação alcoólica	03
2.2. Teor de células em fermentação alcoólica	15
2.3. Mosto de fermentações alcoólicas	17
2.4. Açúcares fermentescíveis em fermentação alcoóli- ca	19
2.5. Generalidades sobre fermentações	24
 3. MATERIAIS E MÉTODOS	 39
 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	 48
 5. CONCLUSÕES	 146
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 148

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Esquema do Fermentador	40
2.	Esquema da dorna de fermentação	41
3.	Esquema da camisa de refrigeração	42
4.	Esquema do agitador	43
5.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 1 rodada n.º 1.	51
6.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 1 rodada n.º 1	51
7.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 1 rodada n.º 1	52
8.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 1 rodada n.º 2.	55
9.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 1 rodada n.º 2	55
10.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 1 rodada n.º 2	56
11.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 1 rodada n.º 3.	59
12.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 1 rodada n.º 3	59
13.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 1 rodada n.º 3	60

Figura		Página
14.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 2 rodada n.º 1.	63
15.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 2 rodada n.º 1	63
16.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 2 rodada n.º 1	64
17.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 2 rodada n.º 2.	67
18.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 2 rodada n.º 2	67
19.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 2 rodada n.º 2	68
20.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 2 rodada n.º 3.	71
21.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 2 rodada n.º 3	71
22.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 2 rodada n.º 3	72
23.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 3 rodada n.º 1.	75
24.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 3 rodada n.º 1	75

Figura		Página
25.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 3 rodada n.º 1	76
26.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 3 rodada n.º 2.	79
27.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 3 rodada n.º 2	79
28.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 3 rodada n.º 2	80
29.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 3 rodada n.º 3.	83
30.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 3 rodada n.º 3	83
31.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 3 rodada n.º 3	84
32.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 4 rodada n.º 1.	91
33.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 4 rodada n.º 1	91
34.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 4 rodada n.º 1	92
35.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 4 rodada n.º 2.	95

Figura	Página
36. Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 4 rodada n.º 2	95
37. Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 4 rodada n.º 2	96
38. Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 4 rodada n.º 3.	99
39. Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 4 rodada n.º 3	99
40. Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 4 rodada n.º 3	100
41. Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 5 rodada n.º 1.	103
42. Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 5 rodada n.º 1	103
43. Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 5 rodada n.º 1	104
44. Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 5 rodada n.º 2.	107
45. Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 5 rodada n.º 2	107
46. Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 5 rodada n.º 2	108

Figura		Página
47.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 5 rodada n.º 3.	111
48.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 5 rodada n.º 3	111
49.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 5 rodada n.º 3	112
50.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 6 rodada n.º 1.	119
51.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 6 rodada n.º 1	119
52.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 6 rodada n.º 1	120
53.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 6 rodada n.º 2.	123
54.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 6 rodada n.º 2	123
55.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 6 rodada n.º 2	124
56.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 6 rodada n.º 3.	127
57.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 6 rodada n.º 3	127

Figura		Página
58.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 6 rodada n.º 3	128
59.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 7 rodada n.º 1.	131
60.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 7 rodada n.º 1	131
61.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 7 rodada n.º 1	132
62.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 7 rodada n.º 2.	135
63.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 7 rodada n.º 2	135
64.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 7 rodada n.º 2	136
65.	Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n.º 7 rodada n.º 3.	139
66.	Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n.º 7 rodada n.º 3	139
67.	Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n.º 7 rodada n.º 3	140

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Efeitos da temperatura na produção de álcool ..	13
2. Valores encontrados para <i>S. ellipsoideus</i>	20
3. Valores de eficiência fermentativa, e produtividade (g/l*h), para diferentes sistemas de condução do processo fermentativo, empregando-se <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
4. Resultados experimentais para células, substrato e etanol em condições operacionais ..	34
5. Resultados da fermentação alcoólica em meio sintético	36
6. Resultados da fermentação alcoólica em meio natural	36
7. Datas das fermentações e número de ordem	46
8. Quadro da Análise da Variância	47
9. Resultados do experimento n.º 1 e rodada n.º 1 ..	50
10. Resultados do experimento n.º 1 e rodada n.º 2 ..	54
11. Resultados do experimento n.º 1 e rodada n.º 3 ..	58
12. Resultados do experimento n.º 2 e rodada n.º 1 ..	62
13. Resultados do experimento n.º 2 e rodada n.º 2 ..	66
14. Resultados do experimento n.º 2 e rodada n.º 3 ..	70
15. Resultados do experimento n.º 3 e rodada n.º 1 ..	74
16. Resultados do experimento n.º 3 e rodada n.º 2 ..	78
17. Resultados do experimento n.º 3 e rodada n.º 3 ..	82
18. Resultados do experimento n.º 4 e rodada n.º 1 ..	90
19. Resultados do experimento n.º 4 e rodada n.º 2 ..	94
20. Resultados do experimento n.º 4 e rodada n.º 3 ..	98

Tabela	Página
21. Resultados do experimento n.º 5 e rodada n.º 1 ..	102
22. Resultados do experimento n.º 5 e rodada n.º 2 ..	106
23. Resultados do experimento n.º 5 e rodada n.º 3 ..	110
24. Resultados do experimento n.º 6 e rodada n.º 1 ..	118
25. Resultados do experimento n.º 6 e rodada n.º 2 ..	122
26. Resultados do experimento n.º 6 e rodada n.º 3 ..	126
27. Resultados do experimento n.º 7 e rodada n.º 1 ..	130
28. Resultados do experimento n.º 7 e rodada n.º 2 ..	134
29. Resultados do experimento n.º 7 e rodada n.º 3 ..	138
30. Concentrações celulares durante o enchimento ..	141
31. Valores de Produtividade (g/l*h) e de Eficiência(%) nas fermentações analisadas estatisticamente	145

INFLUÊNCIA DE DOIS NÍVEIS DE TEMPERATURA E RECICLO DE CÉLULAS NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

AUTOR: TADEU ALCIDES MARQUES

ORIENTADOR: JORGE HORII

Resumo

O presente trabalho, visou basicamente estudar a influência da temperatura de fermentação e a reciclagem de células (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada, sendo que em todos os ensaios foi utilizada uma razão de alimentação constante de 500 ml/15 minutos, durante 5 horas.

Para tanto foi utilizado um fermentador com capacidade para 15 litros e realizados os seguintes ensaios: fermentação conduzida à temperatura de 30°C e 1500 g de massa úmida de fermento inicial; fermentação conduzida à temperatura de 25°C e 1500 g de massa úmida de fermento inicial e fermentação conduzida a 30°C e 750 g de massa úmida de fermento como inóculo. Foram analisados os teores de etanol, açúcares redutores totais, massa celular, de hora em hora, até a fermentação ser considerada terminada, sendo analisados os diversos comportamentos dos experimentos.

Foi constatado que as técnicas de determinação de massa celular utilizadas nos ensaios com ciclos não foram adequadas (turbidimetria e centrifugação). Ambas as técnicas sofrem influências diversas do meio que acabam por interferir nos resultados, principalmente de estudos cinéticos de fermentação, como as velocidades de consumo de açúcar e formação de produtos. Constatou-se também que tanto a produção de etanol, como o consumo de açúcar no período de enchimento do fermentador apresentaram um elevado coeficiente de

correlação (r de 0,9212 a 1,0000) da correlação linear entre as massas citadas e o tempo.

Na temperatura de 25°C a eficiência fermentativa média foi de 89% (90%) contra 84% (84%) das fermentações realizadas à 30°C, no entanto as fermentações realizadas a 25°C possuíam uma menor produtividade (7,15 g de etanol/l.h) contra (7,87 g de etanol/l.h) das fermentações realizadas em temperaturas de 30°C.

INFLUENCE OF TWO TEMPERATURE LEVELS AND, CELL RECYCLING IN ALCOHOLIC FERMENTATION

AUTHOR: TADEU ALCIDES MARQUES

ADVISER: JORGE HORII

Summary

The present work was carried out basically to study the influence of fermentation temperature and the cell recycling alcoholic fermentation of sugar cane molasses worts in feed batch with all assays using a constant feeding ratio of 500 ml/15 minutes, for 5 hours.

Three assays were carried out in a reactor of 15 liter capacity at three different conditions, using 10 liter of sugar cane worts and pressed yeast as inoculum.

1. Fermentation conducted at 30.0°C using 1,500 g of yeast.

2. Fermentation conducted at 25.0°C and 1,500 g of yeast.

3. Fermentation conducted at 30.0°C and 750 g of yeast

To follow the fermentation performance, total ethanol, total reducing contents and dry matter weight were analyzed hourly up to the end of fermentation.

The statistics analyses of the results showed a very good correlation between the alcohol production and time of reactor feeding and also between sugar consumption and time of reactor feeding ($r = 0.9212$ to 1.0000).

At 25.0°C the average of yield fermentation was 90% whereas at 30.0°C it was 84%.

However the fermentation conducted at 25.0°C showed a lower productivity, that is, 7.15 g ethanol/hr than that at 30.0°C, which was of 7.87 ethanol/hr.

1. INTRODUÇÃO

A temperatura é um fator muito importante no processo de fermentação alcoólica, em função da influência direta na velocidade das reações que ocorrem durante a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura, como qualquer outro microrganismo, apresenta valores de temperatura ideais para seu crescimento, e valores nos quais não consegue se multiplicar de maneira adequada, podendo então dar chance à contaminações, bem como provocar uma produtividade mais baixa na fermentação alcoólica. Temperaturas inadequadas podem também levar à formação de produtos secundários indesejáveis em uma fermentação alcoólica, que além de provocar um decréscimo na eficiência fermentativa acarreta o aparecimento destes compostos no vinho e ocasionalmente poderão ser arrastados na fase de destilação junto com o etanol.

No entanto, a determinação da faixa de trabalho, deve levar em consideração diversos fatores, como por exemplo: linhagem de levedura utilizada, concentração de açúcares fermentáveis, concentração de inóculo, disponibilidade de água para o resfriamento do fermentador,

temperatura ambiente do local entre outros tantos fatores. Atualmente com a exigência cada vez mais forte no sentido de que sejam obtidos rendimentos e produtividades maiores para a produção industrial, inclusive para produção de etanol, torna-se necessário o estudo mais aprofundado destes fatores e suas inter-relações com a temperatura de fermentação, no sentido de que se possa conhecer o processo e assim poder melhorá-lo.

Deve-se salientar também que os estudos da temperatura da fermentação vem sendo realizado há muito tempo, no entanto, devido as dificuldades outroras enfrentadas, dificilmente depara-se com trabalhos que estudam a temperatura juntamente com outros fatores na fermentação alcoólica.

É neste contexto que o presente trabalho foi realizado, no sentido de estudar o meio fermentativo, e alterações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Temperatura em fermentação alcoólica

GRAY (1941) demonstrou que aumentando a concentração de etanol no meio, a utilização da glucose por diversas leveduras foi inibida, ocorrendo diferenças entre as leveduras quanto à capacidade de tolerar o etanol. Aumentando a temperatura de 30 °C para 35 °C diminuiu a porcentagem de etanol que a levedura consegue tolerar.

WHITE & MUNNS (1951), relataram que embora o crescimento de levedura tenha diminuído acima de 36 °C, a produção de álcool foi maior nas temperaturas mais elevadas.

ALMEIDA (1958), relata que a levedura alcoólica, como aliás todo o ser vivo, encontra condições normais de vida dentro de certos limites - zona ótima - de temperatura. As temperaturas abaixo da zona ótima enfraquecem gradualmente as suas atividades, fazendo com que o microrganismo tome uma forma de resistência - esporo - na qual permanece em estado de vida latente. Nesta condição a levedura resiste a temperaturas extremamente baixas - até 130 °C abaixo de zero - sem que deixe de recuperar todas as

suas funções logo que sejam estabelecidas novamente condições favoráveis à sua "vida". Não acontece o mesmo com as temperaturas acima da zona ótima, onde a ação do calor se torna muito mais sensível. Qualquer pequena elevação da temperatura pode tornar-se perigosa, sendo facilmente atingida a temperatura completamente destruidora. Isto acontecendo, é obvio, a volta às condições normais se torna inútil. Dentro da zona ótima para a levedura alcoólica, a melhor temperatura encontra-se entre 26-32 °C. Assim sendo, para que vantagens de ordem prática sejam auferidas, é preciso que o industrial durante a fermentação alcoólica proporcione à sua levedura um limite de temperatura situado entre aqueles extremos. Daí vem a necessidade de um aquecimento inicial do mosto em épocas frias e um sistema de refrigeração quando a temperatura esteja elevada. Neste ponto achou-se de interesse ressaltar que o ótimo de temperatura para um grande número de microrganismos prejudiciais à fermentação alcoólica, encontra-se entre 32 a 38 °C. Por essa razão, o autor diz preferir numa fermentação pecar por falta de temperatura do que por excesso. No primeiro caso haverá apenas pequeno retardamento no processo fermentativo enquanto que no segundo estar-se-á propiciando condições favoráveis ao desenvolvimento de fermentações nocivas, havendo ainda a considerar que sob temperaturas elevadas, as perdas de álcool por evaporação e por projeção aumentarão em razão progressiva.

Segundo ALMEIDA (1960), o mosto deve entrar numa dorna de fermentação, qualquer que seja o sistema de fermentação adotado, com uma temperatura variável de 24 a 26 °C, para que a temperatura durante a fermentação não ultrapasse 35 °C.

Foi observado por diversos autores a maior excreção de ácido pirúvico com o aumento de temperatura (RANKINE, 1965).

MERRIT (1966), verificou que em meio anaeróbico o máximo crescimento e as produções de glicerol e álcool superiores foram obtidos a 30 °C e a maior produção de etanol a 25 °C.

Com a alteração da temperatura, diversos processos dos microrganismos são afetados, de acordo com o exposto por FARREL & ROSE (1967), como por exemplo o efeito das baixas temperaturas sobre o aumento da proporção de ácidos graxos insaturados.

A piruvato carboxilase, enzima responsável pela formação do ácido oxaloacético, que é o precursor do ácido succínico durante a fermentação alcoólica, tem sua atividade aumentada até 35 °C. (CAZZULO & STOPPANI, 1968).

Com o aumento da temperatura o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* foi maior do que *Saccharomyces carlbergensis* (HAUKELI & LIE, 1971).

CESAR et alii (1971), citam que o mosto deve apresentar uma concentração compatível com a raça da levedura e com o processo de fermentação a utilizar. E ainda citam que com relação a temperatura as leveduras podem ser de alta ou baixa fermentação. As leveduras altas, mais empregadas nas destilarias de álcool trabalham bem de um modo geral, entre 20 - 35 °C, sendo o ótimo entre 26-32 °C; as leveduras baixas tem seu ótimo de temperatura em 15 °C.

Com relação à temperatura, BRAVO (1973) relata que as fermentações alcoólicas devem transcorrer em temperaturas ao redor de 27-28 °C e nunca superiores a 33 °C.

O tempo de fermentação é reduzido e a velocidade de morte das células foi aumentada com o aumento de temperatura. (NAGODAWITHANA et alii, 1974).

NOVAES et alii (1974), citam que de um modo geral, as leveduras utilizadas nas destilarias de aguardente possuem, como acontece com todos os seres vivos, uma determinada faixa de temperatura na qual desempenham eficientemente suas atividades. Para elas, o ideal seria trabalharem entre 26 e 32 °C e mais especificamente a 30 °C, temperatura na qual a atividade enzimica das mesmas é máxima. À medida em que se afasta daquela faixa, quer para mais ou para menos, suas condições de "vida" vão se tornando precárias, sendo que a sensibilidade é bem mais acentuada para as temperaturas elevadas. Ocorrendo queda da

temperatura, as leveduras vão diminuindo suas atividades, à medida em que adquirem formas de resistência, entretanto, neste caso elas não perecem visto que, desde que condições ótimas sejam de novo atingidas, retornam às suas atividades normais. Nos casos em que a temperatura atinge valores superiores à faixa ótima, as leveduras vão se enfraquecendo e, desde que se atinja um máximo, elas são destruídas.

WALSH & MARTIN (1977), verificaram que para *Saccharomyces cerevisiae* a temperatura ótima para crescimento foi de 30 - 35 °C, enquanto que para *Saccharomyces uvarum* essa temperatura foi de 26,8 - 30,4 °C.

NAVARRO & DURAND (1978), estudando a influência de temperatura, verificaram que quanto maior a temperatura, mais alta foi a concentração intracelular de etanol, como resultado de uma maior resistência à difusão pela parede celular.

CODISTIL (1978), relata que as leveduras empregadas nas destilarias de álcool, em função da temperatura ótima, na qual desempenham eficientemente suas atividades, são classificadas como mesofílicas. Independente dessa temperatura ótima, que para as leveduras alcoólicas é de (26 à 30 °C), existe uma amplitude de variação, da mesma, dentro da qual apresenta atividade; entretanto, variações bruscas ocasionam dificuldades para as condições vitais, comprometendo o desenvolvimento das fermentações. Para as leveduras alcoólicas, o ideal seria

trabalhar a temperatura ao redor de 30 °C, o que não ocorre normalmente na prática. No início da safra, que coincide com o inverno, as temperaturas são baixas, ao redor de 15 °C. Nestas condições, o mosto não constitui um meio adequado ao desenvolvimento das fermentações, estando a atividade da levedura reduzida. No início da safra deve-se aquecer os mostos, por um processo qualquer, a fim de favorecer a fermentação inicial e depois, sendo a fermentação um processo exotérmico, a quantidade de calor desprendido será suficiente para manter o processo. No decorrer da safra, a temperatura ambiente se eleva, não havendo necessidade de aquecer o mosto, invertendo-se o problema. Se o mosto possui uma temperatura ideal, a fermentação contribuirá para elevá-la de modo exagerado, podendo as condições tornarem-se adversas às leveduras, que tem a sua atividade limitada e ao mesmo tempo, favorecendo o desenvolvimento de bactérias que então, encontram o seu ótimo. O resfriamento do mosto pode ser conseguida, na prática, pela circulação de água em canalizações de serpentina (interna) ou em coroa (externa), nas dornas de fermentação. É importante, observar sempre se não há vazamentos nas serpentinas internas, o que primeiro diluiria mais o mosto em fermentação e segundo se a água de resfriamento contiver microrganismos indesejáveis, causará problemas para a fermentação e para o equipamento de destilação (corrosão microorgânica). Quando o resfriamento

externa é usada, deve-se tomar o cuidado de se ter uma lâmina de água constante e caindo bem sobre a parede externa da dorna na parte útil, não deve ser colocada muito próxima a boca da dorna pois, uma água contaminada, poderá borrifar para dentro da dorna. Verificar sempre se todos os furos estão abertos, pois é normal obstruírem-se diminuindo a área de vazão.

A diminuição de temperatura, estudada por PFISTERER *et alii* (1979), provocou aumento nos ácidos graxos totais, devido a maior formação de ácidos graxos insaturados e que aumentando a concentração de açúcar aumentou os lipídeos totais.

Com o aumento da temperatura, houve maior produção de ácido esteárico (OKUYAMA *et alii*, 1979).

BORZANI *et alii* (1980), utilizando fermentador de 15 litros, contendo 6,5 a 7,0 litros de meio, aeração 1,0 v/v/m, agitação de 250 min^{-1} e temperatura variando de $20 - 40^{\circ}\text{C}$, observaram que o valor de Y (concentração de células/variação na concentração de açúcar), diminuiu com o aumento da temperatura, iniciando à 20°C com um valor aproximado de 0,095 e chegando a um mínimo de aproximadamente 0,045 na temperatura de 35°C , à partir desta temperatura o valor de Y voltou a crescer apesar de modestamente, sendo que à 40°C o valor situava-se aproximadamente em 0,06. Isto indica que houve um maior crescimento celular em temperaturas mais baixas. O mesmo

autor citou o valor de $\bar{\mu} = 0,11 \text{ h}^{-1}$ com uma alimentação de 30,3 g ART/litro.

LEE *et alii* (1980), relataram para *Saccharomyces uvarum* que a temperatura ótima para crescimento foi de 34 °C e para produção de etanol de 37 a 43 °C, sendo que até 38 °C os efeitos inibitórios do etanol sobre o crescimento não foram afetados pela temperatura.

SANTOS (1988), concluiu que a estirpe *Saccharomyces cerevisiae* IZ-365 é uma levedura termotolerante, tendo obtido maior eficiência de conversão de açúcar do caldo de cana-de-açúcar à 40 °C com 14% de açúcares totais.

JÁ STUPIELLO & HORII (1981) citam que a reprodução das células ocorrem até temperatura de 38°C, ocorrendo a inibição de multiplicação a 40°C. Esses mesmos autores afirmam que existe uma recomendação de se manter a concentração do meio em cerca de 50% do brix do mosto. E relatam ainda que existe uma faixa na qual o processo fermentativo deve ocorrer e esta faixa é condicionada pela linhagem de levedura empregada e pela possibilidade de maior ou menor crescimento de contaminantes no processo.

LOUREIRO & VAN UDEN (1982), utilizando a levedura IGC 4072 *Saccharomyces cerevisiae* em temperaturas variáveis, chegaram a conclusão que quanto maior o teor alcoólico menor a temperatura letal para a levedura, sendo realizado um gráfico que inicia a 40°C e a 0 %v de álcool e

terminando em 32°C e a 10%v de álcool, o que sugere que em temperatura mais baixa como 25°C, o teor alcoólico no meio não provocaria inibição e talvez fosse responsável pelo maior crescimento celular.

PATEL & LEWIS (1982), verificaram que os principais ácidos graxos encontrados nas leveduras foram palmitoléico, oléico e palmítico, totalizando mais de 90% do total. Houve aumento da proporção do ácido palmitoléico e redução do ácido oleico quando a temperatura abaixou de 30 °C para 20 ou 10 °C.

PARADA & ACEVEDO, (1983), utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, meio sintético contendo 3,92 g/l de glucose e pH ajustado com citrato à 4,6; e temperatura variando na faixa de 25 a 35°C, observaram que a velocidade de crescimento específico μ aumentava com o aumento da temperatura até atingir o valor máximo de 0,41 h⁻¹ na temperatura de 30°C e após esta temperatura este valor entrava em declínio. Ainda os mesmos autores observaram que a capacidade de síntese proteica de uma célula é determinada pelo seu número de ribossomos e de suas atividades. Aumentando a temperatura de 20 °C para 35 °C diminuiu o conteúdo de RNA das células de *Saccharomyces cerevisiae*, ocorrendo cerca de 43% de redução. Essa redução pode explicar a diminuição do crescimento com o aumento da temperatura, pois a proteína e RNA aumentaram linearmente com a velocidade de crescimento.

JANSSENS et alii (1984), utilizando *Kluyveromyces fragilis* em meio sintético contendo 5% de lactose, 1% de extrato de levedura e 2% de peptona (YP5L) para multiplicação da cultura e para o cultivo contínuo foi preparada uma solução com (0, 12, 15 e 20% de lactose e com 0,5% de peptona, usaram um fermentador com capacidade de 3 litros, temperatura ajustada à 30 °C, agitação 250 rpm e pH 4,5. Obtiveram uma produtividade de 7,1 g/l*h e relataram que o aumento da concentração de biomassa no fermentador é de fundamental importância para o processo.

MEHAIA & CHERYAN (1984), obtiveram que em fermentação contínua, utilizando-se *S. cerevisiae* e concentração de açúcar ao redor de 100 g/l no meio, com uma utilização de 85% da glucose, a produtividade foi de 10 g de etanol/l*h. Esses mesmos autores obtiveram para fermentação em batelada o valor de 2,1 g de etanol/l*h e utilização de 100% da glucose, com 100 g/l de concentração no meio.

QURESHI & TAMHANE (1985), utilizando mel diluído e inóculo de 0,5% v/v, trabalhando com temperaturas de 14 a 41 °C, e células imobilizadas, chegou aos seguintes resultados:

Tabela 1 - Efeitos da temperatura na produção de álcool

N ^o da amostra	Células livres		Células imobilizadas	
	Temp °C	Produção de Álcool (g/h)	Temp °C	Produção de Álcool (g/h)
1	14	0,02	12	2,22
2	25	0,05	18	3,58
3	30	0,07	30	3,75
4	37	0,05	35	4,60
5			41 ^a	3,33
6			41 ^b	2,72

a - 41°C 2 horas antes da incubação

b - 41°C 8 horas antes da incubação

FONTE: QURESHI & TAMBANE (1985)

SILVA et alii (1987) relatam que numa usina ou destilaria é necessário que se tenha uma alta produtividade em etanol, para diminuir os custos de investimentos. Existem alguns fatores críticos que afetam a fermentação alcoólica, tais como: concentração de substrato, concentração de levedura, temperatura de fermentação, pH, concentração de extrato de levedura, suplementação de nutrientes e micronutrientes. Os autores trabalharam com as seguintes variáveis:

	Inferior	Superior
Glicose (g/l)	120,0	360,0
Levedura (g/l)	4,0	84,0
NH ₄ H ₂ PO ₄	2,0	6,0
Extrato de levedo	4,0	52,0

A temperatura foi fixada em 30 °C, e conseguiram otimizar a produtividade em 20,5 g/l.h com concentrações de substrato de 155 g/l, inóculo 83 g/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 3,7 g/l e extrato de levedura 25,8 g/l.

A inativação das células das leveduras em altas temperaturas (40 °C) durante a fermentação do melaço foi prevenida pela adição de óleos vegetais (SAIGAL & VISWANATHAN, 1984).

MANCILHA et alii (1984), utilizando como meio caldo extraído de sorgo e diversas linhagens de leveduras obtidas do Instituto Zimotécnico da ESALQ, trabalharam com temperatura de 30 °C a fim de determinar a produção de etanol pelas linhagens consideradas.

Segundo FINGUERUT et alii (1987), a principal estratégia no controle do processo fermentativo é manter a mais alta atividade celular possível, dentro da faixa usual das chamadas variáveis independentes, por exemplo: ART mosto, tempo de enchimento e pH. Um aumento da temperatura de fermentação provoca uma inibição na reprodução, morte de leveduras e instabilidade no rendimento e produção.

LALUCE et alii (1991), disseram que é economicamente melhor produzir etanol via fermentativa em temperatura ao redor de 35-40 °C, pois facilita a recuperação de etanol e reduz o custo de resfriamento principalmente em países tropicais, como é o caso do Brasil. Usaram em seus ensaios linhagens termotolerantes isoladas em

trabalhos anteriores e levedura de panificação, e meio utilizando caldo de cana tratado, esterilizado e adicionado com extrato de levedura, peptona e sacarose, tendo o pH ajustado para o valor de 4,5 e observaram que o ótimo de produção de etanol ficou entre 30 - 35 °C.

2.2. Teor de Células em Fermentação Alcoólica

GRAY (1945) citou que a capacidade de quatro linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* de utilizar glucose variou com a concentração inicial de glucose, afirmando que a inibição em altas concentrações de glucose é devido em parte ao fenômeno osmótico.

SHUKLA & KAPOOR (1958), relataram que na fermentação alcoólica a produção de leveduras consome de 3 a 6% do açúcar, usando inóculo de 0,4 g/l e 10 g/l e temperatura ao redor de 30 °C, e concluíram que há maior eficiência fermentativa com inóculo de 0,4 g/l que 10 g/l e que a formação de fermento é maior em baixas concentrações de açúcar e diminui com o aumento da concentração.

Segundo STANIER et alii (1969) e LIMA et alii (1975), os organismos responsáveis pela fermentação alcoólica são as leveduras e raramente algumas bactérias, sendo que os principais agentes desse tipo de fermentação são as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Segundo FERRARI et alii (1980), as linhagens de leveduras utilizadas na indústria são selecionadas para promover altas velocidades de fermentações, altas eficiências, tolerância a glucose e etanol, baixo pH ótimo de fermentação e altas temperaturas ótimas de fermentação.

HSIE (1981), relatou que o efeito do tamanho do inóculo entre 5 - 10% v/v foi considerado satisfatório e que inóculo acima de 10% não provocam aumento de eficiência porém o tempo de fermentação é grandemente reduzido. O inóculo pode ser reduzido a 1% v/v quando a fermentação se realiza em agitação de 100 rpm.

Segundo AMORIM (1982), o tempo de fermentação está diretamente associado à quantidade de fermento na dorna, além de outros fatores. A redução do tempo de fermentação além de proporcionar uma economia significativa em dornas de fermentação reduz a chance de contaminações. Relata também testes com fermentação à vácuo, com temperatura em torno de 35-37 °C.

VEGA et alii (1987) estudaram o efeito de níveis de inóculo de levedura sobre a inibição da fermentação pelo etanol e concluíram que o aumento do inóculo diminui a severidade da inibição e o substrato pode atuar sinergisticamente com o etanol provocando forte inibição. Sendo este efeito variável de açúcar para açúcar (MOULIN et alii, 1980).

2.3. Mosto para fermentações alcoólicas

Segundo OLBRICH (1960) a composição do melaço é predominantemente de sacarose e açúcar invertido, no entanto menciona a existência de outros compostos que não eram conhecidos na época.

ARAÚJO et alii (1961) estudando viscosidade de melaços em Pernambuco, Minas Gerais e Rio de Janeiro, obtiveram nas análises realizadas para açúcares totais valores entre 57,31% até 67,43%, e 14,82% a 28,41% para açúcares redutores, já OLBRICH (1960) achou o valor médio de 64% de açúcares totais e 30% de açúcares redutores e salientou também que a soma de sacarose real obtida transformada em açúcares redutores presentes no melaço não correspondiam ao valor obtido quando da determinação de açúcares totais.

HONIG (1969) explicou este fato, citando a ocorrência de substâncias não açúcares, infermentescíveis no melaço.

AIBA et alii (1976), propondo a otimização da operação do sistema descontínuo alimentado, para o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, mantiveram a concentração de glucose abaixo de 70 mg/l, valor acima do qual ocorre a metabolização da glucose para etanol e gás carbônico.

YAROVENKO (1978), relata que para mosto de xarope tem-se os seguintes valores no meio em fermentação: pH inicial = 4,3; pH final = 4,0 e a duração das fermentações em mosto de xarope gira ao redor de 24 horas.

O melaço subproduto a obtenção do açúcar constitui um excelente meio de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*. (OLIVEIRA, 1978; COZZOLINO, 1982).

SAIGAL & WISWANATHAN (1984), relatam que o uso de melaços como fonte de açúcar para a produção de etanol, introduz no sistema uma série de compostos orgânicos e inorgânicos capazes de interferir no processo. Salientam ainda, que a realização de um pré-tratamento, para remover tais substâncias pode resultar em aumentos na eficiência fermentativa, além de diminuir possíveis incrustações nas colunas de destilação.

LETORNEAU & VILLA (1987) determinaram que em mosto de beterraba a partir de 177 g/l de açúcar as velocidades específicas de crescimento sofrem quedas significativas.

BORZANI (1987), concluiu que durante a fase de produção de etanol, quando da alimentação em batelada alimentada, a velocidade de formação de etanol foi constante, indicando a existência de uma correlação linear entre a variação da massa de etanol e o tempo, sendo a inclinação da reta função da alimentação e concentração do mosto.

2.4. Açúcares fermentecíveis em fermentação alcoólica

WHITE (1954), parece ser o primeiro a propor uma variação exponencial da vazão de alimentação com o tempo, para ajustar o oferecimento de nutriente e substrato com o crescimento celular.

Segundo ALMEIDA (1960), a concentração do mosto a fermentar deve ser controlado da seguinte maneira:

Nos primeiros dez (10) dias de fermentação o brix deverá ser ajustado pela adição de água entre 12 e 14 °Brix, nos 10 dias seguintes eleva-se a concentração para 14 a 16 e posteriormente 16 a 18 °Brix. O objetivo deste procedimento é minimizar os efeitos prejudiciais, constantes e acumulativos de álcool no vinho, sobre a levedura.

FALCINELLI (1970), estudando a importância do meio e da levedura em fermentação alcoólica, chegou aos seguintes valores para fermentação utilizando *S. ellipsoideus*:

Tabela 2 - Valores encontrados para *S. ellipsoideus*

MOSTO		VINHO			
Acidez Total (g/l)	Açúcar (g/l)	Alcool (°V)	Acidez Total (g/l)	Açúcar residual (%)	Alcool/Açúcar
9,5	20,5	11,48	0,15	0,5	0,58
9,5	24,5	12,78	0,22	1,3	0,55
9,5	27,5	14,20	0,30	2,0	0,55
9,5	29,5	14,56	0,32	2,5	0,53
10,4	20,5	12,78	0,16	0,3	0,64
10,4	24,5	14,02	0,19	0,9	0,60
10,4	27,5	14,74	0,31	1,5	0,56
10,4	29,5	15,48	0,38	1,6	0,55
11,2	20,5	12,60	0,26	0,4	0,63
11,2	24,5	14,11	0,24	0,9	0,59
11,2	27,5	15,84	0,31	1,0	0,59
11,2	29,5	16,40	0,37	1,5	0,58

FONTE: FALCINELLI (1970)

E concluiu que o rendimento diminuiu com o aumento do teor de açúcar no mosto e o mesmo aumentou com a elevação do teor de acidez no mosto.

STREHAIANO et alii (1978), observaram que quanto maior a concentração de açúcar inicial, menor foi a velocidade de crescimento (μ), em uma fermentação.

Segundo Moritz & Meirelles¹, o processo de batelada alimentada é mais comumente usado quando o substrato não deve ser introduzido de uma só vez no início do processo, sendo alimentado ao longo da fermentação, de modo a manter uma concentração adequada ao processo.

PERINGER & BLACHERE (1979), citam que o controle da vazão de alimentação atenua o mecanismo de inibição por produto e substrato, favorecendo a reprodução celular.

ALMEIDA (1980), comparou os processos de batelada e batelada alimentada na fermentação de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (IZ 1904). As concentrações de açúcares na faixa de 270 g/l inibiram a fermentação no processo de batelada convencional. A concentração do etanol de 25 g/l determinou o término da fase exponencial de crescimento e de 80 g/l apresentou uma inibição total. Concluiu também que batelada alimentada permite evitar o efeito inibidor do açúcar na fase exponencial.

HORII (1980), cita que a maioria dos processos utilizados na prática, em fermentação alcoólica são em batelada (exceção feita a fermentação contínua) e a alimentação é feita com a preocupação de se evitar a concentração excessiva de açúcares.

¹MORITZ, V. & MEIRELLES, D.F. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Fermentação em batelada alimentada e sua aplicação a substrato não convencionais para a produção de biomassa; relatório ao CEPG, 1978.

Aumentando de 10% para 25% a glucose no meio ocorreu uma redução no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas e alimentação gradual, reduziu este efeito (WADA *et alii* 1981).

Hsie², citado por VASCONCELOS & VALDMAN (1988), trabalhou com mosto de melaço com concentrações de açúcar de 210 g/l, testou várias condições de condução e inclusive a origem industrial dos melaços.

VASCONCELOS & VALDMAN (1988) cita que Almeida³, estudando fermentação alcoólica, trabalhou com mosto sintético variando a concentração de sacarose de 10 a 300 g/l.

RICHTER & BECKER (1985), afirmaram que concentrações de sacarose inferiores a 100 g/l não inibiram a produção de etanol.

².HSIE, M. C. Studies on the Alcohol production from Molasses by Fed-Batch Fermentation-Examination of the Optimum condition. Report of the Taiwan Sugar Research Institute, Taiwan, 95:33-40, 1982.

³.ALMEIDA, S. B. B. G. Fermentação Alcoólica: Ensaios em Batelada Convencional e em Batelada Alimentada. Rio de Janeiro, 1980. 96 p. (Dissertação de Mestrado-Escola de Química da UFRJ).

Segundo PEISINO (1986), as melhores condições para utilização de açúcar e para manter a viabilidade celular acima de 80% para a levedura M-300-A e Fleischmann acima de 90%, foi de 12,3% de açúcar e temperatura de 30 °C.

D'AMORE *et alii* (1988), verificaram que aumentando-se a concentração de glucose de 10% para 20% houve redução da biomassa, enquanto houve aumento de produção de glicerol, de 0,34% para 1,01%.

Entretanto D'AMORE *et alii* (1987), não encontraram efeito negativo do aumento da concentração de açúcar do meio sobre as velocidades de crescimento e de fermentação, tendo observado, aumento na eficiência da produção de etanol, embora o glicerol tenha aumentado.

Com o aumento de 25% para 35% na concentração de sacarose, BAJPAI *et alii* (1988), verificaram uma redução na eficiência da fermentação de 91,6% para 78,9% em células imobilizadas.

SWEERE *et alii* (1988), estudando o efeito da variação de glucose no meio sobre a produção de fermento de panificação chegaram à conclusão que a relação biomassa/etanol está intimamente ligada ao nível de glucose.

Segundo GUTIERREZ (1989) aumentando a concentração de sacarose diminui a eficiência das leveduras M-300-A, Fleischmann e Itaiquara, enquanto que as leveduras IZ 1904 e IZ 270 não sofreram efeitos dos níveis de sacarose, sendo que a faixa ensaiada foi de 8% a 16% de sacarose.

2.5. Generalidades sobre fermentações

Segundo BORZANI (1956), a cinética dos processos fermentativos é a resultante do conjunto de transformações provocadas em um determinado meio por algum microrganismo, ao longo do tempo, produzindo substâncias de interesse econômico. Entre os parâmetros utilizados para tal estudo, destacam-se a velocidade da fermentação (produtividade), cujos fatores interferentes devem ser bem conhecidos pois podem auxiliar a obter maiores eficiências, além de um melhor entendimento do mecanismo da fermentação.

AIBA et alii (1968), estudaram o efeito da concentração de etanol no meio, sobre as velocidades de crescimento específicos μ e produção de etanol ν e confirmaram a influência do etanol na cinética fermentativa.

TRILLI (1977), relatam que existe um desconhecimento grande da cinética de fermentações e que a relação entre velocidades específicas de crescimento celular e de formação de produtos só foram estudadas para a produção de penicilina.

Segundo STREHAIANO et alii (1979), o conhecimento do vinho, laboratórios, técnicas analíticas, vem tendo grandes progressos com o tempo. A bioquímica da fermentação alcoólica também vem sendo melhor conhecida, no entanto o controle é feito empiricamente e desta maneira torna-se de fundamental importância o conhecimento dos

parâmetros da fermentação alcoólica, pois poder-se-á ter melhores fermentações.

GHOSE (1979) provou que em altas concentrações de etanol (87 g/l) é paralisado o crescimento celular da levedura e acima de 114 g/l não há mais produção de etanol. Descreveu também as seguintes equações para a inibição:

$$\mu = \mu_m * \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)$$

$$V = V_m * \left(1 - \frac{P}{P_{me}} \right)$$

P = concentração de etanol (g/l)

μ_m = velocidade específica máxima de crescimento

V_m = velocidade específica máxima de formação do produto.

μ = velocidade específica de crescimento

V = velocidade específica de formação do produto

P_m = concentração de etanol máxima acima da qual as células não crescem (g/l)

P_{me} = concentração de etanol máxima acima da qual não se produz mais etanol

BUENO NETO (1982) concluiu que o valor de etanol inibitório do crescimento celular foi de 56,6 g/l e que a variação em massa da produção de etanol obedece a uma regressão linear com o tempo durante o enchimento da dorna. Também concluiu que a produção de etanol está associada ao crescimento celular e que aumentando a produtividade tende a cair o rendimento das fermentações.

MILLAR et alii (1982), citam que enzimas glicolíticas são inibidas por concentrações altas de etanol (12% v/v) e podem ser responsáveis pelo declínio da fermentação.

LEÃO & VAN UDEN (1982), citaram que o álcool na fermentação apesar de produzido pela levedura exerce também um forte efeito tóxico sobre elas, causando uma inibição do tipo não competitiva.

Segundo MAIORELLA et alii (1983), a produtividade de uma fermentação pode ser limitada por produtos secundários. Novos processos estão sendo desenvolvidos, nos quais o etanol é removido do meio para evitar seu efeito inibidor, exemplo são as fermentações à vácuo, a qual concentra no meio produtos não voláteis; sistema de filtração em membranas, que podem concentrar moléculas grandes.

MEHAIA & CHERYAN (1984), estudando diferentes sistemas de condução de fermentação etanólica citaram os seguintes valores para Eficiência e Produtividade.

Tabela 3 - Valores de eficiência fermentativa, e produtividade (g/l.h), para diferentes sistemas de condução do processo fermentativo, empregando-se *Saccharomyces cerevisiae*.

SISTEMA DE CONDUÇÃO DO PROCESSO	Eficiência	Produtividade
	(%)	(g/l.h)
Batelada	100	2.5
Ferm. contínua	38	4.1
Células imobilizadas	74	25.0

FONTE : MEHAIA & CHERYAN (1984).

LEÃO & VAN UDEN (1984), relataram que o etanol alterava a cinética de entrada de próton na célula de levedura, pois afetava a membrana lipoproteica, podendo assim comprometer a viabilidade celular.

CASTRO (1985), cita que existem basicamente 3 métodos de fermentação: batelada, semi-contínua e contínua, sendo que, para produção de etanol, os dois primeiros são os mais utilizados, e que em condições típicas, a concentração de substrato gira em torno de 14-18% e o inóculo em torno de 10^7 células por ml, com o etanol numa faixa de 6 - 9 % p/v e com um rendimento teórico a 80 %.

LUONG (1985), cita que o efeito inibidor do etanol sobre o crescimento e fermentação de leveduras foi estudado para a cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 sob condições de bateladas anaeróbicas e os resultados obtidos

revelam que não há grande diferença entre a resposta ao crescimento e fermentação alcoólica e propôs dois modelos de cinéticas de inibição de crescimento celular e de produção de etanol:

$$\frac{\mu_i}{\mu_o} = 1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^\alpha \quad (\text{para crescimento})$$

$$\frac{\mu_i}{\mu_o} = 1 - \left(\frac{P}{P'_m} \right)^\beta \quad (\text{para prod. de etanol})$$

onde:

μ_i = velocidade de crescimento específico na presença de etanol (1/h).

μ_o = velocidade de crescimento específico com teor de etanol igual a zero (1/h).

P = concentração de etanol (g/l).

P_m = concentração de etanol acima da qual não há crescimento de células (g/l).

P'_m = concentração de etanol acima da qual não ocorre mais produção de etanol (g/l).

α e β = constantes da equação

O mesmo autor citou ainda que o valor máximo de etanol acima do qual as células não cresceram foi de 112 g/l e que a capacidade de produção de etanol foi completamente inibida com 115 g/l de etanol.

AQUARONE *et alli* (1986) em estudos em fermentação alcoólica de melaço utilizando como inóculo *S. cerevisiae*, e alimentação em batelada alimentada, concluíram que as melhores produtividades foram obtidas com aumento do inóculo e alimentação do mosto realizada conforme o modelo decrescente.

MARQUES (1986), citou que a eficiência fermentativa é a relação percentual entre o etanol produzido e o etanol teórico esperado com base na conversão total dos açúcares redutores totais do mosto. Assim o cálculo da eficiência fermentativa, pode ser definido através da seguinte equação:

$$EF = \frac{100 * PV * E}{PM * AT * 0,5111}$$

EF = Eficiência fermentativa (%)

PV = Peso de vinho (g)

E = % de Etanol no vinho.

PM = peso de mosto

AT = % de açúcares totais no mosto

0,5111 = peso de etanol (g)/100 g de AT

Segundo COPERSUCAR (1987), para o sucesso de uma fermentação alguns fatores devem ser observados, como por exemplo: número e estado fisiológico da população inicial de leveduras, limpeza, etc. Com relação ao inóculo tem-se três sistemas de partida para a fermentação alcoólica, sendo eles: Fermento selecionado, partindo de tubos de cultura pura; Fermento selecionado, partindo de leite de leveduras; Fermento prensado. No caso de partida com tubo de cultura pura, podem ocorrer variações nos microrganismos utilizados, acarretando que as habilidades requeridas podem não ser alcançadas. Este método é baseado no semeamento periódico em meios sólidos de quantidades muito pequenas de leveduras, seguido de incubação em temperatura ambiente de 30 - 32°C. Na fase industrial, após multiplicação em laboratório, ter-se-á um vinho com pequena concentração de leveduras (1-2% v/v) que será alimentado com mosto não estéril, que costumeiramente possui leveduras já adaptadas, levando a uma competição desfavorável as leveduras selecionadas. No caso de partida com leite de fermento selecionado, deve-se manter a concentração de leveduras na faixa acima de 6% e a temperatura entre 25 e 28°C, pois temperaturas maiores tendem a desviar o metabolismo para a produção de etanol. Com relação ao uso do fermento prensado (Caso dos experimentos realizados), a produção de álcool é proporcional ao teor de fermento vivo nas dornas, ou seja, o aumento de produção deve seguir o

aumento da massa de leveduras, até que se atinja uma concentração na faixa de 6 a 12% v/v.

OKOLO *et alii* (1987), trabalhando com meio sintético, contendo:

Extrato de levedura	4 g/l
H_2PO_4	3 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	3 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,25 g/l
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 g/l,

e utilizando linhagens de leveduras utilizadas nas destilarias da Escócia, na concentração de 10^6 células por ml, e glucose na concentração de 20 g/l, agitação de 250 rpm e temperatura mantida à 30 °C, determinaram que o aumento do teor de etanol provocam um decréscimo exponencial no número de células de leveduras este fato alerta para a possibilidade de que em meios onde a concentração de açúcares sejam maiores, possa ocorrer uma maior produção de etanol e outros produtos, os quais levariam a uma inibição ou até mesmo em uma diminuição dos níveis celulares em fermentação, podendo provocar situações indesejadas, como por exemplo menor eficiência, devido a maior possibilidade de contaminação por bactérias, menor produtividade, devido aos menores teores de fermentos no vinho, e outros tantos problemas oriundos de uma menor porcentagem de leveduras.

Segundo JIMENEZ & BENITEZ (1988), a tolerância a etanol em espécies de *Saccharomyces cerevisiae* é conhecida por ser controlada geneticamente por um grande número de genes, consequentemente é muito difícil obter leveduras mutantes altamente tolerantes a etanol e o isolamento destes mutantes requerem técnicas de seleção em culturas contínuas, também é conhecido que alguns genes limitam a proliferação de células na presença de etanol.

Segundo VASCONCELOS & VILELA FILHO (1988), a medida que se adiciona mosto à dorna, as concentrações de células vão diminuindo devido a velocidade de diluição ser significativamente maior que a de multiplicação celular. Verificou ainda que a produção percentual de etanol até o final da fase de enchimento do fermentador atinge valor médio igual a 66,95 % do total (com um mínimo igual a 62,8 % e um máximo igual a 75,25 %), isto evidencia a grande importância que tem a fase de enchimento da dorna, sendo esta de fundamental importância para o processo fermentativo e se otimizada pode trazer grandes benefícios para a condução da fermentação, assim como ganhos de eficiência e produtividade.

VASCONCELOS & VALDMAN (1988), estudando a otimização do processo de fermentação alcoólica através da batelada alimentada, concluíram que existe uma tendência de se obter maiores produtividades com perfis crescentes para a alimentação, para a fase de enchimento obtiveram as maiores

produtividades os perfis decrescentes de alimentação. Obtiveram alta correlação entre os valores de ART e de Brix, mostrando que é válido o controle da concentração de ART pela análise de Brix.

Alguns dos resultados obtidos podem ser vistos na tabela a seguir:

Tabela 4 - Resultados experimentais para células, substrato e etanol e condições operacionais.

Tempo (h)	Volume	VOC (%)	Células	
	Total 1		XVT g/l	MXT g
0	42	25,9	56,4	2369,6
1	60	19,2	42,3	2542,2
2	78	16,3	33,0	2578,6
3	100	12,2	27,8	2787,0
4	118	11,5	25,1	2966,5
5	142	11,0	22,3	3173,7
6	159	9,7	20,4	3245,1
7	159	9,8	20,5	3262,6
8	159	10,7	20,8	3318,3
9	159	7,9	22,2	3529,8
10	159	7,8	20,3	3234,0

Continuação...

Tempo (h)	Substrato			Etanol		
	SVIC g/l	SVT g/l	MST g	EVIC g/l	EVT g/l	MET g
0	0	0	0	0	0	0
1	5,5	4,5	271,0	29,1	27,9	1675,1
2	12,5	10,4	816,0	37,1	35,8	2800,0
3	18,7	16,4	1649,7	48,6	47,1	4714,8
4	18,4	16,2	1921,5	47,2	45,9	5427,9
5	25,8	23,0	3270,7	47,3	46,0	6541,5
6	30,5	27,5	4380,0	57,4	56,0	8910,4
7	18,9	17,0	2710,6	64,3	63,0	10022,7
8	9,7	8,6	1380,1	65,8	64,5	10264,9
9	7,3	6,7	1073,8	67,3	66,0	10499,8
10	7,1	6,6	1051,8	68,2	67,0	10655,4

SVIC E EVIC - Concentrações de ART e etanol no vinho isento de células

SVT, XVT e EVT - Concentrações de ART, células (p.s.) e etanol tomando como base o volume do meio em fermentação no momento da amostragem.

MXT, MST e MET Massas de células, ART e etanol no momento da amostragem.

VOC (%) - Percentual de leveduras, v/v

FONTE: VASCONCELOS & VALDMAN (1988).

PONS *et alii*, (1989), trabalhando com fermentação alcoólica de sucos de frutas e meios sintéticos, nas seguintes condições:

Volume 2 litros (no fermentador)

Temperatura constante (30 °C)

Agitação moderada (magnética)

Concentração celular inicial 6,5 g/l (m.s.)

Concentração de ART 100 g/l (glucose, frutose ou sacarose),

propuseram a determinar cinéticas de produção para diversos componentes, utilizando de novas técnicas cromatográficas, e chegaram aos seguintes resultados:

a) O primeiro componente a ser produzido é o aldeído acético, e a maior velocidade produção de etanol é obtido quando o teor de aldeído acético encontra-se no seu maior teor, isto para o meio sintético. Já para os sucos naturais, as velocidades de produção de etanol são ligeiramente menores que nos meios sintéticos. A concentração de etanol (tabelas 3 e 4) está na faixa citada na literatura. Um aumento na temperatura, tamanho do inóculo, também são observados e uma diminuição no tempo de fermentação e não modificação nas concentrações finais de metabólitos, significativamente.

Tabela 5 - Resultados da fermentação alcoólica em meio sintético.

Rodada	Açúcar	Inóculo	Acetaldeído (máx.)	Etanol
		g/l p.s.	mg/l	g/l
1	Glucose	6,5	64,3	52
2	Glucose	6,5	43,4	69,7
3	Frutose	6,5	64,3	50
4	Frutose	6,5	40	43,9
5	Sacarose	6,5	60	50

FONTE: PONS et alii (1989)

Tabela 6 - Resultados da fermentação alcoólica em meio natural.

Rodada	Tempo de Fermentação	Inóculo	Acetaldeído (máx.)	Etanol
		g/l p.s.	mg/l	g/l
1	10,5	6,5	28,6	74,0
2	10,5	6,5	43,0	59,0
3	22,0	6,5	51,3	55,6
4	13,5	6,5	35,7	42,8
5	12,0	6,5	52,6	54,6
6	10,0	9,7	35,6	54,8
7	16,0	3,2	62,5	54,7

FONTE: PONS et alii (1989)

OLIVA NETO (1990), calculou o rendimento em etanol da seguinte forma:

$$R = \frac{(Me_{10} - Me_0)}{Me_{teórica}} * 100 (\%)$$

onde:

$$M_e \text{ teórica} = 0,5111 * F * S_o * t_e$$

S_o = concentração em glucose no substrato inicial (g/l)

F = vazão (l/hora)

t_e = tempo de enchimento das dornas (horas)

M_{e0} = massa de etanol no início (g)

0,5111 = coeficiente de transformação de glucose em etanol,

e citou a produtividade como uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção de etanol. Ela foi calculada pelo quociente entre massa de etanol produzida e o volume e tempo transcorrido para se atingir esta quantidade:

$$P_e = \frac{(M_{e10} - M_{e0})}{t * V} \quad (\text{g/ l * h})$$

t = tempo de fermentação (horas)

V = volume (litros)

P_e = produtividade de etanol (g/ l * h)

A produtividade celular analogamente a do etanol:

$$P_c = \frac{(M_b - M_{b0})}{t * V} \quad (\text{g/ l * h})$$

Velocidade de consumo de açúcar:

$$P_s = \frac{ART_c}{t * V} \quad (\text{g/ g * h})$$

Para os fatores de conversão o mesmo autor usou as seguintes fórmulas:

$$Y_{p/s} = \frac{M_{e10} - M_{e0}}{ART_c}$$

ou seja, quantidade de etanol produzida por unidade de massa consumida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foi utilizado um conjunto de fermentadores, de projeto do Prof.Dr. Jorge Horii, construído pela CONGER, cujos detalhes estão relatados a seguir:

Figura 1 - Esquema do Fermentador

- Dornas, em número de três, constituídas de aço inox, com volume útil de 15 litros cada, em desenho como se pode ver na Figura 2.

Figura 2 - Esquema da dorna de fermentação

-Sistema de Resfriamento: camisa de resfriamento interna em aço inox, como pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 - Esquema da camisa de resfriamento

Possuindo ainda os seguintes acessórios:

Banho-maria com controle de temperatura variando de ($- 40^{\circ}\text{C}$ a $+ 60^{\circ}\text{C}$), com capacidade de bombeamento do líquido refrigerado até à camisa. Agitador dotado de palheta de agitação acionada por um motor elétrico, com controle de rpm, Foi usado no ensaio 200 rpm, e o equipamento está esquematizado na Figura 4.

VISTA LATERAL

Figura 4 - Esquema do agitador

O fermento utilizado foi *Saccharomyces cerevisiae* na forma de fermento biológico prensado comercial em blocos de 0,5 kg.

O melaço utilizado foi obtido junto às usinas da região, analisado com relação ao Brix, Açúcares Redutores Totais e diluído quando da fermentação até a concentração desejada.

Para o preparo do mosto, o melaço foi diluído em água destilada e autoclavado com a adição de fosfato como auxiliar de clarificação, tendo no final um brix de aproximadamente 33°B. O procedimento técnico de clarificação foi o seguinte: O melaço foi diluído com solução aquosa de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ na proporção de 3 litros de melaço para 7 litros de H_2O potável, contendo 15 g do fosfato. Autoclavar inicialmente em vapor fluente por 15 minutos e em seguida a 1 atm. (115°C - 120°C) por 15 minutos ou mais. Manter o material em repouso por 24 - 48 horas. Sifonar o sobrenadante, ajustar pH e determinar açúcares redutores.

Quando necessário, em função do controle operacional com microscopia foram empregados anti-espumante e antibiótico (FERMACOL 0,1 g/l), durante as fermentações realizadas.

Para o preparo do inóculo, pesou-se, em balança eletrônica, a quantidade de fermento necessária para atingir o peso seco desejado em cada tratamento. A seguir,

esta massa de fermento foi suspensa em H₂O destilada, até o volume de cinco litros, sendo na sequência, ajustado seu pH ao valor de 2,0.

As condições experimentais foram:

- a) Temperatura da fermentação ajustada ao redor de 25 °C, mosto 200 g/l, inóculo 1500 g de massa úmida na primeira rodada.
- b) Temperatura da fermentação ajustada ao redor de 30 °C, mosto 200 g/l, inóculo 1500 g de massa úmida na primeira rodada.
- c) Temperatura da fermentação ajustada ao redor de 30 °C, mosto 200 g/l, inóculo 750 g de massa úmida na primeira rodada.

O fermento foi reciclado para fermentações subsequentes (02), através do uso de centrífuga de açúcar marca, INTERNATIONAL CHEMICAL CENTRIFUGE Modelo CH7021M, utilizando tecido especial de "nylon" no interior dos cestos de centrifugação como, filtros que retinham as células. Houve, entretanto pequenas perdas neste processo.

Os ensaios realizados, bem como suas condições experimentais podem ser vistos na tabela 7.

Tabela 7 - Datas das fermentações e número de ordem

Condição	Ensaio	RECICLO		
		1.	2.	3.
1	1	26.09.89	27.09.89	28.09.89
1	2	31.10.89	01.11.89	02.11.89
1	3	29.11.89	30.11.89	01.12.89
2	4	22.01.90	23.01.90	24.01.90
2	5	26.01.90	27.01.90	28.01.90
3	6	16.05.90	17.05.90	18.05.90
3	7	16.05.90	17.05.90	18.05.90

Condição 1 - Mosto 200 g/l, Temperatura 30 °C, 10% fermento inicial na dorna, agitação 200 rpm.

Condição 2 - Mosto 200 g/l, Temperatura 25 °C, 10% fermento inicial na dorna, agitação 200 rpm.

Condição 3 - Mosto 200 g/l, Temperatura 30 °C, 05% fermento inicial na dorna, agitação 200 rpm.

As técnicas analíticas empregadas foram as seguintes:

a) Determinação da acidez volátil

método: Destilação e titulação
Segundo BACILA (1960)

b) Determinação de pH

método: Uso de potenciômetro

c) Determinação de massa celular

método: Turbidimetria e Centrifugação
Segundo TRÍBOLI (1987)

d) Concentração de AT

método: Segundo BACILA (1960)

e) Teor alcoólico

método: Dicromato de potássio
Segundo TRÍBOLI (1987)

Foi também realizada análise estatística para os ensaios realizados, utilizando o seguinte quadro de análise de variância.

Tabela 8 – Quadro de Análise de Variância

Causas da Variação	G.L.
Temperatura	1
Reciclos	2
Horas	11
Temperatura * Reciclos	2
Temperatura * Horas	11
Reciclos * Horas	22
Temperatura * Reciclos * Horas	22
Resíduo	108
Total	179

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos na série de experimentos com variações na temperatura e concentração de inóculo estão contidos em tabelas e figuras no texto que serão apresentadas individualmente para melhor compreensão de cada ensaio.

Cada ensaio de fermentação foi constituído de três rodadas consecutivas com recuperação de células e reutilização após prévio tratamento ácido, como referido em Materiais e Métodos.

4.1. Experimento n^o 1, rodada n^o 1.

4.1.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 214,19 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1475,4 g

Inóculo inicial (X_0) = 450 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1366,12 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	3,08	30,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,83	32,0	7,00
2	2,00	9,00	4,13	32,0	6,20
3	2,00	11,00	4,24	32,0	5,40
4	2,00	13,00	4,28	32,0	5,00
5	2,00	15,00	4,37	32,0	5,00
6	0,00	15,00	4,43	31,0	4,60
7	0,00	15,00	4,46	29,5	4,60
8	0,00	15,00	4,46	29,5	4,60
9	0,00	15,00	4,46	29,5	4,60

4.1.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 1 rodada n^o 1 são apresentados na tabela n^o 09 e Figuras 05, 06 e 07.

Tabela - 09: Resultados do experimento n^o 1 e rodada n^o 1.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1366,12
1	7,00	428,38	3,69	19,97	408,41	1593,86
2	9,00	856,76	1,15	8,40	848,36	1715,45
3	11,0	1285,14	5,65	52,15	1232,99	1768,66
4	13,0	1713,51	7,95	88,85	1624,66	1820,00
5	15,0	2141,89	6,78	89,37	2052,52	1826,40
6	15,0	2141,89	5,34	70,30	2071,59	1826,40
7	15,0	2141,89	5,34	70,30	2071,59	1826,40
8	15,0	2141,89	5,34	70,30	2071,59	1826,40

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
	0	90,00	450,0	n.d.	0,00	0,00	0,00
1	75,00	525,0	30,0	3,73	29,48	206,35	5406,14
2	62,79	565,1	22,5	4,04	31,88	286,91	7284,55
3	52,96	582,6	20,5	5,58	44,08	484,92	9231,34
4	46,15	600,0	17,5	6,50	51,29	666,73	11178,74
5	40,11	601,7	15,0	7,28	57,49	862,34	13173,60
6	40,11	601,7	15,5	7,38	58,29	874,35	13173,60
7	40,11	601,7	15,5	7,36	58,09	871,34	13173,60
8	40,11	601,7	n.d.	7,36	58,09	871,34	13173,60

Figura 05 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 1 rodada n^o 1.

Figura 06 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 1 rodada n^o 1.

Figura 07 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 1 rodada nº 1.

4.2. Experimento n^o 1, rodada n^o 2.

4.2.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 224,46 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1649,50 g

Inóculo inicial (X_0) = 503,1 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1527,32 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,90	27,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,50	32,0	8,40
2	2,00	9,00	3,87	32,0	7,60
3	2,00	11,00	4,10	32,0	7,20
4	2,00	13,00	4,18	31,0	7,00
5	2,00	15,00	4,26	32,0	6,60
6	0,00	15,00	4,24	32,0	5,00
7	0,00	15,00	4,30	32,0	4,80
8	0,00	15,00	4,30	32,0	4,80

4.2.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 1 rodada n^o 2 são apresentados na tabela n^o 10 e Figuras 08, 09 e 10.

Tabela - 10: Resultados do experimento n^o 1 e rodada n^o 2.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	13,78	2,76	13,78	0,00	1527,32
1	7,00	462,70	10,08	54,40	408,30	1602,91
2	9,00	911,63	14,41	105,45	806,17	1680,82
3	11,0	1360,55	19,22	178,02	1182,11	1718,22
4	13,0	1809,48	21,35	241,31	1568,17	1756,67
5	15,0	2258,40	11,53	153,15	2105,94	1772,29
6	15,0	2258,40	9,67	127,14	2130,61	1791,13
7	15,0	2258,40	4,43	58,48	2199,93	1807,23
8	15,0	2258,40	4,33	57,16	2201,24	1807,23

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	
0	100,62	503,1	n.d.	4,63	36,55	182,75	3472,68
1	75,44	528,1	29,5	6,24	49,24	344,66	5396,75
2	61,52	553,7	23,5	7,25	57,20	514,80	7319,18
3	51,45	565,9	21,5	7,25	57,20	629,20	9281,78
4	44,39	577,1	16,5	7,22	57,00	741,01	11248,28
5	38,92	583,8	15,0	7,70	60,78	911,75	13227,66
6	39,33	589,9	15,0	7,57	59,79	896,82	13208,99
7	39,69	595,4	15,0	8,31	65,56	983,41	13192,77
8	39,69	595,4	n.d.	8,31	65,56	983,41	13192,77

Figura 08 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 1 rodada n^o 2.

Figura 09 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 1 rodada n^o 2.

Figura 10 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n° 1 rodada n° 2.

4.3. Experimento n^o 1, rodada n^o 3.

4.3.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 200,59 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1654,26 g

Inóculo inicial (X_0) = 504,6 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1531,72 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,50	25,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,60	34,0	9,80
2	2,00	9,00	3,86	33,0	9,30
3	2,00	11,00	4,04	31,0	9,20
4	2,00	13,00	4,14	31,0	9,20
5	2,00	15,00	4,21	32,0	8,80
6	0,00	15,00	4,27	32,0	7,00
7	0,00	15,00	4,29	31,0	6,00
8	0,00	15,00	4,30	31,0	5,20
9	0,00	15,00	4,35	31,0	4,80
10	0,00	15,00	4,35	31,0	4,80

4.3.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 1 rodada n^o 3 são apresentados na tabela n^o 11 e Figuras 11, 12 e 13.

Tabela - 11: Resultados do experimento n^o 1 e rodada n^o 3.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	10,35	2,07	10,35	0,00	1531,72
1	7,00	411,53	29,72	162,55	248,97	1531,00
2	9,00	812,70	32,48	242,52	570,18	1533,00
3	11,0	1213,87	40,70	385,25	828,62	1534,00
4	13,0	1615,05	40,99	469,91	1145,14	1536,12
5	15,0	2016,22	44,56	599,64	1416,58	1543,71
6	15,0	2016,22	26,95	362,29	1653,93	1557,37
7	15,0	2016,22	17,46	234,58	1781,64	1566,48
8	15,0	2016,22	8,67	116,12	1900,10	1608,16
9	15,0	2016,22	6,51	87,10	1929,12	1620,29
10	15,0	2016,22	6,51	87,10	1929,12	1620,29

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
0	100,91	504,6	35,0	5,33	42,08	210,38	3468,28
1	72,03	504,2	24,0	4,86	38,35	268,43	5417,99
2	56,11	505,0	19,5	5,13	40,49	364,42	7394,74
3	45,93	505,2	16,0	5,57	44,00	484,01	9416,30
4	38,92	506,0	15,0	6,02	47,51	617,64	11445,07
5	33,90	508,5	13,5	7,11	56,09	841,35	13475,74
6	34,19	512,9	13,5	7,57	59,79	896,92	13469,81
7	34,40	516,0	13,5	7,97	62,91	943,72	13379,71
8	35,32	529,8	13,5	8,12	64,08	961,26	13391,84
9	35,58	533,7	13,5	8,12	64,08	961,26	13379,71
10	35,58	533,7	n.d.	8,12	64,08	961,26	13379,71

Figura 11 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n° 1 rodada n° 3.

Figura 12 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n° 1 rodada n° 3.

Figura 13 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 1 rodada nº 3.

4.4. Experimento n^o 2, rodada n^o 1.

4.4.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_o) = 194,62 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1500,0 g

Inóculo inicial (X_o) = 480,75 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1388,89 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	26,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,40	31,0	8,20
2	2,00	9,00	3,50	34,0	8,20
3	2,00	11,00	3,55	33,0	6,40
4	2,00	13,00	3,67	31,0	6,80
5	2,00	15,00	3,75	31,0	7,40
6	0,00	15,00	3,78	31,0	6,40
7	0,00	15,00	3,78	31,0	5,20
8	0,00	15,00	3,78	30,0	5,00
9	0,00	15,00	3,78	30,0	5,00

4.4.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 2 rodada n^o 1 são apresentados na tabela n^o 12 e Figuras 14, 15 e 16.

Tabela - 12: Resultados do experimento n^o 2 e rodada n^o 1.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1388,89
1	7,00	389,24	12,06	66,39	322,85	1494,41
2	9,00	778,48	9,45	69,75	708,73	1557,18
3	11,0	1167,73	9,77	91,65	1076,07	1615,81
4	13,0	1556,97	16,23	184,18	1372,78	1648,38
5	15,0	1946,21	27,15	363,48	1582,73	1687,18
6	15,0	1946,21	11,42	152,22	1793,99	1713,18
7	15,0	1946,21	6,56	86,85	1859,36	1727,63
8	15,0	1946,21	6,65	88,28	1857,93	1734,12
9	15,0	1946,21	6,65	88,28	1857,93	1734,12

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
0	96,15	480,8	n.d.	0,00	0,00	0,00	3611,11
1	73,90	517,3	26,5	2,63	20,72	145,07	5505,59
2	59,89	539,0	22,5	4,34	34,24	308,15	7382,72
3	50,85	559,4	18,5	4,88	38,49	423,36	9384,19
4	43,89	570,6	18,5	5,90	46,60	605,75	11351,62
5	38,94	584,1	15,0	6,25	49,30	739,49	13390,32
6	39,53	593,0	13,5	6,73	53,16	797,41	13328,59
7	39,87	598,1	14,0	7,17	56,64	849,55	13240,52
8	40,02	600,3	14,0	7,22	57,02	855,34	13265,88
9	40,02	600,3	n.d.	7,22	57,02	855,34	13265,88

Figura 14 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 2 rodada n^o 1.

Figura 15 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 2 rodada n^o 1.

Figura 16 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 2 rodada nº 1.

4.5. Experimento n^o 2, rodada n^o 2.

4.5.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 218,00 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1338,22 g

Inóculo inicial (X_0) = 428,9 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1239,09 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	24,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,53	30,0	7,80
2	2,00	9,00	3,64	31,0	6,80
3	2,00	11,00	3,73	31,0	6,90
4	2,00	13,00	3,86	32,0	8,20
5	2,00	15,00	3,88	31,0	8,20
6	0,00	15,00	3,89	32,0	5,60
7	0,00	15,00	3,85	31,0	4,40
8	0,00	15,00	3,94	30,5	4,20
9	0,00	15,00	4,00	31,0	4,00
10	0,00	15,00	4,00	31,0	4,00

4.5.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 2 rodada n^o 2 são apresentados na tabela n^o 13 e Figuras 17, 18 e 19.

Tabela - 13: Resultados do experimento n^o 2 e rodada n^o 2.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	2,47	0,49	2,47	0,00	1239,09
1	7,00	438,47	14,89	85,77	352,70	1239,16
2	9,00	874,47	14,32	110,19	764,28	1305,00
3	11,0	1310,48	5,59	54,20	1256,28	1304,32
4	13,0	1746,48	14,85	173,47	1573,01	1317,13
5	15,0	2182,48	29,05	396,92	1785,56	1337,54
6	15,0	2182,48	17,58	239,72	1942,76	1360,47
7	15,0	2182,48	7,65	104,11	2078,37	1383,54
8	15,0	2182,48	6,90	93,83	2088,65	1395,12
9	15,0	2182,48	6,23	84,81	2097,67	1383,54
10	15,0	2182,48	6,23	84,81	2097,67	1383,54

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
0	85,78	428,9	n.d.	1,37	10,81	54,07	3760,91
1	61,27	428,9	24,0	4,22	33,35	233,42	5760,84
2	50,19	451,7	19,0	5,72	45,16	406,45	7695,00
3	41,04	451,4	19,0	5,82	45,95	505,44	9695,68
4	35,07	455,9	14,5	6,77	53,43	694,62	11682,87
5	30,86	462,9	11,5	6,82	53,83	807,39	13662,46
6	31,39	470,9	12,0	7,97	62,88	943,27	13639,53
7	31,93	478,9	11,5	8,07	63,67	955,08	13616,46
8	32,19	482,9	12,5	8,12	64,07	960,99	13604,88
9	31,93	479,0	12,5	8,12	64,07	960,99	13616,46
10	31,93	479,0	n.d.	8,12	64,07	960,99	13616,46

Figura 17 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 2 rodada n^o 2.

Figura 18 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 2 rodada n^o 2.

Figura 19 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 2 rodada nº 2.

4.6. Experimento n^o 2, rodada n^o 3.

4.6.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 204,71 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1318,24 g

Inóculo inicial (X_0) = 422,5 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1220,60 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	26,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,31	31,0	8,00
2	2,00	9,00	3,64	29,0	7,40
3	2,00	11,00	3,72	32,0	6,80
4	2,00	13,00	3,86	30,0	7,20
5	2,00	15,00	3,87	30,0	7,00
6	0,00	15,00	3,83	32,0	5,30
7	0,00	15,00	3,83	32,0	4,00
8	0,00	15,00	3,85	31,5	4,00
9	0,00	15,00	3,85	31,5	4,00

4.6.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 2 rodada n^o 3 são apresentados na tabela n^o 14 e Figuras 20, 21 e 22.

Tabela - 14: Resultados do experimento n^o 2 e rodada n^o 3.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	4,09	0,82	4,09	0,00	1220,60
1	7,00	413,51	22,12	127,85	285,66	1220,64
2	9,00	822,92	6,50	50,65	772,27	1213,51
3	11,0	1232,34	6,50	63,56	1168,78	1228,90
4	13,0	1641,75	15,05	176,98	1464,77	1239,41
5	15,0	2051,17	32,09	440,10	1611,07	1286,41
6	15,0	2051,17	15,83	216,61	1834,56	1314,73
7	15,0	2051,17	7,04	96,20	1954,97	1343,26
8	15,0	2051,17	6,70	91,50	1959,66	1348,99
9	15,0	2051,17	6,70	91,46	1959,70	1349,02

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	
1	84,50	422,5	n.d.	2,06	16,26	81,31	3779,40
2	60,36	422,5	22,0	4,35	34,34	240,37	5779,36
3	46,67	420,0	18,5	5,52	43,56	392,02	7786,49
4	38,67	425,4	14,5	6,08	47,97	527,63	9771,10
5	33,00	429,0	12,5	6,89	54,38	706,94	11760,59
6	29,69	445,4	12,5	7,04	55,58	833,73	13713,59
7	30,34	455,0	12,5	8,06	63,60	953,98	13685,27
8	31,00	465,0	12,5	8,62	68,01	1020,12	13656,74
9	31,13	466,9	12,5	8,41	66,40	996,07	13651,01
9	31,13	466,9	n.d.	8,41	66,39	995,83	13650,98

Figura 20 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 2 rodada n^o 3.

Figura 21 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 2 rodada n^o 3.

Figura 22 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 2 rodada nº 3.

4.7. Experimento n^o 3, rodada n^o 1.

4.7.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 197,31 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1395,4 g

Inóculo inicial (X_0) = 447,2 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1292,05 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	23,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,45	30,0	8,50
2	2,00	9,00	3,77	31,0	6,80
3	2,00	11,00	3,96	30,0	6,80
4	2,00	13,00	4,03	30,0	6,80
5	2,00	15,00	4,15	31,0	6,60
6	0,00	15,00	4,20	31,0	5,40
7	0,00	15,00	4,09	31,0	4,80
8	0,00	15,00	4,10	30,0	4,60

4.7.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 3 rodada n^o 1 são apresentados na tabela n^o 15 e Figuras 23, 24 e 25.

Tabela - 15: Resultados do experimento n^o 3 e rodada n^o 1.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1292,05
1	7,00	394,62	12,73	70,97	323,65	1422,82
2	9,00	789,24	5,72	42,46	746,78	1581,94
3	11,0	1183,86	12,12	113,33	1070,53	1650,12
4	13,0	1578,48	18,85	215,74	1362,74	1684,29
5	15,0	1973,10	25,32	338,82	1634,28	1716,07
6	15,0	1973,10	10,58	140,44	1832,66	1728,89
7	15,0	1973,10	6,53	86,63	1886,47	1728,89
8	15,0	1973,10	5,78	76,68	1896,42	1728,89

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
0	89,45	447,3	n.d.	0,00	0,00	0,00	3707,95
1	70,36	492,5	26,5	2,81	22,14	155,01	5577,18
2	60,84	547,6	22,5	4,62	36,47	328,19	7418,06
3	51,92	571,1	19,0	5,58	44,02	484,27	9349,88
4	44,85	583,1	15,5	6,13	48,40	629,20	11447,73
5	39,60	594,0	15,0	6,36	50,19	752,86	13380,58
6	39,90	598,5	15,0	7,19	56,75	851,31	13271,11
7	39,90	598,5	15,0	7,19	56,75	851,31	13271,11
8	39,90	598,5	15,0	7,19	56,75	851,31	13271,11

Figura 23 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 3 rodada n^o 1.

Figura 24 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 3 rodada n^o 1.

Figura 25 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 3 rodada nº 1.

4.8. Experimento n^o 3, rodada n^o 2.

4.8.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 234,35 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1371,61 g

Inóculo inicial (X_0) = 439,6 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1270,01 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	28,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,24	31,0	8,60
2	2,00	9,00	3,56	31,0	8,40
3	2,00	11,00	3,73	31,0	8,20
4	2,00	13,00	3,91	32,0	8,00
5	2,00	15,00	3,91	31,0	8,00
6	0,00	15,00	3,97	31,0	6,20
7	0,00	15,00	3,94	30,5	5,40
8	0,00	15,00	3,96	30,0	5,00
9	0,00	15,00	4,10	30,0	4,60
10	0,00	15,00	4,10	30,0	4,60

4.8.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 3 rodada n^o 2 são apresentados na tabela n^o 16 e Figuras 26, 27 e 28.

Tabela - 16: Resultados do experimento n^o 3 e rodada n^o 2.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	11,24	2,25	11,24	0,00	1270,01
1	7,00	479,95	21,47	123,14	356,81	1265,03
2	9,00	948,65	29,29	226,24	722,41	1275,00
3	11,0	1417,36	30,91	300,02	1117,35	1295,13
4	13,0	1886,07	42,18	491,49	1394,57	1346,83
5	15,0	2354,77	44,97	612,54	1742,24	1378,08
6	15,0	2354,77	24,24	329,47	2025,31	1409,45
7	15,0	2354,77	13,45	182,68	2172,09	1421,38
8	15,0	2354,77	8,22	111,49	2243,28	1432,22
9	15,0	2354,77	7,57	102,76	2252,02	1432,22
10	15,0	2354,77	7,57	102,76	2252,02	1432,22

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
0	87,92	439,6	n.d.	2,47	19,50	97,49	3729,99
1	62,55	437,9	24,5	4,37	34,46	241,22	5734,97
2	49,04	441,4	19,5	5,48	43,24	389,17	7725,00
3	40,75	448,3	16,5	5,65	44,64	491,02	9704,87
4	35,86	466,2	14,5	6,39	50,43	655,53	11653,17
5	31,80	477,0	14,0	6,44	50,82	762,37	13621,92
6	32,52	487,8	n.d.	7,20	56,81	852,18	13590,55
7	32,80	492,0	n.d.	7,70	60,80	912,05	13578,62
8	33,05	495,8	13,0	7,80	61,60	924,03	13567,78
9	33,05	495 8	13,0	7,85	62,00	930,02	13567,78
10	33,05	495 8	n.d.	7,85	62,00	930,02	13567,78

Figura 26 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionada para o experimento n^o 3 rodada n^o 2.

Figura 27 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 3 rodada n^o 2.

Figura 28 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n° 3 rodado n° 2.

4.9. Experimento n^o 3, rodada n^o 3.

4.9.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 212,42 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1006,63 g

Inóculo inicial (X_0) = 322,7 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 932,07 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	29,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,00	31,5	8,00
2	2,00	9,00	3,44	31,0	7,60
3	2,00	11,00	3,67	30,5	7,40
4	2,00	13,00	3,82	30,0	8,50
5	2,00	15,00	3,90	31,0	8,00
6	0,00	15,00	3,85	32,0	6,20
7	0,00	15,00	4,00	32,0	4,80
8	0,00	15,00	3,86	32,0	4,20
9	0,00	15,00	3,86	31,0	4,20

4.9.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 3 rodada n^o 3 são apresentados na tabela n^o 17 e Figuras 29, 30 e 31.

Tabela - 17: Resultados do experimento n^o 3 e rodada n^o 3.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	9,61	1,92	9,61	0,00	932,07
1	7,00	434,44	4,06	24,30	410,14	1007,70
2	9,00	859,27	3,18	25,46	833,81	996,97
3	11,0	1284,10	39,16	391,31	892,79	1008,73
4	13,0	1708,93	62,42	750,93	958,00	970,55
5	15,0	2133,76	36,53	511,75	1622,01	990,51
6	15,0	2133,76	37,58	523,92	1609,85	1057,23
7	15,0	2133,76	16,16	224,93	1908,83	1083,20
8	15,0	2133,76	1,82	25,29	2108,47	1098,87
9	15,0	2133,76	7,08	98,43	2035,33	1098,87

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	
0	64,53	322,6	n.d.	2,54	20,05	100,25	4067,93
1	49,83	348,8	19,5	3,79	29,92	209,43	5992,30
2	38,34	345,0	16,0	4,54	35,82	322,35	8003,03
3	31,74	340,1	12,5	5,24	41,35	454,81	9991,27
4	25,84	335,9	11,5	5,61	44,29	575,83	12029,45
5	22,86	342,9	11,0	6,22	49,09	736,30	14009,49
6	24,40	366,0	11,5	7,20	56,83	852,41	13942,77
7	25,00	375,0	11,5	8,27	65,31	979,59	13916,80
8	25,36	380,4	11,5	8,55	67,52	1012,76	13901,13
9	25,36	380,4	n.d.	8,58	67,70	1015,52	13901,13

Figura 29 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 3 rodada n^o 3.

Figura 30 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 3 rodada n^o 3.

Figura 31 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 3 rodada nº 3.

Os experimentos denominados 1, 2 e 3, cada qual com 3 rodadas consecutivas, foram considerados repetições de experimentos e serão aqui abordados de uma maneira conjunta.

Nota-se nesse conjunto de ensaios realizados com cerca de 450 g de matéria seca como inóculo, 200 g de ART no mosto e temperatura ao redor de 30°C e alimentação em "feed batch" constante (500 ml/15 min.), que para essa condição, praticamente não ocorre acúmulo de ART na dorna e que quase todo o açúcar adicionado é consumido rapidamente, de tal modo, que os resultados não permitiram observações sobre a influência da concentração e da quantidade de açúcares sobre o crescimento e a fermentação pelas leveduras.

Em relação ao crescimento celular, duas metodologias foram aplicadas e o que se pode notar é a possível influência do meio sobre as metodologias.

Observando-se cada experimento verifica-se que entre a 1.ª, 2.ª e 3.ª rodadas, ocorreram diferenças sucessivamente maiores nos valores plotados graficamente com curvas. Apesar do mosto de melaço ter sido clarificado com fosfato, como descrito em materiais e métodos, previamente aos experimentos de fermentação, com o correr das rodadas a massa celular foi tomando uma coloração diferente do inóculo inicial bem como recebendo o acúmulo de impurezas, não eliminadas junto com o sobrenadante ao

final de cada fermentação.

Ainda assim, a análise ou determinação da concentração de matéria seca resultou em valores superiores, da ordem de 15 a 25%, quando efetuados por centrifugação do que por turbidimétrica. A possível explicação dessa discrepância, além do erro do método seja o acúmulo de impurezas no pé-de-cuba e sucessiva reciclagem mais as impurezas contidas no mosto a cada rodada, além da influência da diluição interferindo em cada amostragem durante o enchimento da dorna, como pode ser visto na tabela 17. A isso acrescenta-se as lavagens sucessivas com água destilada antes da turbidimetria, o que não ocorria com a técnica de centrifugação.

Como não foi feita a determinação da viabilidade celular nem observações acerca da morfologia celular, é bem possível que estes fatores ainda tenham exercido influência, como já citara (MALLETTE, 1969).

Embora existam outras técnicas como a secagem em estufa até peso constante (BUENO NETO, 1982) ou em forno microondas até peso constante (SAKAI et alii, 1990), ou determinações de componentes celulares como proteína, fosfato, DNA, ATP entre outros (MALLETTE, 1969) todas elas são passíveis de influências e erros que aumentam com o decorrer de rodadas consecutivas onde se acumulam fatores diversos dos que surgem ou influem em uma única rodada.

Outro fato que corrobora com tal colocação é o acréscimo da massa de etanol, mostrada às figuras 1 a 31 que demonstram crescimento da massa de etanol, possivelmente junto ao crescimento da massa celular, uma vez que o fenômeno é bem conhecido e descrito por AIBA et alii (1968), como cultura de crescimento associado. Assim, a curva representada pela centrifugação, embora superestimada pela deposição de impurezas, reflete melhor o fenômeno que a curva obtida pela metodologia da turbidimetria, pois esta mostra um fenômeno de crescimento desvinculado ao fenômeno de produção de etanol e que também é incompatível com o raciocínio de energia de manutenção (BAILEY & OLLIS, 1986).

É verdade que embora esses ensaios sejam considerados como repetições de experimentos, em realidade, as diferenças de pH do inóculo, condições peculiares de cada ensaio, devam ter influido de maneira diversa em vários fatores de modo que as repetições indicam mais similaridade de procedimento do que de fenômeno biológico em si.

Em seguida são apresentados os resultados obtidos nos experimentos número 4 e número 5, cada qual com 3 rodadas consecutivas e considerados como repetições de experimentos e que diferiram da série anterior, basicamente em relação a temperatura de condução da fermentação, que foi ao redor de 25°C. Os demais

parâmetros de condução, foram semelhantes aos experimentos da série anterior ou seja, mosto com concentração em torno de 200,00 g/l, volume de mosto de 10,0 litros alimentados em batelada alimentada em alíquotas de 500 ml a cada 15 minutos, perfazendo 5,00 horas de enchimento, com inóculo inicial próximo a 500 g de matéria seca, tratadas previamente com ácido sulfúrico a pH em torno de 2,0.

Não se determinou a viabilidade celular apesar do rigor do pH de tratamento e da sequência de rodadas consideradas.

4.10. Experimento n^o 4, rodada n^o 1.

4.10.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 201,13 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1500,0 g

Inóculo inicial (X_0) = 493,20 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1388,89 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	21,2	n.d.
1	2,00	7,00	3,20	23,0	12,40
2	2,00	9,00	3,70	25,0	11,80
3	2,00	11,00	3,86	25,0	11,60
4	2,00	13,00	3,93	24,0	11,40
5	2,00	15,00	3,99	24,0	10,20
6	0,00	15,00	3,98	24,0	9,60
7	0,00	15,00	3,85	24,0	8,20
8	0,00	15,00	3,83	24,0	6,80
9	0,00	15,00	3,92	24,0	6,00
10	0,00	15,00	3,90	23,0	6,00
11	0,00	15,00	3,90	23,0	5,80

4.10.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 4 rodada n^o 1 são apresentados na tabela n^o 18 e Figuras 32, 33 e 34.

Tabela - 18: Resultados do experimento n^o 4 e rodada n^o 1.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1388,89
1	7,00	402,25	42,52	232,13	170,12	1540,05
2	9,00	804,51	46,67	346,60	457,91	1573,47
3	11,0	1206,76	50,71	476,90	729,86	1595,18
4	13,0	1609,02	48,20	547,14	1061,88	1649,07
5	15,0	2011,27	52,80	703,33	1307,94	1678,75
6	15,0	2011,27	36,62	485,58	1525,69	1741,49
7	15,0	2011,27	21,84	289,59	1721,68	1741,49
8	15,0	2011,27	10,16	134,09	1877,18	1805,22
9	15,0	2011,27	4,44	58,62	1952,65	1805,22
10	15,0	2011,27	2,89	38,18	1973,09	1811,65
11	15,0	2011,27	3,24	42,68	1968,60	1811,65

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
0	98,64	493,2	n.d.	0,00	0,00	0,00	3611,11
1	78,13	546,9	n.d.	1,36	10,71	74,95	5459,95
2	62,08	558,7	19,0	3,14	24,81	223,29	7426,53
3	51,50	566,5	16,0	3,69	29,12	320,31	9404,82
4	45,05	585,7	14,0	4,73	37,35	485,49	11350,93
5	39,74	596,1	12,0	5,48	43,22	648,32	13321,25
6	41,23	618,5	12,5	6,42	50,66	759,97	13258,51
7	41,23	618,5	12,5	7,14	56,34	845,17	13258,51
8	42,74	641,1	12,5	7,81	61,63	924,50	13194,78
9	42,74	641,1	12,5	8,25	65,16	977,38	13194,78
10	42,89	643,4	12,5	8,45	66,73	1000,88	13188,35
11	42,89	643,4	12,5	8,45	66,73	1000,88	13188,35

Figura 32 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionada para o experimento n^o 4 rodada n^o 1.

Figura 33 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 4 rodada n^o 1.

Figura 34 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 4 rodada nº 1.

4.11. Experimento n^o 4, rodada n^o 2.

4.11.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 259,14 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1667,41 g

Inóculo inicial (X_0) = 548,2 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1543,69 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	20,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,12	23,0	12,80
2	2,00	9,00	4,00	23,0	12,80
3	2,00	11,00	4,15	24,0	12,80
4	2,00	13,00	4,20	24,5	12,60
5	2,00	15,00	4,29	24,0	12,20
6	0,00	15,00	4,26	24,0	10,60
7	0,00	15,00	4,25	24,0	8,40
8	0,00	15,00	4,20	24,0	7,40
9	0,00	15,00	4,20	25,5	6,20
10	0,00	15,00	4,11	24,0	5,80
11	0,00	15,00	4,11	24,0	5,80

4.11.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 4 rodada n^o 2 são apresentados na tabela n^o 19 e Figuras 35, 36 e 37.

Tabela - 19: Resultados do experimento n^o 4 e rodada n^o 2.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	1,98	0,40	1,98	0,00	1543,69
1	7,00	520,25	43,68	233,40	286,86	1657,11
2	9,00	1038,53	48,67	357,92	680,61	1645,54
3	11,0	1556,80	55,61	514,09	1042,70	1754,56
4	13,0	2075,07	57,30	648,75	1426,32	1677,72
5	15,0	2593,34	54,77	726,52	1866,83	1735,17
6	15,0	2593,34	38,27	505,19	2088,16	1798,80
7	15,0	2593,34	23,54	309,08	2284,26	1869,99
8	15,0	2593,34	13,78	179,97	2413,37	1935,84
9	15,0	2593,34	6,14	80,28	2513,07	1929,20
10	15,0	2593,34	4,39	57,42	2535,93	1929,20
11	15,0	2593,34	4,39	57,42	2535,93	1929,20

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	
0	109,63	548,2	n.d.	3,10	24,47	122,36	3456,31
1	84,06	588,4	n.d.	3,83	30,23	211,63	5342,89
2	64,93	584,4	n.d.	3,90	30,82	277,42	7354,46
3	56,64	623,0	n.d.	5,45	43,05	473,54	9245,44
4	45,83	595,8	n.d.	5,88	46,40	603,21	11322,28
5	41,08	616,2	n.d.	6,28	49,56	743,33	13264,83
6	42,58	638,7	n.d.	7,35	58,03	870,50	13201,20
7	44,27	664,1	n.d.	8,28	65,33	979,93	13130,01
8	45,83	687,5	n.d.	8,90	70,26	1053,87	13064,16
9	45,67	685,1	n.d.	9,45	74,60	1118,94	13070,80
10	45,67	685,1	n.d.	9,42	74,40	1115,98	13070,80
11	45,67	685,1	n.d.	9,42	74,40	1115,98	13070,80

Figura 35 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 4 rodada n^o 2.

Figura 36 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 4 rodada n^o 2.

Figura 37 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n° 4 rodada n° 2.

4.12. Experimento n^o 4, rodada n^o 3.

4.12.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 237,16 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1681,35 g

Inóculo inicial (X_0) = 552,9 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1556,81 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	23,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,47	25,0	12,40
2	2,00	9,00	3,77	23,0	11,80
3	2,00	11,00	3,99	24,0	11,20
4	2,00	13,00	4,10	24,0	10,80
5	2,00	15,00	4,16	24,0	10,80
6	0,00	15,00	4,17	24,0	9,20
7	0,00	15,00	4,18	24,0	7,20
8	0,00	15,00	4,15	24,0	6,30
9	0,00	15,00	4,16	23,5	6,00
10	0,00	15,00	4,22	24,0	5,90

4.12.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 4 rodada n^o 3 são apresentados na tabela n^o 20 e Figuras 38, 39 e 40.

Tabela - 20: Resultados do experimento n^o 4 e rodada n^o 3.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	1,06	0,21	1,06	0,00	1556,81
1	7,00	475,39	35,68	188,43	286,96	1718,53
2	9,00	949,72	58,85	429,91	519,81	1694,82
3	11,0	1424,05	42,95	398,28	1025,78	1727,39
4	13,0	1898,38	40,93	458,69	1439,70	1794,76
5	15,0	2372,71	45,02	591,64	1781,07	1856,95
6	15,0	2372,71	27,59	362,61	2010,10	1856,95
7	15,0	2372,71	13,58	177,85	2194,86	1902,78
8	15,0	2372,71	6,32	82,38	2290,34	1969,17
9	15,0	2372,71	3,76	49,12	2323,59	1935,84
10	15,0	2372,71	3,85	50,36	2322,35	1935,84

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)		(%)	(%V)	(g/l)	
0	110,57	552,9	n.d.	2,20	17,37	86,83	3443,19
1	87,18	610,3	25,0	3,79	29,90	209,28	5281,47
2	66,87	601,8	19,0	5,02	39,60	356,39	7305,18
3	55,76	613,4	17,0	6,07	47,91	527,06	9272,61
4	49,03	637,4	15,0	7,15	56,43	733,56	11205,24
5	43,96	659,4	14,0	7,30	57,62	864,24	13143,05
6	43,96	659,4	13,0	8,18	64,55	968,18	13143,05
7	45,05	675,8	13,0	8,75	69,10	1036,49	13097,22
8	46,62	699,3	13,0	9,26	73,06	1095,89	13030,83
9	45,83	687,5	13,0	9,48	74,84	1122,62	13064,16
10	45,83	687,5	13,0	9,51	75,04	1125,59	13064,16
11	45,83	687,5	13,0	9,51	75,04	1125,59	13064,16

Figura 38 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 4 rodada n^o 3.

Figura 39 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 4 rodada n^o 3.

Figura 40 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 4 rodado nº 3.

4.13. Experimento n^o 5, rodada n^o 1.

4.13.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 221,15 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1486,8 g

Inóculo inicial (X_0) = 488,85 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1376,64 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	23,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,45	25,5	10,00
2	2,00	9,00	3,82	24,0	10,60
3	2,00	11,00	4,01	22,5	11,00
4	2,00	13,00	4,01	24,0	10,40
5	2,00	15,00	4,04	23,5	10,80
6	0,00	15,00	4,02	25,0	10,00
7	0,00	15,00	3,98	24,0	7,60
8	0,00	15,00	3,96	23,0	6,60
9	0,00	15,00	3,95	24,0	5,80
10	0,00	15,00	4,00	24,0	5,80
11	0,00	15,00	4,00	24,0	5,80

4.13.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 5 rodada n^o 1 são apresentados na tabela n^o 21 e Figuras 41, 42 e 43.

Tabela - 21: Resultados do experimento n^o 5 e rodada n^o 1.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1376,64
1	7,00	442,31	22,99	125,42	316,89	1543,74
2	9,00	884,62	34,63	256,68	627,94	1587,63
3	11,0	1326,93	44,23	413,96	912,97	1640,93
4	13,0	1769,24	49,62	560,51	1208,73	1703,82
5	15,0	2211,55	47,63	633,24	1578,31	1706,25
6	15,0	2211,55	65,91	871,77	1339,78	1774,20
7	15,0	2211,55	36,79	484,52	1727,02	1830,72
8	15,0	2211,55	14,79	194,72	2016,83	1837,05
9	15,0	2211,55	3,79	49,72	2161,82	1881,67
10	15,0	2211,55	3,49	45,91	2165,64	1830,72
11	15,0	2211,55	3,49	45,91	2165,64	1830,72

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
0	97,77	488,9	n.d.	0,00	0,00	0,00	3623,36
1	78,31	548,2	25,0	2,56	20,22	141,54	5456,26
2	62,64	563,8	19,0	3,84	30,33	272,98	7412,37
3	52,97	582,7	17,0	4,70	37,07	407,78	9359,07
4	46,54	605,0	15,0	4,95	39,05	507,69	11296,18
5	40,39	605,9	13,0	5,73	45,20	677,98	13293,75
6	42,00	630,0	13,0	6,78	53,52	802,87	13225,80
7	43,34	650,1	13,0	7,36	58,08	871,27	13169,28
8	43,49	652,4	13,0	8,06	63,64	954,53	13162,95
9	44,55	668,3	n.d.	8,24	65,02	975,34	13118,33
10	43,34	650,1	n.d.	8,44	66,61	999,13	13169,28
11	43,34	650,1	n.d.	8,44	66,61	999,13	13169,28

Figura 41 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 5 rodada n^o 1.

Figura 42 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 5 rodada n^o 1.

Figura 43 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n^o 5 rodada n^o 1.

4.14. Experimento n^o 5, rodada n^o 2.

4.14.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 223,34 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1486,77 g

Inóculo inicial (X_0) = 488,9 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1376,64 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	25,5	n.d.
1	2,00	7,00	3,17	25,5	11,80
2	2,00	9,00	3,70	25,0	11,60
3	2,00	11,00	3,90	24,0	10,80
4	2,00	13,00	3,99	23,5	10,80
5	2,00	15,00	4,03	25,0	10,60
6	0,00	15,00	4,05	23,0	9,10
7	0,00	15,00	4,01	22,5	7,60
8	0,00	15,00	3,99	24,0	6,20
9	0,00	15,00	4,06	24,0	5,90
10	0,00	15,00	4,10	24,0	5,90
11	0,00	15,00	4,10	24,0	5,90

4.14.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 5 rodada n^o 2 são apresentados na tabela n^o 22 e Figuras 44, 45 e 46.

Tabela - 22: Resultados do experimento n^o 5 e rodada n^o 2.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	1,56	0,31	1,56	0,00	1376,64
1	7,00	448,23	31,32	165,51	282,72	1715,02
2	9,00	894,91	32,70	244,38	650,53	1527,29
3	11,0	1341,58	39,16	363,42	978,16	1719,47
4	13,0	1788,25	44,81	501,04	1287,21	1819,45
5	15,0	2234,93	40,54	531,28	1703,65	1894,51
6	15,0	2234,93	54,06	708,42	1526,50	1894,51
7	15,0	2234,93	25,05	326,88	1908,04	1952,85
8	15,0	2234,93	11,02	143,73	2091,20	1959,39
9	15,0	2234,93	3,91	51,05	2183,88	1959,39
10	15,0	2234,93	3,47	45,26	2189,66	1959,39
11	15,0	2234,93	3,47	45,26	2189,66	1959,39

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)		(%)	(%V)	(g/l)	
0	97,77	488,9	n.d.	2,20	17,37	86,83	3623,36
1	87,00	609,0	28,0	3,59	28,37	198,56	5284,98
2	60,26	542,3	21,0	5,15	40,69	366,23	7472,71
3	55,51	610,6	17,0	6,04	47,65	524,16	9280,53
4	49,70	646,1	15,0	6,31	49,84	647,89	11180,55
5	44,85	672,8	14,0	6,87	54,21	813,18	13105,49
6	44,85	672,8	14,0	7,82	61,77	926,51	13105,49
7	46,23	693,5	14,0	8,58	67,73	1015,98	13047,15
8	46,39	695,9	14,0	8,93	70,52	1057,73	13040,61
9	46,39	695,9	14,0	9,18	72,50	1087,55	13040,61
10	46,39	695,9	n.d.	9,34	73,70	1105,45	13040,61
11	46,39	695,9	n.d.	9,34	73,70	1105,45	13040,61

Figura 44 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 5 rodada n^o 2.

Figura 45 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 5 rodada n^o 2.

Figura 46 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 5 rodada nº 2.

4.15. Experimento n^o 5, rodada n^o 3.

4.15.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 218,26 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 1486,77 g

Inóculo inicial (X_0) = 488,9 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 1376,64 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	25,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,20	25,0	13,40
2	2,00	9,00	3,96	25,0	13,00
3	2,00	11,00	4,32	24,0	12,30
4	2,00	13,00	3,91	24,0	11,60
5	2,00	15,00	4,07	24,0	11,20
6	0,00	15,00	4,20	23,0	10,20
7	0,00	15,00	4,26	24,0	8,00
8	0,00	15,00	4,25	23,5	7,10
9	0,00	15,00	4,36	25,0	6,00
10	0,00	15,00	4,50	25,0	6,00
11	0,00	15,00	4,50	25,0	6,00

4.15.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 5 rodada n^o 3 são apresentados na tabela n^o 23 e Figuras 47, 48 e 49.

Tabela - 23: Resultados do experimento n^o 5 e rodada n^o 3.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	1,91	0,38	1,91	0,00	1376,64
1	7,00	438,44	39,98	207,58	230,86	1808,56
2	9,00	874,96	47,94	343,43	531,53	1835,83
3	11,0	1311,49	47,03	435,23	876,25	1746,16
4	13,0	1748,01	42,37	473,66	1274,35	1819,45
5	15,0	2184,54	40,68	530,46	1654,07	1959,39
6	15,0	2184,54	59,25	776,10	1408,43	1900,95
7	15,0	2184,54	27,39	356,85	1827,69	1972,50
8	15,0	2184,54	14,60	189,40	1995,14	2025,40
9	15,0	2184,54	4,44	57,64	2126,89	2025,40
10	15,0	2184,54	4,44	57,61	2126,92	2032,07
11	15,0	2184,54	4,44	57,61	2126,92	2032,07

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			ETANOL			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
0	97,77	488,9	n.d.	2,40	18,95	94,73	3623,36
1	91,75	642,3	n.d.	3,31	26,13	182,93	5191,44
2	72,43	651,9	21,0	5,05	39,90	359,08	7164,17
3	56,37	620,1	16,0	5,86	46,28	509,10	9253,84
4	49,70	646,1	16,0	6,62	52,27	679,46	11180,55
5	46,39	645,9	16,0	7,25	57,25	858,81	13040,61
6	45,00	675,0	16,0	7,96	62,84	942,59	13099,05
7	46,70	700,5	16,0	8,59	67,83	1017,40	13027,50
8	47,95	719,3	16,0	9,17	72,41	1086,22	12974,60
9	47,95	719,3	16,0	9,58	75,61	1134,10	12974,60
10	48,11	721,7	16,0	9,58	75,61	1134,10	12967,93
11	48,11	721,7	n.d.	9,58	75,61	1134,10	12967,93

Figura 47 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 5 rodada n^o 3.

Figura 48 - Valores de massa celular expressos em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 5 rodada n^o 3.

Figura 49 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n° 5 rodada n° 3.

Os experimentos conduzidos a cerca de 25°C, diferem dos resultados obtidos a cerca de 30°C, de acordo com os modelos descritos na literatura por NAMBA et alii (1987); ROSINI, (1986).

Com a possível diminuição nos valores de μ_m , um crescimento celular em velocidades significativamente menores que em 30°C, levaria consequentemente à redução também dos valores de açúcar consumido e em decorrência, como pode ser visto às figuras 32 a 49 referentes a situação de ART na dorna, há um acúmulo do mesmo na dorna durante o enchimento e cuja curva de massa de ART consumido é uma reta, pelo menos durante o tempo de enchimento, aliás, coincidente com o gráfico de etanol, em concordância com o descrito por NAMBA et alii, (1987).

As retas obtidas nas curvas de massa de ART consumido na dorna apresentam altas correlações, com valores de r de 0,97 a 1,00 e diferem daquelas obtidas nos experimentos a 30°C, pois naquelas a concentração de fermento e a atividade maior ou seja a maior produtividade faziam com que praticamente não houvesse acúmulo de açúcar no meio em concentrações significativas. Já nos experimentos a 25°C, houve acúmulo de açúcares no meio, dada a menor produtividade (g/g*h) e o gráfico da massa de açúcares consumida apresentou-se como uma reta que poderia ser expressa por uma equação do tipo $M_{ART} = K * d(t)$. A linearidade da massa de etanol no meio de fermentação durante a fase de

enchimento da dorna fora já explicada por BORZANI (1987), e de forma semelhante talvez se possa explicar também a linearidade da massa de açúcar consumida, sob condições experimentais de alta concentração de fermento e alimentação em vazão constante. Segundo BORZANI (1987), para uma dada faixa de valores de massa de células de leveduras, a taxa de produção de etanol é proporcional ao número de moléculas de açúcar presentes no meio em fermentação e que a despeito da variação que possa ocorrer nesta concentração, durante a fase de enchimento, a taxa de produção de etanol permanece constante. É lícito, então esperar-se que a taxa de açúcar consumido durante essa fase também seja constante, mesmo que ocorram variações na concentração de açúcar do meio.

Valores de r de uma série de experimentos utilizados neste trabalho mostram que as massas de açúcar consumida e de etanol ao menos durante a fase de enchimento comportam-se como uma reta. Há que considerar ainda que gráficos de valores e fenômenos de dimensões muito distintas, estudadas conjuntamente, trazem problemas da própria escala em que se expressa graficamente os acúmulos de massa de células, de produto e de consumo de açúcares acabam transformando em retas uma série de fenômenos biológicos, como o crescimento durante a fermentação cuja grandeza é muito distinta de outros parâmetros. Figuras e valores, como está sendo discutido, podem ser verificados em OLIVA NETO (1990), em seu estudo de fermentação

alcoólica em batelada alimentada com alimentação em vazão constante e 18 rodadas consecutivas. Embora o autor citado estivesse estudando a influência de contaminações bacterianas no desenvolvimento de fermentações consecutivas, o perfil cinético das fermentações tiveram comportamento similar aos obtidos no presente estudo. Aliás, o comportamento da fermentação por leveduras alcoólicas em diferentes temperaturas foram já objeto de estudo de muitos autores como se verifica pela própria revisão bibliográfica.

EXPERIMENTO NÚMERO	RODADA NÚMERO	r P/AÇ. CONSUMIDO	r P/ETANOL
1	1	0,9996	0,9904
1	2	0,9966	0,9944
1	3	0,9989	0,9569
2	1	1,0000	0,9980
2	2	0,9878	0,9935
2	3	0,9705	0,9987
3	1	0,9940	0,9969
3	2	0,9611	0,9970
3	3	0,9212	0,9959
4	1	0,9892	0,9796
4	2	0,9947	0,9800
4	3	0,9837	0,9942
5	1	0,9987	0,9969
5	2	0,9968	0,9975
5	3	0,9859	0,9926
6	1	0,9926	0,9950
6	2	0,9846	0,9980
6	3	0,9978	0,9970
7	1	0,9953	0,9923
7	2	0,9958	0,9964
7	3	0,9989	0,9982

Um fato interessante que foi observado nos experimentos a 25°C, no tocante ao crescimento celular durante as três rodadas consecutivas é que a discrepância dos resultados obtidos pelas técnicas da turbidimetria e pelo volume de centrifugado foi menor que nos experimentos realizados a 30°C. É possível que tenha ocorrido maior viabilidade celular nas fermentações conduzidas a 25°C e este fato tenha influenciado para que por ambas as técnicas, os dados se aproximassem. Entretanto, a tendência geral se manteve, isto é, com o passar das rodadas consecutivas, tende a aumentar a discrepância dos resultados. Como consequência, qualquer estudo cinético ficará com valores sub ou superestimados de velocidades em função do erro introduzido na avaliação da massa celular, principalmente quando tais dados forem provenientes da enésima rodada consecutiva. Há que se estudar técnicas mais adequadas para avaliações de massa celular em fermentações com ciclos consecutivos.

4.16. Experimento n^o 6, rodada n^o 1.

4.16.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 208,99 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 750,0 g

Inóculo inicial (X_0) = 234,08 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 694,45 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	25,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,78	30,5	7,20
2	2,00	9,00	3,83	32,0	7,10
3	2,00	11,00	4,03	34,5	6,70
4	2,00	13,00	4,02	32,0	6,40
5	2,00	15,00	4,01	31,0	6,80
6	0,00	15,00	4,03	31,0	5,20
7	0,00	15,00	4,14	31,0	4,00
8	0,00	15,00	4,13	31,0	3,60
9	0,00	15,00	4,13	31,0	3,60

4.16.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 6 rodada n^o 1 são apresentados na tabela n^o 24 e Figuras 50, 51 e 52.

Tabela - 24: Resultados do experimento n^o 6 e rodada n^o 1.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	694,45
1	7,00	417,98	29,41	185,02	232,96	709,94
2	9,00	835,95	29,06	239,86	596,10	747,56
3	11,0	1253,93	27,86	283,38	970,55	829,65
4	13,0	1671,91	25,55	309,84	1362,07	874,99
5	15,0	2089,88	31,28	443,18	1646,71	830,26
6	15,0	2089,88	12,62	176,32	1913,56	1024,53
7	15,0	2089,88	4,84	68,00	2021,88	957,59
8	15,0	2089,88	4,61	64,51	2025,37	1007,58
9	15,0	2089,88	4,61	64,51	2025,37	1007,58

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			Etanol			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
	0	46,82	234,1	n.d.	0,00	0,00	0,00
1	34,19	239,3	14,0	1,99	15,72	110,07	6290,06
2	28,00	252,0	11,0	3,31	26,14	235,30	8252,44
3	25,42	279,6	10,0	4,44	35,05	385,54	10170,35
4	22,69	295,0	09,0	5,21	41,11	534,46	12125,01
5	18,66	279,9	07,5	5,69	44,90	673,52	14169,74
6	23,02	345,3	09,0	6,58	51,91	778,66	13975,47
7	21,52	322,8	09,0	7,03	55,51	832,66	14042,41
8	22,64	339,6	09,0	7,13	56,27	844,03	13992,42
9	22,64	339,6	n.d.	7,13	56,27	844,03	13992,42

Figura 50 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 6 rodada n^o 1.

Figura 51 - Valores de massa celular expresso em materia seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 6 rodada n^o 1.

Figura 52 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 6 rodada nº 1.

4.17. Experimento n^o 6, rodada n^o 2.

4.17.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 184,19 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 920,79 g

Inóculo inicial (X_0) = 287,4 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 852,58 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	21,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,56	31,0	6,20
2	2,00	9,00	3,73	34,0	5,20
3	2,00	11,00	4,05	31,0	6,00
4	2,00	13,00	4,03	30,0	6,30
5	2,00	15,00	3,98	30,0	6,40
6	0,00	15,00	3,98	31,5	4,60
7	0,00	15,00	4,08	31,5	4,00
8	0,00	15,00	4,03	32,0	3,80
9	0,00	15,00	4,03	32,0	3,80

4.17.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 6 rodada n^o 2 são apresentados na tabela n^o 25 e Figuras 53, 54 e 55.

Tabela - 25: Resultados do experimento n^o 6 e rodada n^o 2.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	1,20	0,24	1,20	0,00	852,58
1	7,00	369,59	9,72	59,06	310,53	924,72
2	9,00	737,97	4,88	39,18	698,79	974,23
3	11,0	1106,35	11,20	111,92	994,43	1008,66
4	13,0	1474,73	17,57	211,74	1262,99	948,02
5	15,0	1843,11	29,14	408,18	1434,93	990,77
6	15,0	1843,11	7,01	97,51	1745,60	1097,40
7	15,0	1843,11	4,41	61,38	1781,73	1093,86
8	15,0	1843,11	3,94	54,84	1788,27	1076,30
9	15,0	1843,11	3,94	54,84	1788,27	1076,30

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			Etanol			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	
0	57,48	287,4	n.d.	0,97	7,66	38,29	4147,42
1	44,53	311,7	15,0	3,22	25,45	178,13	6075,28
2	36,49	328,9	12,5	4,89	38,60	347,42	8025,77
3	30,91	340,0	11,0	5,75	45,38	499,17	9991,34
4	24,58	319,5	09,0	6,00	47,37	615,84	12051,98
5	22,26	333,9	08,5	6,66	52,55	788,32	14009,23
6	24,66	369,9	09,0	7,49	59,13	886,99	13902,60
7	24,58	368,7	09,0	7,67	60,53	907,91	13906,14
8	24,19	362,9	09,0	7,52	59,33	889,98	13923,70
9	24,19	362,9	n.d.	7,52	59,33	889,98	13923,70

Figura 53 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 6 rodada n^o 2.

Figura 54 - Valores de massa celular expresso em materia seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 6 rodada n^o 2.

Figura 55 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 6 rodada nº 2.

4.18. Experimento n^o 6, rodada n^o 3.

4.18.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 225,77 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 946,18 g

Inóculo inicial (X_0) = 295,3 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 876,09 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	25,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,58	29,0	8,00
2	2,00	9,00	3,72	33,5	6,20
3	2,00	11,00	4,04	32,0	7,20
4	2,00	13,00	4,04	32,0	7,00
5	2,00	15,00	4,05	32,0	7,20
6	0,00	15,00	4,17	32,0	5,60
7	0,00	15,00	4,05	31,5	4,60
8	0,00	15,00	4,23	32,0	4,60
9	0,00	15,00	4,23	32,0	4,60

4.18.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 6 rodada n^o 3 são apresentados na tabela n^o 26 e Figuras 56, 57 e 58.

Tabela - 26: Resultados do experimento n^o 6 e rodada n^o 3.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	0,93	0,19	0,93	0,00	876,09
1	7,00	452,48	22,40	135,40	317,08	956,23
2	9,00	904,03	14,51	115,58	788,46	1033,58
3	11,0	1355,58	19,55	194,91	1160,67	1029,74
4	13,0	1807,13	22,07	261,77	1545,36	1138,91
5	15,0	2258,68	26,64	370,89	1887,79	1076,30
6	15,0	2258,68	10,10	140,13	2118,56	1125,89
7	15,0	2258,68	5,59	77,20	2181,49	1184,17
8	15,0	2258,68	4,83	66,63	2192,05	1195,29
9	15,0	2258,68	4,83	66,63	2192,05	1195,29

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			Etanol			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
	0	59,06	295,3	n.d.	1,17	9,24	46,18
1	46,04	322,3	16,0	3,04	24,01	168,06	6043,77
2	38,71	348,4	17,0	5,04	39,80	358,16	7966,42
3	31,55	347,1	11,0	5,94	46,90	515,90	9970,26
4	29,53	383,9	09,5	6,54	51,64	671,26	11861,09
5	24,19	362,9	08,0	6,77	53,41	801,17	13923,70
6	25,30	379,5	08,0	8,14	64,26	963,97	13874,11
7	26,61	399,2	08,0	7,77	61,30	919,57	13815,83
8	26,86	402,9	08,0	7,99	63,08	946,21	13804,71
9	26,86	402,9	08,0	7,99	63,08	946,21	13804,71

Figura 56 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 6 rodada n^o 3.

Figura 57 - Valores de massa celular expresso em matéria seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 6 rodada n^o 3.

Figura 58 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 6 rodada nº 3.

4.19. Experimento n^o 7, rodada n^o 1.

4.19.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_o) = 208,99 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 750,0 g

Inóculo inicial (X_o) = 234,08 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 694,45 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	26,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,78	30,5	6,60
2	2,00	9,00	3,83	32,0	6,20
3	2,00	11,00	3,87	35,0	6,20
4	2,00	13,00	3,84	32,0	6,10
5	2,00	15,00	4,03	31,0	6,40
6	0,00	15,00	4,14	31,0	5,00
7	0,00	15,00	4,22	31,0	4,00
8	0,00	15,00	4,15	31,0	3,60
9	0,00	15,00	4,15	31,0	3,60

4.19.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 7 rodada n^o 1 são apresentados na tabela n^o 27 e Figuras 59, 60 e 61.

Tabela - 27: Resultados do experimento n^o 7 e rodada n^o 1.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	694,45
1	7,00	417,98	25,39	160,01	257,97	698,88
2	9,00	835,95	25,55	210,37	625,58	767,59
3	11,0	1253,93	23,74	242,39	1011,54	790,49
4	13,0	1671,91	23,82	289,34	1382,57	852,48
5	15,0	2089,88	26,87	381,20	1708,68	814,91
6	15,0	2089,88	12,70	177,87	1912,01	990,77
7	15,0	2089,88	5,18	73,03	2016,85	899,25
8	15,0	2089,88	4,49	62,89	2026,99	990,77
9	15,0	2089,88	4,49	62,89	2026,99	990,77

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			Etanol			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
	0	46,82	234,1	n.d.	0,00	0,00	0,00
1	33,65	235,6	13,5	1,90	14,97	104,77	6301,12
2	28,75	258,8	11,0	3,31	26,14	235,30	8232,41
3	24,22	266,4	09,0	4,37	34,48	379,29	10209,51
4	22,10	287,3	09,0	5,21	41,11	534,46	12147,52
5	18,31	274,7	09,5	5,81	45,85	687,73	14185,09
6	22,26	333,9	09,0	6,55	51,72	775,82	14009,23
7	20,21	303,2	09,0	7,13	56,27	844,03	14100,75
8	22,26	333,9	09,0	7,03	55,51	832,66	14009,23
9	22,26	333,9	n,d.	7,03	55,51	832,66	14009,23

Figura 59 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 7 rodada n^o 1.

Figura 60 - Valores de massa celular expresso em materia seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 7 rodada n^o 1.

Figura 61 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n-7 rodada n-1.

4.20. Experimento n^o 7, rodada n^o 2.

4.20.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 187,75 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 926,39 g

Inóculo inicial (X_0) = 289,2 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 857,77 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	21,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,57	31,0	6,20
2	2,00	9,00	3,78	34,0	5,00
3	2,00	11,00	4,06	30,5	6,00
4	2,00	13,00	4,04	30,0	6,40
5	2,00	15,00	3,98	30,0	6,40
6	0,00	15,00	3,97	31,5	4,80
7	0,00	15,00	4,08	32,0	4,00
8	0,00	15,00	4,04	32,0	3,80
9	0,00	15,00	4,04	32,0	3,80

4.20.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 7 rodada n^o 2 são apresentados na tabela n^o 28 e Figuras 62, 63 e 64.

Tabela - 28: Resultados do experimento n^o 7 e rodada n^o 2.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	1,70	0,34	1,70	0,00	857,77
1	7,00	377,21	14,12	85,59	291,62	937,26
2	9,00	752,71	6,62	53,03	699,68	988,93
3	11,0	1128,22	16,68	166,11	962,11	1042,46
4	13,0	1503,72	22,37	269,50	1234,23	954,14
5	15,0	1879,23	23,62	330,80	1548,43	994,12
6	15,0	1879,23	9,91	137,13	1742,10	1165,77
7	15,0	1879,23	5,18	71,75	1807,48	1147,54
8	15,0	1879,23	4,72	65,52	1813,71	1111,59
9	15,0	1879,23	4,72	65,52	1813,71	1111,59

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			Etanol			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	
0	57,83	289,2	n.d.	0,97	7,66	38,29	4142,23
1	45,13	315,9	15,0	3,10	24,45	171,15	6062,74
2	37,04	333,4	12,5	4,99	39,40	354,60	8011,07
3	31,94	351,3	11,0	5,55	43,78	481,63	9957,54
4	24,74	321,6	09,0	5,82	45,98	597,70	12045,86
5	22,34	335,1	08,5	6,41	50,56	758,42	14005,88
6	26,20	393,0	09,0	7,34	57,94	869,05	13834,23
7	25,79	386,9	09,0	7,36	58,14	872,04	13852,46
8	24,98	374,7	09,0	7,36	58,14	872,04	13888,41
9	24,98	374,7	n.d.	7,36	58,14	872,04	13888,41

Figura 62 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 7 rodada n^o 2.

Figura 63 - Valores de massa celular expresso em materia seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n^o 7 rodada n^o 2.

Figura 64 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento n° 7 rodada n° 2.

4.21. Experimento n^o 7, rodada n^o 3.

4.21.1. Condições experimentais.

Concentração do mosto (S_0) = 225,77 g/l

Volume total de mosto adicionado = 10,0 litros

Inóculo inicial em fermento,

massa úmida = 940,50 g

Inóculo inicial (X_0) = 293,6 g (matéria seca)

Inóculo inicial (Volume ocupado

pelas células) = 870,83 ml

Inóculo inicial (volume total) = 5,0 litros

Tipo de alimentação = batelada alimentada

Alimentação em: Volume constante (500 ml/15 min)

Tempo total de alimentação = 5,0 horas

Agitação = 200 rpm

Horas	VOLUME		pH	Temperatura (°C)	BRIX
	ADICIONADO	TOTAL			
0	0,00	5,00	2,00	25,0	n.d.
1	2,00	7,00	3,60	29,0	8,00
2	2,00	9,00	3,68	34,0	6,10
3	2,00	11,00	4,06	32,0	7,00
4	2,00	13,00	4,01	32,0	6,80
5	2,00	15,00	4,02	32,0	7,20
6	0,00	15,00	4,17	32,0	5,60
7	0,00	15,00	4,02	31,5	4,60
8	0,00	15,00	4,21	32,0	4,60
9	0,00	15,00	4,21	32,0	4,60

4.21.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos no experimento n^o 7 rodada n^o 3 são apresentados na tabela n^o 29 e Figuras 65, 66 e 67.

Tabela - 29: Resultados do experimento n^o 7 e rodada n^o 3.

HORAS	VOLUME TOTAL	ART ADICIONADO (g)	ART (g/l)	ART NA DORNA (g)	ART CONSUMIDO (g)	VOLUME CELULAR (ml)
0	5,00	1,90	0,38	1,90	0,00	870,83
1	7,00	453,45	20,09	121,11	332,34	972,19
2	9,00	905,00	18,05	143,46	761,54	1052,44
3	11,0	1356,55	21,29	212,13	1144,41	1038,21
4	13,0	1808,10	21,63	256,43	1551,66	1142,34
5	15,0	2259,65	25,01	347,89	1911,75	1090,34
6	15,0	2259,65	12,28	170,23	2089,42	1133,08
7	15,0	2259,65	4,84	67,14	2192,51	1133,08
8	15,0	2259,65	4,43	61,38	2198,27	1140,30
9	15,0	2259,65	4,43	61,38	2198,27	1140,30

continuação

H O R A S	MASSA CELULAR			Etanol			VOLUME DA FASE LIQUIDA
	Turbidi- métrica		Volumé- trica				
	(g/l)	(g)	(%)	(%V)	(g/l)	(g)	(ml)
	0	58,71	293,6	n.d.	1,24	9,79	48,94
1	46,81	327,7	16,0	3,04	24,01	168,06	6027,81
2	39,42	354,8	18,0	4,87	38,41	345,73	7947,56
3	31,81	349,9	11,0	5,89	46,50	511,55	9961,79
4	29,62	385,1	09,5	6,44	50,85	661,00	11857,66
5	24,50	367,5	08,0	6,89	54,40	815,97	13909,66
6	25,46	381,9	08,0	7,79	61,50	922,53	13866,92
7	25,46	381,9	08,0	7,79	61,50	922,53	13866,92
8	25,62	384,3	08,0	7,99	63,08	946,21	13859,70
9	25,62	384,3	n.d.	7,99	63,08	946,21	13859,70

Figura 65 - Valores de massa de etanol e de massa teórica em função do tempo e da massa de açúcar adicionado para o experimento n^o 7 rodada n^o 3.

Figura 66 - Valores de massa celular expresso em materia seca pelas técnicas de centrifugação e turbidimétricas em função do tempo para o experimento n- 7 rodada n- 3.

Figura 67 - Valores de massa de Açúcares Redutores Totais em função do tempo para o experimento nº 7 rodada nº 3.

Na série de experimentos números 6 e 7 e suas respectivas reciclagens, todas as condições experimentais dos experimentos 1 e 2 foram mantidas, variando-se somente a concentração de inóculo.

Foi utilizada, nessa série, apenas a metade da massa celular anteriormente ensaiada, partindo a primeira rodada com 750 g de fermento prensado, o que equivale a inocular com cerca de 5% em volume, ensaio em batelada convencional.

Acompanhando a massa celular durante o experimento em batelada alimentada, em volume constante, observa-se que, o inóculo representa muito mais que os 5%, como vê-se a seguir no exemplo do experimento número 6 rodada número 1, com massa úmida calculada pela equação de KOSHIMIZU (1983).

Tabela 30: Concentrações celulares durante o enchimento

Tempo (h)	Volume (litros)	Xi (g/l)	massa úmida (%)
0	5	46,82	15,5
1	7	34,19	11,3
2	9	28,00	9,3
3	11	25,42	8,4
4	13	22,69	7,5
5	15	18,66	6,2
6	15	23,02	7,6
7	15	21,52	7,1

Assim, a fermentação conduzida com metade da massa dos experimentos anteriores apresentou ainda uma grande concentração de células cujos fenômenos pouco variaram dos experimentos anteriores e uma das razões demonstradas por BORZANI (1987), é que quando a massa de células de leveduras é suficientemente alta, sua variação praticamente não afeta a taxa de produção de etanol. Verificou-se ainda que não afeta também a taxa de consumo de açúcares.

4.22. Resultados da análise estatística

De acordo com a análise estatística efetuada em microcomputador utilizando-se do programa SANEST e o quadro de análise de variância citado em materiais e métodos pode-se chegar nas seguintes comparações:

Os valores médios de pH não foram diferentes estatisticamente, para as temperaturas estudadas.

As fermentações conduzidas em temperaturas inferiores produziram grau alcoólico semelhante, estatisticamente falando, aos das fermentações conduzidas em temperaturas mais elevadas, no entanto quando analisa-se o teor de etanol em g observa-se que as fermentações conduzidas em temperaturas inferiores tiveram uma maior produção média de etanol no tempo, fato este que está em concordância com o que relatou MERRIT (1966), no entanto discorda com o que citaram WHITE & MUNNS (1951), e esta produção foi diferente estatisticamente falando, isto devido ao fato de que a fermentação alcoólica em baixa temperatura demoraram mais e portanto ficaram mais tempo expostas a um valor de etanol maior. É importante salientar que as massas de etanol média foram maiores estatisticamente para os segundo e terceiro ciclos, visto que os pés de cuba (fermentos) já possuíam um teor alcoólico considerável.

Com relação ao volume celular, nota-se que houve uma maior concentração celular, estatisticamente, nas fermentações conduzidas em temperaturas inferiores o que nos leva a concluir que ocorreu maior crescimento celular na temperatura de 25°C, e que em 30°C os segundo e terceiro ciclos tiveram uma menor concentração celular no meio, e que a 25°C o fato foi inverso.

Para os valores de ART em g, observou-se que a análise estatística identificou diferenças nas médias para as fermentações conduzidas a 30°C contra as conduzidas a 25°C, pois estas últimas tinham fermentação mais lenta e portanto o valor médio de ART foi maior. No entanto a análise estatística não encontrou diferenças para os valores de ART consumido indicando que em média o consumo de ART foi semelhante para as duas faixas de temperaturas estudadas e observou-se também que em temperaturas de 30°C o terceiro ciclo foi o que teve o maior valor médio de ART consumido, já para temperaturas de 25°C foi o primeiro ciclo.

Com relação a eficiência fermentativa, a análise estatística encontrou diferenças entre as fermentações conduzidas a 30°C (84%) e as fermentações conduzidas a 25°C (90%) e ainda em ambos tratamentos foi observado uma queda na eficiência fermentativa na segunda rodada de fermentação sendo o valor recuperado na terceira rodada.

Com relação a produtividade observou-se uma maior produtividade (7,87 g/l.h) para as fermentações conduzidas à 30°C do que para as fermentações conduzidas à 25°C (7,15 g/l.h) o que está em desacordo com o proposto por MEHAIA & CHERYAN (1984), o qual citam produtividade de 2,1 g/l.h para fermentações em batelada e o valor de 10 g etanol/h.h em fermentações contínuas.

No entanto, SILVA et alii (1987) citam o valor de 20,5 g de etanol/l.h com uma concentração de substrato no meio de 155 g/l e inóculo de 83 g/l. Não havendo diferenças para as médias dos ciclos.

Tabela 31: Valores de Produtividade (g/l.h) e de Eficiência (%) nas fermentações analisadas estatisticamente

N.º	Reciclo	Produtividade (g/l.h)	Eficiência (%)
1	1	9,72	0,82
1	2	9,72	0,71
1	3	6,26	0,76
2	1	7,13	0,90
2	2	7,56	0,90
2	3	7,82	0,94
3	1	9,46	0,88
3	2	6,17	0,72
3	3	6,78	0,88
4	1	6,67	0,99
4	2	7,38	0,78
4	3	7,67	0,88
5	1	6,66	0,90
5	2	6,79	0,91
5	3	7,70	0,96

5. CONCLUSÕES

Do presente trabalho, podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. Nas condições experimentais ensaiadas, há uma correlação linear (r entre 0,9212 e 1,0000) entre as massas de açúcar consumido, de etanol produzido e o tempo de enchimento da dorna.

2. Para estudos cinéticos de fermentação alcoólica com mosto de melaço e reutilização de massa celular em ciclos consecutivos, as técnicas analíticas para massa celular por centrifugação (volume de centrifugado) e turbidimetria, mostraram-se inadequadas pela disparidade de valores encontrados.

3. Fermentações conduzidas na faixa de temperatura de 30°C tiveram maiores produtividades que fermentações conduzidas na temperatura de 25°C.

4. Fermentações conduzidas nas condições experimentais descritas e na faixa de temperatura de 25°C mostraram estatisticamente maiores eficiências que fermentações conduzidas na faixa de 30°C.

5. Fermentações conduzidas com inóculo inicial de cerca de 225 g de matéria seca são suficientes para estudo da condução do processo em batelada alimentada e vazão constante de alimentação. Inóculos superiores não alteram o comportamento geral do processo, para as condições ensaiadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S.; NAGAI, S.; NISHIZAWA, Y. Fed batch culture of *Saccharomyce cerevisiae*: a perspective of computer control to enhance the productivity in Baker's Yeast cultivation. Biotechnology and Bioengineering, New York, 18: 1001-116, 1976.

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinectics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering, New York, 10: 845-64, 1968.

ALMEIDA, J.R. de. Tecnologia do álcool. Piracicaba, CALQ, 1958. 137 p.

ALMEIDA, J.R. de. Fermentação do caldo de cana. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 55(3) 165-71, 1960.

ALMEIDA, S.B.G. Fermentação alcoólica: ensaios em batelada convencional e em batelada alimentada. Rio de Janeiro, 1980. 108p. (Mestrado - Escola Química/ Universidade Federal do Rio de Janeiro).

AMORIM, H.V. Progressos na técnica de fermentação alcoólica no Brasil. Alcool e Açúcar, São Paulo, 2(4): 50-6, 1982.

AQUARONE, E.; SATO, S.; BORZANI, W. Non-constant fed-batch ethanol fermentation of molasses (preliminary tests). Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba, 29(2): 327-35, 1986.

ARAÚJO, N.Q.; GIACOMO, D.; PARREIRA, D. Estudos sobre melaço de cana e outros. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 314: 97-106. 1961.

BACILA, M. Curso de fisiologia de microrganismos. Curitiba, Universidade do Paraná, 1960. 209 p.

BAILEY, J.E. & OLLIS, D.F. Biochemical engineering fundamentals. 2ed. New York, McGraw-Hill, 1986. 987p.

BAJPAI, P.; SHARMA, A.; RAGHURAM, N.; BAJAI, P.K. Rapid production of ethanol in high concentration by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* through soya flour supplementation. Biotechnology Letters, Kew, 10(3): 217-20, 1988.

BORZANI, W. Cinética dos processos fermentativos. Referatas e Seminários. Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, Piracicaba, 3(1): 116-20, jan. 1956.

BORZANI, W. Kinetics of ethanol production during the reactor feeding phase in constant fed-batch fermentation of molasses. Biotechnology and Bioengineering, New York, 29: 844-9, 1987.

BORZANI, W.; VAIRO, M. L. R.; PEREGO JUNIOR., L.; KOSHIMIZU, L. H.; CRUZ, M. R. M.; DIAS, J. M. C S. Response of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* to variation of temperature. Biotechnology and Bioengineering, New York, 23(1): 231-5, Jan. 1980.

BRAVO, P.N. Temperatura de fermentação. Revista Brasileira de Bebidas e Alimentos, São Paulo, 6(66): 20-1, jan. 1973.

BUENO NETO, C.L. Influência da concentração inicial de células e do tempo de enchimento da dorna no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melão de cana-de-açúcar. São Paulo, 1982. 147p. (Mestrado - Escola Politécnica/USP).

CASTRO, H.F. Biocatalyst and substrate properties for alcohol production. Manchester, 1985. 139p. (PhD. - Faculty of Science/ University of Manchester).

CAZZULO, J.J. & STOPPANI, A.O.M. The regulation of yeast pyruvate carboxilase by acetyl-coenzyme A and L Aspartate. Archives of Biochemistry and Biophysics Dulwth, 127: 563-7, 1968.

CESAR, M.A.A.; DELGADO, A.A.; OLIVEIRA, E.R.de; NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; VALSECHI, O. Elementos de tecnologia do álcool. Piracicaba, ESALQ, 1971. 61p.

CODISTIL. Fermentação alcoólica. Piracicaba, Codistil, 1978. 110 p.

COPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ALCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO LTDA. Fermentação. Piracicaba, COPERSUCAR/ Tecnologia/ Divisão Industrial, 1987. 434p.

COZZOLINO, S.M.F. Valor nutricional da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*. estudo em gerações sucessivas de ratos. São Paulo, 1982. 147p. (Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ USP).

D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. The effect of osmotic pressure on the intracellular accumulation of ethanol in *S. cerevisiae* during fermentation in wort. Journal of the Institute of Brewing, London, 93: 472-6, 1987.

D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. Intracellular ethanol accumulation in *S.cerevisiae* during fermentation. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 54(1): 110- 14, 1988.

FALCINELLI, A. Sull' importanza del mezzo e dei lieviti nella fermentazione alcolica. Vini D'Italia, Brescia, 12(65): 142-5, 1970.

FARREL, J. & ROSE, A. Temperature effects on microorganism. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, 21: 101-120, 1967.

FERRARI, S.E.; LOPES, J.J.C.; LEME, J.R.A.; OLIVEIRA, E.R. Industrial efficiency of alcohol fermentation: comparative study. In: SYMPOSIUM ALCOHOL FUELS TECHNOLOGY, n.º , São Paulo, ,1980, p. 139-44.

FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.A.; FURCO, M.A.; ALTOMAN, R.;
ROSSELI, C.E.V. Controle operacional da fermentação.
Boletim Técnico da Copersucar, São Paulo, (38): 19-23,
1987.

GHOSE, T. K. & TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of
cellulose hydrolysate: I batch versus continuous
systems. Biotechnology and Bioengineering, New York,
21: 1387-400, 1979.

GRAY, W. D. Studies on the alcohol tolerance of yeasts.
Journal of Bacteriology, Wahington, 42: 561-74, 1941.

GRAY, W. D. The sugar tolerance of four strains of
distiller's yeast. Journal of Bacteriology, Washington,
49: 445-52, 1945.

GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo da fermentação
alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e
Saccharomyces uvarum. Piracicaba, 1989. 160p. (Livre-
Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz"/USP).

HAUKELI, A.D. & LIE, S. Experimental conditions affecting
yeast growth. Journal of the Institute of Brewing,
London, 77: 253-8, 1971.

HONIG, P. Princípios de tecnologia azucareira. México, Continental , 1969. 3V.

HORII, J. Condução de processos fermentativos. In: SEMINÁRIO SOBRE A TECNOLOGIA E ECONOMIA DO ALCOL, 1,. Piracicaba, 1980. Anais. Piracicaba, Coordenadoria da Indústria e Comércio, 1980. p 147.

HSIE, M. C. Improviment of alcohol fermentation. Taiwan Sugar, Taipei, 28(2): 46-9, 1981.

JANSSENS, J. H.; BERNARD, A.; BAILEY, R.B. Ethanol from whey: continuous fermentation with cell recycle. Biotechnology and Bioengineering, New York, 26: 1-5, 1984.

JIMENEZ, J. & BENITEZ, T. Selection of ethanol-tolerant yeast hybrids in pH-regulated continuous culture. Applied and Enviromental Microbiology, Washington, 54(4): 917-22, 1988.

KOSHIMIZU, L.H.; MELO CRUZ, M.R.de.; VALDEOLIVAS GÓMEZ, E.I.; BUENO NETTO, C.L.; RAMOS GONÇALVES, A.C.; ROMERO de La INGLESIA, M.; BORZANI, W. Fermentação alcoólica contínua de caldo de cana-de-açúcar em uma única dorna em escala piloto. Stab, Piracicaba, 1(4): 27-31, 1983.

LALUCE, C.; PALMIERI, M.C.; CRUZ, R.C.L.da. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. Biotechnology and Bioengineering, New York, 37: 528-36, 1991.

LEÃO, C. & VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the kinetics and activation parameters of thermal death in *Saccaromyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 24: 1581-90, 1982.

LEÃO, C. & VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta., Amsterdam, 774: 43-8, 1984.

LEE, J.H.; WILLAMSON, D.; ROGERS, P.L.. The effects of temperature on the kinetics of ethanol production by *S.uvarum*. Biotechnology Letters, Kew, 2(4): 141-6, 1980.

LETORNEAU, L. & VILLA, P. *Saccharomyces* yeast growth on beet molasses effects of substrate concentration on alcohol toxicity. Biotechnology Letters, Kew, 9(1): 53-8, 1987.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Tecnologia das fermentações. São Paulo, Edgard Blücher, 1975. 285 p.

LOUREIRO, U. & VAN UDEN, N. Effects of Ethanol on the Maximum temperature for growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 24(8): 1881-4, Aug. 1982.

LUONG, J.H.T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering, New York, 27: 280-5, 1985.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 25: 103-21, 1983.

MALLETTE, M.F. Evaluation of growth by physical and chemical means. Methods in Microbiology, 1:521-66, 1969.

MANCILHA, I. M.; PEARSON, A.M.; WALLER, J.; HAGABOAM, G.J. Increasing alcohol yield by selected yeast fermentation of sweet *Sorghum*. 1. Elavuation of yeast strain for ethanol production. Biotechnology and Bioengineering, New York, 26: 632-34, 1984.

MARQUES, O.M. Efeito de tratamentos hidrolíticos sobre a fermentação alcoólica. Piracicaba, 1986. 108p. (Mestrado - Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

MEHAIA, M.A. & CHERYAN, M. Ethanol production in a hollow fiber bioreactor using *S. cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, Heidelberg, 20: 100-4, 1984.

MERRIT, N.R. The influence of temperature on some properties of yeast. Journal of the Institute of Brewing, London, 72: 374-383, 1966.

MILLAR, D. G.; GRIFFITHS-SMITH, K; ALGAR, E.; SCOPES, R. K. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. Biotechnology Letters, Kew, 4(9): 601-6, 1982.

MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnology and Bioengineering, New York, 22: 2375-81, 1980.

NAGODAWITHANA, T.W.; CASTELLANO, C.; SETEINKRAUS, K.H.
Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". Applied Environmental Microbiology, Washington, 28(3): 383-91, 1974.

NANBA, A.; NISHIZAWA, Y.; TSUCHIYA, Y.; NAGAI, S. Kinetic analysis of batch ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation Technology, Tokyo, 64(3) 277-83, 1987.

NAVARRO, J. M. & DURAND, G. Fermentation alcoolique: influence de la temperature sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levure. Annales de Microbiologie, Paris, 129 B: 215-21, 1978.

NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, E.R.de.; VALSECHI, O. Primeiro Curso de extensão em tecnologia de aguardentes de cana; apontamentos. Piracicaba, ESALQ, 1974. 104 p.

OKOLO, B.; JOHNSTON, J.R.; BERRY, D.R. Toxicity of ethanol, n-butanol and iso-amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae* when supplied separately and in mixtures. Biotechnology Letters, Kew, 9(6) 431-4, 1987.

OKUYAMA, H.; SAITO, M.; JOSHI, N.C.; GUNSBERG, S.; W KIL, S. Regulation by temperature of the chain length of fatty acids in yeast. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 254(24): 12281- 4, 1979.

OLBRICH, H. O melaço. Trad. de H. Serdezello. 3.ed. Rio de Janeiro, IAA, 1960. 153p.

OLIVA NETO, P. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada. Campinas, 1990. 207 p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

OLIVEIRA, E. V. Proteína derivada da cana-de-açúcar pelo desenvolvimento de *Saccharomyces cerevisiae* em melaço. Industria Alimentar, São Paulo, 15: 13-7, 1978.

PARADA, G. & ACEVEDO, F. On the relation of temperature and RNA content to the specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 25: 2785-8, 1983.

PATEL, P.C. & LEWIS, M.J. Influence of growth temperature on the fatty acid composition of the cytoplasmic membrane of a larger yeast. Journal of the American Society of Brewing Chemists, St. Paul, 40(1): 26-30, 1982.

PEISINO, G. Avaliação de leveduras industriais em diferentes condições de fermentação alcoólica. Piracicaba, 1986. 140p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

PERINGER, P. & BLACHERE, H.T. Modeling and optimal control of baker's yeast production in repeated fed batch culture. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York, 9: 205-13, 1979.

PFISTERER, E.; HANCOCK, I.; GARRISON, I. Effects of fermentation environment on yeast lipid synthesis. Journal of the American Society of Brewing Chemists, St. Paul, 35: 49-54, 1979. Apud Journal of the Institute Brewing, London, 83: 316. 1979. (Resumo).

PONS, M.N.; PICHON, D.; AUTHIER, M. Monitoring of Alcoholic Fermentations of Fruit Juices Via a Gas Membrane Sensor. Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka, 4:282-5, 1989.

QURESHI, N & TAMHANE, D. U. Production of mead by immobilized whole cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology Biotechnology Berlin, 21: 280-1. 1985.

RANKINE, B.C. Factors influencing the pyruvic acid content of wines. Journal of the Science of Food Agriculture, Essex, 16: 394-8, 1965.

RICHTER, K. & BECKER, U. Inhibition phenomene in ethanol fermentation II. Effects of substrate concentration on the specific rate of ethanol production by *S. cerevisiae*. Acta Biotechnologica, Berlin, 5(2): 145-52, 1985.

ROSINI, G. Wine-making by cell-recycle-batch fermentation process. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 24(2): 140-3, 1986.

SAIGAL, D. & WISWANATHAN, L. Effect of clarification in a hollow fiber bioreactor using *S. cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 20: 100-4, 1984.

SAKAI, L.; GONÇALVES, R.H.; HORII, J. Matéria-seca em leveduras. Comparação entre secagem em estufa e em forno microondas. Anais do V Congresso de Iniciação Científica da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1990. p. 74.

SANTOS, M.N.G. Seleção de leveduras termotolerantes para a produção de etanol. Viçosa, 1988. 45p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa).

SHUKLA, J. P. & KAPOOR, D. Recycling of yeast in distillery practice. International Sugar Journal, West Glam, 50: 258-9, 1958.

SILVA, R.S.F.; BORSATO, D.; OLIVEIRA, C.L.F.; PALADINO, P.V. Otimização de fermentação alcoólica em meio sintético usando o método super-simplex modificado. Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba, 20(3): 507-14, 1987.

STANIER, R. Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBURG, E.A. O mundo dos micróbios. São Paulo, Edgard Blücher, 1969. 741 p.

STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. GENIE BIOCHIMIQUE - Fermentation alcoolique influence de la concentration in glucose sur le taux d'ethanol et le taux de croissance. C.R. Acad. Sc. Paris, 286: 225-28, 1978.

STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. Fermentation alcoolique: observations cinetiques. Connaissance de la Vigne et du Vin, Talence, 13(4): 281-93, 1979.

STUPIELLO, J.P. & HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. Saccharum, São Paulo, 4(17): 43-6, 1981.

SWEERE, A.P.J.; MATLA, Y.A.; ZANDVLIET, J.; LUYBEN, K.Ch.A.; LOSSEN, N.W.F. Experimental simulation of glucose fluctuations. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 28: 109-15, 1988.

TRIBOLI, E.P.R. Métodos analíticos para o acompanhamento da fermentação alcoólica. São Caetano do Sul, Instituto Mauá de Tecnologia, 1987. 40 p.

TRILLI, A. Estimation of productivities in repeat fed batch cephalosporin fermentation. Journal applied Chemistry Biotechnology, London, 27: 219-24, 1977.

VASCONCELOS, J. N. & VALDMAN, B. Otimização do processo de fermentação alcoólica através da batelada alimentada. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 106(2): 38-48, 1988.

VASCONCELOS, J.N. & VILELA FILHO, V. Estudo do comportamento cinético da fermentação alcoólica industrial conduzida pelo processo descontínuo. STAB, Piracicaba, 7(2): 40-50, 1988.

VEGA, J.L.; NAVARRO, A.R.; CLAUSEN, E.C. e GADDY, J.L.

Effects on inoculum size on ethanol inhibition modeling and other fermentation parameters. Biotechnology and Bioengineering, New York, 29: 633-8, 1987.

WADA, M.; KATO, J.; CHIBATA, I. Continuous production of ethanol in high concentration using immobilized growing yeast cells. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 11: 67-71, 1981.

WALSH, R.M. & MARTIN, P.A. Growth of *S. cerevisiae* and *S. uvarum* in a temperature gradient incubator. Journal of the Institute of Brewing, London, 83: 169-72, 1977.

WHITE, J. Baker's yeast: the growth of yeast and the mechanism of yeast growth, In: _____ Yeast technology. London, Chapman & Hall, 1954. cap. 3, p.27-41.

WHITE, J. & MUNNS, J. Influência of temperature on yeast growth and fermentation. Journal of the Institute of Brewing, London, 57: 280-4, 1951.

YAVORENKO, V.L. Theory and practice of continuous cultivation of microorganisms in industrial alcoholic processes. Advances in Biochemical Engineering, Berlin, 9: 1-29, 1978.