UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO–USP
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA MECÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Jean Mimar Santa Cruz Yabarra

**Modelagem do processo de fermentação
etanólica com interferência de bactérias
heterofermentativa e homofermentativa**

Jean Mimar Santa Cruz Yabarrrena

**Modelagem do processo de fermentação
etanólica com interferência de bactérias
heterofermentativa e homofermentativa**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Engenharia Mecânica da Escola de Engenharia de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Mecânica

Orientador: Glauco Augusto de Paula Caurin

Coorientador: Luiz Carlos Basso

São Carlos

2012

Trata-se da versão corrigida da tese. A versão original se encontra disponível na EESC/USP que aloja o Programa de Pós-Graduação de Engenharia Mecânica.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Yllm Yabarrrena,, Jean Mimar Santa Cruz
Modelagem do processo de fermentação etanólica com
interferência de bactérias heterofermentativa e
homofermentativa / Jean Mimar Santa Cruz Yabarrrena,;
orientador Prof. Glauco Augusto de Paula Caurin;
coorientador Prof Luiz Carlos Basso. São Carlos, 2013.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Mecânica e Área de Concentração em Dinâmica
de Máquinas e Sistemas -- Escola de Engenharia de São
Carlos da Universidade de São Paulo, 2013.

1. Fermentação. 2. Modelagem. 3. Bactéria
homofermentativa. 4. Heterofermentativa. 5. Bayesiana.
6. Evolução diferencial. 7. Simulação de Monte Carlo.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **JEAN MIMAR SANTA CRUZ YABARRENA**

Título da tese: "Modelagem do processo de fermentação etanólica com interferência de bactérias heterofermentativa e homofermentativa".

Data da defesa: 04/05/2012

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **Glauco Augusto de Paula Caurin (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADO

Prof. Dr. **Flávio Henrique da Silva**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADO

Prof. Dr. **Luiz Carlos Basso**
(Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ESALQ)

APROVADO

Dr. **Whisner Fraga Mamede**
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo)

APROVADO

Dr. **Armando José Dal Bem**
(Virgolino de Oliveira S/A – Açúcar e Alcool)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica:
Prof. Associado **Marcelo Areias Trindade**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo Cesar Lima Segantine**

À minha esposa Sharita e meus filhos Michelle, Matteo e Nickolas.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida e pelas maravilhosas providências fornecidas na minha vida.

À minha esposa Sharita, a grão heroína, que sempre me amou, apoiou, suportou e incentivou e a meus filhos por deixar-me tomar seu valioso tempo.

Aos meus pais Zoraida e Daniel.

Ao meu orientador Glauco Caurin pela confiança e enorme paciência.

Ao meu co-orientador Luiz Carlos Basso pelos ensinamentos e por mostrar a beleza da fisiologia e bioquímica da vida e à Thalita Basso pelo apoio fornecido.

Ao meu amigo Edrian pela ajuda no texto e pelas madrugadas de cooperação, à Douglas pela presença nos momentos importantes.

Ao meu amigo Elias Borges pelo enorme esforço dado no texto e nas metodologias, pela amizade.

À meu amigo Luis Lucatti pelo empenho e dedicação

Ao meu amigo Akira pela amizade e apoio.

Ao professor Marinho de Andrade, pelas discussões, diretrizes e pelo apoio na pesquisa.

Ao meu amigo Willian L. de Oliveira, pela nobreza em todo o enorme apoio fornecido na abordagem bayesiana.

Ao meu amigo Vitor Marchi pelo apoio.

Ao Dr. Armando Dal Bem pelas valiosas correções e observações do texto.

Ao Dr. Oscar Paulino pela gestão na aprovação para utilizar o material biológico da Usina São Martinho.

Ao meu amigo Valdinei Belini pela ajuda no texto e pela perseverança na escrita.

À Usina São Martinho pelas lições aprendidas, aos seus funcionários que sempre estiveram dispostos a apoiar.

Ao Dr. Ricardo Yassushi Inamasu pela rigorosa e valiosa revisão do texto.

Ao meu amigo Elmer pela valiosa ajuda na sensibilidade e estimação de parâmetros e pela amizade sincera.

Aos meus amigos e irmãos, Marcelo, Ricardo, Paulo, Madison pela amizade e pela com-

panhia fraterna.

Ao Dr. Osmar Netto, pela colaboração no sequenciamento das bactérias e pelo apoio nas informações metodológicas.

Ao meu amigo Fernando Fonseca pelas discussões e esclarecimentos..

À CAPES pelo apoio fornecido a esta pesquisa.

À NANOX pelo apoio fornecido a esta pesquisa em especial ao meu amigo André Araujo.

Ao BNDES pelo apoio fornecido a esta pesquisa.

E, finalmente a todos que me ajudaram de alguma direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho e que não foram listados, favor de desculpar a omissão.

*“... E surgirão ainda novas alturas a atingir, novas maravilhas
a admirar, novas verdades a compreender, novos objetivos
a aguçar as faculdades do espírito, da alma e do corpo.
Todos os tesouros do Universo estarão abertos
ao estudo dos remidos de Deus”.
(Ellen White)*

Resumo

Yabarra, Jean **Modelagem do processo de fermentação etanólica com interferência de bactérias heterofermentativa e homofermentativa**. 180 p. Tese de doutorado – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

O processo fermentativo para a obtenção de etanol constitui um sistema complexo. Durante a fermentação se desenvolvem infecções em forma crônica e os surtos de infecção aguda aparecem em condições que; por causa da dinâmica não-linear do processo que envolve uma rede de reações metabólicas dos microrganismos, a alta dependência às condições de contorno e pelas interações sinérgicas e antagônicas envolvidas neste ecossistema; ainda representam um tema relevante de pesquisa em aberto.

O presente trabalho propõe contribuir na tarefa de interpretar tais efeitos por intermédio de um modelo que inclua a interferência das bactérias. É proposto um cenário em escala laboratorial e controlado com a linhagem isolada de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em co-cultura com bactérias de metabolismo heterofermentativo e homofermentativo. A interferência é explicada por intermédio de um modelo com efeito fixo baseado em um modelo não estruturado proposto por Lee (1983), e modificado a partir dos estudos de Andrietta (2003).

São conduzidos ensaios de quatro tratamentos: uma fermentação controle e outras contaminadas com cada um dos diferentes tipos de bactérias e também em conjunto, a fim de fornecer dados experimentais para ajuste do modelo em discussão. Em seguida, são realizadas estimativas dos parâmetros que compõem as equações diferenciais da cinética da fermentação, utilizando um algoritmo genético baseado em evolução diferencial Storn e Price (1997). Completa-se a avaliação dos parâmetros por intermédio da análise de sensibilidade paramétrica dos mesmos.

De posse desses resultados, é utilizado o modelo do tratamento controle como base, e são inseridos vetores de variáveis categóricas, correspondentes a efeitos fixos. Tais variáveis permitem modelar a interferência da contaminação no modelo matemático proposto. A

estatística descritiva, a análise utilizando inferência bayesiana e a interpretação bioquímica dos resultados complementam as inferências obtidas a respeito do modelo.

A análise de sensibilidade e correlação dos parâmetros, mostrou que os modelos para a cinética da fermentação, estudados e bem conhecidos não são adequados para modelar o processo, pela alta correlação dos seus parâmetros.

O tratamento controle teve um rendimento de 46,97% na produção de etanol, o tratamento com bactéria heterofermentativa teve uma redução de 2,35% e com a mistura de ambas a redução foi de 1,58%. Uma das principais contribuições deste estudo relaciona-se à produção de glicerol, o resultado mostra que não há impacto significativo na presença de bactérias homofermentativas e sim uma clara tendência a inibir a sua produção. Apresentam-se também indícios de sinergia entre as bactérias e de consumo de manitol pela bactéria homofermentativa.

Palavras-chave: Fermentação. Modelagem . Bactéria homofermentativa. Heterofermentativa. Bayesiana. Evolução diferencial, Simulação de Monte Carlo..

Abstract

Yabarrena, Jean **Interference modelling of heterofermentative and homofermentative bacteria in the ethanol fermentation process.** 180 p. Ph.D. Thesis – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, 2012.

The fermentation process for obtaining ethanol is a complex system. During fermentation develop chronic infections and outbreaks of acute infection in conditions that appear, because of the nonlinear dynamics of the process that involves a network of metabolic reactions of microorganisms, the high dependence on boundary conditions and the synergistic interactions and antagonistic involved in this ecosystem, still represent a relevant topic of research open.

This paper proposes to contribute in the interpreting such effects through a model that includes the interference of bacteria. We propose a scenario in laboratory scale and controlled with the strain isolated from *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 in co-culture with bacteria and homofermentative heterofermentative metabolism. The interference is explained by means of a template with fixed effect based on a non structured proposed by Lee (1983) and modified from studies Andrietta (2003).

Tests are conducted four treatments: a control fermentation and other contaminated with each of the different bacteria and also in conjunction in order to provide experimental data to fit the model under discussion. Are then carried estimates of the parameters that make up the differential equations of the kinetics of the fermentation, using a genetic algorithm based on differential evolution Storm and Price (1997). To complete the parameters evaluated through analysis of the same parameter sensitivity.

With these results, the model is used as the basis of the control treatment, and are inserted vectors of categorical variables, corresponding to fixed effects. These variables allow modeling the interference of contamination in the mathematical model. Descriptive statistics and Bayesian inference analysis and interpretation of biochemical results obtained complement inferences about the model.

Sensitivity analysis and correlation of parameters for the models showed that the kinetics of the fermentation, well studied and known are not suitable for modeling the process, the high correlation between the parameters.

The control had a yield of 46.97 % in ethanol, treatment with heterofermentative bacteria was reduced by 2.35 % and a mixture of both reduction was 1.58 %. A major contribution of this study is related to the glycerol, the result shows that no significant impact on the presence of homofermentative bacteria but a clear tendency to inhibit their production. It also presents evidence of synergy between bacteria and consumption of mannitol by homofermentative bacteria.

Keywords: Fermentation. Kinetic modelling. Homofermentative bacteria. Heterofermentative bacteria. Bayesian approach. Differential evolution. Monte Carlo simulations.

.

Lista de ilustrações

Figura 1	Redes metabólicas da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fonte: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (KEGG) Metabolic pathways - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> budding yeast	36
Figura 2	.- Curva de crescimento típica na fermentação tipo batelada. Fonte: Modificado de Doran (1995)	38
Figura 3	.- Metabolismo das bactérias heteroláticas. Fonte: Inês (2007), Wright e Axelsson (2011)	42
Figura 4	.- Metabolismo das bactérias homoláticas Fonte: Inês (2007), Wright e Axelsson (2011)	43
Figura 5	Identificação de 44 culturas da microbiota bacteriana Usina Santa Adélia e Usina Modelo (Jaboticabal)	44
Figura 6	Identificação de 334 culturas da microbiota bacteriana Usina Costa Pinto , Piracicaba, Julho-Dez.	44
Figura 7	Identificação de 222 culturas da microbiota bacteriana industrial. . . .	45
Figura 8	Correlação entre a população inicial de <i>lactobacillus</i> e a concentração de ácido láctico.	45
Figura 9	Classificação dos modelos da fermentação.	48
Figura 10	Efeito da complexidade do modelo no desempenho do estimador. . . .	49
Figura 11	Taxonomia dos métodos metaheurísticos	53
Figura 12	Fluxograma da metodologia aplicada	56
Figura 13	Layout da execução dos ensaios	58
Figura 14	Materiais usados nos ensaios	59
Figura 15	Fluxograma da estimação de parâmetros e otimização por o algoritmo de Evolução Diferencial	72
Figura 16	Forma de interpretar o <i>box plot</i>	77
Figura 17	Perfil de ajuste do modelo aos dados experimentais de Pad no tratamento Controle ($\epsilon = 0,0067$).	86

Figura 18	Perfil de ajuste do modelo aos dados experimentais de Sad no tratamento Controle ($\epsilon = 0,0067$).	87
Figura 19	Perfil de ajuste do modelo aos dados experimentais de Xad no tratamento Controle ($\epsilon = 0,0067$).	87
Figura 20	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Produto - Fase batelada alimentada.	88
Figura 21	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Produto - Fase batelada alimentada. Inclusão de Yx_{s_d} e Yps_d	89
Figura 22	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Produto - Fase batelada.	89
Figura 23	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Produto - Fase batelada. Inclusão de Yx_{s_d} e Yps_d	90
Figura 24	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Substrato - Fase batelada alimentada.	90
Figura 25	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Substrato - Fase batelada alimentada. Inclusão de Yx_{s_d} e Yps_d	91
Figura 26	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Substrato - Fase batelada.	91
Figura 27	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Substrato - Fase batelada. Inclusão de Yx_{s_d} e Yps_d	92
Figura 28	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre a Biomassa - Fase batelada alimentada.	92
Figura 29	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre a Biomassa - Fase batelada alimentada. Inclusão de Yx_{s_d} e Yps_d	93
Figura 30	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre a Biomassa - Fase batelada.	93
Figura 31	Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre a Biomassa - Fase batelada. Inclusão de Yx_{s_d} e Yps_d	94
Figura 32	Influência da ponderação sobre o Produto.	99
Figura 33	Influência da ponderação sobre o Substrato.	99
Figura 34	Influência da ponderação sobre a Biomassa.	100
Figura 35	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Produto no tratamento Hetero.	101
Figura 36	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Substrato no tratamento Hetero.	102
Figura 37	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais da Biomassa no tratamento Hetero.	102
Figura 38	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Produto no tratamento Homo.	103
Figura 39	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Substrato no tratamento Homo.	104

Figura 40	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais da Biomassa no tratamento Homo.	104
Figura 41	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Produto no tratamento Homo+Hetero.	105
Figura 42	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Substrato no tratamento Homo+Hetero.	106
Figura 43	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais da Biomassa no tratamento Homo+Hetero.	106
Figura 44	<i>Box plot</i> dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Acetato.	108
Figura 45	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Acetato (Controle).	111
Figura 46	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Acetato (Homo).	111
Figura 47	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Acetato (Hetero).	112
Figura 48	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Acetato (Homo + Hetero).	112
Figura 49	<i>Box plot</i> para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Acetato.	113
Figura 50	Rendimento (%) de acetato ao longo dos 8 ciclos fermentativos.	113
Figura 51	Produção de acetato durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.	114
Figura 52	Curvas de ART Cinética para os 4 tratamentos.	115
Figura 53	<i>Box plot</i> dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Biomassa.	116
Figura 54	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Biomassa (Controle).	118
Figura 55	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Biomassa (Homo).	118
Figura 56	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Biomassa (Hetero).	119

Figura 57	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Biomassa (Homo + Hetero).	119
Figura 58	<i>Box plot</i> para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Biomassa.	120
Figura 59	Rendimento (%) de biomassa ao longo dos 8 ciclos fermentativos. . . .	120
Figura 60	Produção de biomassa durante o ciclo IV para os 4 tratamentos. . . .	121
Figura 61	<i>Box plot</i> dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - DeltaCO ₂	122
Figura 62	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - DeltaCO ₂ (Controle).	123
Figura 63	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - DeltaCO ₂ (Homo).	124
Figura 64	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - DeltaCO ₂ (Hetero).	124
Figura 65	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - DeltaCO ₂ (Homo + Hetero).	125
Figura 66	<i>Box plot</i> dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - DeltaCO ₂	125
Figura 67	<i>Box plot</i> dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Etanol.	126
Figura 68	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Etanol (Controle).	128
Figura 69	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Etanol (Homo).	128
Figura 70	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Etanol (Hetero).	129
Figura 71	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Etanol (Homo + Hetero).	129
Figura 72	<i>Box plot</i> para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Etanol.	130

Figura 73	Rendimento (%) de etanol ao longo dos 8 ciclos fermentativos.	130
Figura 74	Produção de etanol durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.	131
Figura 75	<i>Box plot</i> dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Glicerol.	132
Figura 76	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Glicerol (Controle).	134
Figura 77	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Glicerol (Homo).	134
Figura 78	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Glicerol (Hetero).	135
Figura 79	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Glicerol (Homo + Hetero).	135
Figura 80	<i>Box plot</i> para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Glicerol.	136
Figura 81	Rendimento (%) de glicerol ao longo dos 8 ciclos fermentativos.	136
Figura 82	Produção de glicerol durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.	137
Figura 83	<i>Box plot</i> dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Lactato.	138
Figura 84	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Lactato (Controle).	139
Figura 85	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Lactato (Homo).	140
Figura 86	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Lactato (Hetero).	140
Figura 87	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Lactato (Homo + Hetero).	141
Figura 88	<i>Box plot</i> para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Lactato.	141
Figura 89	Rendimento (%) de lactato ao longo dos 8 ciclos fermentativos.	142
Figura 90	Evolução da população bacteriana ao longo dos 8 ciclos fermentativos [$\times 10^7$ células/mL].	143

Figura 91	Produção de acetato durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.	145
Figura 92	<i>Box plot</i> dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Manitol.	146
Figura 93	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Manitol (Controle).	147
Figura 94	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Manitol (Homo).	148
Figura 95	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Manitol (Hetero).	148
Figura 96	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Manitol (Homo + Hetero).	149
Figura 97	<i>Box plot</i> para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Manitol.	149
Figura 98	Rendimento (%) de manitol ao longo dos 8 ciclos fermentativos.	150
Figura 99	Produção de manitol durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.	151
Figura 100	<i>Box plot</i> dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Succinato.	151
Figura 101	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Succinato (Controle).	153
Figura 102	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Succinato (Homo).	153
Figura 103	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Succinato (Hetero).	154
Figura 104	(a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Succinato (Homo + Hetero).	154
Figura 105	<i>Box plot</i> para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Succinato.	155
Figura 106	Rendimento (%) de succinato ao longo dos 8 ciclos fermentativos.	155
Figura 107	Produção de succinato durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.	156
Figura 108	Resultados comparativos do FBST com os testes t e WMW - Etanol.	158
Figura 109	Resultados comparativos do FBST com os testes t e WMW - Biomassa.	159

Figura 110	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Produto no tratamento Hetero de validação.	160
Figura 111	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Substrato no tratamento Hetero de validação.	161
Figura 112	Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais da Biomassa no tratamento Hetero de validação.	161
Figura 113	Balanço de massa do tratamento Hetero de validação.	162

Lista de tabelas

Tabela 1	Perdas de etanol em função da população de bactéria.	40
Tabela 2	Classificação do gênero <i>Lactobacillus</i>	41
Tabela 3	Modelos matemáticos para a fermentação etanólica.	51
Tabela 4	Classificação das bactérias isoladas da fermentação etanólica industrial em função da produção de manitol e identificação por sequenciamento de rDNA . (A concentração de manitol do meio de cultivo foi de 0,171 g/L.)	57
Tabela 5	Dados experimentais para o tratamento Controle.	84
Tabela 6	Dados experimentais para o tratamento com bactérias homofermentativas.	84
Tabela 7	Dados experimentais para o tratamento com bactérias heterofermentativas.	84
Tabela 8	Dados experimentais para o tratamento com bactérias homofermentativa e heterofermentativas em conjunto.	85
Tabela 9	Parâmetros adimensionais estimados para o tratamento Controle pela ED.	85
Tabela 10	Parâmetros dimensionais estimados para o tratamento Controle pela ED.	86
Tabela 11	Resultado do ranking da matriz FIM	95
Tabela 12	Correlação dos parâmetros do modelo - Produto	96
Tabela 13	Correlação dos parâmetros do modelo - Substrato	96
Tabela 14	Correlação dos parâmetros do modelo - Biomassa	96
Tabela 15	Sensibilidade dos parâmetros medida em $t_a d = 0,5$ (adimensional). . .	98
Tabela 16	Matriz de pesos do tratamento Hetero - Pesos do $\vec{E_f}$ para Pad, Xad e Sad.	100
Tabela 17	Matriz de ponderação do tratamento Hetero - Valores para Pad, Xad e Sad.	101

Tabela 18	Vetor $\vec{E}_f$ para o tratamento Hetero.	101
Tabela 19	Matriz de ponderação do tratamento Homo - Valores para Pad, Xad e Sad.	101
Tabela 20	Matriz de pesos do tratamento Homo - Pesos do $\vec{E}_f$ para Pad, Xad e Sad.	103
Tabela 21	Vetor $\vec{E}_f$ para o tratamento Homo.	103
Tabela 22	Matriz de ponderação do tratamento Homo+Hetero - Valores para Pad, Xad e Sad.	103
Tabela 23	Matriz de pesos do tratamento Homo+Hetero - Pesos do $\vec{E}_f$ para Pad, Xad e Sad.	105
Tabela 24	Vetor $\vec{E}_f$ para o tratamento Homo+Hetero.	105
Tabela 25	Testes t e WMW: teste entre médias - Acetato.	109
Tabela 26	Sumário <i>a posteriori</i> para os parâmetros destransformados do modelo - Acetato.	110
Tabela 27	Teste t e WMW: teste entre médias - Biomassa.	117
Tabela 28	Sumário <i>a posteriori</i> para os parâmetros destransformados do modelo - Biomassa.	117
Tabela 29	Teste t e WMW: teste entre médias - DeltaCO ₂	122
Tabela 30	Sumário <i>a posteriori</i> para os parâmetros destransformados do modelo - DeltaCO ₂	123
Tabela 31	Teste t e WMW: teste entre médias - Etanol.	127
Tabela 32	Sumário <i>a posteriori</i> para os parâmetros destransformados do modelo - Etanol.	127
Tabela 33	Teste t e WMW: teste entre médias - Glicerol.	132
Tabela 34	Sumário <i>a posteriori</i> para os parâmetros destransformados do modelo - Glicerol.	133
Tabela 35	Teste t e WMW: teste entre médias - Lactato.	138
Tabela 36	Sumário <i>a posteriori</i> para os parâmetros destransformados do modelo - Lactato.	139
Tabela 37	Teste t e WMW: teste entre médias - Manitol.	146
Tabela 38	Sumário <i>a posteriori</i> para os parâmetros destransformados do modelo - Manitol.	147
Tabela 39	Teste t e WMW: teste entre médias - Succinato.	152
Tabela 40	Sumário <i>a posteriori</i> para os parâmetros destransformados do modelo - Succinato.	152
Tabela 41	Teste Kruskal Wallis	157
Tabela 42	Matriz de ponderação do tratamento Hetero de validação - Valores para Pad, Xad e Sad.	160
Tabela 43	Vetor $\vec{E}_f$ para o tratamento Hetero de validação.	160

Lista de siglas

ART Açúcares reductores totais

AG algoritmos genéticos

AE algoritmos evolucionários

BALs bactérias láticas

CTC Centro de Tecnologia Canavieira

EDOs Equações diferenciais ordinárias

ED Evolução Diferencial

FIM matriz de informação de Fisher

FBST *Full Bayesian Significance Test*

HPAEC *High Performance Anion Exchange Chromatography*

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

KW Kruskal Wallis

MRS Ágar Man-Rogosa-Sharpe

MCMC Monte Carlo via Cadeias de Markov

WMW Wilcoxon-Mann-Whitney

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

rDNA Ácido desoxirribonucleico ribossomal

UFC Unidades Formadoras de Colônias

YEPD *Yeast Extract Peptone Dextrose*

Sumário

1	Introdução	29
1.1	Objetivos	31
1.2	Objetivos específicos - bioquímica	32
1.3	Objetivos específicos - engenharia	32
2	Revisão bibliográfica	33
2.1	Introdução às tecnologias de fermentação	33
2.2	A complexidade da fisiologia da fermentação etanólica	34
2.3	A importância da contaminação bacteriana	38
2.4	Bactérias homofermentativas e heterofermentativas	39
2.5	A interação entre leveduras e bactérias	42
2.6	Modelos da fermentação etanólica	47
2.7	Estimação de parâmetros e otimização	50
2.8	Abordagem bayesiana	54
3	Metodologia	55
3.1	Comentários iniciais	55
3.2	Metodologia dos ensaios	55
3.2.1	Planejamento experimental	55
3.2.2	Análises microbiológicas	62
3.2.3	Análises químicas	63
3.2.4	Balanco de massa	64
3.3	Metodologia de implementação computacional	66
3.3.1	Análise dimensional do conjunto de EDO's	66
3.3.2	Evolução Diferencial	70
3.3.3	Sensibilidade paramétrica	73
3.3.4	Correlação de parâmetros	74
3.3.5	Matriz de informação de Fisher	75

3.4	Testes estatísticos	75
3.4.1	Teste t	75
3.4.2	Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney	76
3.4.3	Análise exploratória dos dados	76
3.4.4	Teste de Kruskal-Wallis	76
3.5	Abordagem bayesiana	76
3.5.1	Monte Carlo via cadeia de Markov	78
3.5.2	Cadeia de Markov	78
3.5.3	Algoritmo de Metropolis-Hastings	78
3.5.4	Amostrador de Gibbs	79
3.5.5	Modelo	80
3.5.6	FBST	82
4	Resultados e discussão	83
4.1	Comentários iniciais	83
4.2	Resultados - Implementação computacional	83
4.2.1	Evolução Diferencial	83
4.2.2	Sensibilidade paramétrica	87
4.2.3	Correlação de parâmetros e matriz de informação de Fisher	94
4.2.4	Introdução do Efeito Fixo	97
4.3	Análises bioquímica e estatística	105
4.3.1	Avaliação dos analitos	106
4.3.2	Acetato	108
4.3.3	ART no ciclo IV	115
4.3.4	Biomassa	115
4.3.5	DeltaCO ₂	121
4.3.6	Etanol	126
4.3.7	Glicerol	131
4.3.8	Lactato	137
4.3.9	Manitol	145
4.3.10	Succinato	150
4.4	Teste Kruskal Wallis	156
4.5	FBST	157
4.6	Validação do modelo	159
5	Conclusões	163
5.1	Trabalhos futuros	164
	Referências	167

CAPÍTULO 1

Introdução

O crescimento da população mundial, associado a uma necessidade crescente de energias modernas, limpas e renováveis impõe pressões adicionais sobre a produção de energia e alimentos. O setor sucroenergético brasileiro é diretamente afetado por esta pressão, uma vez que é responsável pela produção de quase 50% do combustível total consumido no país e 20% do açúcar consumido no mundo (UNICA, 2011). Juntamente com os EUA, o Brasil é responsável por 70% da produção de etanol do mundo (RFA, 2011). Para lidar com o aumento nessas demandas, as indústrias de açúcar e etanol terão de enfrentar o desafio de aumentar a produção de etanol, melhorando o desempenho da fermentação, que é o núcleo do processo, e ao mesmo tempo, elas terão de adaptar-se aos novos cenários econômicos e também aos requisitos de sustentabilidade.

A maioria das plantas produtoras de bioetanol brasileiro opera em batelada alimentada (75% das destilarias), enquanto as instalações restantes adotaram o processo contínuo. Independentemente do método de operação, ambas usam ciclos de células. Em outras palavras, depois de terminar a fermentação, as células de leveduras são centrifugadas e reutilizadas num novo ciclo fermentativo. Como consequência, há redução da necessidade de propagação do fermento, pelo tanto, menos açúcar é desviado para a formação de biomassa. A suspensão de células concentradas de levedura resultante é diluída com água e tratada com ácido sulfúrico concentrado (pH 1,8-2,5) durante 1 a 2 horas, a fim de reduzir a contaminação bacteriana. Esta é uma característica singular do processo fermentativo brasileiro onde as células de levedura são reutilizados pelo menos duas vezes por dia durante o período da safra de 200-250 dias (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Devido à natureza do processo industrial e os grandes volumes de substratos transformados, as condições assépticas são muito difíceis de ser alcançadas e a fermentação normalmente opera com contaminação bacteriana (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Esta é uma das principais causas da redução do rendimento na produção de etanol onde leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são utilizados para fermentar substratos de açúcar ou de amido (NARENDRANATH et al., 1997; NARENDRANATH, 2003).

Não somente o substrato consumido pelas bactérias é desviado e convertido em subpro-

duto, mas alguns metabólitos bacterianos produzem um efeito inibitório no metabolismo de crescimento das leveduras (NARENDRANATH; THOMAS; INGLEDEW, 2001), ocorrência de floculação das células, formação de espuma e queda da viabilidade celular (YOKOYA; MANFIO; VARIANE, 1997; BAYROCK; INGLEDEW, 2004; EGGLESTON et al., 2007).

Como relatado por Kandler e Weiss (1986), os contaminantes bacterianos predominantes na fermentação etanólica são as bactérias lácticas (BALs) do gênero *Lactobacillus*. De acordo com Kandler (1983), Skinner e Leathers (2004), a explicação provável para esta predominância é devido à maior capacidade dos laboratórios em lidar com um pH mais baixo e uma elevada concentração de etanol, em comparação com outros microrganismos.

Devido à complexidade inerente à conversão de substratos em bioetanol pode-se supor que a interação entre leveduras e bactérias ocorre por intermédio de códigos bioquímicos, que são codificados e decodificados no interior das células de cada microrganismo. Assim, a ecologia do processo irá depender da capacidade de adaptação de tais bioagentes para sobreviver em um ambiente fermentativo. Como um benefício potencial, a compreensão deste ecossistema é fundamental para inferir e conduzir o processo com o objetivo de definir as melhores condições para aumentar a produtividade e desempenho fermentativo em indústrias sucroenergéticas. Outro benefício imediato é representada por uma melhor compreensão de como substrato fermentável é transformado em álcool combustível pode contribuir significativamente para executar um processo de fermentação mais controlável e consistente.

Neste contexto, vários modelos cinéticos que descrevem o comportamento de sistemas microbiológicos têm sido propostos na literatura para as células suspensas livremente em qualquer método de operação descontínuo ou contínuo (RAMON-PORTUGAL et al., 1997; REYNDERS; RAWLINGS; HARRISON, 1996; TAN; WANG; MARSHALL, 1996). Entre eles, os modelos não estruturados dar as observações mais fundamentais sobre processos metabólicos microbiana e pode ser considerada uma boa aproximação quando a composição celular é dependente do tempo ou quando a concentração do substrato é elevada em comparação com a constante de saturação (SONNLEITNER; ROTHEN; KURIYAMA, 1997). Além disso, os modelos de controle para a operação de rotina de fermentações industriais muitas vezes são baseadas em modelos simples, não estruturados, uma vez que o computador de processo ajustará os parâmetros do modelo com base na resposta do sistema a perturbações (LIN; TANAKA, 2006).

Um modelo desestruturado bem conhecida para descrever a cinética da fermentação, considerando limitação do substrato, a inibição pelo produto (etanol), e a inibição pela concentração de células de levedura, foi proposto por Lee, Pagan e Rogers (1983), (ANDREWS, 1968) e Haldane (1930). Embora este modelo tem sido adequada para descrever com precisão a cinética da fermentação etanólica (ANDRIETTA; FERREIRA; ANDRIETTA, 2003; FERREIRA, 2005), não tem a capacidade de descrever o efeito de contaminação bacteriana, essencial para aprofundar o conhecimento da dinâmica de bioconversão.

O presente trabalho propõe um modelo estruturado capaz de descrever a interferência de bactérias na cinética de conversão de substratos a partir de cana de açúcar em etanol combustível. Especificamente, o modelo proposto engloba influência bacteriana para o modelo de Lee, Pagan e Rogers (1983), adicionando o termo inibição pelo substrato (HALDANE, 1930). O modelo resultante foi avaliado num ambiente escala laboratorial com as cepas isoladas da levedura *S. cerevisiae* PE- 2 em co-cultura com bactérias de metabolismo heterofermentativo e homofermentativo¹. O balanço de massa demonstrou uma redução do volume de etanol proporcionou são acoplados com o aumento da formação de metabólitos específicos e da biomassa bacteriana. Para o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que modela a influência de bactérias na bioconversão de açúcares em etanol.

Pesquisas anteriores, não apresentam estudos da contaminação presente na cinética do processo. A exemplo disso, Alvarenga (2008), desenvolveu estudos da fermentação de uma co-cultura de leveduras e bactérias, a fim de modelar o crescimento e morte da levedura *S. cerevisiae*. Contudo, este trabalho não apresenta uma análise dos metabólitos e seu consequente impacto no rendimento fermentativo. Ainda nessa linha, Gomes (2009), estudou o antagonismo de bactérias e leveduras, durante ciclos fermentativos de 24 horas, mas sem estudar a cinética fermentativa nem os metabólitos relevantes, visto que o único metabólito avaliado foi o CO₂. Semelhante dificuldade é encontrada quando se avaliam os trabalhos de Parazzi (2006), no qual não se encontram dados sobre a contaminação e em Cherubin (2003), que exclui de suas análises o manitol, importante metabólito para as bactérias heterofermentativas.

Nota-se que em muitos trabalhos relacionados com a fermentação não se introduzem os interferentes da contaminação. O que se pretende nesse trabalho é adicionar uma variável categórica, por meio do que se chama Efeito Fixo e, a partir da análise de Evolução Diferencial, estimação de parâmetros e sensibilidade paramétrica, encontrar um modelo analítico que caracterize a contaminação e aspectos bioquímicos da fermentação.

1.1 Objetivos

O objetivo do presente trabalho é estudar a cinética da fermentação em condições estéreis e contaminadas com dois tipos de bactérias, heterofermentativas e homofermentativas, mostrando o efeito isolado e combinado das bactérias no processo fermentativo. Além disso, a intenção desse trabalho é desenvolver uma metodologia apropriada para estimar parâmetros que participam diretamente da modelagem fermentativa, tanto aqueles que se encontram em condições estéreis, como outros que são observados apenas como efeito da contaminação.

¹Na presente tese, utilizamos o termo bactérias de metabolismo homofermentativo refere-se ao *Lactobacillus plantarum* que na condição do processo industrial apresenta um metabolismo homolático. Taxonomicamente, é apresentado como de metabolismo heterofermentativo facultativo.

1.2 Objetivos específicos - bioquímica

- ❑ Analisar o efeito combinado do crescimento bacteriano e dos metabólitos na cinética da fermentação.
- ❑ Analisar o efeito dos ciclos antes e depois do ciclo escolhido para estudar a cinética.
- ❑ Analisar o impacto das bactérias homofermentativas e heterofermentativas na cinética da fermentação, mostrando as semelhanças e diferenças encontradas.

1.3 Objetivos específicos - engenharia

- ❑ Desenvolver um modelo não linear com efeito fixo, baseado no modelo clássico proposto por Andrietta, Ferreira e Andrietta (2003), que inclui efeitos provenientes das bactérias.
- ❑ Avaliar uma nova abordagem matemática/estatística com efeito fixo na solução de um problema de engenharia.
- ❑ Avaliar uma nova abordagem bayesiana para formular um modelo que auxilie nas conclusões com maior evidência estatística.

Revisão bibliográfica

2.1 Introdução às tecnologias de fermentação

Processos de fermentação de etanol foram recentemente objecto de muita atenção da comunidade científica, devido ao intenso debate sobre energias renováveis, particularmente no que diz respeito às tecnologias de produção de biocombustíveis (LIN; TANAKA, 2006).

Os processos fermentativos são complexos, devido ao fato de seus modelos serem não-lineares, não-determinísticos e até mesmo não-causais, torna-se muito difícil implementar uma lei de controle do sistema sem conhecer suas características a fundo (NETO; COURI, 1996).

Segundo Andrietta (1994), a história da indústria da fermentação alcoólica ¹ passou por dois saltos tecnológicos, o primeiro na década de 30, com o surgimento do processo Melle-Boinot e o segundo, com o surgimento do processo contínuo consolidado na década de 80. Segundo Finguerut et al. (1992), a fermentação contínua é uma evolução natural do processo em batelada alimentada.

As usinas sucroenergéticas brasileiras operam com o sistema de fermentação denominado Melle-Boinot ou com fermentação contínua (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). No processo Melle-Boinot ² as leveduras e uma parte das bactérias que constituem a biomassa são reaproveitadas por centrifugação do vinho em fermentações consecutivas, durante toda a safra canavieira. Sucessivas fermentações podem ser obtidas, se parte da cultura de um ciclo é reutilizada no ciclo seguinte, destas repetições de esvaziamento e enchimento no biorreator se obtém uma operação cíclica de volume variado (OLIVA-NETO,

¹O termo mais conveniente é "fermentação etanólica", dado que o produto principal gerado neste processo é um tipo específico de álcool: o álcool etílico ou etanol, analogamente existem denominações para fermentação láctica, acética, etc. que em geral (apesar de ter exceções) não são agrupadas e referidas como "fermentação ácida". Em consequência, no decorrer deste texto será adotado o termo etanólica ao invés de alcoólica

²O nome Melle-Boinot é pelo autor Firmin Boinot das usinas de Melle (Les Usines de Melle, France). O aporte deste método é a reciclagem de células. Porém, no método francês, o substrato era levado inicialmente ao reator e a biomassa de leveduras era alimentada depois. No método utilizado no Brasil, a biomassa é inoculada no início no reator e, posteriormente é alimentado o substrato.

1990). Pirt (1974), utilizou o termo cultivo fed-batch repetido e estabeleceu um estado "quase"equilibrado onde a taxa específica da formação de produto.

O processo descontínuo alimentado, fed-batch ou batelada alimentada permite um ajuste da velocidade de alimentação e a otimização como foi proposto por Aiba, Nagai e Nishizawa (1976), baseada no controle da cinética do processo, com velocidades abaixo do nível que induz um estresse osmótico e a repressão catabólica na levedura (PERINGER; BLACHERE, 1979) e em casos de aeração elevada, manter acima do nível crítico (70 mg/L) para induzir ao chamado "efeito da glicose"ou "efeito Crabtree"evitando-se o desvio do substrato para biomassa. Além disso, diminui os riscos de contaminações, permite a parada da usina e reinício do processo sem maiores prejuízos no fermento ³.

No entanto, Borzani (1960) e Facciotti (2001) apresentam as vantagens do processo contínuo: maior produtividade pela redução do tempo morto ou não-produtivo, maior uniformidade do produto, maior adaptabilidade e facilidade na aplicação de técnicas avançadas de controle, menores equipamentos.

Segundo Wheals et al. (1999), 70% das usinas conduziam o processo fermentativo em batelada alimentada, ao passo que Amorim e Leão (2005) e Brethauer e Wyman (2010), publicaram que 80% a 85% das usinas no Brasil utilizam a batelada alimentada para a obtenção de etanol.

2.2 A complexidade da fisiologia da fermentação etanólica

Segundo Boccara (2010) um sistema complexo se caracteriza pela existência de uma dinâmica global emergente e resultante de ações das suas partes. Um sistema complexo não tem um comportamento imposto por um controlador central, mas sim por múltiplos agentes que o levam a exibir um comportamento coordenado. Os sistemas complexos exibem algumas características comuns:

1. Consistem de um grande número de agentes que interagem entre si;
2. Exibem emergência, isto é, um comportamento de auto-organização coletiva difícil de prever a partir do conhecimento do comportamento dos agentes isolados;
3. O comportamento emergente não resulta da existência de uma central de controle.

O microrganismo principal, responsável pela fermentação etanólica é um fungo unicelular de aproximadamente $60\mu m^3$ de volume (PHILLIPS; KONDEV; THERIOT, 2009) que se

³O termo fermento, no âmbito das usinas sucroenergéticas, refere-se à mistura de leveduras, bactérias, o resto do vinho bruto e a água.

reproduz predominantemente por brotamento (RUSSELL, 2003) e pertence ao gênero *Saccharomyces* e a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo Tortora, Funke e Case (2010) uma célula de levedura pode produzir mais de 24 células filhas por brotamento.

Este tipo de fungo, chamado de levedura é o único organismo vivo conhecido que pode mudar da respiração para fermentação (RUSSELL, 2003), a levedura fermenta porque é a única forma que desenvolveu para gerar energia e conseguir sobreviver no meio anaeróbio.

A *S.cerevisiae* tem um conjunto de vias metabólicas, e a interação com o meio externo, é exposta a vários tipos de estresse tanto térmico, osmótico e oxidativo. Estudos revelaram que cerca de 14% (900 genes) do genoma da levedura foi alterado em forma similar no perfil de expressão gênica, quando reagem a um ambiente estressante (GASCH et al., 2000).

As leveduras, mesmo na presença de oxigênio, vão sempre escolher a rota fermentativa para utilizar a glicose quando este substrato apresenta-se em alta concentração (o chamado efeito Crabtree), por isso, não pode ser considerado um microrganismo anaeróbio facultativo sensu stricto (RUSSELL, 2003).

O primeiro genoma do reino eucariótico a ser sequenciado foi da levedura *S. cerevisiae*, se estima que 23% deste genoma é compartilhado com o ser humano, e que 6275 genes foram identificados. Diversas manipulações genéticas tem sido exploradas na tentativa de melhorar o rendimento fermentativo. Um modelo metabólico, totalmente compartimentalizado, em escala genômica foi reconstruído por Herrgård et al. (2008), e nele, foram obtidos 832 genes, 888 proteínas 1168 metabólitos e 96 proteínas complexas catalíticas completando 2153 espécies e 1857 reações das quais 1761 correspondem a reações metabólicas e 96 a reações de formação complexa localizados em 15 compartimentos (citoplasma, mitocôndria, núcleo, extracelular etc.).

O tipo mais comum de glicólise, descrito pela via metabólica *Embden-Meyerhof-Parnas*, envolve só 10 reações intracelulares que agem no catabolismo da oxidação da glicose para a formação do piruvato (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010). As reações pós-glicólise são duas até a formação de etanol, desta forma, somente 12 reações das 1761 possíveis dentro da célula *S. cerevisiae* são necessárias para a formação do etanol. Duas conclusões se inferem destas informações: (1) a aparente simplicidade para a produção de etanol dentro da célula da levedura e (2) a incerteza subsequente devido à grande quantidade de rotas alternativas que podem ser percorridas durante o processo fermentativo, produzindo dificuldade no balanço de massa em virtude da indeterminação da origem de uma porcentagem do açúcar metabolizado no processo. Outras incertezas aparecem quando a levedura produz metabólitos que ela mesma consome posteriormente como, por exemplo, o ácido málico que pode ser assimilado até em 92.4% (KIRTADZE; NUTSUBIDZE, 2009). Na Figura 1 é apresentado um mapa com as redes metabólicas da levedura *S. cerevisiae*.

Figura 1 – Redes metabólicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fonte: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Metabolic pathways - *Saccharomyces cerevisiae* budding yeast)

A equação estequiométrica da glicólise é:

Logo após a obtenção do piruvato, ele é catabolizado para produzir etanol:

A resposta adaptativa aos estresses, conhecido como resistência cruzada ao estresse (do termo inglês *cross-protection*), ocorre quando as células da levedura adquirem resistência a uma condição severa de estresse, em decorrência da submissão previa a uma forma mais branda do mesmo ou diferente tipo de estresse (RUIS; SCHULLER, 1995; SIDERIUS; MAGER, 1997). Imagina-se que o fenômeno de resistência cruzada ocorra como uma consequência do mecanismo geral de resposta ao estresse que é ativada sob condições mais brandas de estresse (LEWIS; LEARMONTH; WATSON, 1995; CHEN et al., 2003). Por exemplo, um leve choque de temperatura fornece a levedura não somente uma resistência a uma temperatura mais elevada, mas também para várias outras fontes de estresse, como o etanol, elevada concentração de sais, estresse oxidativo, e a exposição a radiação (CARMELO et al., 1998).

A existência de resistência cruzada levou a especulação de que condições de estresse necessitam de um mecanismo geral de resposta ao estresse que envolvem funções celulares como proteção celular, metabolismo energético e produção de proteínas protetoras HSP (do inglês *Heat Shock Proteins*) ou armazenamento de carboidratos (p.e.: a trealose). A produção de trealose e HSPs estão entre as formas de resposta mais notáveis associadas à resistência cruzada. Tal fenômeno de resistência cruzada é uma evidência para as respostas observadas ao estresse em geral (RUIS; SCHULLER, 1995; SIDERIUS; MAGER, 1997).

No entanto, sob certas condições particulares, não foi possível observar a aquisição da resistência cruzada ao estresse, existindo exemplos não recíprocos de resistência cruzada (SIDERIUS; MAGER, 1997). Em consequência, a resistência cruzada ao estresse não é universal, dando indícios de que enquanto uma pequena porção da resposta ao estresse é comum e pode ser compartilhada, existem respostas específicas ao estresse que devem ser relacionadas a um tipo específico de dano imposta sobre a célula por um estresse em particular. A levedura submetida ao estresse alcoólico tem dificuldades iniciais para manter a produção energética, promovendo um aumento na expressão dos genes associados com as atividades de geração de energia como a glicólise, funções mitocondriais e diminuição nas taxas de expressão de muitos genes associadas com os processos que consomem energia, como o crescimento celular.

Futuros estudos acerca da resposta da *S. cerevisiae* ao estresse alcoólico devem continuar a explorar o comportamento energético da célula estressada, particularmente o papel dos mecanismos associados à restauração do balanço de NAD^+/NADH , incluindo aquelas associadas com a mitocôndria (STANLEY et al., 2010).

As fases da fermentação etanólica, a pesar de não poder distinguir os limites de separação, segundo Lima, Aquarone e Borzani (1975), são três : i) fase preliminar, caracterizada pela adaptação da levedura ao novo meio com substrato, e restringida produção de CO_2 . ii) fase principal ou tumultuosa, com intensa produção de dióxido de carbono e etanol e aumento da temperatura; e iii) fase completar com a queda da produção de etanol e esgotamento do substrato.

As fases do crescimento dos microrganismos, apresentadas na Figura 2 são: i) fase *lag*: na qual a levedura está na fase de adaptação metabólica ao estresse osmótico inicial; ii) fase exponencial: onde se produz a maior taxa de crescimento da biomassa; iii) fase estacionária: onde a taxa de crescimento e morte é semelhante ; e iv) fase de declínio: onde a taxa de morte é maior que a de surgimento de novas leveduras (DORAN, 1995).

Na fermentação etanólica, o produto metabólico principal está associado ao crescimento da biomassa (MACAULEY-PATRICK; FINN, 2008), por esse motivo, a fase exponencial de crescimento estará sincronizada com a fase tumultuosa da fermentação – uma é consequência da outra. Na fermentação em batelada alimentada a fase estacionária é seguida pela fase de centrifugação e de tratamento ácido.

Figura 2 – .- Curva de crescimento típica na fermentação tipo batelada. Fonte: Modificado de Doran (1995)

No entanto, um fenômeno estudado por Longo, Gralla e Valentine (1996), que acontece no início da fase estacionária, quando se esgota a glicose, é a diauxia, esta segunda fase de adaptação, inicia-se quando os nutrientes são limitados e o metabolismo, para gerar energia, transmuta a respiração, neste ponto, são sintetizadas proteínas da mitocôndria, a taxa de crescimento decresce e as células utilizam etanol ou outras fontes de carbono para produzir energia -a levedura pode metabolizar até 0,7% do etanol do meio (KIRTADZE; NUTSUBIDZE, 2009). Depois desta fase, trealose, glicogênio e compostos de proteção como enzimas e metabólitos antioxidantes são armazenados e a célula torna-se mais resistente ao estresse, não se produz divisão celular, o metabolismo se torna mais lento e levedura pode sobreviver por semanas até meses atingindo assim, uma “verdadeira” fase estacionária (LONGO; GRALLA; VALENTINE, 1996).

Em síntese, a sinergia e o antagonismo levedura/levedura, bactéria/bactéria, bactéria/levedura, as complexas vias metabólicas, o fenômeno de resistência cruzada das leveduras, as mudanças biológicas e químicas produzidas pela alta taxa de recombinação dos genes das leveduras e os efeitos do estresse térmico, acidez, toxicidade, osmótico e oxidativo do meio formam parte do conjunto de interações complexas que determinam o estado da fermentação.

2.3 A importância da contaminação bacteriana

Os primeiros relatos de contaminação bacteriana no processo de fermentação são de Pasteur em 1873, em trabalhos onde o autor foi solicitado para pesquisar as "doenças" dos vinhos.

Segundo Gallo (1989), a primeira publicação no Brasil que menciona as fermentações acética, láctica, butírica e da dextrana como acidentes da fermentação etanólica do caldo de cana-de-açúcar e melaço é de (NEVES, 1938).

Devido à natureza do processo industrial e aos grandes volumes de processamento do substrato, condições de assepsia são muito difíceis de alcançar e a fermentação normalmente opera com contaminação bacteriana (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

O substrato típico nas usinas no Brasil é uma mistura de caldo das moendas e de melaço que é um subproduto da linha de produção de açúcar. Neste meio composto denominado dentro das usinas e destilarias como mosto, existem condições de temperatura, pH e abundância de micronutrientes que favorecem a contaminação (GALLO, 1989).

A contaminação bacteriana é uma das principais causas de redução do rendimento da produção de etanol durante as fermentações por *S. cerevisiae* com matéria-prima de amido ou açúcar (NARENDRANATH et al., 1997; NARENDRANATH, 2003). Não só o substrato consumido pelas bactérias é desviado e convertido em subprodutos, mas também, esses metabólitos bacterianos produzem um efeito inibitório no metabolismo de crescimento das leveduras (NARENDRANATH; THOMAS; INGLEDEW, 2001), floculação das células, formação de espuma e queda da viabilidade (YOKOYA; MANFIO; VARIANE, 1997; BAYROCK; INGLEDEW, 2004; EGGLESTON et al., 2007).

A floculação é um fenômeno que se ocorre quando as células individuais das leveduras formam agregados ou flocos que sofrem sedimentação ou flotação (ROSA, 2008). Pode-se classificar como: autofloculação, quando crescem intrinsecamente floculadas pelas características fenotípicas da linhagem; e, co-floculação, quando o fenômeno é formado entre linhagens diferentes de leveduras ou entre leveduras e bactérias (STEWART; RUSSELL; GARRISON, 1975; STAHL; KÜES; ESSER, 1983).

Para exemplificar as perdas produzidas pela contaminação bacteriana, apresenta-se na Tabela 1, um estudo com a estimativa de perda de álcool em função da população de *Lactobacillus* presentes no processo (KELSALL; LYONS, 2003).

Estratégias para detecção, identificação, monitoramento e controle da contaminação por bactérias e leveduras selvagens tem sido apresentadas recentemente por Muthaiyan, Limayem e Ricke (2011), Beckner, Ivey e Phister (2011), Ivey e Phister (2011).

2.4 Bactérias homofermentativas e heterofermentativas

As “bactérias lácticas”, “bactérias de ácido láctico” ou “bactérias ácido-láticas” (BALs) são um grupo de microrganismos procarióticos, gram-positivos que produz ácido láctico como maior produto do metabolismo de carboidratos (KANDLER; WEISS, 1986). Desenvolvem-se em meio ligeiramente ácido e em condições anaeróbias e microaerófilas.

Tabela 1 – Perdas de etanol em função da população de bactéria.

Bactérias ^a (UFC/mL)	Perda de álcool (%v/v)	Perda de álcool ^b (L)
10 ⁵	0.1-0.2	303.000
10 ⁶	0.2-0.4	848.000
10 ⁷	0.6-1.0	2.120.000
10 ⁸	0.9-1.2	2.544.000
10 ⁹	1.0-1.5	3.180.000

^a Depende da linhagem de bactéria láctica^b Perda máxima calculada com base em produção de 151.000 m³/ano

Fonte: Kelsall e Lyons (2003)

Não possui o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória clássica, fator limitante para ambientes com baixas concentrações de oxigênio (KANDLER; WEISS, 1986).

O primeiro trabalho de classificação das BALs foi apresentado por Orla-Jensen (1919). Kandler e Weiss (1986), Cherubin (2003) e Wright e Axelsson (2011), descreve-as em função do seu metabolismo em:

1. Homofermentativos ou homoláticas obrigatórios (Grupo I); Por intermédio da via Embden-Meyerhof-Parnas metabolizam 1 mol de hexoses em 2 moles de ácido láctico. Não tem capacidade metabólica para assimilar pentoses ou gluconato;
2. Heterofermentativos ou heteroláticas facultativo (Grupo II); Realizam fermentação de forma semelhante ao grupo homofermentativo, porém, algumas espécies produzem outros ácidos em condições limitantes de glicose. Pentoses são catabolizadas em ácido láctico e acético pela via 6-fosfogluconato/fosfocetolase;
3. Heterofermentativos ou heteroláticas obrigatórios (Grupo III): convertem 1 mol de hexoses em 1 mol de CO₂, 1 mol de etanol ou de ácido acético, e 1 mol de ácido láctico por intermédio da via 6-fosfogluconato. Pentoses são reduzidas a ácido láctico e acético.

Na Tabela 2, apresenta-se a classificação das BALs do gênero *Lactobacillus* realizada por Kandler e Weiss (1986), incluindo algumas espécies agrupadas pelo tipo de metabolismo.

O *L. plantarum* é uma BAL do grupo heterofermentativa facultativa, muito versátil e flexível é encontrada numa variedade de nichos ambientais incluindo alguns produtos lácteos, carne, vegetais e muitas fermentações de plantas ou vegetais, além de viver no trato intestinal dos mamíferos. A linhagem WCFS1, foi isolada da saliva humana, e sequenciada pela primeira vez por Kleerebezem et al. (2003), é o lactobacilo mais conhecido e estudado e foi o primeiro genoma dos lactobacilos a ser sequenciado, considerado um

Tabela 2 – Classificação do gênero *Lactobacillus*.

Características	Grupo I, Obrig. Homofermentativa	Grupo II, Facul. Heterofermentativa	Grupo III, Obrig. Heterofermentativa
Fermenta pentoses	-	+	-
CO ₂ de glicose	-	-	+
CO ₂ de gluconato	-	+ ^a	+ ^a
FDP aldolase presente	+	+	-
Fosfoquetolase presente	-	+ ^b	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbrückii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. reuteri</i>

^a Quando fermenta^b Inducido por pentoses

Fonte: Sharpe (1981) e Kandler e Weiss (1986)

microrganismo modelo. Siezen e Vlieg (2011) e Siezen et al. (2012), realizaram o completo resequenciamento desta mesma linhagem e realizaram reconstrução da rede metabólica desta bactéria a partir do genoma (TEUSINK et al., 2005); (FRANCKE; SIEZEN; TEUSINK, 2005). Um modelo das redes metabólicas do *L. plantarum* foi apresentado por Teusink et al. (2006), incluindo 721 genes, 643 reações, 434 metabólitos internos e 97 externos. Outro trabalho, apresentado por (GOFFIN et al., 2010), construiu o modelo com 775 proteínas e 781 reações. Uma fração do metabolismo principal das bactérias lácticas no meio fermentativo é apresentado nas Figuras 3 e 4.

Os contaminantes bacterianos majoritários durante a fermentação etanólica são BALs, provavelmente devido à sua maior capacidade de lidar com baixos valores de pH e concentrações elevadas de etanol em comparação com outros microrganismos (KANDLER, 1983; SKINNER; LEATHERS, 2004).

A microbiota bacteriana presente nas usinas é muito extensa, nesse sentido, a quantidade de espécies e linhagens presentes é muito grande. Um levantamento bibliográfico foi feito baseado principalmente nas pesquisas de Gallo (1989), que isolou 334 culturas; Rosales (1989), que isolou 222 culturas e Oliva-Neto (1995), que isolou 44 culturas. Estudos realizados a nível só de linhagem como o de Maeda (1997), que isolou 32 bactérias acéticas da espécie *Acetobacter*. Um resumo da microbiota encontrada nos principais estudos é apresentado nas Figuras 5, 7 e 6

A conclusão principal é a predominância das BALS na contaminação bacteriana do processo de fermentação etanólica e dentro deste grupo os lactobacilos são o gênero majoritário; assim mesmo, o *L. fermentum* é a espécie que apresentou maior adaptação ao processo seguido do *L. plantarum* e *L. murinos*.

Figura 3 – .- Metabolismo das bactérias heteroláticas. Fonte: Inês (2007), Wright e Axelsson (2011)

2.5 A interação entre leveduras e bactérias

Leveduras e BALs são frequentemente encontradas coexistindo juntas em numerosos ecossistemas naturais (ALEXANDER, 1971; NARENDHRANATH; POWER, 2005), porque elas possuem muitos requerimentos ecológicos comuns (DEAK, 2006).

As interações encontradas quando se misturam populações de microrganismos podem ser classificadas por seu efeito em: Diretas; refere-se a predação e parasitismo e Indiretas; refere-se a competição, comensalismo, mutualismo, amensalismo ou antagonismo e neutralismo (BULL; SLATER, 1982; LINTON; DROZD, 1982; FREDRICKSON, 1977). Na fermentação para a obtenção de bioetanol predomina o amensalismo entre as leveduras e BALs; no entanto, em fermentações de alimentos e bebidas o desenvolvimento das qualidades nutricionais e organolépticas dos produtos depende da atividade metabólica simultânea de uma sucessão destes microrganismos (VERACHTERT; KUMARA; DAWOUD, 1990).

Estudos da estrutura das comunidades microbianas de *S. cerevisiae* com BALs e as

Figura 4 – .- Metabolismo das bactérias homoláticas Fonte: Inês (2007), Wright e Axelsson (2011)

suas relações tróficas foram realizados por Kennes et al. (1991), eles concluíram que o uso de meios modelos (refere-se a meios definidos com específicas quantidades de nutrientes, temperatura e pH), não forneceram uma completa imagem de um complexo ecossistema natural –que contém muitas atividades metabólicas das populações subdominantes e são caracterizados por sua complexa composição química e microbial mudando e evoluindo constantemente -, mas permitirão uma simulação e interpretação de uma parte deste.

Estudos relevantes de Oliva-Neto (1995), Narendranath et al. (1997), Kelsall e Lyons (2003), Dorta (2006), demonstraram uma alta complexidade e acoplamento nos fatores bióticos e abióticos que determinam o estado da fermentação etanólica. Desta forma, só uma abordagem holística que modele as interações sinérgicas e antagônicas entre os microrganismos e suas condições de contorno poderá elucidar o seu estado analisá-lo e fornecer o conhecimento suficiente para uma tomada de decisão que melhore o processo.

Narendranath et al. (1997), trabalhou com cinco linhagens de lactobacilos (o estudo incluiu duas linhagens enviadas pelo (Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) - Brasil) e de-

Figura 5 – Identificação de 44 culturas da microbiota bacteriana Usina Santa Adélia e Usina Modelo (Jaboticabal)

Fonte: Oliva-Neto (1995)

Figura 6 – Identificação de 334 culturas da microbiota bacteriana Usina Costa Pinto, Piracicaba, Julho-Dez.

Fonte: Gallo (1989)

monstrou uma correlação entre o número de bactérias e o teor de ácido lático; assim como o comportamento metabólico diferencial das espécies de leveduras heterofermentativas e homofermentativas. Pode-se ver na Figura 8, uma concentração de 0,5 %m/v de ácido lático foi produzida por uma população de 10^5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do inglês (CFU)/mL. de *L. rhamnosus* (homofermentativa) ou de 10^9 CFU/mL. de *L. fermentum* (heterofermentativa), sendo ambas do mesmo gênero *Lactobacillus*.

A redução na produção de etanol depende da linhagem, que pode variar de 0,4% até 0,8% com uma população de 10^9 . Narendranath, Thomas e Ingledew (2001), estudaram o

Figura 7 – Identificação de 222 culturas da microbiota bacteriana industrial.

Fonte: Rosales (1989)

Figura 8 – Correlação entre a população inicial de *lactobacillus* e a concentração de ácido láctico.

Fonte: Narendranath et al. (1997)

efeito do ácido láctico e acético no crescimento de leveduras e estabeleceu as concentrações inibitórias mínimas para desencadear a reação inibitório na *S. cerevisiae*; ao passo que, outro estudo de Graves et al. (2006) demonstrou que os efeitos inibitórios não eram tão grandes como os estudos prévios.

Oliva-Neto (1990), trabalhou com isolamento, taxonomia e testes de resistência ao etanol para selecionar BALs de dornas de fermentação industrial. Logo conduziu 18 ciclos fermentativos em co-cultura com uma linhagem de *L. fermentum*. Os resultados mostraram que em concentrações acima de 4,8 g/L. de ácido láctico e com uma relação de

levedura/bactéria inferior a 0,9 a viabilidade e vitalidade das leveduras foram seriamente comprometidas.

Adicionalmente, a acidez total do vinho tem correlação inversa com a proporção levedura/bactéria e está correlacionada diretamente com a população de BALs até um limite, a partir do qual, o aumento da população bacteriana não corresponde mais a correlação com tais fatores.

Oliva-Neto (1995), continuou os estudos para entender a interação das bactérias e leveduras em co-cultura durante 30 ciclos fermentativos, e concluiu que não ocorre crescimento quando as bactérias estão em cultura pura e que necessitam da autólise da levedura para crescer, principalmente dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina que são fornecidos nesse processo de estiolamento celular (extrato de levedura 1% propicia uma forte infecção bacteriana). Outros fatores como: tempo de fermentação longo favorece às bactérias, baixas velocidades de centrifugação, sais e vitaminas não são necessários para que ocorra crescimento de *L. fermentum*.

Estudos de Eggleston et al. (2007), confirmaram que o manitol, um álcool de açúcar, metabólito produzido exclusivamente pelas BALs pode ser utilizado como um indicador bioquímico da contaminação. Novos estudos de Basso (2006), demonstraram que a produção e excreção de manitol é característica exclusiva das bactérias lácticas heterofermentativas, constitui-se então, no segundo metabólito bacteriano mais abundante, depois do lactato, responsável pelo desvio do açúcar na fermentação etanólica.

Segundo Alves (1994), o ácido succínico é produzido quase que exclusivamente por leveduras, considera-se o principal ácido produzido por este microrganismo pelo fato de ser catabolizado em maiores quantidades. Segundo Oura (1977), a sua formação é provavelmente resultado do desenvolvimento celular sob condições anaeróbias, pois não se encontra nenhuma razão fisiológica para a sua produção. Não obstante, Basso, Alves e Amorin (1997) e Klerk (2010), pesquisaram a ação deste ácido e concluíram que atua sinergicamente com o etanol como antibacterianos naturais, tornando a levedura mais competitiva no meio fermentativo, mostrando uma elegante função ecológica.

O glicerol ocupa o segundo lugar nos metabólitos produzidos com maior quantidade pela *S. cerevisiae* durante a fermentação. Em condição anaeróbia, a *S. cerevisiae* produz glicerol para manter o balanço de redox que sustenta o processo de glicólise (NORDSTROM, 1966; OURA, 1977). Além disso, exerce uma importante função de proteção fisiológica contra o estresse osmótico (OURA, 1977; CRONWRIGHT; ROHWER; PRIOR, 2002).

A adaptação constitui a qualidade mais importante no meio competitivo da fermentação etanólica, desta condição, dependerá a dominância e persistência de uma determinada linhagem de levedura ou bactéria durante os ciclos do processo. Jones e Greenfield (1984), mostraram que é possível obter respostas adaptativas de tolerância ao etanol em curto prazo em leveduras *S. cerevisiae*. No experimento, aclimatou as leveduras expostas a 7% m/v (do inglês w/v) de concentração de etanol durante 16 residências de 30 horas

em um quimiostato. As células foram lavadas e expostas a 12% m/v de concentração de etanol durante três dias, e demonstrou que a tolerância das células adaptadas foi de 40 vezes maior que a das progenitoras em termos de resistência à morte celular.

Pesquisas com bactérias tentaram avaliar a dinâmica de adaptação e diversificação da espécie *E. Coli* durante 1500 dias, onde dez mil gerações foram seguidas por Lenski e Travisano (1994), e concluíram que as duas métricas escolhidas: tamanho celular e aptidão (do inglês *fitness*) mudaram rapidamente durante as primeiras dois mil gerações. No entanto, segundo Rainey (2004), o tempo de adaptação de bactérias pode ser de até dez gerações e explica que a diferença entre a adaptação genética e a aclimação fenotípica se encontra na reversibilidade do genótipo, em função do meio ambiente. Apresenta também, a fenotípica diversidade de populações de bactérias cultivadas em ambientes heterogêneos depois de sete dias (RAINEY; TRAVISANO, 1998).

Pode-se concluir que as interações das leveduras e bactéria ocorrem por intermédio de códigos bioquímicos que são codificados e decodificados dentro das células de cada microrganismo; assim, a ecologia do processo dependerá da capacidade de adaptação para sobreviver no meio ambiente fermentativo de cada um destes bioagentes. O entendimento desse ecossistema é fundamental para interferir e conduzir o processo com o objetivo de aumentar a produtividade e rendimento nas usinas sucroenergéticas.

2.6 Modelos da fermentação etanólica

Modelos estruturados consideram os estados internos das células, eles incorporam atributos genéticos, morfológicos e bioquímicos que coletivamente determinam o estado fisiológico da biomassa, essas qualidades fornecem um grande potencial para descrever o fenômeno do crescimento em forma integral, respostas e tendências podem ser reconhecidas e mudanças na composição da biomassa medidas (LIAO et al., 1988). Assim, a estruturação do modelo é função dos componentes da biomassa: concentração de metabólitos, enzimas, DNA e RNA (MRWEBI, 2004). Uma forma didática de apresentar a diferença nestes modelos é apresentada na Figura 9.

Vários modelos cinéticos foram propostos na literatura para células livres em suspensão tanto em modo batch quanto em operação contínua (TAN; WANG; MARSHALL, 1996).

Modelos não estruturados se restringem as informações “mais relevantes” do estado dos processos metabólicos microbianos e podem ser considerados uma boa aproximação quando:

- ❑ A concentração de substrato é alta comparada com a constante de saturação e a composição celular;
- ❑ Há tempo suficiente para permitir o equilíbrio na composição interna da célula, ou seja, todos os componentes das células crescem ao mesmo tempo, em condição

		<i>Unstructured</i>	<i>Structured</i>
<i>Characteristics</i>		Reactions rates are described by input/output rates (q) that depend on the environment	Reaction rates are functions also of parameters of intra-cellular compartments (a, b)
Non-segregated	All cells are similar	$q_s \rightarrow \text{cell} \rightarrow q_p$	$q_s \rightarrow \text{cell} \xrightarrow{q_{ab}} \text{cell} \xrightarrow{q_{bp}} \text{out}$
Segregated	The population contains cells with different properties	$q_{s1} \rightarrow \text{cell}_1 \rightarrow q_{p1}$ $q_{s2} \rightarrow \text{cell}_2 \rightarrow q_{p2}$

Figura 9 – Classificação dos modelos da fermentação.

Fonte: Enfors e Haggstrom (1999)

de crescimento balanceado (NIELSEN; VILLADSEN, 1992; SONNLEITNER; ROTHEN; KURIYAMA, 1997).

A utilização de uma técnica matemática em conjunto com as medições permite estimar parâmetros e valores de variáveis de processo que não podem ser acessados diretamente. Estimativas on-line permitem o refinamento do desempenho e a capacidade para consultar o estado metabólico da célula e dos reatores. A Figura 10 fornece uma descrição qualitativa da relação entre a confiabilidade de uma estimativa on-line e a complexidade do identificador. O grau de precisão da estimação do estado do processo depende da disponibilidade e da precisão de medições de variáveis do processo como: pH, OD! (OD!) e da composição dos gases presentes no biorreator. Demais medidas como a de produtos metabólicos extracelulares ou metabólitos intracelulares podem fornecer uma melhor descrição do Sistema. Entretanto, deve-se ressaltar que tais medições podem ser muito imprecisas (medições intracelulares são intrinsecamente mais difíceis de realizar e tem metabólitos intermediários com um rápido turnover) e incompletas. Dessa forma, a melhoria do desempenho do estimador não pode ser garantida (KOMIVES; PARKER, 2003).

O esquemático descreve o efeito da complexidade do modelo no desempenho do estimador. Conforme as informações aumentam e tornam-se disponíveis, eleva-se o desempenho teórico do estimador. Estas informações incluem: DO, pH, temperatura (T), gases de saída, substratos, biomassa, produtos metabólicos e metabólitos intracelulares (IM) (KOMIVES; PARKER, 2003).

No entanto, Lin e Tanaka (2006), indicam que os modelos de controle para processos de fermentação industrial são geralmente baseados em abordagens simples e não estrutu-

Figura 10 – Efeito da complexidade do modelo no desempenho do estimador.

Fonte: Komives e Parker (2003)

radas, para que o sistema de identificação computacional possa ajustar os parâmetros do modelo a partir da resposta do sistema a distúrbios.

Lin e Tanaka (2006), faz uma revisão desde modelos simples e estruturados como o proposto por Mori, Konno e Terui (1970), e outros não estruturados mais complexas que incluem a inibição pelo substrato e pelo produto (OH et al., 2000). Outros modelos que consideram aminoácidos e glicose como substrato foram propostos por Korte et al. (1991). Lei, Rotbøll e Jørgensen (2001) apresenta um modelo adequado para um quimiostato e limitado para dinâmicas batch e fed-batch, ou mudando a taxa de diluição. Uma nova abordagem baseada na modelagem da tendência é apresentado por Visser et al. (2000). Os autores assumem que a dinâmica dos metabólitos é determinada pela estrutura estequiométrica da rede metabólica e pelas diferentes interações alostéricas e não mais, pelos mecanismos enzimáticos exatos; essa abordagem permitiu simplificar o modelo de Rizzi et al. (1997) reduzindo no numero de parâmetros de 84 para 35.

Um modelo bioquímico estruturado foi proposto por Sansonetti et al. (2011) para fermentação etanólica em modo batch com a levedura *Kluyveromyces marxianus*, e com lactose como substrato. Este modelo permite prever os coeficientes de rendimento de biomassa, produtos, e manutenção, utiliza restrições metabólicas em concordância com o balanço de massa e com o balanço bioenergético, mantendo a integridade termodinâmica. Uma análise correlação de parâmetros cinéticos foi adicionada para avaliar a confiabilidade do mesmo.

Um estudo de onze modelos não estruturados foi realizado por Birol et al. (1998): os modelos de Monod, Moser e Teissier foram utilizados para representar a cinética sem

inibidores; os modelos de Andrews e Noack, Aiba e Luong incluem o efeito de inibição pelo substrato; e finalmente os modelos de Levenspiel, Aiba, Jerusalimsky, Ghose e Tyagi, e Hinshelwood adicionam o efeito de inibição pelo produto, os modelos de Monod e Hinshelwood foram os mais apropriados para descrever o processo em batelada .

Segundo Lin e Tanaka (2006), nenhum desses estudos têm apresentado um modelo geral suficientemente bem desenvolvido para simular o processo considerando simultaneamente os quatro fatores que afetam o processo fermentativo: limitação do substrato, inibição pelo substrato, inibição pelo produto e morte celular. No entanto, Andrietta, Ferreira e Andrietta (2003), apresentou um modelo que inclui três destes fatores sendo que a morte celular foi desconsiderada.

Os modelos não estruturados, embora aplicados com sucesso a diversos processos fermentativos, envolvem algumas limitações devido à falta de estrutura, o que resulta numa deficiência na descrição das reações do processo, em virtude de estar constituídos principalmente por equações empíricas que podem ser muito úteis para descrever as principais variáveis do processo, mas revelam quase nada sobre os mecanismos por trás do fenômeno observado (SANSONETTI et al., 2011).

Assim, são necessários esforços adicionais para se deduzir modelos capazes de fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos que regulam o processo de fermentação. Para este fim, uma abordagem de modelos bioquimicamente ou metabolicamente estruturados, foi introduzida por Roels (1980).

Tosetto (2002), utilizou seis modelos do tipo não estruturado sendo eles: Ghose e Tyagi (1979); Sevely et al. (1981), Jin, Chiang e Wang (1981); Lee, Pagan e Rogers (1983); Levenspiel (1980); e Ghose modificado e concluiu que os modelos que mais se adequaram aos resultados experimentais são o modelo de Ghose modificado e de Jin, Chiang e Wang (1981). Utilizando um único substrato e foi proposto um modelo com dois substratos (glicose e frutose) que melhorou a resposta do modelo de Ghose modificado.

Conclui-se que o modelo proposto por Lee, Pagan e Rogers (1983), modificado para incluir a inibição pelo substrato de acordo com o modelo de Haldane (1930), foi aplicado por Andrietta, Ferreira e Andrietta (2003), e que inclui quatro fatores mais importantes da fermentação etanólica 3: limitação do substrato, inibição pelo substrato, inibição pelo produto e inibição pela concentração celular; é o mais adequado para descrever a cinética do processo.

2.7 Estimação de parâmetros e otimização

Segundo Aguirre (2007), há varias formas de classificar técnicas de modelagem, uma delas faz com três grupos denominados: modelagem caixa branca, modelagem caixa preta e modelagem caixa cinza.

Na modelagem caixa branca é necessário conhecer bem o sistema e as leis físicas que

Tabela 3 – Modelos matemáticos para a fermentação etanólica.

Referência	Modelo
Sem inibição (Monod)	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s}$
Haldane (1930)	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s + \frac{s^2}{k_i}}$
Ghose e Thyagi (1979)	$\mu = \mu_m \frac{s}{s + k_s + \frac{s^2}{k_i}} \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)$
Levenspiel (1980)	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s} \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^n$
Lee et al. (1983)	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s}\right) \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^n \left(1 - \frac{x}{x_{max}}\right)^m$
Severly et al. (1980)	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s}\right) \left(\frac{k_p}{p + k_p}\right) \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^m$
Han e Levenspiel (1987)	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s}\right) \left(1 - \frac{s}{s_{max}}\right)^m \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^n$
Tosetto (2002)	$\mu = \mu_m \frac{s}{s + k_s + \frac{s^2}{k_i}} \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^n$
Andrietta et al. (2003)	$\mu = \left(\mu_m \frac{s}{k_s + s + \frac{s^2}{k_i}}\right)^n \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^n \left(1 - \frac{x}{x_{max}}\right)^m$

μ_m - Velocidade específica máxima de crescimento celular
 μ - Velocidade específica de crescimento celular
 k_s - Constante de saturação de Monod
 k_i - Constante de inibição pelo substrato
 k_p - Constante de inibição pelo produto
 p_{max} - Concentração do produto em que cessa o crescimento celular
 x_{max} - Concentração da biomassa em que cessa o crescimento celular
 s_{max} - Concentração do substrato em que cessa o crescimento celular
 m - Potência do termo de inibição pela biomassa
 n - Potência do termo de inibição pelo produto

Fonte: Borges (2008)

o descrevem, é também conhecida como modelagem pela física ou natureza do processo ou modelagem fenomenológica ou conceitual. Na modelagem caixa preta ou identificação de sistemas pouco ou nenhum conhecimento do sistema é necessário por isso é também conhecida como modelagem empírica. A modelagem caixa cinza encontra-se entre a modelagem branca e a preta, por isso seu nome, as técnicas desse grupo caracterizam-se por usar informação auxiliar, que no se encontra no conjunto de dados para a identificação (AGUIRRE, 2007).

O termo **estimação de parâmetros** é apenas uma das etapas da solução de um problema de estimação de sistemas (caixa preta) e o significado é diferente ao problema de modelagem pela física do processo (caixa branca). Uma diferença importante, entretanto,

é que em muitos problemas de identificação de sistemas, ao contrario do problema de estimação, os parâmetros normalmente não têm nenhum significado físico (AGUIRRE, 2007).

Segundo Aguirre (2007), há vários aspectos importantes envolvidos em problemas reais de identificação. Em linhas gerais, as principais etapas de um problema de identificação de sistemas são:

1. Testes dinâmicos e coleta de dados;
2. Escolha da representação matemática a ser usada;
3. Determinação da estrutura do modelo;
4. Estimação de parâmetros;
5. Validação do modelo.

O problema de estimação de parâmetros em função dos dados coletados, ou problema inverso, tem dificuldades associadas com a identificabilidade, unicidade e estabilidade dos parâmetros (CARRERA et al., 2010).

Os métodos para estimação dos parâmetros envolvem a otimização global dada uma função objetivo, dependendo da formulação desta função será necessária a minimização do valor resultante. Os métodos de otimização determinísticos ou exatos garantem a convergência para um mínimo global para alguns problemas, embora nenhum destes algoritmos possa ter certeza de resolver o problema em tempo finito. O esforço computacional geralmente incrementa-se exponencialmente com o tamanho do problema. Além disso, exigem requisitos como suavidade e diferenciabilidade que são raramente cumpridos em problemas reais (GUUS; BOENDER; ROMEIJN, 1995; MOLES; MENDES; BANGA, 2003; EGEA, 2008).

Em contraste, modernas abordagens de otimização como algoritmos evolucionários (AE) e outras meta-heurísticas conseguem encontrar o mínimo global ou perto de uma solução global num tempo razoável para problemas complexos. Os AE têm a vantagem de robustez em sistemas com ruído e tem uma estrutura que pode ser explorada com modernos sistemas computacionais paralelos, por esta causa é estes métodos são atrativos para otimizar complexos problemas biológicos (SUN; GARIBALDI; HODGMAN, 2012). Uma revisão dos avanços pode ser encontrada em Abraham, Grosan e Ishibuchi (2007), Siarry e Michalewicz (2008).

Dentre os métodos de otimização heurísticos desenvolvidos, o algoritmo de evolução diferencial proposto por Storn e Price (1997), se configura como uma das estratégias mais utilizadas para a resolução de problemas de engenharia (LOBATO; STEFFEN JR; NETO, 2011).

Algoritmos evolutivos, diferentes dos algoritmos convencionais utilizam somente uma função objetivo ao invés de derivadas ou informações adicionais do problema. Nos pro-

cessos biotecnológicos a tendência é a hibridização de duas ou mais técnicas para gerar uma nova estrutura e parâmetros (ENITAN; ADEYEMO, 2011).

O uso de algoritmos de otimização para auxiliar na condução do processo com foco na produtividade é uma qualidade atraente de uma estimativa on-line dos estados do processo (SMETS; VERSYCK; Van IMPE, 2002). A Evolução Diferencial (ED) e os algoritmos genéticos (AG) são tipos de algoritmos evolutivos apropriados para serem utilizados quando se dispõe de poucas informações ou nenhum conhecimento prévio do processo, porém, a complexidade matemática é elevada (KOMIVES; PARKER, 2003). Idealmente, um processo deve ser operado na condição ótima com o objetivo de maximizar a produtividade e minimizar o impacto ambiental.

Na Figura 11, é possível ver a localização do método de ED no conjunto de meta-heurísticas.

Figura 11 – Taxonomia dos métodos metaheurísticos

Fonte: Egea (2008)

Embora a otimização baseada em AG tenha se mostrada como uma boa técnica para encontrar os mínimos globais, a ED se apresenta como uma técnica significativamente mais rápida e robusta devido a sua habilidade para utilizar código real ao invés de codificação binária. Salienta-se no entanto que existem algumas formas de AG que também utilizam códigos reais (ENITAN; ADEYEMO, 2011).

Hocalar et al. (2011), realizaram uma comparação de diferentes técnicas para estimar a concentração de biomassa em processos fermentativos em grande escala e concluíram que na ED um número reduzido de variáveis do processo são necessárias: concentração de etanol, concentração de oxigênio e fluxo do melaço; além que pode trabalhar off-line e on-line.

Concluiu-se que os métodos meta-heurísticos são mais apropriados para os sistemas biológicos complexos, o método ED apresentou melhor desempenho de facilidade para resolver problemas de otimização global.

2.8 Abordagem bayesiana

O benefício da abordagem bayesiana na pesquisa científica é a capacidade para incorporar informação a priori, desta forma, permite o melhor uso da informação disponível nos dados, e consequentemente possibilita a obtenção de conclusões mais próximas da realidade do processo (MOALA, 2009).

A inferência bayesiana constitui uma alternativa de grande flexibilidade, tanto em relação aos modelos estatísticos que podem ser utilizados nas análises quanto em relação às inferências que podem ser realizadas a partir de seus resultados (PADILHA, 2011).

Métodos bayesianos para análise estatística vem sendo cada vez mais utilizados em problemas das mais diversas áreas, mostrando-se bastantes eficientes. Diferente da abordagem clássica em que o parâmetro do modelo em estudo é um escalar ou vetor desconhecido, mas fixo, na inferência bayesiana o parâmetro ou vetor de parâmetros é incerto e toda a incerteza deve ser quantificada em termos de probabilidade, ou seja, assume-se que os parâmetros do modelo em estudo são variáveis aleatórias (PAULINO; AMARAL-TURKMAN; MURTEIRA, 2003).

A inferência bayesiana é baseada na fórmula de Bayes (BERNARDO; SMITH, 1994), e é caracterizada pelo fato de que a informação inicial a respeito de um parâmetro de interesse pode ser melhorada se combinada com observações de uma quantidade aleatória relacionada com o parâmetro em questão (PAULINO; AMARAL-TURKMAN; MURTEIRA, 2003).

A amostragem de Gibbs (GILKS; RICHARDSON; SPIEGELHALTER, 1996), permite obter estimativas pontuais, regiões de alta densidade e intervalos de credibilidade ou de confiança para as distribuições a posteriori dos parâmetros de interesse, sem aproximações ou pressuposições de normalidade, que são necessárias quando se adotam os métodos clássicos (i.e. máxima verossimilhança restrita), e pode ser utilizado sem perda de precisão tanto em pequenos quanto em grandes conjuntos de dados (FALCÃO et al., 2004; FARIA et al., 2007).

O *Full Bayesian Significance Test* (FBST) foi apresentado por Pereira e J.M.Stern (1999), como um teste intuitivo, com caracterização geométrica, e que pode ser implementado por intermédio de técnicas de otimização e integração numérica. O método é considerado totalmente bayesiano por requerer apenas o conhecimento do espaço paramétrico representado pela sua distribuição a posteriori. Uma vantagem do FBST é a não necessidade de premissas adicionais, como probabilidade positiva para hipóteses precisas (LAURETTO, 2007).

Metodologia

3.1 Comentários iniciais

Para avaliação do objetivo proposto, que consiste em estudar a cinética da fermentação e desenvolver um modelo não linear para o processo fermentativo, foram necessários esforços em diferentes vertentes, incluindo ensaios experimentais, implementação computacional e estudos estatísticos, para comprovação dos resultados obtidos. Para esboçar a metodologia de desenvolvimento desse trabalho, foi feito um diagrama, contendo atividades e procedimentos, realizados em ordem cronológica.

Como visto na Figura 12, foi traçada a diretriz para o trabalho a ser realizado e, em seguida, qual a abordagem que será utilizada para análise da fermentação. A cada etapa, os resultados obtidos tornavam-se entradas para o processo seguinte. Dessa forma, a análise numérica só pode ser desenvolvida a partir dos resultados experimentais e, de modo semelhante, apenas foi possível realizar a comprovação do modelo e dos parâmetros obtidos computacionalmente por meio da análise estatística. As seções seguintes contêm o detalhamento das etapas citadas, descritas também por meio de diagramas.

3.2 Metodologia dos ensaios

3.2.1 Planejamento experimental

Foram isoladas da indústria 80 colônias de bactérias. Foram classificadas e escolhidas 18 bactérias pela tipo de metabolismo (produção de manitol). Foi realizado o sequenciamento para identificar as espécies destas bactérias. Após agrupadas, este conjunto de cada grupo de bactérias (9 de cada) constituiu a base para os tratamentos propostos. A levedura selecionada PE-2 foi escolhida para os ensaios.

Figura 12 – Fluxograma da metodologia aplicada

3.2.1.1 Caracterização metabólica e identificação das bactérias

Identificação do tipo de metabolismo das bactérias isoladas de processo industrial de produção de etanol, segundo a produção de manitol após crescimento por 24 horas em meio com 1% de glicose, 1% de frutose, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e sulfato de magnésio (MgSO_4), sulfato de manganés (MnSO_4) e fosfato monopotássico (KH_2PO_4) em pH=6,5 e 32°C.

Foi escolhido o gene 16S do Ácido desoxirribonucleico ribossomal (rDNA) para sequenciamento e identificação das 18 colônias isoladas. O resultado identificou duas espécies: *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*. Desta forma foi verificado em forma

coerente o comportamento metabólico heterofermentativo e homofermentativo com ambas espécies.

Os procedimentos para extração de DNA foram adaptados do protocolo descrito por Ausubel et al. (1998) usando lizosima (100 mg/mL) e proteinase K (10 mg/mL). A amplificação do 16S rDNA foi executada por meio da reação Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ¹ com um volume final de 50 µL usando 4 ng DNA, 0.5 µM dos primers F27 (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') e R1378 (5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') (HEUER et al., 1997), 0.25 mM cada dNTP, 3.5 mM MgCl₂, 1X Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega) e 1.25 U GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega). O programa de amplificação está descrito a seguir: manter por 3 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C e 60 s a 72°C. Ao final, uma extensão de 5 minutos a 72°C. Os produtos PCR foram purificados utilizando o kit de purificação NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel), de acordo às instruções do fabricante. Os produtos PCR (45 ng) foram sequenciados usando o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) no analisador modelo 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O programa de reações está descrito a seguir: 94 ° C durante 2 min, seguido por 35 ciclos de 20 s a 94°C, 30 s a 55°C and 2 minutos a 60°C. A similaridade das sequencias foi obtida por análise BLASTn utilizando o banco de dados GenBank não redundante (NR) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

O resultado é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Classificação das bactérias isoladas da fermentação etanólica industrial em função da produção de manitol e identificação por sequenciamento de rDNA . (A concentração de manitol do meio de cultivo foi de 0,171 g/L.)

Colônia	Manitol (g/L)	Tipo de metabolismo	Identificação (rDNA)
I-1	0.178	Homofermentativo	L. plantarum
I-2	7.800	Heterofermentativo	L. fermentum
I-3	39.800	Heterofermentativo	L. fermentum
I-4	0.080	Homofermentativo	L. plantarum
I-5	7.620	Heterofermentativo	L. fermentum
I-6	0.166	Homofermentativo	L. plantarum
I-7	0.043	Homofermentativo	L. plantarum
I-8	0.053	Homofermentativo	L. plantarum
I-9	8.073	Heterofermentativo	L. fermentum
III-1	0.181	Homofermentativo	L. plantarum
III-3	7.021	Heterofermentativo	L. fermentum
III-4	0.156	Homofermentativo	L. plantarum
III-5	8.786	Heterofermentativo	L. fermentum
III-6	8.220	Heterofermentativo	L. fermentum
III-7	0.170	Homofermentativo	L. plantarum
III-8	0.096	Homofermentativo	L. plantarum
III-9	8.629	Heterofermentativo	L. plantarum ^a
III-10	8.359	Heterofermentativo	L. fermentum

^a Esta bactéria produziu manitol e foi considerada no grupo heterofermentativo

¹Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

3.2.1.2 Descrição dos ensaios

Os ensaios foram realizados no laboratório de Bioquímica da ESALQ/USP, com o auxílio e coordenação do Prof. Dr. Luiz Carlos Basso. O planejamento experimental é resumido na Figura 13.

Figura 13 – Layout da execução dos ensaios

Utilizaram-se, para os experimentos, leveduras e bactérias. Para tanto, foi escolhida a linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2². As leveduras foram propagadas em meio de mel esterilizado em autoclave (120°C a 1 atm por 15 minutos), com 10%

²Selecionada da Usina da Pedra, por isso leva as siglas do seu nome.

(m/v) de Açúcares redutores totais (ART) ³. Para a propagação, a cultura, antes a -80°C, foi reativada em meio *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD) ⁴ por 24 horas, a 30°C. A cultura foi inoculada em um frasco erlenmeyer contendo 100 mL de YEPD e novamente cultivada, ao longo de um mesmo período e nas mesmas condições.

Figura 14 – Materiais usados nos ensaios

A propagação se deu após adição de meio contendo melaço ⁵, a 10% (m/v) de ART, duplicando o volume da suspensão a cada 24 horas. A biomassa ⁶ resultante de levedura foi obtida mediante centrifugação, em condições de operação de 800 g durante 15 minutos.

Inicialmente foi proposta a utilização de apenas uma linhagem de bactéria por tratamento. Contudo, essa prática não se mostrou eficiente, principalmente com a bactéria homofermentativa que teve dificuldades em instalar-se no processo. Assim, optou-se pela utilização de um conjunto de bactérias homofermentativas e heterofermentativas para garantir a manutenção e interferência delas no processo. Ao todo, usou-se 9 diferentes cepas de bactérias homofermentativas isoladas do meio industrial e outras 9 heterofermentativas. O objetivo da inserção das bactérias é criar um ecossistema propício à contaminação,

³Açúcares Redutores Totais, para este trabalho o termo é utilizado para agrupar a sacarose, glicose e frutose, considerados açúcares fermentescíveis. O cálculo utilizado é $\% \text{ ART} = (\% \text{ sacarose}/0,95 + \% \text{ glicose} + \% \text{ frutose})$

⁴Yeast Extract Peptone Dextrose é um meio completo para crescimento de leveduras

⁵Nome utilizado na indústria sucroenergética para descrever o substrato conformado por: caldo de cana, mel e água para diluição

⁶Neste trabalho, o termo biomassa será utilizado para nomear as células de leveduras, mesmo que uma pequena fração (nos tratamentos contaminados) pode corresponder à biomassa bacteriana

para que o efeito da mesma possa ser observado nos resultados experimentais e modelado matematicamente.

As bactérias foram, isoladamente, reativadas mediante incubação a 32°C por 48 horas em meio Ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRS)⁷. Antes disso, elas se encontravam em estoque a -80°C. Após o crescimento, foram adaptadas em meio de melaço, com 2% de ART e contendo 1% de extrato de levedura, com 0,5% de peptona. O crescimento se seguiu, após a adaptação, em 100 mL de meio de melaço, de mesma composição. A mistura das culturas ocorreu de acordo com o tipo fermentativo. Ao final do crescimento, após 24 horas a 32°C, foi determinado por intermédio de microscopia ótica uma concentração de $6,29 \times 10^8$ células/mL, para as bactérias heterofermentativas, e de $8,89 \times 10^8$ células/mL para o cultivo homofermentativo.

Após isso, iniciou-se o ciclo de fermentações, conduzidas a 33°C, simulando as condições de fermentação industrial por meio dos ciclos fermentativos. Foi utilizado, para tanto, mosto misto, cuja composição apresentava caldo de cana e mel, cada qual contribuindo com 50% do açúcar. O teor de açúcar foi ajustado para resultar em teores alcoólicos entre 8% e 9% (v/v), conforme os fatores estequiométricos típicos de conversão. Por intermédio da cromatográfica aniônica, encontraram-se teores de ART em 17,5% (m/v). Foram realizados quatro tratamentos fermentativos distintos: homofermentativo, heterofermentativo, homofermentativo+heterofermentativo e controle⁸.

A adição de mosto se deu em parcelas, em três porções iguais, sobre um pé-de-cuba, com concentração média de 70% de fermento (massa úmida) após a centrifugação, correspondente a 30% do volume final da fermentação. O primeiro ciclo fermentativo foi iniciado com um teor de fermento de 10%. Ao final de cada ciclo efetuou-se sangria em média de 3% do fermento em todos os tratamentos. Os conjuntos de bactérias foram inoculados no momento de alimentação do primeiro ciclo (I) fermentativo, sendo que a suspensão do meio de cultura das bactérias, juntamente com as bactérias foram acrescidas em substituição à água de diluição do fermento. Tal suspensão de bactérias correspondeu a 15% do volume final da fermentação, e resultou numa contaminação de $1,33 \times 10^8$ células/mL para o tratamento com bactérias homofermentativas, $0,94 \times 10^8$ células/mL para o tratamento com bactérias heterofermentativas. O tratamento com a mistura de bactérias recebeu uma carga bacteriana de $0,67 \times 10^8$ células/mL e de $0,47 \times 10^8$ células/mL de bactérias homofermentativas e heterofermentativas, respectivamente.

Como resultado, obteve-se uma contaminação próxima a 10^8 células/mL. Assim, as fermentações se procederam com 4g de fermento inicial, 2 mL do vinho do ciclo anterior e 6 mL de água. Foram adicionadas três porções de mosto totalizando 28 mL. O volume final estimado foi de 40 mL. A velocidade de fermentação e medida do CO₂ foi avaliada por intermédio de pesagens, a cada 2 horas, num intervalo total de 8 horas. Além disso,

⁷Ágar Man-Rogosa-Sharpe rico em nutrientes para cultura de bactérias

⁸As fermentações de referência, que não contém bactéria, nomeadas como controle, foram consideradas como mais um tratamento

ao final de cada ciclo fermentativo foi centrifugado o vinho bruto⁹ e realizou-se a pesagem de fermento, que foi reutilizado em fermentações subsequentes, no transcorrer de 8 ciclos fermentativos.

Como é apresentado na Figura 13, os quatro tratamentos propostos foram conduzidos em quadruplicata durante os ciclos I, II e III num volume estimado de 40 mL. No ciclo IV são juntadas as biomassas das repetições em uma de volume maior, estimado em 188 mL. Para o ciclo V a biomassa remanescente do ciclo IV foi dividida em três porções iguais e continuaram-se os reciclos VI, VII e VIII num volume estimado de 40 mL. A quadruplicata permite a obtenção de um volume maior na realização da cinética de fermentação no ciclo IV (devido a perdas inerentes à cinética, na qual ocorre remoção de amostras para análise)

Os ciclos I, II, III, V, VI, VII e VIII foram conduzidos em modo batelada alimentada, o substrato foi adicionado em 3 porções iguais às 0, 2 e 4 horas. O ciclo IV foi conduzido também em modo batelada alimentada, no entanto a alimentação foi em modo rampa com velocidade constante por 4 horas.

Para o quarto ciclo, correspondente à cinética, as biomassas do final do terceiro ciclo foram centrifugadas, acumuladas e procedeu-se uma fermentação, em volume maior e com agitação a 90 rpm. A alimentação foi realizada durante 4 horas à velocidade constante e controlada por uma bomba peristáltica. O processo de fermentação se transcorreu durante 8 horas, com remoção de amostras a cada 2 horas. O volume total da fermentação foi estimado em 188 mL, sendo que o volume de amostras removidas até o final da alimentação representou 12 mL (cerca de 6%), permitindo-se supor que as amostragens não deveriam impactar os resultados da cinética de fermentação.

3.2.1.3 Ensaio de validação

Para montar um cenário diferente que permita validar os modelos testados, foi planejado conduzir uma fermentação com parâmetros do processo que permitam verificar o desempenho do modelo da cinética. De esta forma a adimensionalização permitiria comparar fermentações com volume, nível de contaminação e concentração do substrato diferentes. Além disso, a condição de início seria diferente dos reciclos já executados.

Após a primeira avaliação dos resultados, se concluiu que o tratamento com bactérias de metabolismo heterofermentativo produzem um impacto maior no rendimento fermentativo, mantém uma população majoritária e mais estável.

A linhagem de levedura PE-2 foi propagada em meio de mel com 10% (m/v) de ART a 30°C, duplicando-se o volume de meio a cada 24 horas a fim de obter biomassa suficiente para o ensaio. Após a fase de propagação, foi recuperada por centrifugação (800 g por 20 minutos). As bactérias heterofermentativas após reativação das culturas estoques (-80°C), mediante crescimento em 5 mL de meio MRS a 32°C por 24 horas. Estas 9 linhagens de

⁹O vinho bruto é o fluido da fermentação que inclui o fermento, o mosto e os analitos que são produzidos pelas leveduras e bactérias

Lactobacillus fermentum, foram propagadas em 100 mL de meio MRS mediante inoculação dos cultivos anteriores, e incubadas à mesma temperatura durante 38 horas.

Uma fermentação previa foi conduzida. A levedura PE-2 foi submetida a uma fermentação simulando as condições industriais de batelada, com 70% de concentração de fermento na centrífuga, empregando-se mosto misto com 18,58% (m/v) de ART, sobre um pé-de-cuba correspondente a 30% do volume total da fermentação. O teor de fermento no pé-de-cuba foi 34% (m/v). A fermentação se processou a 32°C sendo o teor final de fermento de 13% (m/v) e de etanol de 8,26% (v/v).

A fermentação deliberadamente contaminada foi conduzida. A levedura coletada na fermentação prévia foi contaminada com as bactérias, resultando numa contagem de $1,74 \times 10^8$ células/mL (considerando-se o volume total da fermentação). Sobre um pé-de-cuba de 446 mL foram acrescidos 1074 mL de mosto misto durante um período de alimentação de 4 horas (mediante o emprego de bomba peristáltica com velocidade constante). Utilizou-se mosto misto com 18,58% (m/v) de ART, agitação de 90 rpm e uma temperatura de 32°C.

Durante as 8 horas, a cada hora, amostras de 10mL foram removidas, resfriadas (em banho de gelo por 10 minutos) e centrifugadas (800 g por 15 minutos). Após retirada do sobrenadante a massa de levedura foi pesada. Recolheu-se 1 mL do sobrenadante (em tubos de rosca, os quais foram fervidos durante 10 minutos, para inativação da invertase e imediatamente congelados) para as análises de açúcares e polióis (sacarose, glicose, frutose, glicerol e manitol), mediante cromatografia iônica. Outra porção do sobrenadante foi imediatamente congelado (-20°C) para as análises de ácidos orgânicos (succinato, acetato e lactato), mediante cromatografia líquida. O etanol foi dosado no vinho delevedurado (sobrenadante), mediante destilação com vapor seguido de densimetria eletrônica. Para minimizar os distúrbios causados pela remoção de biomassa nas amostragens, a mesma era repostada no reator tão logo separada pela centrifugação.

Os ciclos fermentativos resultaram em 101 fermentações, analisadas quanto aos teores de: etanol; açúcares (sacarose, glicose e frutose); produtos de origem bacteriana (lactato, acetato e manitol); glicerol; succinato; biomassa de levedura; viabilidade da levedura; e contaminação bacteriana. Com relação ao ensaio de cinética, para cada tempo de amostragem foram medidas as concentrações de: etanol; fermento; açúcares (sacarose, glicose e frutose); glicerol e produtos de origem bacteriana (lactato, acetato e manitol). Para o mosto foram medidas as concentrações dos açúcares, glicerol, lactato, acetato e manitol.

3.2.2 Análises microbiológicas

A viabilidade celular e a contagem da população de células de leveduras e de bactérias, foram determinadas no momento do inóculo e a cada hora. Para as leveduras, foi utilizada a coloração diferencial das células pela solução de eritrosina, em tampão fosfato. A técnica

é seguida pela contagem das células viáveis, que permanecem incolores, e não viáveis, as quais adquirem uma coloração rósea intensa na presença do corante. A mesma análise foi feita para as bactérias, diferenciando-se apenas pelo corante utilizado solução de Azul de Metileno (0,2%) e Sulfato Azul de Nilo (2,0%) acorde com Oliveira et al. (1996).

3.2.3 Análises químicas

As análises químicas podem ser subdivididas em quantificações referentes ao etanol, açúcares, ácidos orgânicos.

Os teores de etanol (nos três primeiros ciclos fermentativos) foram determinados utilizando-se um micro-destilador Tecnal (Piracicaba, Brasil) pela técnica de destilação por arraste a vapor, seguida pela quantificação do etanol coletado por densimetria eletrônica, por meio de um densímetro digital (Anton-Paar DMA-48, Graz, Austria).

O etanol apresenta ainda uma eficiência fermentativa (rendimento etanólico), o qual se refere à porcentagem, em relação ao máximo possível, de conversão de ART em etanol. O cálculo baseia-se na equação estequiométrica da fermentação alcoólica, na qual 100 g de ART resultariam em 51,11 g de etanol (para eficiência de conversão de 100%). Para o cálculo do rendimento, consideraram-se as quantidades de etanol previamente presentes no pé-de-cuba¹⁰. Em ensaios de laboratório nos quais se determinam os teores de etanol no vinho delevedurado (como no presente caso), faz-se necessária também a quantificação do teor de etanol na biomassa de levedura sedimentada. Tal parâmetro é levantado em teste à parte e depende das condições de sedimentação, tempo e velocidade de centrifugação, bem como da levedura utilizada. Para o teste realizado, demonstrou-se que 1 g de biomassa úmida sedimentada, nas dadas condições, continha o equivalente a 0,7 mL de vinho explicado pela fase líquida contida no espaço entre as células.

Por outro lado, a quantificação dos açúcares - glicose, frutose, sacarose - e polióis - glicerol e manitol -, nos vinhos delevedurados, foram estimadas por meio da cromatografia de troca aniônica (*High Performance Anion Exchange Chromatography* (HPAEC)), utilizando o equipamento Dionex DX-300 (Sunnyvale, USA), em associação com coluna Carbpak PA-1 e detector de amperometria de pulso. As condições de operação continham NaOH 100 mM como fase móvel e uma vazão de 0,9 mL/min. A calibração do sistema foi feita por meio de soluções-padrão, contendo concentrações conhecidas das substâncias avaliadas, enquanto que a glicosamina foi empregada como padrão interno.

Outra quantificação realizada é a formação de ácidos orgânicos (succinato, lactato e acetato) e de etanol, ambos no vinho delevedurado - durante o ensaio de cinética de fermentação. A estimativa foi feita mediante Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

¹⁰Pé-de-cuba é o nome dado nas usinas sucroenergéticas para o porção de massa úmida de leveduras conhecida como "fermento", diluída com água e tratada com ácido sulfúrico. Esta biomassa tratada nos tanques chamados de "cubas" é levada para as dornas. Logo inicia-se a alimentação do substrato e assim, o processo fermentativo

(HPLC), empregando-se para tanto uma coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (BioRad, Hercules, EUA) a 65°C, utilizando-se H₂SO₄ 5 mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min, associado a um detector de índice de refração CG 410 (Instrumentos Científico C.G. LTDA, Brasil). Para tanto, soluções-padrão contendo concentrações destas substâncias foram utilizadas para calibração externa do sistema. Também no vinho delevedurado, foi determinado o pH ao final de cada ciclo fermentativo.

3.2.4 Balanço de massa

O cálculo do balanço de massa de cada ciclo é fundamental para iniciar a análise comparativa entre tratamentos e dentro dos ciclos do mesmo tratamento. Somente os dados das concentrações dos analitos ao longo do processo não fornecem uma adequada informação para aprofundar na análise. No processo de batelada alimentada, temos a diluição produzida pelo aumento do volume ao longo do período de alimentação. Outro fator que influencia o balanço de massa é a concentração dos analitos do substrato que no volume dosado no fermentador, adiciona uma massa, que deve ser subtraída da massa total para obter a massa total gerada como produto do processo em si.

Após a centrifugação do vinho bruto, o fermento é pesado. O peso do fermento é convertido em volume por intermédio da densidade assumida 1,1 g/mL. Assume-se que o volume proporcional de vinho para calcular a massa de etanol e os outros analitos (acetato, lactato, succinato, manitol e glicerol) na massa úmida do fermento é de 70%; e o volume proporcional de vinho para calcular os açúcares (sacarose, glicose e frutose) na massa úmida do fermento é de 30% (BASSO, 2010). Nas Equações 3 e 4 e 6 são utilizados estes índices (0,7 e 0,3).

O rendimento do etanol $Y_{CP/S}$ é calculado em função da massa de etanol produzida Pp e o substrato consumido Sc para produzir esta massa. As Equações são apresentadas a seguir:

$$Pp = (((Mfe_f * 0,7 + Vc_f) * Cp_f)/100 - ((Mfe_{pe} * 0,7 + Vc_{pe}) * Cp_{pe})/100)/\rho \quad (3)$$

$$Sc = V_{sa} * Cs_{sa}/100 - (Vc + 0,3 * Mf)Cs_{fi}/100 \quad (4)$$

$$Y_{CP/S} = Pp/Sc \quad (5)$$

onde:

Pp - Massa de etanol produzida [g];

Mfe_f - Massa de fermento no final da fermentação [g];

V_{cf} - Volume de vinho centrifugado no final da fermentação [mL];

C_{pf} - Concentração (v/v) do etanol no final da fermentação [mL/mL];

M_{fepe} - Massa de fermento no pé-de-cuba [g];

V_{cpe} - Vinho centrifugado adicionado no pé-de-cuba [g];

C_{ppe} - Concentração (v/v) do etanol no pé-de-cuba [mL/mL];

ρ - Densidade do etanol produzido (0,7895) [g/mL];

$Y_{cP/S}$ - Rendimento de etanol calculado [g];

Sc - Massa de substrato consumido [g];

V_{sa} - Volume de substrato alimentado [mL];

C_{ssa} - Concentração do substrato alimentado [g/100mL];

C_{sfi} - Concentração do substrato no final da fermentação [g/100mL];

Logo, o cálculo do balanço de massa onde Ap , pode ser quaisquer dos analitos (acetato, lactato, succinato, manitol e glicerol) pode ser calculado com as Equações 4 e 6 e 7. Observa-se que a massa de um determinado analito presente no substrato alimentado - o mosto misto - será subtraído Ap_{sa} para encontrar a massa gerada pelo processo fermentativo. O cálculo do rendimento destes analitos é apresentado a seguir:

$$Ap_{sa} = V_{sa} * Ca_{sa}/1000$$

$$Ap = (((M_{fe_f} * 0,7 + V_{cf}) * Ca_f) - ((M_{fe_{pe}} * 0,7 + V_{cpe}) * Ca_{pe}))/1000 - Ap_{sa} \quad (6)$$

$$Y_{cAp/S} = (Ap/1000)/Sc \quad (7)$$

onde:

Ap - Massa produzida do analito [mg];

Ca_f - Concentração do analito no final da fermentação [mg/L];

Ca_{pe} - Concentração do analito no pé-de-cuba [mg/L];

Ca_{sa} - Concentração do analito no substrato alimentado [mg/L];

$Y_{cAp/S}$ - Rendimento do analito calculado adimensional (g/g);

Para a medida do CO_2 (massa molar: 44,01 g/mol) foi estimada em forma indireta por intermédio do peso do fermentador, considerando a estequiometria dos produtos gerados a partir da massa molar da glicose 180,16 g/mol. Os processos que produzem CO_2 como subproduto são: etanol (massa molar: 46,06844 g/mol), acetato (massa molar: 60,05 g/mol) e succinato (massa molar: 118,09 g/mol).

Para o cálculo da biomassa, o teor de matéria seca considerado na levedura centrifugada foi de 25% (BASSO, 2010).

3.3 Metodologia de implementação computacional

Após a realização dos ensaios, dados foram coletados, referentes aos subprodutos da fermentação. Esses dados formam a base para o estudo das equações diferenciais do processo fermentativo, de forma que, a partir deles, se busca modelar matematicamente a fermentação e encontrar valores adequados para parâmetros anteriormente citados.

Para tanto, foram propostas duas abordagens, uma subsequente à outra. Em um primeiro momento, os parâmetros foram estimados, por intermédio de um algoritmo de ED (elucidado a seguir), seguido por uma análise paramétrica de sensibilidade. O intuito das abordagens era o de estimar inicialmente os parâmetros, ajustando a influência sobre a solução das EDO's e, posteriormente, identificar quais desses parâmetros contribuíram com maior impacto nas mudanças ocorridas, por intermédio da sensibilidade paramétrica.

Contudo, para evitar efeitos de escalas dos parâmetros, é necessário realizar uma análise dimensional das equações diferenciais, por meio da adimensionalização das variáveis de estado e dos parâmetros que compõem as EDO's.

3.3.1 Análise dimensional do conjunto de EDO's

Para análise adimensional das variáveis e equações que compõem o conjunto de Equações diferenciais ordinárias (EDOs) do processo fermentativo, baseou-se nos trabalhos de Popova e Boyadjiev (2008), Dutta, Chowdhury e Bhattacharya (2001), Borges (2008), Pacheco (2010). As variáveis de estado que descrevem o crescimento de microrganismos (X), o consumo de substrato (S), a formação de produto (P) e a variação de volume do fermentador (V), se encontram em formato adimensional, a fim de eliminar efeitos de escala e fornecer um modelo matemático que fosse genérico. O conjunto de equações é dado por:

A cinética do processo pode ser explicada pela velocidade de conversão em subprodutos (DRAPCHO; NHUAN; WALKER, 2008):

$$r_x = \mu X, \quad (8)$$

onde r_x is the taxa de formação de biomassa; μ velocidade específica de crescimento celular, e X é a concentração de biomassa.

Uma vez que a formação do produto está acoplada à formação de biomassa, a velocidade de transformação do produto pode ser expressado como: (DRAPCHO; NHUAN; WALKER, 2008):

$$r_p = k_{pg} r_x, \quad (9)$$

onde $k_{pg} = Y_{P/X}$, e $Y_{P/X} = Y_{P/S}/Y_{X/S}$. Assim, $Y_{P/X}$ é a fração de etanol produzido $Y_{P/S}$ por unidade de biomassa, onde $Y_{X/S}$ denota a fração de substrato que foi utilizado para produzir a biomassa resultante.

A velocidade de transformação do substrato r_s em biomassa e produto (P) esta diretamente acoplada à formação da biomassa r_x e ao coeficiente de manutenção celular (m_s) (DORAN, 1995):

$$r_s = r_x/Y_{X/S} + m_s X. \quad (10)$$

Estas velocidades compõem as equações dinâmicas para o balanço de massa na fermentação em modo batelada, onde o volume é constante. (WANG; SU; JANG, 2001):

$$\frac{dX}{dt} = r_x, \quad (11)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p, \quad (12)$$

$$\frac{dS}{dt} = r_s. \quad (13)$$

Dado que o volume (V) é variável no processo batelada alimentada, as velocidades nas Equações (11) – (13) podem ser reescritas assim: dXV/dt , dPV/dt , e dSV/dt . Utilizando a regra da cadeia para resolver, temos (DORAN, 1995)

$$\frac{dV}{dt} = F, \quad (14)$$

$$\frac{dS}{dt} = (FS_f - FS - (\frac{1}{Y_{X/S}}\mu XV + m_s XV))/V, \quad (15)$$

$$\frac{dP}{dt} = (\frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}}\mu XV - FP)/V, \quad (16)$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu XV - FX)/V. \quad (17)$$

onde:

μ - Velocidade específica de crescimento celular [1/h];

P - Concentração de produto[g/L];

X - Concentração de biomassa [g/L];

S - Concentração de substrato [g/L];

V - Volume [L];

F - Vazão de alimentação do substrato [L/h];

S_f - Concentração de substrato alimentado [g/L];

(m_s) - Coeficiente de manutenção celular [1/h];

$Y_{X/S}$ - Rendimento em biomassa;

$Y_{P/S}$ - Rendimento em produto;

O sistema de equações encontrado também foi aplicado por Borges (2008). Nesse contexto, o termo F/V , é conhecido como taxa de diluição (D) [1/h] (VILLADSEN; NIELSEN; LIDÅEN, 2011), representa o efeito da alimentação no processo de batelada alimentada. Conclui-se que o modelo proposto por Lee, Pagan e Rogers (1983), modificado para incluir a inibição pelo substrato de acordo com o modelo de Haldane (1930), descrito na Equação 18 foi aplicado por Andrietta, Ferreira e Andrietta (2003), e que inclui quatro fatores mais importantes da fermentação etanólica: limitação do substrato, inibição pelo substrato, inibição pelo produto e inibição pela concentração celular; é o mais adequado para descrever a cinética do processo.

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

O significado dos termos da (Equação 18) é:

μ_{MAX} - Velocidade específica máxima de crescimento celular [1/h];

K_s - Constante de saturação de Monod ¹¹ [g/L];

K_i - Constante de inibição pelo substrato [g/L];

P_{MAX} - Concentração do produto em que cessa o crescimento celular [g/L];

X_{MAX} - Concentração da biomassa em que cessa o crescimento celular [g/L];

N - Potência do termo de inibição pelo produto [adimensional];

M - Potência do termo de inibição pela biomassa [adimensional];

As Equações 14 – 18, foram normalizadas (POPOVA; BOYADJIEV, 2008; DUTTA; CHOWDHURY; BHATTACHARYA, 2001; BORGES, 2008) utilizando o máximo valor de tempo (t_{max}), concentração celular (x_{max}), concentração do substrato (s_{max}), etanol (p_{max}), e volume (v_{max}). Este procedimento é necessário para permitir comparações diretas entre diferentes fermentações. O sufixo **ad** é adicionado para diferenciar entre os parâmetros dimensionais e adimensionais.

As equações serão apresentadas para o caso menos restrito, no qual há batelada alimentada. Para a batelada não alimentada, basta considerar nulo o valor de alimentação. A fermentação em batelada alimentada tem 2 fases, a fase alimentada e não alimentada. Na fase alimentada o volume muda no tempo e o sistema é resolvido utilizando 4 equações parciais. Na fase não alimentada que o volume não muda, pode ser resolvido com 3 equações e o sistema se reduz a:

¹¹Constante de saturação para o crescimento celular

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}}\mu X - m_s X, \quad (19)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}}\mu X, \quad (20)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (21)$$

Os parâmetros e variáveis adimensionais são dados por:

$$X_{ad} = \frac{X}{x_{max}} \quad (22)$$

$$S_{ad} = \frac{S}{s_{max}} \quad (23)$$

$$P_{ad} = \frac{P}{p_{max}} \quad (24)$$

$$V_{ad} = \frac{V}{v_{max}} \quad (25)$$

$$Sf_{ad} = \frac{S_f}{s_{max}} \quad (26)$$

$$t_{ad} = \frac{t}{t_{max}} \quad (27)$$

$$F_{ad} = F \frac{t_{max}}{v_{max}} \quad (28)$$

$$Yx_{s_{ad}} = Y_{X/S} \frac{s_{max}}{x_{max}} \quad (29)$$

$$Yp_{s_{ad}} = Y_{P/S} \frac{s_{max}}{p_{max}} \quad (30)$$

$$umax_{ad} = \mu_m t_{max} \quad (31)$$

$$Ks_{ad} = \frac{K_s}{s_{max}} \quad (32)$$

$$Ki_{ad} = \frac{K_i}{s_{max}} \quad (33)$$

$$Pmax_{ad} = \frac{P_{MAX}}{p_{max}} \quad (34)$$

$$Xmax_d = \frac{X_{MAX}}{x_{max}} \quad (35)$$

$$Ms_d = m_s t_{max} \quad (36)$$

As equações de 22 a 25 representam as variáveis de estado adimensionais.

Nota-se que os coeficientes influenciam diretamente o comportamento das equações diferenciais. Apesar de existirem valores na literatura, esses coeficientes dependem das condições de ensaio, leveduras e bactérias utilizadas. Dessa forma, é conveniente otimizar seu valor, para melhor adequação dos resultados numéricos aos experimentais. Visto isso, é proposto a seguir um método de ED para estimar esses parâmetros.

Uma descrição mais detalhada de métodos de estimação pode ser encontrado em Hocalar et al. (2011).

3.3.2 Evolução Diferencial

Quando se avaliam os métodos determinísticos e meta-heurísticos de otimização propostos na secção 2.7, o algoritmo de Evolução Diferencial (ED), proposto em Storn e Price (1997), se mostra uma das estratégias utilizada para a resolução de problemas de engenharia. Suas principais características são a habilidade de não prender-se a ótimos locais e flexibilidade quanto à complexidade do problema avaliado.

Após a resolução do problemas inversos, os parâmetros de modelos teóricos são utilizados para simular o comportamento de sistemas, dispensando a prática experimental. O que se busca na escolha desse algoritmo é contribuir com uma metodologia que permita solucionar problemas inversos relativos à fermentação, de modo concomitante a adequação dos parâmetros acima citados.

Sinteticamente, a ideia principal do algoritmo ED é o método proposto para atualização de cada indivíduo, por meio de operações vetoriais. A diferença ponderada entre dois indivíduos da população é adicionada a um terceiro indivíduo da mesma população. Esse indivíduo é então avaliado, por intermédio de uma função objetivo, em geral que se busca minimizar. O processo é repetido, para um determinado número de indivíduos e iterações populacionais. De maneira geral, o algoritmo apresenta as seguintes etapas: inicialização da população, mutação, cruzamento, seleção, além do critério de parada do algoritmo.

Em associação ao algoritmo ED foi desenvolvido um programa para solução do conjunto das equações diferenciais descritas nas Equações 14 – 18. Dentre as etapas da evolução diferencial enumeradas, a seleção dos indivíduos e o critério de parada estão diretamente conectadas ao programa desenvolvido. A seleção torna-se uma função da melhor estimativa dos parâmetros, comparando dados experimentais e solução numérica encontrada, enquanto que se estabelece um critério de parada por uma função objetivo,

dada pelo erro entre os dados experimentais e a solução numérica, ponto à ponto. Um fluxograma das operações é mostrado pela Figura 15

Inicialmente, os dados experimentais são inseridos no programa, pelo usuário. Ocorre então a adimensionalização dos dados, utilizando os valores máximos encontrados no vetor de pontos experimentais. São inseridos em seguida as condições iniciais, as quais são utilizadas também na resolução do conjunto de EDOs. O algoritmo utilizado para estimar os parâmetros é chamado *devec3*. Para seu correto funcionamento é necessário inserir valores que caracterizam a simulação, escolhendo a estratégia de otimização, os intervalos para busca dos parâmetros, limitando o vetor em um mínimo e máximo, o tamanho da população e quantidade de iterações. A partir desses valores o algoritmo é iniciado.

O processo de inicialização da população do algoritmo de ED se dá por meio da geração de indivíduos de forma aleatória. A partir das definições do tamanho da população e dos intervalos são gerados números aleatórios, contidos no intervalo, e obtém-se um vetor de indivíduos para essa população. A equação para gerar indivíduos aleatórios é dada por:

$$x_{i,j} = x_{i,L} + rand(x_{i,U} - x_{i,L}) \quad (37)$$

em que $x_{i,L}$ e $x_{i,U}$ são os limites inferiores e superiores das j -ésimas variáveis de projeto, respectivamente, e $rand$ é um gerador de números aleatórios entre 0 e 1.

A população gerada é então inserida, um vetor por vez, no algoritmo de solução do conjunto de EDO's. Os parâmetros gerados aleatoriamente são avaliados segundo uma função objetivo, representada pelo erro inerente ao aproximar o modelo matemático dos dados experimentais, por intermédio do vetor de parâmetros. Após o cálculo, há o retorno para a função de estimativa de parâmetros e se inicia o processo evolutivo.

Para o processo evolutivo, são utilizadas duas ferramentas, a primeira baseada em operações de mutação e recombinação, a fim de gerar novos indivíduos e compor uma nova população; e a segunda baseada na utilização de um operador de cruzamentos.

O operador de mutação diferencial adiciona um vetor aleatório, usado como referência, a um vetor diferença, obtido a partir de outros dois membros aleatórios de uma população. A combinação é dada por:

$$v_{i,g} = x_{r0,g} + F(x_{r1,g} - x_{r2,g}) \quad (38)$$

em que o escalar F , denominado taxa de perturbação, é um número real que controla a magnitude do vetor diferença obtido em cada operação aritmética realizada.

A mutação se completa quando o algoritmo emprega o operador de cruzamento. O vetor $v_{i,g}$ gerado anteriormente pode ou não ser utilizado em uma próxima população,

Figura 15 – Fluxograma da estimação de parâmetros e otimização por o algoritmo de Evolução Diferencial

segundo a condição:

$$u_{i,g} = \begin{cases} v_{i,g} & \text{se } rand \leq CR \text{ ou } j = j_{rand} \\ x_{i,g} & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (39)$$

em que CR é denominada probabilidade de cruzamento, definida pelo usuário e contida no intervalo $[0, 1]$, que controla as informações parentais que serão transmitidas aos filhos. Para determinar qual a contribuição de um determinado vetor gerado, o cruzamento compara CR com o gerador de números aleatórios $rand$. Se o número randômico gerado é menor ou igual a CR , o vetor $v_{i,g}$ (com posição j_{rand}) é aceito, caso contrário, o vetor $x_{i,g}$ é mantido na população atual.

São selecionados para compor as gerações seguintes os vetores que apresentam melhor valor de função objetivo, em geral que tendem ao mínimo valor. Caso contrário, o vetor é mantido na população por mais uma geração.

Os novos valores são inseridos novamente como parâmetros a serem otimizados nas EDO's. A solução é repetida até que se atinja o número máximo de iterações por população. O vetor de parâmetros que produzir a menor função objetivo é aquele que melhor aproxima os pontos experimentais.

Os valores experimentais inicialmente utilizados para a estimativa de parâmetros foram os correspondentes ao ensaio de controle, na ausência de bactérias. Determinados os parâmetros, é necessário avaliar a sensibilidade dos mesmos, ou seja, o quanto pequenas variações em seus valores acarretarão em variações na solução da equação diferencial. O solver *ode113*¹² foi utilizado para a solução numérica das EDOs, baseado no algoritmo de Adams-Bashforth-Moulton (SIGMON; DAVIS, 2004).

3.3.3 Sensibilidade paramétrica

A análise de sensibilidade elucida a dependência do comportamento de um sistema e os parâmetros afetam a sua dinâmica. Os coeficientes de sensibilidade de primeira ordem fornecem a medida mais simples desta dependência por intermédio da quantificação das variações nas saídas do sistema em função das perturbações nos parâmetros:

$$Xp_{i,j} = \partial y_i / \partial p_j \quad (40)$$

A matriz de sensibilidade é a matriz onde as colunas correspondem às derivadas parciais da variável de estado em relação a cada parâmetro p_j (GUNAWAN; TAYLOR; DOYLE, 2005). Esta matriz pode ser utilizada para verificar se o conjunto de observações contém informação suficiente para estimar os parâmetros (CARI, 2009).

¹²Solver fornecido no Matlab® 2010a

Para realizar a análise de sensibilidade foi escolhido o pacote de soluções de equações diferenciais chamado XPP (ou XPPAUT, ambas as denominações corretas) (ERMENTROUT, 2011). O código contempla uma série de algoritmos úteis para avaliação de equações diferenciais, de diferenças, de funções, de problemas de contorno e de equações estocásticas. Para o trabalho aqui apresentado, estes algoritmos permitiram analisar a sensibilidade dos parâmetros estimados, quando acoplados às equações diferenciais que caracterizam o problema da fermentação. As interfaces entre o XPP e o pacote Doyle Group Biosens (BIOSENS, 2011), foi por intermédio de funções implementadas por Clewley (2004).

Para análise de sensibilidade foram escolhidos os parâmetros estimados e porcentagens de seus valores correspondentes a pequenas perturbações. Quando perturbados, os valores geram variações na solução encontrada (delta), cuja amplitude se relaciona diretamente com o quão determinante o valor do parâmetro é para a aproximação conseguida. A isso se chama sensibilidade e, dessa forma, avaliam-se a quais parâmetros o conjunto de equações diferenciais é mais sensível.

3.3.4 Correlação de parâmetros

Como o objetivo é mostrar as diferenças de um tratamento e outro, é importante qualificar nosso modelo, para verificar a correlação entre os parâmetros. Este procedimento sistemático para verificar a robustez do modelo (SANZ; VOSS, 2006). A Equação 41 proposta em Sanz e Voss (2006) foi calculada considerando o valor de $\sigma = 1$ e o valor de $w = 1$ em virtude que não estamos estudando o efeito do ruído no processo e não temos indícios para incluir pesos na equação. No caso que a correlação entre parâmetros seja maior de 0,7 eles são considerados inadequados para ser utilizados como único valor na modelagem (desde que o valor de um parâmetro é afetado pelo valor do outro parâmetro correlacionado) (SANSONETTI et al., 2011).

$$cov(b) = \sigma^2(\mathbf{Xp}^T w \mathbf{Xp})^{-1} \quad (41)$$

onde $\mathbf{Xp}$ é a matriz de sensibilidade; σ^2 é a variância dos erros nas determinações e w é a matriz de pesos estimados. A covariância dos parâmetros da matriz de sensibilidade é calculada com a Equação 41. A correlação de dois parâmetros b_i e b_j é calculada com a Equação 42.

$$cor(b_i, b_j) = cov(b)_{ij} / ([cov(b)_{ii} cov(b)_{jj}])^{1/2} \quad (42)$$

3.3.5 Matriz de informação de Fisher

A matriz de informação de Fisher (FIM)¹³ representa a medida da informação contida nas medidas ruidosas para a identificação dos parâmetros do modelo. Quando o ruído das medições segue uma distribuição Gaussiana pode ser expressada assim (LJUNG, 1999):

$$FIM = (\mathbf{Xp}^T \mathbf{Vc}^{-1} \mathbf{Xp}) \quad (43)$$

onde $\mathbf{Vc}$, é a matriz de covariância das medidas e $\mathbf{Xp}$, a matriz de sensibilidade. Após o cálculo da matriz FIM , é calculado o ranking de sensibilidade baseada nos elementos da diagonal da matriz FIM normalizada.

$$r_i = (D \times FIM \times D)_{ii}^{1/2} \quad (44)$$

$$D = \begin{bmatrix} p_1 & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \cdots & p_m \end{bmatrix} \quad (45)$$

onde p_i são os parâmetros nominais e m , o número de parâmetros.

3.4 Testes estatísticos

3.4.1 Teste t

O Teste t de Student é um teste de hipóteses que usa conceitos estatísticos para rejeitar ou não a hipótese nula.

A hipótese nula aqui testa a igualdade entre as médias contra a hipótese alternativa, que testa a diferença entre as médias, ora analisando se uma média é maior que a outra, ora analisando se uma média é menor que a outra, dependendo da situação de interesse envolvida.

O Teste t utiliza os dados da amostra para calcular a estatística t e depois compara com a distribuição t de Student para identificar a probabilidade de se ter obtido o resultado observado, caso a hipótese nula seja verdadeira.

A importância deste teste está em que a distribuição t de Student surge naturalmente a partir de variáveis aleatórias que seguem a distribuição normal, quando sua média e variância são desconhecidas (BUSSAB; MORETTIN, 2010).

¹³do inglês *Fisher Information Matrix*

3.4.2 Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney

O teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) (MANN; WHITNEY, 1947; WILCOXON, 1945), é o teste não-paramétrico adequado para comparar as funções de distribuição de uma variável medida pelo menos em uma escala ordinal em duas amostras independentes (HOLLANDER; WOLFE, 1999). Este teste pode também ser utilizado como alternativa ao teste t Student para amostras independentes, quando os pressupostos deste teste não são válidos.

As hipóteses estatísticas do teste WMW podem escrever-se como $H_0 : F(X1) = F(X2)$ vs $H_1 : F(X1) \neq F(X2)$ para um teste bilateral; $H_0 : F(X1) \leq F(X2)$ vs $H_1 : F(X1) > F(X2)$ para um teste unilateral à direita e $H_0 : F(X1) \geq F(X2)$ vs $H_1 : F(X1) < F(X2)$ para um teste unilateral à esquerda. As hipóteses do teste WMW são também frequentemente escritas em função das medianas populacionais.

No presente trabalho, o nível de significância considerado foi de 95%, é a probabilidade de se rejeitar a hipótese que as medidas não sejam significativamente diferentes, quando a probabilidade (p -valor) for menor ou igual a 0,05 (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

3.4.3 Análise exploratória dos dados

Neste trabalho a análise exploratória dos dados será feita por intermédio de *box plots* (TUKEY, 1970; TUKEY, 1977). O *box plot* é uma ferramenta da estatística descritiva que fornece em forma gráfica muitos aspectos dos dados como: localização dos quartis, assimetria, e os valores discrepantes ou atípicos (*outliers*) (HOAGLIN; MOSTELLER; TUKEY, 2006). A medida de dispersão é a amplitude interquartil que é a distância do primeiro quartil (Q1) ao terceiro quartil (Q3). Os limites do valor máximo e mínimo são calculadas em função de um fator de 1,5 da amplitude interquartil (Q3–Q1). Na Figura 16 é apresentado um exemplo para interpretar o *box plot*.

3.4.4 Teste de Kruskal-Wallis

O teste de Kruskal Wallis (KW) é uma extensão do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. É um teste não paramétrico utilizado para comparar três ou mais amostras. Ele é usado para testar a hipótese nula de que todas as populações possuem funções de distribuição iguais contra a hipótese alternativa de que ao menos duas das populações possuem funções de distribuição diferentes (GIBBONS; CHAKRABORTI, 2003).

3.5 Abordagem bayesiana

Seja θ o vetor de parâmetros do modelo proposto. A informação inicial associada aos parâmetros pode ser modelada por uma função densidade de probabilidade *a priori*,

Figura 16 – Forma de interpretar o *box plot*.

denotada por $\pi_0(\boldsymbol{\theta})$. Além disso, tem-se a função de verossimilhança associada a um conjunto de observações $\mathcal{D}$ que será denotada por $L(\mathcal{D}|\boldsymbol{\theta})$. Assim, combinando a densidade de probabilidade *a priori* com a função de verossimilhança por meio do teorema de Bayes, obtém-se a função densidade de probabilidade *a posteriori*, denotada por $\pi(\boldsymbol{\theta}|\mathcal{D})$ (PAULINO; AMARAL-TURKMAN; MURTEIRA, 2003), a qual é dada por:

$$\pi(\boldsymbol{\theta}|\mathcal{D}) = \frac{L(\mathcal{D}|\boldsymbol{\theta})\pi_0(\boldsymbol{\theta})}{\int_{\Theta} L(\mathcal{D}|\boldsymbol{\theta})\pi_0(\boldsymbol{\theta})d\boldsymbol{\theta}}, \quad \boldsymbol{\theta} \in \Theta \quad (46)$$

É comum encontrar na literatura a notação de proporcionalidade para representar a densidade de probabilidade *a posteriori* já que a integral no denominador de (46) é função somente dos dados observados $\mathcal{D}$ e representa a constante normalizadora da densidade *a posteriori* que garante que a integral de $\pi(\boldsymbol{\theta}|\mathcal{D})$ para $\boldsymbol{\theta} \in \Theta$ seja igual a 1. Desta forma, tem-se

$$\pi(\boldsymbol{\theta}|\mathcal{D}) \propto L(\mathcal{D}|\boldsymbol{\theta})\pi_0(\boldsymbol{\theta}), \quad \boldsymbol{\theta} \in \Theta. \quad (47)$$

3.5.1 Monte Carlo via cadeia de Markov

Uma das principais ideias dos métodos de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) é obter uma amostra da distribuição a posteriori e calcular estimativas amostrais de características desta distribuição.

3.5.2 Cadeia de Markov

Uma cadeia de Markov é um processo estocástico $\{X_0, X_1, \dots\}$ tal que a distribuição de X_t dados todos os valores anteriores $X_0, \dots, X_{t-1}$ depende apenas de X_{t-1} , o que equivale a dizer que,

$$P(X_t \in A | X_0, \dots, X_{t-1}) = P(X_t \in A | X_{t-1}) \quad (48)$$

para qualquer subconjunto A .

3.5.3 Algoritmo de Metropolis-Hastings

A fundamentação básica dos algoritmos de Metropolis-Hastings (METROPOLIS et al., 1953; HASTINGS, 1970), está em gerar um valor de uma distribuição auxiliar e aceitar tal valor com uma dada probabilidade. Este método garante a convergência da cadeia para a distribuição *a posteriori*.

Suponha-se que a cadeia esteja no estado θ , ou seja, o parâmetro possui um valor e um novo valor θ' para esse parâmetro é gerado de uma distribuição proposta $q(\cdot|\theta)$, em que a distribuição proposta pode depender do estado atual da cadeia. Assim, o novo valor θ' é aceito como probabilidade.

$$\alpha(\theta, \theta') = \min \left(1, \frac{\pi(\theta')q(\theta|\theta')}{\pi(\theta)q(\theta'|\theta)} \right), \quad (49)$$

em que π é a distribuição de interesse.

Uma propriedade importante é que só precisa-se conhecer π parcialmente, o que é indispensável em aplicações bayesianas, em que não conhecemos completamente *a posteriori*. Note-se ainda que a cadeia pode permanecer no mesmo estado por muitas iterações e na prática costuma-se controlar isto calculando a porcentagem média de iterações para as quais novos valores são aceitos.

De maneira prática, o algoritmo de Metropolis-Hastings pode ser detalhado pelos seguintes passos:

1. faça $t = 0$ e entre com um valor inicial $\theta^{(0)}$;
2. gere um novo valor θ' de $q(\cdot|\theta)$;
3. calcule a probabilidade de aceitação $\alpha(\theta, \theta')$ e gere $u \sim U(0, 1)$;

4. se $u \leq \alpha$ então aceite o novo valor gerado e especifique $\theta^{(t+1)} = \theta'$, senão rejeite e faça $\theta^{(t+1)} = \theta$;
5. incremente o contador e volte ao passo 2.

Em aplicações bayesianas, a distribuição de interesse é a própria posteriori, isto é, $\pi = p(\theta|x)$.

Quando as distribuições condicionais não são facilmente identificadas utiliza-se O algoritmo de Metropolis-Hastings é utilizado quando as distribuições condicionais não são facilmente identificadas. Quando se conhece a forma da distribuição condicional costuma-se usar o Amostrador de Gibbs (GEMAN; GEMAN, 1984; GELFAND; SMITH, 1990).

3.5.4 Amostrador de Gibbs

No amostrador de Gibbs a cadeia sempre se move para um novo valor. As transições de um estado para outro são feitas de acordo com as distribuições completas $\pi(\theta_i|\theta_{-i})$, em que $\theta_{-i} = (\theta_1, \dots, \theta_{i-1}, \theta_{i+1}, \dots, \theta_d)'$. Tais distribuições são obtidas a partir da distribuição conjunta,

$$\pi(\theta_i|\theta_{-i}) = \frac{\pi(\theta)}{\int \pi(\theta) d\theta_i}. \quad (50)$$

Se as distribuições condicionais completas forem completamente conhecidas, então o amostrador de Gibbs é definido pela seguinte esquematização:

1. faça $t = 0$ para inicializar o contador;
2. determine valores iniciais $\theta^{(0)} = (\theta_1^{(0)}, \dots, \theta_d^{(0)})$;
3. obtenha um novo valor de $\theta^{(t)}$ por intermédio de $\theta^{(t-1)}$ por meio da geração sucessiva dos valores

$$\begin{aligned} \theta_1^{(t)} &\sim \pi(\theta_1|\theta_2^{(t-1)}, \theta_3^{(t-1)}, \dots, \theta_d^{(t-1)}) \\ \theta_2^{(t)} &\sim \pi(\theta_2|\theta_1^{(t)}, \theta_3^{(t-1)}, \dots, \theta_d^{(t-1)}) \\ &\vdots \\ \theta_d^{(t)} &\sim \pi(\theta_d|\theta_1^{(t)}, \theta_2^{(t)}, \dots, \theta_{d-1}^{(t)}) \end{aligned}$$

4. incremente o contador e retorne ao passo 2 até obter convergência.

O amostrador de Gibbs é um caso especial do algoritmo de Metropolis-Hastings, tomando a distribuição condicional completa como proposta e probabilidade de aceitação igual a 1.

3.5.5 Modelo

No final dos ensaios fermentativos realizados, é importante verificar se os rendimentos (valor adimensional calculado em função da massa produzida de um analito em função da massa de substrato fornecida)¹⁴ dos analitos em estudo (acetato, lactato, succinato, glicerol, manitol e etanol), são diferentes para cada tratamento. Com esta análise, pode-se inferir qual o comportamento metabólico de cada tratamento ao longo dos ciclos. Adicionalmente aos metabólitos, considerou-se para análise a biomassa. O CO₂ gerado, que não está acoplado com a produção de etanol, acetato e succinato, também será analisado. Este analito foi nomeado como DeltaCO₂ e os resultados apresentados permitirão iniciar futuros estudos que expliquem como a levedura produz outros metabólitos por outras vias metabólicas, as mesmas que geram também CO₂.

Para isto, compara-se os rendimentos médios de cada analito analisado nos quatro tratamentos. Como o número de amostras em geral é pequena (8 ciclos), testes clássicos podem não ser adequados, dado que recomendam uma amostra relativamente grande para que se consiga resultados satisfatórios (CASELLA; BERGER, 1990). A validade da aplicação dos testes clássicos, como o teste *t* de Student ou o teste F da Análise de Variância, depende dos pressupostos de normalidade, homoscedasticidade e independência (BRANCO, 2010). Por esta razão, utiliza-se alternativamente à abordagem clássica, a abordagem bayesiana.

Na abordagem bayesiana, considera-se, para cada analito, um modelo Log-Normal com dados correlacionados para representar o rendimento ao longo dos ciclos considerados. A escolha da distribuição Log-Normal se deve ao fato de os rendimentos em estudo assumirem somente valores positivos.

Seja Y a variável aleatória que representa o rendimento do analito em estudo. Segue que $Y \sim \text{Log} - \text{Normal}(\mu_Y, \sigma_Y^2)$. Por consequência, a variável aleatória $X = \log(Y) \sim N(\mu_X, \sigma_X^2)$. Sejam $Y_1, Y_2, \dots, Y_n$ variáveis aleatórias com distribuição Log-Normal com média (μ_Y) e variância (σ_Y^2), em que Y_i representa a concentração média do analito no i -ésimo ciclo, $i = 1, \dots, n$. Logo, tem-se que $X_1 = \log(Y_1)$, $X_2 = \log(Y_2)$, $\dots$, $X_n = \log(Y_n)$ são variáveis aleatórias com distribuição Normal com média (μ_X) e variância (σ_X^2) seguindo as seguintes relações:

$$E(Y) = \exp(E(X) + 0.5\text{Var}(X)) \quad (51)$$

$$\text{Var}(Y) = (\exp(\text{Var}(X)) - 1) \exp(2E(X) + \text{Var}(X)) \quad (52)$$

As Equações 51 e 52, são utilizadas para realizar a transformação reversa dos parâmetros do modelo (μ_X e σ_X^2) e obter μ_Y e σ_Y^2 .

¹⁴considera-se analitos aos metabólitos das leveduras e bactérias assim como a biomassa produzida

¹⁵Considera-se a função logaritmo natural

É importante destacar que o modelo proposto considera dados correlacionados, o que permite incluir o efeito dos reciclos. Mais precisamente, considera-se que a concentração do ciclo atual (X_i) está correlacionada somente com a concentração do ciclo anterior (X_{i-1}), para $i = 2, \dots, n$. Desta forma, a concentração do primeiro ciclo entra no modelo, mas não se relaciona com nenhum outro ciclo, apenas fornece mais informação para a solução do problema.

Definindo o vetor $\boldsymbol{\theta} = (\mu_X, \tau_X, \rho_X)$, em que $\tau_X = \frac{1}{\sigma_X^2}$, tem-se que a função de verossimilhança para o modelo proposto, considerando n ciclos, é dada por:

$$\begin{aligned} L((\mu_X, \tau_X, \rho_X) | \mathcal{D}) &= \left[\prod_{i=2}^n f(X_i | X_{i-1}) \right] f(X_1) \\ &\propto \frac{\tau_X^{(n/2)}}{(1 - \rho_X^2)^{(n-1)/2}} \exp \left\{ -\frac{\tau_X}{2} \left[\frac{1}{(1 - \rho_X^2)} \sum_{i=2}^n (X_i - \mu_X(1 - \rho_X) - \rho_X X_{i-1})^2 \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + (X_1 - \mu_X)^2 \right] \right\} \end{aligned}$$

sendo que $f(X_i | X_{i-1})$ é a função densidade de probabilidade condicional da variável aleatória $X_{i+1} | X_i \sim N(\mu_X + \rho_X(X_i - \mu), \sigma_X^2(1 - \rho_X^2))$ e $f(X_1)$ é a função densidade de probabilidade da variável aleatória $X_1 \sim N(\mu_X, \sigma_X^2)$.

Os parâmetros de interesse (μ_X, τ_X, ρ_X) do modelo em estudo foram considerados independentes. Assim, a distribuição *a priori* conjunta para $\boldsymbol{\theta}$ é dada por:

$$\pi_0(\boldsymbol{\theta}) = \pi_0(\mu_X) \pi_0(\tau_X) \pi_0(\rho_X) \quad (53)$$

Foram atribuídas distribuições *a priori* não informativas para μ_X , τ_X e ρ_X . As distribuições *a priori* consideradas foram, respectivamente:

$$\pi_0(\mu_X) \propto \text{constante} \quad (54)$$

$$\pi_0(\tau_X) \sim \text{Gama}(a, b), \quad (55)$$

com a e b conhecidos.

$$\pi_0(\rho_X) \sim U[-1, 1] \quad (56)$$

Combinando a função de verossimilhança e a distribuição *a priori* conjunta, obtém-se a densidade *a posteriori* conjunta de $\boldsymbol{\theta}$, dada por:

$$\begin{aligned} \pi(\boldsymbol{\theta} | \mathcal{D}) &\propto \frac{\tau_X^{(n/2)}}{(1 - \rho_X^2)^{(n-1)/2}} \exp \left\{ -\frac{\tau_X}{2} \left[\frac{1}{(1 - \rho_X^2)} \sum_{i=2}^n (X_i - \mu_X(1 - \rho_X) - \rho_X X_{i-1})^2 \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + (X_1 - \mu_X)^2 \right] \right\} \pi_0(\boldsymbol{\theta}) \end{aligned}$$

Considere a transformação:

$$\delta = \log((\rho_X + 1)/(1 - \rho_X)) \quad (57)$$

isto é,

$$\rho_X = (\exp(\delta) - 1)/(1 + \exp(\delta)) \quad (58)$$

Assim, uma distribuição *a priori* para δ , é dada por uma normal $(\mu_\delta, \sigma_\delta^2)$, com μ_δ e σ_δ^2 conhecidas e chamadas de hiperparâmetros.

onde:

$$\begin{aligned} \delta &\in [-\infty, +\infty] \\ \rho_X &\in [-1, 1] \end{aligned}$$

Logo, para obter-se os estimadores bayesianos dos parâmetros desejados, utilizamos o algoritmo MCMC, considerando a transformação dada pela Equação 58.

O critério Geweke (GEWEKE, 1992), será utilizado para verificar a convergência de (μ_X, σ_X^2) , $(\rho_X, \mu_Y, \sigma_Y^2)$ e (ρ_Y) .

3.5.6 FBST

O FBST é um teste estatístico bayesiano utilizado para testar hipóteses (PEREIRA; STERN, 1999). Suponha que há o interesse em testar duas hipóteses H_0 : Tratamento A = Tratamento B versus H_1 : Tratamento A $\neq$ Tratamento B. Por intermédio do teste FBST é possível ter uma evidência de que a hipótese H_0 é verdadeira ou não. Inicialmente, estima-se os parâmetros do modelo considerando os dados do Tratamento A. Depois, estima-se os parâmetros do modelo considerando os dados do tratamento B. Então, calcula-se as probabilidades *a posteriori* de ambas as estimativas, considerando os dados do tratamento A e compara-se estas probabilidades.

A evidência de que o tratamento A, é maior do que o tratamento B, é dada pela proporção de probabilidades *a posteriori* considerando as estimativas do tratamento A, maiores do que considerando estimativas do tratamento B.

Repete-se, calculando-se as probabilidades *a posteriori* de ambas as estimativas, considerando os dados do tratamento B. A evidência de que o tratamento B é maior do que o tratamento A é dado pela proporção de probabilidades *a posteriori* considerando as estimativas do tratamento B, maiores do que probabilidades *a posteriori* considerando as estimativas do tratamento A.

Assim, se em ambos os casos, a proporção for pequena (evidência baixa), não rejeita-se a hipótese de igualdade entre os tratamentos.

Resultados e discussão

4.1 Comentários iniciais

Os resultados aqui apresentados serão divididos de maneira semelhante à proposta de metodologia. Dessa forma, inicialmente serão apresentados resultados obtidos a partir da implementação computacional, sendo essa seção referente à estimação de parâmetros do conjunto de EDO's em função dos dados experimentais do tratamento Controle.

A análise de sensibilidade paramétrica junto com a matriz de Fisher indicará o grau de influência de cada parâmetro. Entretanto, a correlação desses parâmetros complementará a informação suficiente e necessária para escolher os mesmos. Assim, um vetor de efeito fixo será formulado para caracterizar a interferência causada pela contaminação tendo como referência o tratamento Controle.

Em seguida, serão apresentados os resultados da inferência estatística desenvolvida, sintetizada por meio dos testes t de Student (t), Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) e Kruskal Wallis (KW), seguidos pela abordagem bayesiana desenvolvida. Por meio dos testes e abordagem citados, serão avaliados os analitos ¹ medidos ao longo dos ciclos fermentativos, avaliação complementada pela discussão das implicações bioquímicas e fisiológicas desses analitos, a fim de esclarecer os resultados, relacionando-os com a natureza do processo fermentativo.

4.2 Resultados - Implementação computacional

4.2.1 Evolução Diferencial

Para estimar os parâmetros encontrados no conjunto de EDO's, foram utilizadas as medições correspondentes ao ciclo fermentativo do tratamento Controle, os quais continham informações sobre a concentração de células de leveduras (X), nomeada como

¹Neste trabalho considera-se analitos aos metabólitos das leveduras e bactérias assim como a biomassa produzida

biomassa; ao produto (P), concentração de etanol; e à concentração de ART encontrado (S), ou substrato. Os dados das medidas podem ser encontrados nas Tabelas 5, 6, 7 e 4.2.1:

O processo fermentativo em estudo tem duas fases: 1) A fase de batelada alimentada, em que o substrato é alimentado a velocidade constante ao longo de 4 horas; e, 2) A fase de batelada, iniciada pela condição no final da alimentação até o final da fermentação definida em 8 horas. A concentração de ART do substrato para os 4 tratamentos foi de 175 g/L.

Tabela 5 – Dados experimentais para o tratamento Controle.

Controle				
Tempo	Produto	Substrato	Biomassa	Volume
h	g/L	g/L	g/L	L
0	36.55	0.31	88.55	0.0557
2	55.74	8.08	44.70	0.1217
4	58.58	15.32	27.83	0.1792
6	68.53	1.04	27.85	0.1792
8	67.74	0.98	27.50	0.1792

Tabela 6 – Dados experimentais para o tratamento com bactérias homofermentativas.

Homofermentativas				
Tempo	Produto	Substrato	Biomassa	Volume
h	g/L	g/L	g/L	L
0	36.16	0.31	87.60	0.0553
2	55.42	8.83	41.30	0.1213
4	60.79	15.32	27.75	0.1781
6	68.45	0.62	27.75	0.1781
8	67.90	0.51	27.00	0.1781

Tabela 7 – Dados experimentais para o tratamento com bactérias heterofermentativas.

Heterofermentativas				
Tempo	Produto	Substrato	Biomassa	Volume
h	g/L	g/L	g/L	L
0	35.61	0.31	87.25	0.0553
2	52.26	11.59	40.53	0.1213
4	59.92	14.19	27.83	0.1778
6	65.69	0.79	26.60	0.1778
8	66.63	0.31	26.88	0.1778

Os dados tabelados foram inseridos no programa desenvolvido, como citado na descrição da metodologia adotada. Para execução do algoritmo de ED a introdução de valores seletores da estratégia de otimização, valores máximos e mínimos para os parâmetros estimados, e a quantidade de iterações escolhida para refinar o resultado.

Modificações do algoritmo original² implementado por Storn e Price (1997), foram necessárias para adequar as saídas das gerações do AG³, ao nosso problema. O algoritmo

²O algoritmo está disponível em <http://www1.icsi.berkeley.edu/~storn/code.html>

³Algoritmo genético do inglês *Genetic Algorithm*

Tabela 8 – Dados experimentais para o tratamento com bactérias homofermentativa e heterofermentativas em conjunto.

Homo+Heterofermentativas				
Tempo	Produto	Substrato	Biomassa	Volume
h	g/L	g/L	g/L	L
0	35.92	0.31	87.98	0.0553
2	48.63	12.45	41.58	0.1213
4	58.66	18.45	27.18	0.1778
6	65.29	1.50	26.15	0.1778
8	67.42	0.31	26.50	0.1778

modificado *devec3modc*, implementa ajustes que restringem os valores aleatórios gerados como indivíduos das populações a valores positivos, para que dessa forma não se perdesse seu significado físico e biológico.

Os parâmetros para o algoritmo ED foram: $VTR = 10^{-6}$; $D = 7$; $NP = 20$; $itermax = 100$; $F = 0,8$; $CR = 0,8$; $strategy = 7$; $refresh = 10$.

Iterações foram feitas para minimizar o valor da função objetivo (erro quadrático). O erro final encontrado, considerando o acumulado entre as três variáveis de estado (X_{ad} , S_{ad} , P_{ad}) permaneceu em valores da ordem de 10^{-3} . Os parâmetros estimados se encontram na Tabela 9. Os gráficos com as soluções das EDOs, utilizando os parâmetros estimados por ED e ajustados aos dados experimentais por intermédio da função objetivo expressada na Equação 59, são apresentados nas Figuras 17, 18 e 19.

$$\epsilon = \sum_{n=1}^N \left[(X_{ad_n} - X_{ade_n})^2 + (S_{ad_n} - S_{ade_n})^2 + (P_{ad_n} - P_{ade_n})^2 \right] \quad (59)$$

onde: N , é o número de pontos medidos no ensaio; ϵ , é o erro acumulado da função objetivo a ser minimizada; X_{ad_n} , S_{ad_n} e P_{ad_n} são os valores experimentais; e X_{ade_n} , S_{ade_n} e P_{ade_n} são os valores simulados com o modelo e os parâmetros estimados por ED.

O balanço de massa do tratamento Controle foi calculado para encontrar os parâmetros $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$. O parâmetro M foi fixado em 0,1. Desta forma, $Y_{P/S} = 0,46572$ e $Y_{X/S} = 0,01755$. O valor desses parâmetros adimensionalizados é: $Y_{ps_d} = 1,1893$ e $Y_{ps_d} = 0,0347$. O parâmetro M já é adimensional.

Tabela 9 – Parâmetros adimensionais estimados para o tratamento Controle pela ED.

Parâmetro adimensional	Valor
$umax_a d$	0,4837
$Ks_a d$	0,0256
$Ki_a d$	3,2229
$Pmax_a d$	1,5000
N	1,2800
$Ms_a d$	0,0010
$Xmax_a d$	1,6939

Tabela 10 – Parâmetros dimensionais estimados para o tratamento Controle pela ED.

Parâmetro dimensional	Valor
μ_{max}	0,0605
K_s	4,4800
K_i	564,0075
P_{max}	102,7950
N	1,2800
M_s	0,0001
X_{max}	149,9948

Figura 17 – Perfil de ajuste do modelo aos dados experimentais de Pad no tratamento Controle ($\epsilon = 0,0067$).

Apesar da boa aproximação, alguns pontos mostraram-se destoantes visualmente (Figura 18). Contudo, isso se atribui a efeitos de escala, em vista da magnitude pequena da concentração do substrato apresentada durante o ciclo fermentativo.

Na Figura 17 percebe-se um aumento na concentração do produto durante toda a fase de alimentação, compreendida entre os tempos 0 e 0,5⁴. Concomitante a isso, há aumento do substrato (Figura 18) e diminuição da concentração de biomassa (Figura 19), em função da diluição referente à alimentação.

A partir dos valores encontrados para cada um dos parâmetros listados foi avaliada a influência dos mesmos sobre o conjunto de EDO's, por intermédio do método de sensibilidade paramétrica.

⁴A grandeza de tempo e concentração é adimensional

Figura 18 – Perfil de ajuste do modelo aos dados experimentais de Sad no tratamento Controle ($\epsilon = 0,0067$).

Figura 19 – Perfil de ajuste do modelo aos dados experimentais de Xad no tratamento Controle ($\epsilon = 0,0067$).

4.2.2 Sensibilidade paramétrica

Para a análise paramétrica de sensibilidade foi utilizado o pacote de funções XPPAUT 6.10, como descrito anteriormente. Gráficos para os parâmetros estimados foram construídos, separando as curvas da fase batelada alimentada e a fase batelada (antes e após

o término da alimentação do substrato).

Para o cálculo da sensibilidade, as equações diferenciais a serem estudadas, os parâmetros a serem avaliados, as variáveis de estado, as funções e condições iniciais e de contorno foram definidas: *Independent Species* = 4; tolerância ao erro absoluta (*atoler*) = $1e^{-8}$; $dt=0.001$; tolerância ao erro (*toler*) = $1e^{-6}$; método de integração (*solver*) = *cvode* (COHEN; HINDMARSH, 1994); perturbação = 1%. Para a fase batelada o número de variáveis de estado *Independent Species* = 3.

O conjunto de gráficos a seguir apresenta os resultados das curvas de sensibilidade paramétrica calculada ao longo da fase batelada alimentada ($t_{ad} = [0 - 0,5]$) e da fase batelada ($t_{ad} = [0,5 - 1]$).

Figura 20 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Produto - Fase batelada alimentada.

A observação dos gráficos permite conceber uma relação de magnitude e ordem de influência dos fatores sobre as variáveis de estados das EDO's.

Quanto aos gráficos da influência no produto, na Figura 20, verifica-se ao longo da fase alimentada maior sensibilidade aos parâmetros $umax_{ad}$, $Pmax_{ad}$ e Ks_{ad} . Para $umax_{ad}$ e $Pmax_{ad}$ a sensibilidade mostra-se positiva (correlação de proporcionalidade direta), acarretando aumento do produto para um aumento de $umax_{ad}$, $Pmax_{ad}$. Tendência oposta é observada quanto a influência do parâmetro Ks_{ad} .

Quando inserida a análise de Yxs_{ad} e Yps_{ad} , apresentada na Figura 21, nota-se predominância da sensibilidade ao parâmetro Yxs_{ad} , com magnitude de sensibilidade negativa superior à exercida por Ks_{ad} . A predominância Yxs_{ad} e Ks_{ad} permanece para a etapa de batelada como mostrado nas Figuras 22 e 23 ambos com tendências negativas. A influência é reduzida a partir do termo de crescimento da biomassa ($t_{ad} = 0,7$) e a influência da

Figura 21 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Produto - Fase batelada alimentada. Inclusão de Y_{xs_d} e Y_{ps_d} .

Figura 22 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Produto - Fase batelada.

constante de saturação de crescimento celular ou de Monod (Ks_d) também é reduzida.

Os efeitos dos parâmetro N (negativo) e $Pmax_d$ (positivo), tanto fase alimentada, quanto na fase não alimentada apresentaram menor influência. No entanto, a influência Ki_d , M e Ms_d foi considerada desprezível.

Para os gráficos do substrato, quando em batelada alimentada (Figuras 24 e 25),

Figura 23 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Produto - Fase batelada. Inclusão de Yxs_d e Yps_d .

Figura 24 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Substrato - Fase batelada alimentada.

verifica-se permanência da predominância dos parâmetros $umax_d$, Ks_d e Yxs_d , sendo ainda a maior magnitude de sensibilidade advinda de Yxs_d . O que se observa, no entanto, é a inversão entre a proporcionalidade de $umax_d$ e Ks_d , quando se compara produto e substrato. Para o substrato, $umax_d$ exerce tendência negativa, em oposição ao que ocorria com o produto. A oposição se mantém também para Ks_d .

Figura 25 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Substrato - Fase batelada alimentada. Inclusão de Y_{xs_d} e Y_{ps_d} .

Figura 26 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Substrato - Fase batelada.

As Figuras 26 e 27 apresentam a sensibilidade na ausência de alimentação de substrato; nesta fase os parâmetros mais significativos são K_{s_d} e Y_{xs_d} . Ao observar os gráficos, comparativamente, nota-se que a sensibilidade de P_{ad} (produto) e S_{ad} (substrato) são simétricas em relação ao eixo das ordenadas. Dessa forma, parâmetros que contribuíam para um aumento do produto gerado, agora contribuem para diminuição do substrato.

Figura 27 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre o Substrato - Fase batelada. Inclusão de Y_{xs_d} e Y_{ps_d} .

Assim, mostra-se coerência com o processo fermentativo que produz etanol a partir do consumo do substrato.

A influência dos parâmetro N (positiva) e P_{max_d} (negativa), tanto fase de batelada alimentada, quanto na fase não alimentada foi menor. Por outro lado, a influência de K_{i_d} , M e M_{s_d} foi mínima.

Figura 28 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre a Biomassa - Fase batelada alimentada.

Figura 29 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre a Biomassa - Fase batelada alimentada. Inclusão de Yxs_d e Yps_d .

Figura 30 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre a Biomassa - Fase batelada.

Nas Figuras 28 – 31, apresentam-se a sensibilidade dos parâmetros com respeito à biomassa (X_{ad}). Observa-se um comportamento semelhante, do efeito predominante de $umax_d$, Ks_d e Yxs_d . Para a fase de batelada alimentada, X_{ad} é predominantemente afetada por perturbações dos parâmetros Ks_d (negativo) e Yxs_d (positivo). A tendência se mantém para a batelada e nota-se ainda uma flutuação no valor de Ms_d , inerente ao

Figura 31 – Curvas de sensibilidade dos parâmetros sobre a Biomassa - Fase batelada. Inclusão de Yxs_d e Yps_d .

erro de quantização ao resolver as EDO's (Figura 30). A influência do parâmetro $Pmax_d$ (positiva), tanto fase de batelada alimentada, quanto na fase não alimentada foi menor. Por outro lado, a influência de N , Ki_d , M e Ms_d foi mínima.

As observações feitas permitem identificar que, invariavelmente, conferem maior sensibilidade às equações governantes da fermentação os parâmetros $umax_d$, Ks_d e Yxs_d , no entanto o parâmetros $Pmax_d$ teve um aporte considerável no produto, substrato e biomassa. No entanto o parâmetro N , teve influência somente no produto e substrato.

Além disso, a divisão da análise de sensibilidade em duas etapas (batelada alimentada e batelada) mostra que a magnitude de sensibilidade gerada, por meio de uma perturbação percentual do parâmetro, não se mantém constante para as duas etapas e apresenta, em certos casos, inversão da tendência (negativa ou positiva) em função da variável de estado analisada. Este ponto é relevante para avaliar a qualidade do modelo, futuros estudos poderão ser feitos para modelar cada fase com um grupo de parâmetros diferentes, consistente com a mudança no metabolismo das leveduras em função da presença ou não de alimentação.

4.2.3 Correlação de parâmetros e matriz de informação de Fisher

Do resultado apresentado na Tabela 11, mostra o ranking dos parâmetros do modelo e a informação contida em cada um deles para explicar a dinâmica das variáveis de estado. O parâmetro mais relevante é Yps_d , diferente de outras pesquisas onde o parâmetro $umax_d$ foi encontrado como mais relevante (FERREIRA, 2005; BORGES, 2008). A diferença pode

Tabela 11 – Resultado do ranking da matriz FIM

Ordem	Parâmetro	Score	
		Batelada alimenada	Batelada
1	Y_{ps_d}	1.48E+02	3.70E+01
2	P_{max_d}	1.15E+02	2.69E+01
3	u_{max_d}	8.12E+01	1.34E+01 ^a
4	Y_{xs_d}	7.87E+01	1.35E+01
5	N	7.73E+01	1.62E+01 ^a
6	K_{s_d}	2.26E+01	4.42E+00
7	X_{max_d}	3.97E+00	3.26E-01
8	M	3.13E+00	2.95E-01
9	K_{i_d}	1.29E+00	1.88E-01
10	M_{s_d}	3.88E-02	6.75E-02

^a Na etapa de batelada o ranking dos parâmetros N e u_{max_d} foi inverso respeito da fase batelada alimentada

estar explicada pelo valor estimado para este parâmetro. A taxa específica máxima de crescimento foi muito inferior de acordo com a Tabela 9, onde o valor dimensional (0,0605) comparado com (0,39) obtido por de ANDRADE et al. (2007), Andrade et al. (2009). É possível que a utilização de altas concentrações de células no pé-de-cuba e a concentração de etanol no início da fermentação (36,55 g/L), simulando a condição padrão da indústria afete significativamente este parâmetro, mostrando que este resultado seria mais adequado para uma condição industrial padrão.

Uma observação pode ser feita ao respeito do parâmetro K_{s_d} , não foi explicado o ranking na matriz FIM, comparado com a sensibilidade apresentada nas curvas das Figuras 20– 31. As curvas apresentam maior relevância para K_{s_d} , no entanto a matriz FIM, mostrou um ranking maior para P_{max_d} . A análise da sensibilidade é feita por intermédio de derivadas parciais em função de cada variável de estado. Porém, o ranking da matriz FIM fornece uma métrica completa e única para o sistema todo.

Em função da relevância para o modelo, foram escolhidos os cinco primeiros parâmetros (Y_{ps_d} , P_{max_d} , u_{max_d} , Y_{xs_d} , e N), resultados semelhantes foram obtidos por meio da técnica de análise de sensibilidade de Plackett–Burman (ANDRADE et al., 2009). Mantovaneli (2005) utilizou um planejamento fatorial fracionário, concluiu que os parâmetros Y_{ps_d} e N promovem maiores efeitos para todas as variáveis do processo.

Alem da redução dos parâmetros é necessário qualificar o modelo, estudando a correlação dos seus parâmetros.

Nas Tabelas 12 – 14 são apresentados os resultados das correlações dos parâmetros que tiveram o melhor ranking na matriz FIM. O valor da correlação, quanto maior ($\approx \pm 1$) indica que a diferenciação e precisão na estimação são comprometidas, não sendo possível achar uma solução única. Os parâmetros altamente correlacionados são co-dependentes e não poderiam ser estimados em forma simultânea.

No caso que a correlação entre parâmetros seja maior de 0,7, eles são considerados

inadequados para ser utilizados como único valor na modelagem (desde que o valor de um parâmetro é afetado pelo valor do outro parâmetro correlacionado) (SANSONETTI et al., 2011).

Tabela 12 – Correlação dos parâmetros do modelo - Produto

	Produto				
	u_{max_d}	P_{max_d}	N	Y_{xs_d}	Y_{ps_d}
u_{max_d}	1,00	-0,47	-0,16	0,97	-0,77
P_{max_d}		1,00	0,90	-0,36	0,87
N			1,00	-0,11	0,59
Y_{xs_d}				1,00	-0,63
Y_{ps_d}					1,00

Tabela 13 – Correlação dos parâmetros do modelo - Substrato

	Substrato				
	u_{max}	P_{max}	N	Y_{xs}	Y_{ps}
u_{max}	1,00	-0,65	0,87	0,56	-0,76
P_{max}		1,00	-0,61	0,23	0,98
N			1,00	0,31	-0,74
Y_{xs}				1,00	0,11
Y_{ps}					1,00

Tabela 14 – Correlação dos parâmetros do modelo - Biomassa

	Biomassa				
	u_{max}	P_{max}	N	Y_{xs}	Y_{ps}
u_{max}	1,00	-0,73	0,75	0,27	-0,69
P_{max}		1,00	-0,82	-0,75	0,95
N			1,00	0,80	-0,93
Y_{xs}				1,00	-0,87
Y_{ps}					1,00

Pela análise das Tabelas 12 – 14, observa-se uma correlação alta para os pares de parâmetros P_{max_d} , Y_{ps_d} , N e u_{max_d} . No caso do P_{max_d} , apresenta uma alta correlação com o parâmetro Y_{ps_d} para as três variáveis de estado; em função deste resultado e considerando que o rendimento etanólico do processo está determinado pelo parâmetro Y_{ps_d} , escolhemos retirar o parâmetro P_{max_d} .

O parâmetro N , mostrou uma alta correlação (0,87) com u_{max_d} para o substrato, (0,75) para a biomassa e uma alta correlação negativa (-0,93) com Y_{ps_d} , também para a biomassa. Nesta condição, definimos retirar o parâmetro N .

A partir desta análise, assumimos que os três parâmetros restantes (Y_{ps_d} , Y_{xs_d} e u_{max_d}) obtiveram um ranking alto na matriz FIM e uma correlação não ideal. Para o

produto, os parâmetros $umax_d$ e Yx_d estão altamente correlacionados, porém, para o substrato e biomassa mantém uma correlação baixa. No caso da biomassa, encontramos uma alta correlação inversa (-0,87) entre os parâmetros Yp_d e Yx_d , no entanto para o produto e a biomassa permanece baixa. No caso do substrato e o produto a correlação dos parâmetros $umax_d$ e Yp_d foi encontrada em -0,76 e -0,77 respectivamente.

Podemos inferir que com estes resultados que este modelo, bem conhecido e aceito, precisa ser reavaliado. No futuro deverá ser estudada a possibilidade de reduzir o número de parâmetros ou inclusive propor novos modelos que possam garantir uma solução única e estável. Identificabilidade, estabilidade e unicidade são conceitos extensamente estudados para resolver problemas inversos e para avaliar a qualidade dos modelos (CARRERA; NEUMAN, 1986; SANZ; VOSS, 2006).

No entanto, podemos utilizar a informação das sensibilidades e as correlações para propor uma heurística que permita encontrar soluções razoáveis para o modelo proposto, dentro das condições de contorno dos ensaios. Conhecidas as limitações do modelo, é mais justificável a redução dos parâmetros para um vetor de três, utilizando o significado físico de cada parâmetro e considerando que na metodologia proposta não estima os parâmetros Yp_d e Yx_d , mas bem, os calcula a partir do balanço de massa.

Desta forma, os desvios do vetor escolhido serão a base para modelar a interferência das bactérias e o impacto no processo será quantificado diretamente nos rendimentos na produção do produto e da biomassa.

4.2.4 Introdução do Efeito Fixo

A análise de sensibilidade permitiu concluir que alguns parâmetros, dentre todos os estimados, contribuem com maior ênfase para a aproximação dos pontos experimentais e solução numérica do problema da fermentação. Contudo, os parâmetros estimados e analisados equivalem apenas ao comportamento dinâmico do tratamento de controle. Para o caso contaminado é necessária a introdução de parâmetros que correspondam ao efeito das bactérias durante a fermentação.

Com a finalidade de reproduzir a contaminação por meio de parâmetros determináveis e que pudessem ser acoplados às EDO's sem modificar o equacionamento, foi inserido um vetor de variáveis categóricas em parâmetros que se mostraram adequados durante a análise de sensibilidade e correlação. Foram escolhido, para análise, os parâmetros $umax_d$, Yx_d e Yp_d . O vetor, Efeito Fixo, é dado por:

$$\vec{E_f} = [B_1 B_2 B_3] \quad (60)$$

E é inserido nas equações de forma que:

$$umax_d^* = umax_d * B_1 \quad (61)$$

$$Yxs_ad^* = Yxs_ad * B_2 \quad (62)$$

$$Yps_ad^* = Yps_ad * B_3 \quad (63)$$

Os parâmetros, que antes foram estimados para o tratamento Controle (Tabela 9), servem agora como base de referência para resolver as equações dos tratamentos contaminados (Homo, Hetero e Homo+Hetero). A função do Efeito Fixo é destacar a interferência das bactérias no processo fermentativo.

Devido a diferenças bioquímicas e fisiológicas entre as diferentes bactérias utilizadas (heterofermentativa, homofermentativa e a mistura de ambas) espera-se que haja diferenças entre o Efeito Fixo que modela cada um dos tratamentos. Além disso, espera-se que, em função da sensibilidade de cada parâmetro, exista uma diferença na contribuição dos mesmos para a modelagem das equações. Baseando-se nisso, foram introduzidos pesos para cada parâmetro em função da variável de estado estimada.

Para encontrar os parâmetros, a mesma abordagem de ED foi utilizada, considerando o vetor de Efeito Fixo como entrada do algoritmo de estimação, o número de parâmetros a estimar foi reduzido a 3. Foram utilizados diferentes pesos para os parâmetros, refletidos na minimização da função objetivo (ϵ), para separar os efeitos de cada parâmetro sobre as variáveis de estado. Isso foi possível, visto que o algoritmo de evolução diferencial encontrava nos pesos estabelecidos um indício de qual efeito deveria minimizar. O vetor de pesos utilizado foi estimado por intermédio da análise de sensibilidade, a fim de impedir que variações de magnitude dos parâmetros influenciasse a modelagem proposta. Ao final, os efeitos foram sobrepostos, por meio da média ponderada (Equação 64) dos parâmetros encontrados, para diferentes pesos.

$$B_i = \frac{\sum B_{i_k} * P_{i_k}}{\sum P_{i_k}} \quad (64)$$

A matriz de sensibilidade, que serviu de referência para escolha dos pesos, foi padronizada em valores dos parâmetros avaliados, em um tempo correspondente ao fim da alimentação.

Tabela 15 – Sensibilidade dos parâmetros medida em $t_ad = 0,5$ (adimensional).

	Pad	Xad	Sad
$umax_ad$	0,4	0,01	-0,4
Yxs_ad	-5,5	0,4	4,5
Yps_ad	0,4	-0,1	0,25

Para ilustrar o efeito dos pesos e da sensibilidade foram desenvolvidos os seguintes gráficos, nos quais são encontrados os efeitos da ponderação em cada variável de estado, para um parâmetro B_1 .

Figura 32 – Influência da ponderação sobre o Produto.

Figura 33 – Influência da ponderação sobre o Substrato.

De imediato é possível perceber que uma ponderação maior para os parâmetros que interferem em uma dada variável de estado confere menor erro de aproximação para a solução numérica da EDO dessa variável. Em linhas gerais, o peso determina - por meio dos parâmetros a serem estimados - em qual variável de estado o algoritmo encontrará a melhor aproximação.

Figura 34 – Influência da ponderação sobre a Biomassa.

Em outra vertente, analisando a matriz de sensibilidade, os dados correspondentes a B_1 indicam sensibilidade negativa para influenciar o substrato e positiva para influenciar o produto. Dessa forma, quando a ponderação beneficia a melhor aproximação do substrato, os valores encontrados para o produto se deslocam para cima, deslocando a curva para cima e com maior erro. Isso se deve aos valores de sensibilidade oposta.

Os resultados encontrados para os experimentos descritos anteriormente serão introduzidos e discutidos nas seções seguintes.

4.2.4.1 Bactérias heterofermentativas

Seguindo o procedimento descrito, foram encontrados para o ensaio utilizando contaminação com bactérias heterofermentativas, os seguintes valores para o vetor de Efeito Fixo, levando-se em conta a seguinte matriz de pesos:

Tabela 16 – Matriz de pesos do tratamento Hetero - Pesos do $\vec{E}_f$ para Pad, Xad e Sad.

	Pad	Xad	Sad
B1	7/9	1/9	1/9
B2	1/9	7/9	1/9
B3	7/10	1/10	2/10

Realizando a média ponderada descrita, encontrou-se uma função objetivo (ϵ), que foi inserida na tabela seguinte.

Como apresentado Tabela 18, houve uma diminuição no valor da função objetivo por causa do vetor de Efeito Fixo, a redução relativa apresentada foi de 28%. A influência do

Tabela 17 – Matriz de ponderação do tratamento Hetero - Valores para Pad, Xad e Sad.

	Pad	Xad	Sad
$u_{\max_{ad}}$	0,96670	1,03900	1,16800
$Y_{x_{sad}}$	1,03560	0,89000	0,84900
$Y_{p_{sad}}$	0,96670	0,94520	0,99750

Tabela 18 – Vetor $\vec{E}_f$ para o tratamento Hetero.

	B1	B2	B3	ϵ
Sem Ef	1,00000	1,00000	1,00000	0,01400
Com Ef	0,99710	0,90162	0,97071	0,00960

Efeito Fixo no modelo pode ser observada nas Figuras 35, 36 e 37.

Figura 35 – Ajuste do vetor $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Produto no tratamento Hetero.

4.2.4.2 Bactérias homofermentativas

De maneira semelhante ao tratamento Hetero, foram realizadas iterações do algoritmo de estimativa de parâmetros até que o mesmo convergiu, encontrando valores do vetor de Efeito Fixo que melhor aproximam-se aos dados experimentais. Os resultados encontrados são apresentados nas Tabelas 19 – 21.

Tabela 19 – Matriz de ponderação do tratamento Homo - Valores para Pad, Xad e Sad.

	Pad	Xad	Sad
$u_{\max_{ad}}$	1,11700	1,14600	1,18800
$Y_{x_{sad}}$	0,89000	0,83500	0,89000
$Y_{p_{sad}}$	1,00400	0,98000	1,00100

Figura 36 – Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Substrato no tratamento Hetero.

Figura 37 – Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais da Biomassa no tratamento Hetero.

Apresenta-se, nas Figuras 38, 39 e 40, as curvas obtidas a partir dos parâmetros da Tabela 21. O erro encontrado para o caso homofermentativo também apresentou redução da função objetivo. A relação de diminuição encontrada aproxima-se de 12%.

A melhora na aproximação menos significativa já era esperada, pois a avaliação dos da-

Tabela 20 – Matriz de pesos do tratamento Homo - Pesos do $\vec{E}_f$ para Pad, Xad e Sad.

	Pad	Xad	Sad
B1	7/9	1/9	1/9
B2	1/9	7/9	1/9
B3	7/10	1/10	2/10

Tabela 21 – Vetor $\vec{E}_f$ para o tratamento Homo.

	B1	B2	B3	ϵ
Sem Ef	1,00000	1,00000	1,00000	0,01090
Com Ef	1,12800	0,84700	1,00100	0,00960

Figura 38 – Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Produto no tratamento Homo.

dos experimentais coletados permite inferir que a presença da contaminação por bactérias homofermentativas não promove alterações bruscas na dinâmica da fermentação.

4.2.4.3 Conjunto de bactérias homofermentativas e heterofermentativas

O mesmo procedimento foi realizado para o conjunto de bactérias homofermentativas e heterofermentativas. Para esse tratamento, os seguintes dados foram encontrados para a matriz de ponderação:

Tabela 22 – Matriz de ponderação do tratamento Homo+Hetero - Valores para Pad, Xad e Sad.

	Pad	Xad	Sad
$u_{max_{ad}}$	0,80820	0,86650	0,98400
$Y_{xs_{ad}}$	1,05810	1,01220	1,24740
$Y_{ps_{ad}}$	0,94530	0,95100	0,94690

Figura 39 – Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Substrato no tratamento Homo.

Figura 40 – Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais da Biomassa no tratamento Homo.

Com os dados das Tabelas 22 e 23, foi obtido o valor da função objetivo igual a 0,02480. Como pode-se observar na Tabela 24, o Efeito Fixo produz uma redução de ϵ .

Contudo, a margem percentual de melhora na aproximação é de apenas 12%. Isso pode ser explicado pelo fato de o modelo não contabilizar a sinergia que ocorre entre

Tabela 23 – Matriz de pesos do tratamento Homo+Hetero - Pesos do $\vec{E}_f$ para Pad, Xad e Sad.

	Pad	Xad	Sad
B1	7/9	1/9	1/9
B2	1/9	7/9	1/9
B3	7/10	1/10	2/10

Tabela 24 – Vetor $\vec{E}_f$ para o tratamento Homo+Hetero.

	B1	B2	B3	ϵ
Sem Ef	1,00000	1,00000	1,00000	0,02810
Com Ef	0,83421	1,04343	0,94619	0,02480

bactérias de metabolismo diferente. A iteração entre elas não pode ser comparada com aquela desenvolvida entre bactérias de metabolismo semelhante.

Os gráficos contendo as curvas encontradas para o tratamento Homo+Hetero encontra-se a seguir:

Figura 41 – Ajuste do vetor $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Produto no tratamento Homo+Hetero.

4.3 Análises bioquímica e estatística

Nas seções a seguir serão apresentados os resultados relacionados aos analitos avaliados, cujo principal objetivo é comparar as concentrações destes analitos entre os tratamentos: Controle, Homo, Hetero e Homo+Hetero. Para avaliar se há diferenças significativas entre o comportamento de um dado analito ao longo de 7 ciclos fermentativos, em um mesmo tratamento, será utilizado o teste de Kruskal Wallis, relatado na Seção 4.4.

Figura 42 – Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Substrato no tratamento Homo+Hetero.

Figura 43 – Ajuste do vector $\vec{E}_f$ aos dados experimentais da Biomassa no tratamento Homo+Hetero.

4.3.1 Avaliação dos analitos

Nos processos fermentativos, as concentrações de analitos produzidos fornecem informação instantânea que permite avaliar como o processo está sendo conduzido. Porém,

devido a mudança do volume na fase batelada alimentada, as concentrações são afetadas pelo aumento deste volume. Desta forma, é preciso calcular o balanço de massa para determinar e analisar quantitativamente o processo. Como foi apresentado na Seção 3.2.4, foi calculado o balanço de massa e a produção dos analitos para cada ciclo fermentativo (I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII). Sendo o Ciclo IV correspondente ao estudo da cinética, como apresentado na Figura 13.

O balanço de massa, fornece uma medida padronizada para comparar 4 tratamentos. Assim, verificou-se, em média, os rendimentos (g/g) dos analitos considerados, e se diferem significativamente de um tratamento para o outro. Além disto, foi avaliado o comportamento deste rendimento ao longo dos ciclos dentro de um mesmo tratamento, assim, é possível afirmar se há diferenças na produção no decorrer dos ciclos.

Para a análise entre os tratamentos, aplicou-se testes paramétrico e não paramétrico. Entretanto, a abordagem clássica requer que suposições sejam válidas (tamanho da amostra suficientemente grande e independência entre as observações) a fim de se obter resultados satisfatórios. Como nem sempre tais suposições são verificadas, utilizou-se uma abordagem bayesiana a fim de complementar os resultados obtidos por meio da abordagem clássica (testes t e WMW). Já para a análise entre os ciclos de um mesmo tratamento, utilizou-se o teste não paramétrico (Teste de Kruskal Wallis). No presente trabalho, o nível de significância considerado foi de 95% ($p\text{-valor} \leq 0,05$).

Foram analisados o comportamento de 8 analitos: acetato, biomassa, ΔCO_2 , Etanol, Glicerol, Lactato, Manitol e Succinato. Nos testes t e WMW, foram considerados os rendimentos dos 7 ciclos (sem o ciclo IV) e dos 8 ciclos (com o ciclo IV) exceto para o Manitol, no qual se considerou apenas as concentrações dos 7 ciclos (sem o ciclo IV). Nos gráficos *box plot* apresentados no início de cada seção foram considerados dados de 7 ciclos (não se considerou o ciclo IV). Já na abordagem bayesiana, considerou-se dados dos 8 ciclos, exceto para o analito ΔCO_2 , para o qual foram utilizados dados apenas de 7 ciclos (sem o ciclo IV).

O motivo da comparação com e sem exclusão do Ciclo IV, é pela diferença deste ciclo respeito dos outros, em função da agitação do fermentador, volume do fermentador e a forma de alimentação do substrato. No ciclo IV foi com agitação de 90 rpm, já nos outros 7 ciclos não teve agitação. O volume final calculado dos ciclos foi em média de 39,42 mL. No caso do ciclo IV, o volume médio foi de 187,4 mL.

Na abordagem bayesiana, para obter amostras da distribuição *a posteriori* dos parâmetros de interesse, utilizou-se métodos MCMC, em particular o algoritmo Metropolis-Hastings para os parâmetros μ e ρ_Y e o amostrador de Gibbs para o parâmetro τ . No algoritmo Metropolis-Hastings a taxa de aceitação dos parâmetros encontra-se, pelo menos, entre 20% e 50% (GILKS; RICHARDSON; SPIEGELHALTER, 1996). Os algoritmos foram implementados no software estatístico R (GENTLEMAN; IHAKA, 2011).

Como visto na Seção 3.5.5, considera-se distribuições *a priori* não informativas. Os

valores utilizados para os parâmetros da distribuição gama, *priori* para τ , foram $a = 20$ e $b = 1$ para todos os analitos estudados. Foi gerada 1 cadeia com 70.000 iterações para cada parâmetro. Em cada cadeia gerada, foram descartadas as 20.000 primeiras iterações (*burning*) para evitar o problema de autocorrelação. Depois de eliminado, pegou-se uma amostra a cada 10 valores gerados, totalizando uma amostra de tamanho 5.000. Por fim, para cada analito fez-se o *box plot* das médias geradas em cada cadeia a fim de comparar graficamente se os tratamentos em média são semelhantes uns aos outros. Para cada um dos analitos e tratamentos analisados, foram calculadas a média, o desvio padrão e o intervalo de confiança (95%) de μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , considerando os 5.000 valores gerados para cada parâmetro.

Para comparar o *box plot* da abordagem clássica e bayesiana, o parâmetro μ_Y é multiplicado por 100, desta forma o rendimento μ_Y de cada analito, é convertido em (%) ou a proporção de g/100g.

4.3.2 Acetato

Na Figura 44 temos o *box plot* para cada tratamento, considerando o rendimento médio de acetato em cada ciclo. É importante destacar que não foi considerada a concentração obtida no ciclo IV.

Figura 44 – *Box plot* dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Acetato.

Analisando a Figura 44, há indícios de que o rendimento de acetato (massa produzida [g] em função do substrato fornecido [g]) em média se diferem entre os tratamen-

tos. Desta forma, realizou-se o teste t (paramétrico) e o teste WMW (não paramétrico). Considerando-se apenas as hipóteses mais evidentes na Figura 44, tem-se os resultados na Tabela 25.

A Figura 44 mostra que o tratamento Hetero produziu um média maior quantidade de acetato, no entanto o tratamento Controle foi o menor. Com estas observações, as hipóteses consideradas são: Controle < Homo, Controle < Hetero, Controle < Homo + Hetero, Homo < Hetero, Homo < Homo + Hetero; as duas hipóteses finais: Hetero < Homo + Hetero e Hetero > Homo + Hetero foram testadas porque na Figura 44 apresentam valores numa amplitude semelhante com a mediana muito próxima.

Tabela 25 – Testes t e WMW: teste entre médias - Acetato.

Hipótese Alternativa	Sem ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	-2,199	0,029	0,020
Controle < Hetero	-4,992	0,001	0,001
Controle < Homo + Hetero	-3,588	0,004	0,002
Homo < Hetero	-2,337	0,019	0,064
Homo < Homo + Hetero	-1,626	0,066	0,104
Hetero < Homo + Hetero	0,401	0,652	0,733
Hetero > Homo + Hetero	0,401	0,348	0,310
Hipótese Alternativa	Com ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	-2,513	0,016	0,009
Controle < Hetero	-5,629	0,000	0,000
Controle < Homo + Hetero	-4,205	0,001	0,001
Homo < Hetero	-2,642	0,010	0,041
Homo < Homo + Hetero	-1,931	0,038	0,052
Hetero < Homo + Hetero	0,380	0,645	0,640
Hetero > Homo + Hetero	0,380	0,355	0,399

Analisando a Tabela 25, tem-se que as hipóteses: Controle < Homo, Controle < Hetero, Controle < Homo + Hetero e Homo < Hetero não são rejeitadas quando considera-se apenas 7 ciclos ($p\text{-valor} \leq 0,05$). Já, quando considera-se os 8 ciclos, encontra-se também que a hipótese Homo < Homo + Hetero não é rejeitada. Entretanto, alguns dos testes clássicos requerem que suposições sejam válidas, entre elas o tamanho da amostra relativamente grande e independência entre as observações. Como tem-se apenas 8 valores dados, espera-se que haja correlação entre o ciclo atual e o anterior, utiliza-se uma abordagem bayesiana baseada no modelo formulado na Seção 3.5.5 a fim de comparar e verificar de fato se existem diferenças significativas, em média, entre os tratamentos.

Na Tabela 26 encontra-se um sumário dos parâmetros do modelo em questão, considerando os 4 tratamentos. Este sumário é composto pela média, pelo desvio padrão e pelo intervalo de confiança (95%) dos parâmetros do modelo, considerando os 5.000 valores gerados pelo algoritmo MCMC.

Na Tabela 26, o valor da média do parâmetro μ_Y no tratamento Controle ($6, 35 \times 10^{-4}$)

Tabela 26 – Sumário *a posteriori* para os parâmetros destransformados do modelo - Acetato.

Tratamento	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	I. C. (95%)
Controle	μ_Y	$6,35 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^{-4}$	$(4,67 \times 10^{-4} ; 8,64 \times 10^{-4})$
	σ_Y^2	$3,87 \times 10^{-8}$	$1,74 \times 10^{-8}$	$(1,74 \times 10^{-8} ; 8,25 \times 10^{-8})$
	ρ_Y	$4,43 \times 10^{-1}$	$1,42 \times 10^{-1}$	$(1,31 \times 10^{-1} ; 6,84 \times 10^{-1})$
Homo	μ_Y	$1,28 \times 10^{-3}$	$2,48 \times 10^{-4}$	$(8,61 \times 10^{-4} ; 1,84 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$1,86 \times 10^{-7}$	$9,85 \times 10^{-8}$	$(7,21 \times 10^{-8} ; 4,42 \times 10^{-7})$
	ρ_Y	$5,59 \times 10^{-1}$	$1,22 \times 10^{-1}$	$(2,89 \times 10^{-1} ; 7,58 \times 10^{-1})$
Hetero	μ_Y	$2,80 \times 10^{-3}$	$4,20 \times 10^{-4}$	$(2,09 \times 10^{-3} ; 3,76 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$5,15 \times 10^{-7}$	$2,29 \times 10^{-7}$	$(2,45 \times 10^{-7} ; 1,09 \times 10^{-6})$
	ρ_Y	$4,93 \times 10^{-1}$	$1,82 \times 10^{-1}$	$(6,65 \times 10^{-2} ; 7,76 \times 10^{-1})$
Homo + Hetero	μ_Y	$2,34 \times 10^{-3}$	$4,03 \times 10^{-4}$	$(1,66 \times 10^{-3} ; 3,25 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$4,39 \times 10^{-7}$	$2,10 \times 10^{-7}$	$(1,92 \times 10^{-7} ; 9,76 \times 10^{-7})$
	ρ_Y	$6,01 \times 10^{-1}$	$1,35 \times 10^{-1}$	$(2,97 \times 10^{-1} ; 8,17 \times 10^{-1})$

foi o menor valor encontrado dentre os tratamentos analisados. No caso do tratamento Hetero, o valor foi o maior ($2,80 \times 10^{-3}$). Em relação ao parâmetro ρ_Y , observa-se que o valor zero não pertence ao intervalo de confiança em nenhum dos tratamentos. Além disso, o intervalo é positivo em todos os casos, indicando uma correlação positiva, ou seja, o rendimento tende a crescer entre o ciclo atual e o anterior. Valores de ρ_Y próximo de 0 indicam que as observações não são correlacionados, enquanto que valores próximos de -1 ou $+1$ indicam que há uma correlação entre as observações. Neste sentido o valor menor é do tratamento Controle ($4,43 \times 10^{-1}$), coerente com a evolução ao longo dos ciclos mostrada na Figura 50, onde observa-se que este tratamento não tem uma continuidade de crescimento, só no ciclo VI, mesmo assim, logo se mantém em valores próximos até o ciclo VIII.

O tipo de correlação (positiva, negativa ou sem correlação) entre os ciclos é definida pelo valor de ρ_Y encontrado nas Figuras 45(e) – 48(e), e os histogramas das Figuras 45(f) – 48(f). Neste caso a correlação positiva é definida pela exclusão do zero e o intervalo ser positivo em todos os casos.

As Figuras 45, 46, 47 e 48 apresentam os gráficos de linhas (a), (c), (e) e os histogramas (b), (d) e (f) dos parâmetros μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y para cada um dos 4 tratamentos. Percebe-se que houve a convergência em todos os casos (gráfico de linhas).

Por fim, tem-se na Figura 49 o *box plot* dos 4 tratamentos considerando os 5.000 valores gerados do parâmetro μ_Y .

Nos tratamentos que foram inoculados com bactérias heterofermentativas, observa-se uma significativa elevação nos teores de acetato. O trabalho de Gomes (2009), também demonstrou que tais tipos bacterianos são produtores de acetato.

Observa-se na Figura 50, que nos ciclos VI, VII e VIII do tratamento Controle, a formação de acetato elevou-se aproximadamente em 300% (de $0,04025 \pm 0,00006$ a $0,13131 \pm 0,00689$), porém, sem aumento da contaminação bacteriana (Figura 90). Tais resultados sugerem que o acetato tenha sido produzido pela própria levedura, pois não se observa a concomitante produção de manitol, por uma possível contaminação com bactérias do tipo

Figura 45 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Acetato (Controle).

Figura 46 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Acetato (Homo).

heterofermentativa como mostrado na (Figura 98).

No caso do tratamento Homo, as produções de acetato sofreram incrementos a partir

Figura 47 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Acetato (Hetero).

Figura 48 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Acetato (Homo + Hetero).

do ciclo III sem uma produção de manitol acoplada. Tal constatação, descarta a possibilidade de contaminação com bactéria de heterofermentativa e leva a supor que a levedura

Figura 49 – *Box plot* para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Acetato.

igualmente foi induzida a produzir mais acetato.

Figura 50 – Rendimento (%) de acetato ao longo dos 8 ciclos fermentativos.

Isso se mostra na Figura 50, quando se observa que inicialmente não há produção de acetato por parte da bactéria homofermentativa, mas que há crescente produção de acetato por parte da bactéria heterofermentativa. Nesse âmbito, percebe-se que a bactéria

Figura 51 – Produção de acetato durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.

homofermentativa (a partir do III ciclo) e o tratamento Controle (a partir do VI ciclo), estariam sendo contaminados pela bactéria heterofermentativa, e que, nessa relação, há dominância da bactéria heterofermentativa, devido à proporção de produção de acetato.

Além disso, não se encontrava antes na literatura gráficos nos quais se observa produção de acetato igual ou superior por parte do conjunto Homo+Hetero, comparativamente ao produzido pela bactéria heterofermentativa, efeito observado na Figura 50, ainda deverá ser melhor explicado por futuras pesquisas.

Uma possível explicação para tal fato consiste na proporção que se observa entre bactéria heterofermentativa e homofermentativa, sendo que a partir do segundo ciclo, já há predominância da bactéria heterofermentativa, tendência que se mantém até o oitavo ciclo.

Em outra vertente, a Figura 51, que representa a cinética do ciclo IV. A avaliação deste processo fermentativo, apresenta congruência com os gráficos dos outros ciclos.

A velocidade de produção de acetato no tratamento Hetero, é superior aos demais tratamentos. Por sua vez, a bactéria homofermentativa apresenta baixa taxa de produção de acetato, apenas superior à taxa do tratamento Controle. Essa relação entre alta produção de acetato da bactéria heterofermentativa e baixa produção de acetato da bactéria homofermentativa é refletida no tratamento Homo+Hetero, que apresenta taxa de produção intermediária.

4.3.3 ART no ciclo IV

O gráfico a seguir apresenta o perfil dos açúcares e mostra a velocidade de metabolização deste substrato por parte das leveduras, durante a cinética.

Figura 52 – Curvas de ART Cinética para os 4 tratamentos.

Na Subseção 4.3.3, observa-se que o tratamento Controle e Homo, durante as primeiras duas horas, apresenta velocidades de metabolização semelhantes e superiores ao tratamento Hetero e Homo+Hetero. Além disso, é possível inferir que a bactéria homofermentativa tem uma atividade metabólica mais intensa durante as quatro primeiras horas de fermentação (durante a fase de alimentação) comparativamente à heterofermentativa, tal efeito persiste até o final da alimentação (quatro horas) apenas na presença da mistura das bactérias. A partir das quatro horas de fermentação, quando há o fim da alimentação, ocorre aumento no teor etanólico e concomitante diminuição da taxa metabólica da bactéria homofermentativa. Esse fato poderia ser explicado por uma baixa resistência ao teor etanólico por parte dessa bactéria. Tal efeito mais nefasto no consumo de açúcar quando da presença de ambas as bactérias ocorre em paralelismo com a maior formação de lactato apresentada na Figura 91.

4.3.4 Biomassa

A biomassa considerada é o conjunto de células de leveduras, mesmo que uma pequena fração (nos tratamentos contaminados) pode corresponder à biomassa bacteriana.

Na Figura 53 temos o *box plot* para cada tratamento, considerando a produção de biomassa em cada ciclo. Não foi considerado o ciclo IV.

Figura 53 – *Box plot* dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Biomassa.

Analisando a Figura 53, não é possível detectar que as concentrações de biomassa em média sejam diferentes de tratamento para tratamento, os tratamentos Controle e Homo+Hetero apresentam uma assimetria semelhante, e as medianas muito próximos. A mediana dos quatro tratamentos mostra-se próxima. Por tal condição, realizou-se o teste *t* (paramétrico) e o teste WMW (não paramétrico) considerando todas as comparações possíveis. Os resultados podem ser vistos na Tabela 27.

Na Tabela 27, tem-se que todas as hipóteses alternativas propostas são rejeitadas quando considera-se apenas 7 ou 8 ciclos (p -valor > 0,05).

Os resultados do modelo proposto na Seção 3.5.5 são apresentados a seguir. Na Tabela 28 tem-se um sumário dos parâmetros do modelo em questão, considerando os 4 tratamentos. Este sumário é composto pela média, desvio padrão e intervalo de credibilidade (95%) dos parâmetros do modelo, considerando os 5.000 valores gerados pelo algoritmo MCMC.

Pode-se verificar na Tabela 28, que os valores das médias do parâmetro μ_Y nos tratamentos são semelhantes ($1,86 \times 10^{-2}$; $1,75 \times 10^{-2}$; $1,87 \times 10^{-2}$; $1,86 \times 10^{-2}$), fornecendo indícios que não há diferenças entre os tratamentos, correlato com o mostrado na Figura 53. Em relação ao parâmetro ρ_Y , observa-se que o valor zero pertence ao intervalo de credibilidade para todos os tratamentos analisados. Assim, há evidências de que não há

Tabela 27 – Teste t e WMW: teste entre médias - Biomassa.

Hipótese Alternativa	Sem ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	0,253	0,598	0,733
Controle > Homo	0,253	0,402	0,310
Controle < Hetero	-0,148	0,442	0,451
Controle > Hetero	-0,148	0,558	0,598
Controle < Homo + hetero	-0,084	0,467	0,549
Controle > Homo + hetero	-0,084	0,533	0,500
Homo < Hetero	-0,398	0,349	0,191
Homo > Hetero	-0,398	0,651	0,841
Homo < Homo + Hetero	-0,366	0,361	0,451
Homo > Homo + Hetero	-0,366	0,639	0,598
Hetero < Homo + Hetero	0,083	0,532	0,772
Hetero > Homo + Hetero	0,083	0,468	0,267
hline	Com ciclo IV		
Hipótese Alternativa	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	0,301	0,616	0,677
Controle > Homo	0,301	0,384	0,360
Controle < Hetero	-0,072	0,472	0,480
Controle > Hetero	-0,072	0,528	0,561
Controle < Homo + hetero	0,558	0,707	0,640
Controle > Homo + hetero	0,558	0,293	0,399
Homo < Hetero	-0,367	0,359	0,253
Homo > Hetero	-0,367	0,641	0,779
Homo < Homo + Hetero	0,308	0,618	0,520
Homo > Homo + Hetero	0,308	0,382	0,520
Hetero < Homo + Hetero	0,611	0,724	0,779
Hetero > Homo + Hetero	0,611	0,276	0,253

Tabela 28 – Sumário *a posteriori* para os parâmetros destransformados do modelo - Biomassa.

Tratamento	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	I. C. (95%)
Controle	μ_Y	$1,86 \times 10^{-2}$	$1,72 \times 10^{-3}$	$(1,56 \times 10^{-2} ; 2,23 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$2,63 \times 10^{-5}$	$8,55 \times 10^{-6}$	$(1,47 \times 10^{-5} ; 4,53 \times 10^{-5})$
	ρ_Y	$-5,67 \times 10^{-2}$	$1,84 \times 10^{-1}$	$(-4,02 \times 10^{-1} ; 2,98 \times 10^{-1})$
Homo	μ_Y	$1,75 \times 10^{-2}$	$1,73 \times 10^{-3}$	$(1,45 \times 10^{-2} ; 2,14 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$2,64 \times 10^{-5}$	$8,75 \times 10^{-6}$	$(1,44 \times 10^{-5} ; 4,65 \times 10^{-5})$
	ρ_Y	$-7,12 \times 10^{-2}$	$1,66 \times 10^{-1}$	$(-3,85 \times 10^{-1} ; 2,43 \times 10^{-1})$
Hetero	μ_Y	$1,87 \times 10^{-2}$	$1,88 \times 10^{-3}$	$(1,55 \times 10^{-2} ; 2,28 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$2,92 \times 10^{-5}$	$1,02 \times 10^{-5}$	$(1,59 \times 10^{-5} ; 5,15 \times 10^{-5})$
	ρ_Y	$-1,59 \times 10^{-2}$	$1,67 \times 10^{-1}$	$(-3,33 \times 10^{-1} ; 3,05 \times 10^{-1})$
Homo + Hetero	μ_Y	$1,86 \times 10^{-2}$	$2,00 \times 10^{-3}$	$(1,50 \times 10^{-2} ; 2,29 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$2,24 \times 10^{-5}$	$7,76 \times 10^{-6}$	$(1,22 \times 10^{-5} ; 4,10 \times 10^{-5})$
	ρ_Y	$1,67 \times 10^{-1}$	$2,07 \times 10^{-1}$	$(-2,55 \times 10^{-1} ; 5,49 \times 10^{-1})$

correlação entre os reciclos.

Já nas Figuras 54, 55, 56 e 57 são encontrados os gráficos de linhas e os histogramas dos parâmetros μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y para cada um dos 4 tratamentos. Percebe-se que houve a convergência em todos os casos (gráfico de linhas). A convergência é demonstrada ao verificar que a cadeia oscila em torno de uma valor.

Por fim, tem-se na Figura 58 o *box plot* dos 4 tratamentos considerando os 5.000

Figura 54 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Biomassa (Controle).

Figura 55 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Biomassa (Homo).

valores gerados do parâmetro μ_Y .

Comparando as Figuras 53 e 58, e pelos resultados dos testes t e WMW, há evidências

Figura 56 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Biomassa (Hetero).

Figura 57 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Biomassa (Homo + Hetero).

de que os tratamentos em média são semelhantes.

Na Figura 59 nos ciclos I e IV, observa-se maior produção de biomassa no tratamento

Figura 58 – *Box plot* para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y \cdot 100$ - Biomassa.

Figura 59 – Rendimento (%) de biomassa ao longo dos 8 ciclos fermentativos.

Controle, comparado ao tratamento Homo+Hetero. Nos demais ciclos, não se encontra diferença significativa entre os tratamentos.

Uma possível explicação para essa observação é a existência de aeração antes do primeiro ciclo e durante o quarto ciclo no controle. A aeração promove aumento de oxigênio,

substituindo o CO_2 , aumentando a quantidade de O_2 disponível para as bactérias. Além disso, no quarto ciclo há remoção proposital de CO_2 , para permitir a coleta da amostra no recipiente em fermentação. Para fazer essa amostragem, é necessário homogeneizar o fermentador e, durante a agitação, remove-se o CO_2 . A oxigenação e diminuição de CO_2 elevam a produção de biomassa (BASSO; AMORIN, 1988).

Durante o ciclo III, teve uma queda na produção de biomassa, respeito dos outros ciclos. Há possibilidade de saturação da biomassa em um determinado volume. Este comportamento fisiológico deverá ser estudado a profundidade nos futuros trabalhos.

Figura 60 – Produção de biomassa durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.

Ao longo da cinética se observa uma velocidade de crescimento relativamente alta no tratamento controle, durante as primeiras duas horas de fermentação. Esse intervalo, de quatro horas iniciais, apresenta a velocidade de crescimento de biomassa, indispensável para o cálculo dos parâmetros estimados pelo algoritmo de ED. A taxa de crescimento máximo da bactéria heterofermentativa assemelhasse ao tratamento Controle, entretanto, o tratamento Homo+Hetero apresenta baixa velocidade de crescimento, no que se insere a predominância da bactéria homofermentativa, e seu retardo de crescimento, sobre a bactéria heterofermentativa, durante a alimentação.

4.3.5 Delta CO_2

Na Figura 61, apresenta-se o *box plot* para cada tratamento, considerando as médias do rendimento na produção de massa de CO_2 não acoplado à produção de etanol, acetato e succinato. Delta CO_2 em cada ciclo.

Figura 61 – *Box plot* dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - DeltaCO₂.

Quando observa-se a Figura 61, não é possível detectar graficamente se há diferenças entre os tratamentos. O teste *t* e o teste WMW foram aplicados. Os resultados são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 – Teste *t* e WMW: teste entre médias - DeltaCO₂.

Hipótese Alternativa	Sem ciclo IV		
	teste <i>t</i>		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	-0,482	0,319	0,267
Controle > Homo	-0,482	0,681	0,772
Controle < Hetero	-0,255	0,401	0,451
Controle > Hetero	-0,255	0,599	0,598
Controle < Homo + Hetero	-0,359	0,363	0,402
Controle > Homo + Hetero	-0,359	0,637	0,645
Homo < Hetero	0,244	0,594	0,645
Homo > Hetero	0,244	0,406	0,402
Homo < Homo + Hetero	0,105	0,541	0,549
Homo > Homo + Hetero	0,105	0,459	0,500
Hetero < Homo + Hetero	-0,127	0,451	0,598
Hetero > Homo + Hetero	-0,127	0,549	0,451

Pelos resultados da Tabela 29, é possível ver que os testes não detectam diferenças entre os tratamentos, em todos os casos analisados (*p*-valor > 0,05), o que significa que a hipótese nula de igualdade entre os tratamentos não foi rejeitada.

Apresenta-se na Tabela 30, um sumário dos parâmetros do modelo. Este sumário é composto pela média, desvio padrão e intervalo de credibilidade (95%) dos parâmetros

do modelo, considerando os 5.000 valores gerados pelo algoritmo MCMC.

Tabela 30 – Sumário *a posteriori* para os parâmetros destransformados do modelo - DeltaCO₂.

Tratamento	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	I. C. (95%)
Controle	μ_Y	$2,46 \times 10^{-2}$	$3,72 \times 10^{-3}$	$(1,78 \times 10^{-2} ; 3,24 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$5,49 \times 10^{-5}$	$2,28 \times 10^{-5}$	$(2,51 \times 10^{-5} ; 1,09 \times 10^{-4})$
	ρ_Y	$3,23 \times 10^{-1}$	$1,90 \times 10^{-1}$	$(-9,92 \times 10^{-2} ; 6,44 \times 10^{-1})$
Homo	μ_Y	$2,84 \times 10^{-2}$	$3,54 \times 10^{-3}$	$(2,21 \times 10^{-2} ; 3,57 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$7,46 \times 10^{-5}$	$2,82 \times 10^{-5}$	$(3,71 \times 10^{-5} ; 1,44 \times 10^{-4})$
	ρ_Y	$1,00 \times 10^{-1}$	$2,03 \times 10^{-1}$	$(-2,98 \times 10^{-1} ; 4,87 \times 10^{-1})$
Hetero	μ_Y	$2,76 \times 10^{-2}$	$3,09 \times 10^{-3}$	$(2,17 \times 10^{-2} ; 3,39 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$7,70 \times 10^{-5}$	$2,74 \times 10^{-5}$	$(3,99 \times 10^{-5} ; 1,44 \times 10^{-4})$
	ρ_Y	$-1,15 \times 10^{-1}$	$2,03 \times 10^{-1}$	$(-4,87 \times 10^{-1} ; 2,92 \times 10^{-1})$
Homo + Hetero	μ_Y	$2,90 \times 10^{-2}$	$2,64 \times 10^{-3}$	$(2,37 \times 10^{-2} ; 3,43 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$7,69 \times 10^{-5}$	$2,50 \times 10^{-5}$	$(4,19 \times 10^{-5} ; 1,41 \times 10^{-4})$
	ρ_Y	$-3,10 \times 10^{-1}$	$2,01 \times 10^{-1}$	$(-6,64 \times 10^{-1} ; 1,20 \times 10^{-1})$

Uma análise da Tabela 30, indica que os valores da média do parâmetro μ_Y nos tratamentos analisados são próximos. Em relação ρ_Y , observa-se que o valor zero pertence ao intervalo de credibilidade em todos os tratamentos considerados. Por tanto, pode-se afirmar que não há correlação entre os ciclos para este analito.

Nas Figuras 62, 63, 64 e 65 podem ser observados os gráficos de linhas e os histogramas dos parâmetros μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y para cada um dos 4 tratamentos. Houve a convergência em todos os casos analisados.

Figura 62 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - DeltaCO₂ (Controle).

Figura 63 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - DeltaCO₂ (Homo).

Figura 64 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - DeltaCO₂ (Hetero).

A seguir, apresenta-se a Figura 66, com o *box plot* dos 4 tratamentos considerando os 5.000 valores gerados do parâmetro μ_Y .

Figura 65 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - DeltaCO₂ (Homo + Hetero).

Figura 66 – Box plot dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - DeltaCO₂.

Pode-se concluir, pela resultado apresentado nas Figuras 61 e 66 e os testes t e WMW da Tabela 29 que os 4 tratamentos, em média, produzem DeltaCO₂ semelhantes. Portanto, não temos indícios para afirmar que os desvios de açúcar para outras rotas meta-

bólicas, que produzam CO_2 , sejam diferentes para os 4 tratamentos.

4.3.6 Etanol

Mostra-se na Figura 67, a fase inicial da análise exploratória dos dados por intermédio do *box plot* para cada tratamento. Apresenta-se o rendimento médio de etanol em cada ciclo. Exceptua-se o ciclo IV.

Figura 67 – *Box plot* dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Etanol.

De acordo com a Figura 67, observa-se que as concentrações de etanol, em média, são diferentes entre os tratamentos. Apresenta-se na Tabela 31, os resultados dos Teste t e WMW. As hipóteses testadas foram baseadas na primeira análise exploratória da Figura 67.

Infere-se dos resultados da Tabela 31, que as hipóteses alternativas Controle $>$ Hetero e Homo $>$ Hetero não são rejeitadas ($p\text{-valor} \leq 0,05$) em ambos casos, com 7 e 8 ciclos. Pode-se observar que, quando é considerado o ciclo IV, o resultado das outras hipóteses: Homo $>$ Homo+Hetero ($p\text{-valor} \leq 0,10$) e Hetero $<$ Homo+Hetero ($p\text{-valor} \leq 0,20$), mesmo sem alcançar significância estatística, mostra uma tendência clara que o rendimento no tratamento Homo+Hetero é intermediário entre os tratamentos Homo e Hetero.

Com o modelo proposto, foi realizada a simulação pela abordagem bayesiana. Os resultados apresentam-se na Tabela 32, contendo um sumário com a média, desvio padrão e intervalo de credibilidade (95%) dos parâmetros do modelo em questão, para os 4 tratamentos considerando os 5.000 valores gerados pelo algoritmo MCMC.

Tabela 31 – Teste t e WMW: teste entre médias - Etanol.

Hipótese Alternativa	Sem ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	0,002	0,501	0,645
Controle > Homo	0,002	0,499	0,402
Controle > Hetero	2,472	0,015	0,036
Controle > Homo + Hetero	1,467	0,086	0,130
Homo > Hetero	2,306	0,020	0,027
Homo > Homo + Hetero	1,382	0,097	0,130
Hetero < Homo + Hetero	-0,733	0,239	0,267

Hipótese Alternativa	Com ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	0,001	0,500	0,677
Controle > Homo	0,001	0,500	0,360
Controle > Hetero	2,791	0,008	0,019
Controle > Homo + Hetero	1,604	0,067	0,080
Homo > Hetero	2,616	0,010	0,014
Homo > Homo + Hetero	1,514	0,076	0,080
Hetero < Homo + Hetero	-0,916	0,188	0,191

Tabela 32 – Sumário *a posteriori* para os parâmetros destransformados do modelo - Etanol.

Tratamento	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	I. C. (95%)
Controle	μ_Y	0,4944	0,1078	(0,3154 ; 0,7390)
	σ_Y^2	0,0132	0,0074	(0,0047 ; 0,0322)
	ρ_Y	0,9910	0,0099	(0,9677 ; 0,9980)
Homo	μ_Y	0,5258	0,1734	(0,2721 ; 0,9356)
	σ_Y^2	0,0339	0,0384	(0,0069 ; 0,1225)
	ρ_Y	0,9929	0,0095	(0,9736 ; 0,9987)
Hetero	μ_Y	0,4895	0,1079	(0,3144 ; 0,7315)
	σ_Y^2	0,0131	0,0077	(0,0046 ; 0,0331)
	ρ_Y	0,9841	0,0251	(0,9362 ; 0,9969)
Homo + Hetero	μ_Y	0,4948	0,1094	(0,3164 ; 0,7380)
	σ_Y^2	0,0133	0,0078	(0,0048 ; 0,0335)
	ρ_Y	0,9804	0,0221	(0,9223 ; 0,9959)

Nas Figuras 68, 69, 70 e 71 podem ser observados os gráficos de linhas e o histogramas dos parâmetros μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y para cada um dos 4 tratamentos. Percebe-se que houve a convergência em todos os casos (gráfico de linhas).

Por fim, tem-se na Figura 72, o *box plot* dos 4 tratamentos considerando os 5.000 valores gerados do parâmetro μ_Y .

Comparando as Figuras 72 e 67, os resultados do *box plot* do modelo bayesiano apresentam uma diferença significativa maior entre o tratamento Hetero e a combinação Homo+Hetero, indicando que no tratamento misto, o rendimento de etanol é maior que no tratamento Hetero.

Mostra-se na Figura 73 a evolução do rendimento na produção de etanol ao longo dos 8 ciclos.

Avaliando Figura 73 e os resultados da Tabela 31, observa-se uma tendência de rendimentos menores de etanol na presença das bactérias heterofermentativas, quer isolada

Figura 68 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Etanol (Controle).

Figura 69 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Etanol (Homo).

ou juntamente com as bactérias homofermentativas. Estes dados são coerentes com os apresentados por Gomes (2009), que igualmente mostrou pouco efeito das bactérias ho-

Figura 70 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Etanol (Hetero).

Figura 71 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Etanol (Homo + Hetero).

mofermentativas isoladamente.

Considerando todos os tratamentos, tais reduções nos rendimentos de etanol são acom-

Figura 72 – *Box plot* para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Etanol.

Figura 73 – Rendimento (%) de etanol ao longo dos 8 ciclos fermentativos.

panhadas de incrementos nas formações de glicerol (Figura 81), manitol (Figura 98), acetato (Figura 50) e biomassa bacteriana (Figura 90), sugerindo que os desvios de açúcar para estes subprodutos tenham contribuído para um desvio de açúcar que refletiu em queda de rendimento em etanol. Da mesma forma Gomes (2009), também observou que

apenas a contaminação com as bactérias heterofermentativas, acarretou efeito deletério na formação de etanol.

Figura 74 – Produção de etanol durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.

Quando avalia-se a cinética, na Figura 74, observa-se uma velocidade de produção de etanol mais baixa quando se tem presença de bactérias heterofermentativas e a mistura de ambas. Coerente com a tendência observada durante os reciclos.

4.3.7 Glicerol

Na Figura 75, se apresentam os *box plot* para cada tratamento, considerando os rendimentos médios de glicerol em cada ciclo. Não considerou-se o ciclo IV.

Após a análise exploratória da Figura 75, realizou-se o teste *t* e o teste WMW. Considerando-se apenas as hipóteses que são apresentadas, junto com os resultados na Tabela 33.

Com os resultados da Tabela 33, tem-se que as hipóteses $\text{Controle} < \text{Hetero}$, $\text{Homo} < \text{Hetero}$ e $\text{Homo} < \text{Homo} + \text{Hetero}$ não são rejeitadas no teste *t* considerando 7 ciclos. Já, para o teste WMW nas mesmas condições, somente as hipóteses $\text{Controle} < \text{Hetero}$ e $\text{Homo} < \text{Hetero}$ não são rejeitadas. Dado que o resultado foi diferente quando é considerado o ciclo IV, podemos afirmar que o comportamento deste ciclo afeta a tendência mostrada por os outros ciclos (Figura 81), no entanto é importante observar que o comportamento do ciclo I é muito diferente, pelo fato de ser o ciclo que contém os meios de cultura das leveduras e bactérias, afeta a fisiologia inicial das leveduras e bactérias.

Figura 75 – *Box plot* dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Glicerol.

Tabela 33 – Teste t e WMW: teste entre médias - Glicerol.

Hipótese Alternativa	Sem ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	0,785	0,776	0,841
Controle > Homo	0,785	0,224	0,191
Controle < Hetero	-2,057	0,033	0,036
Controle < Homo + Hetero	-1,402	0,094	0,082
Homo < Hetero	-2,603	0,013	0,027
Homo < Homo + Hetero	-2,048	0,032	0,064
Hetero < Homo + Hetero	0,798	0,779	0,809
Hetero > Homo + Hetero	0,798	0,221	0,228
Hipótese Alternativa	Com ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	0,589	0,717	0,809
Controle > Homo	0,589	0,283	0,221
Controle < Hetero	-1,424	0,089	0,065
Controle < Homo + Hetero	-0,763	0,229	0,139
Homo < Hetero	-1,868	0,042	0,052
Homo < Homo + Hetero	-1,246	0,117	0,097
Hetero < Homo + Hetero	0,615	0,726	0,779
Hetero > Homo + Hetero	0,615	0,274	0,253

Neste sentido, futuros trabalhos podem ser realizados retirando-se o ciclo I para verificar a significância estatística.

Considerando os 8 ciclos, no teste t tem-se que apenas a hipótese Homo < Hetero é não rejeitada enquanto que no Teste WMW todas as hipóteses alternativas são rejeitadas.

Este fato mostra que as condições de aplicabilidade dos testes paramétrico (pressupostos de distribuição normal e variância homogênea) poderiam não ser adequados para estes dados, dado que o teste não paramétrico rejeita a hipótese alternativa.

Com esta motivação e como a quantidade de observações é pequena e há suspeitas de dependência entre as observações, utilizou-se também uma abordagem bayesiana, a fim de complementar e trazer maiores evidências aos resultados obtidos pelos testes clássicos. Na Tabela 34 tem-se um sumário dos parâmetros do modelo em questão, para os 4 tratamentos considerando os 5.000 valores gerados pelo algoritmo MCMC.

Tabela 34 – Sumário *a posteriori* para os parâmetros destransformados do modelo - Glicerol.

Tratamento	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	I. C. (95%)
Controle	μ_Y	$3,02 \times 10^{-2}$	$2,08 \times 10^{-3}$	$(2,66 \times 10^{-2} ; 3,52 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$4,78 \times 10^{-5}$	$1,39 \times 10^{-5}$	$(2,86 \times 10^{-5} ; 8,12 \times 10^{-5})$
	ρ_Y	$-2,91 \times 10^{-1}$	$3,76 \times 10^{-1}$	$(-8,19 \times 10^{-1} ; 5,12 \times 10^{-1})$
Homo	μ_Y	$2,86 \times 10^{-2}$	$1,92 \times 10^{-3}$	$(2,51 \times 10^{-2} ; 3,27 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$4,43 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-5}$	$(2,61 \times 10^{-5} ; 7,41 \times 10^{-5})$
	ρ_Y	$-2,53 \times 10^{-1}$	$3,10 \times 10^{-1}$	$(-7,50 \times 10^{-1} ; 3,99 \times 10^{-1})$
Hetero	μ_Y	$3,43 \times 10^{-2}$	$1,83 \times 10^{-3}$	$(3,07 \times 10^{-2} ; 3,81 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$6,23 \times 10^{-5}$	$1,71 \times 10^{-5}$	$(3,82 \times 10^{-5} ; 1,04 \times 10^{-4})$
	ρ_Y	$-4,58 \times 10^{-1}$	$2,83 \times 10^{-1}$	$(-8,45 \times 10^{-1} ; 2,15 \times 10^{-1})$
Homo + Hetero	μ_Y	$3,24 \times 10^{-2}$	$2,20 \times 10^{-3}$	$(2,80 \times 10^{-2} ; 3,70 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$5,70 \times 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-5}$	$(3,35 \times 10^{-5} ; 9,70 \times 10^{-5})$
	ρ_Y	$-2,70 \times 10^{-1}$	$2,88 \times 10^{-1}$	$(-7,33 \times 10^{-1} ; 3,45 \times 10^{-1})$

Nas Figuras 76, 77, 78 e 79, podem ser observados os gráficos de linhas e os histogramas dos parâmetros μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y para cada um dos 4 tratamentos. Percebe-se que houve a convergência em todos os casos.

Para finalizar, tem-se na Figura 80 o *box plot* dos 4 tratamentos considerando os 5.000 valores gerados do parâmetro μ_Y .

A seguir, apresenta-se a evolução da produção de glicerol ao longo dos 8 ciclos.

Quanto à formação de glicerol, que se sabe é gerado apenas pela levedura e não pelas bactérias (ALVES, 1994; GOMES, 2009), os dados destes experimentos comprovam aqueles de Gomes (2009) que demonstram maior produção quando há contaminação apenas com bactérias heterofermentativas (Figura 81). Ainda não se sabe como este tipo bacteriano leva a levedura a produzir mais glicerol. Por outro lado, pode-se afirmar, pelos dados da Tabela 33, mesmo sem ter significância estatística (p -valor < 0,23 para o caso sem o ciclo IV), que na presença das bactérias homofermentativas, há uma clara tendência a formar menor quantidade de glicerol, sugerindo que tais bactérias possam consumir o glicerol gerado pela levedura ou mesmo atenuar ou inibir a formação deste subproduto. Tais especulações ainda carecem de um fundamento bioquímico-fisiológico, mas o presente resultado corrobora o que já foi apresentado por Gomes (2009).

Houve um menor desvio na produção de glicerol para todos os tratamentos no ciclo IV que correspondeu ao ensaio de cinética. Como o glicerol é produzido para restaurar o balanço de redox em anaerobiose (OURA, 1974; ALVES, 1994), pode ter ocorrido que

Figura 76 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Glicerol (Controle).

Figura 77 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Glicerol (Homo).

a oxigenação do meio (em função das amostragens durante a fermentação) tenha favorecido o consumo de parte do poder redutor (NADH^+H , gerado pela levedura durante a

Figura 78 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Glicerol (Hetero).

Figura 79 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Glicerol (Homo + Hetero).

fermentação), acarretando redução na formação do glicerol, cuja síntese é dependente de NADH^+H .

Figura 80 – *Box plot* para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y \cdot 100$ - Glicerol.

Figura 81 – Rendimento (%) de glicerol ao longo dos 8 ciclos fermentativos.

As produções de glicerol e succinato são principalmente oriundas do metabolismo da levedura (ALVES, 1994), sendo que incrementos na produção de succinato resultam em elevações dos teores de glicerol, para a manutenção do balanço de redox em anaerobiose (OURA, 1977). No presente trabalho, observa-se um paralelismo entre as produções de

glicerol(Figura 81) e succinato(Figura 106), sugerindo também que a formação de metabólitos (produzidos pela levedura) seja estimulada pelas bactérias com metabolismo heterofermentativo. Assim, a indução bacteriana para produção de glicerol pela levedura em fermentação contaminada, pode ser causada pela formação primeira de succinato. Na Secção 4.3.10, discute-se a função antibacteriana do succinato, e como este fator, pode ser um fator adicional de análise.

Figura 82 – Produção de glicerol durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.

Por sua vez, ao longo da cinética, há maior velocidade de formação de glicerol pela bactéria heterofermentativa, seguida pelo tratamento Homo+Hetero e pelo Controle. Assim, a bactéria homofermentativa apresenta geração inferior, o que reforça a hipótese de que a bactéria homofermentativa consome o glicerol.

4.3.8 Lactato

Apresenta-se na Figura 83, o *box plot* para cada tratamento, considerando os rendimentos médios da produção de lactato em cada ciclo (exceto o ciclo IV).

Após a análise exploratória dos dados, realizou-se o teste *t* e o teste WMW. Os resultados são apresentados na Tabela 35.

Em função dos resultados da Tabela 35, pode-se afirmar o seguinte: as hipóteses alternativas $\text{Controle} < \text{Homo}$, $\text{Controle} < \text{Hetero}$, $\text{Controle} < \text{Homo} + \text{Hetero}$ e $\text{Hetero} < \text{Homo} + \text{Hetero}$ não são rejeitadas considerando-se 7 ou 8 ciclos.

A abordagem bayesiana é aplicada baseada no modelo dado na Seção 3.5.5, a fim de comparar e verificar de fato se há diferenças significativas, em média, entre os tratamento.

Figura 83 – *Box plot* dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Lactato.

Tabela 35 – Teste *t* e WMW: teste entre médias - Lactato.

Hipótese Alternativa	Sem ciclo IV		
	teste <i>t</i>		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	-9,6184	0,0000	0,0003
Controle < Hetero	-8,0236	0,0000	0,0003
Controle < Homo + Hetero	-12,4472	0,0000	0,0003
Homo < Hetero	1,3782	0,9033	0,8957
Homo > Hetero	1,3782	0,0967	0,1297
Homo < Homo + Hetero	-1,7337	0,0555	0,0641
Homo > Homo + Hetero	-1,7337	0,9445	0,9513
Hetero < Homo + Hetero	-3,2213	0,0043	0,0087
Hetero > Homo + Hetero	-3,2213	0,9957	0,9945
Hipótese Alternativa	Com ciclo IV		
	teste <i>t</i>		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	-8,9761	0,0000	0,0001
Controle < Hetero	-9,0549	0,0000	0,0001
Controle < Homo + Hetero	-12,0198	0,0000	0,0001
Homo < Hetero	0,9401	0,8181	0,8359
Homo > Hetero	0,9401	0,1819	0,1911
Homo < Homo + Hetero	-1,5370	0,0740	0,0974
Homo > Homo + Hetero	-1,5370	0,9260	0,9197
Hetero < Homo + Hetero	-2,8276	0,0067	0,0074
Hetero > Homo + Hetero	-2,8276	0,9933	0,9948

Na Tabela 36 tem-se um sumário dos parâmetros do modelo em questão, considerando os 4 tratamentos. Este sumário é composto pela média, desvio padrão e intervalo de credibilidade (95%) dos parâmetros do modelo, considerando os 5.000 valores gerados

pelo algoritmo MCMC.

Tabela 36 – Sumário *a posteriori* para os parâmetros destransformados do modelo - Lactato.

Tratamento	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	I. C. (95%)
Controle	μ_Y	$3,51 \times 10^{-3}$	$6,10 \times 10^{-4}$	$(2,51 \times 10^{-3} ; 4,89 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$1,27 \times 10^{-6}$	$6,07 \times 10^{-7}$	$(5,55 \times 10^{-7} ; 2,81 \times 10^{-6})$
	ρ_Y	$4,60 \times 10^{-1}$	$1,47 \times 10^{-1}$	$(1,45 \times 10^{-1} ; 7,14 \times 10^{-1})$
Homo	μ_Y	$1,86 \times 10^{-2}$	$1,97 \times 10^{-3}$	$(1,54 \times 10^{-2} ; 2,32 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$1,91 \times 10^{-5}$	$6,88 \times 10^{-6}$	$(1,05 \times 10^{-5} ; 3,64 \times 10^{-5})$
	ρ_Y	$8,63 \times 10^{-2}$	$3,61 \times 10^{-1}$	$(-6,02 \times 10^{-1} ; 6,80 \times 10^{-1})$
Hetero	μ_Y	$1,77 \times 10^{-2}$	$2,45 \times 10^{-3}$	$(1,41 \times 10^{-2} ; 2,37 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$1,69 \times 10^{-5}$	$7,68 \times 10^{-6}$	$(8,57 \times 10^{-6} ; 3,60 \times 10^{-5})$
	ρ_Y	$3,24 \times 10^{-1}$	$3,99 \times 10^{-1}$	$(-5,80 \times 10^{-1} ; 8,34 \times 10^{-1})$
Homo + Hetero	μ_Y	$2,11 \times 10^{-2}$	$2,22 \times 10^{-3}$	$(1,73 \times 10^{-2} ; 2,66 \times 10^{-2})$
	σ_Y^2	$2,30 \times 10^{-5}$	$8,51 \times 10^{-6}$	$(1,29 \times 10^{-5} ; 4,38 \times 10^{-5})$
	ρ_Y	$4,78 \times 10^{-2}$	$4,72 \times 10^{-1}$	$(-7,70 \times 10^{-1} ; 7,71 \times 10^{-1})$

Apresenta-se nas Figuras 84, 85, 86 e 87, os gráficos de linhas e os histogramas dos parâmetros μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y para cada um dos 4 tratamentos. É possível notar, pelo gráfico de linhas, que houve a convergência em todos os casos e para todos os parâmetros.

Figura 84 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Lactato (Controle).

Por fim, é apresentado na Figura 88 o *box plot* dos 4 tratamentos considerando os 5.000 valores gerados do parâmetro μ_Y .

Pode-se afirmar em função dos resultados dos testes (Tabela 35), e a comparação das Figuras 83 e 88, que o tratamento Controle produz menor quantidade de lactato que os tratamentos Homo, Hetero e Homo+Hetero.

Figura 85 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Lactato (Homo).

Figura 86 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Lactato (Hetero).

Do ponto de vista bioquímico, o lactato é o mais importante analito, quando se trata de avaliar a contaminação.

Figura 87 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Lactato (Homo + Hetero).

Figura 88 – Box plot para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Lactato.

Vários trabalhos correlacionam os teores de lactato com o nível da contaminação bacteriana (ALVES, 1994; NARENDRANATH et al., 1997; COSTA et al., 2008; GOMES, 2009), dado que é o metabólito bacteriano mais abundantemente produzido. Sabe-se também, que a

Figura 89 – Rendimento (%) de lactato ao longo dos 8 ciclos fermentativos.

bactéria do tipo homofermentativo produz maiores teores de lactato, quando comparada com a do tipo heterofermentativo (GOMES, 2009). Neste trabalho, observa-se uma redução drástica na população de bactérias homofermentativas com o progredir dos ciclos, porém, a formação de lactato não sofreu redução. Esta aparente incongruência poderia ser explicada por uma seleção de bactérias durante os ciclos, resultando numa população menor em número, porém, com mais capacidade de metabolização nas condições da fermentação.

A produção de lactato no tratamento controle, foi bem reduzida até o ciclo VI, sendo incrementada nos dois últimos ciclos (VII e VIII) (Figura 89). Como não verificou-se incremento na contaminação bacteriana (Figura 90), é igualmente provável que tal ácido tenha sido produzido pela levedura, como já relatado na literatura (WHITING, 1976; KLERK, 2010). Particularmente interessante vem a ser a observação de uma drástica redução na população de bactéria homofermentativa até o ciclo IV (Figura 90) em paralelismo com a redução de lactato (Figura 89). Porém, nos ciclos seguintes tal ácido apresenta tendência de significativo incremento sem uma população bacteriana correspondente. Tal constatação poderia ser explicada por uma evolução das linhagens bacterianas, selecionando uma população com alta atividade metabólica e bem adaptada às condições dos ciclos. Desse modo, uma pequena população estaria gerando uma grande quantidade de lactato. Linhagens de bactérias assim evoluídas poderiam contaminar os demais tratamentos provocando níveis elevados de lactato sem que se pudesse detectar níveis elevados de contaminação (número de células/mL). Esta seria uma outra possibilidade para se

explicar os incrementos na produção de lactato nos dois últimos ciclos fermentativos do tratamento Controle.

No entanto, o presente trabalho reforça a suposição de uma evolução de linhagens bacterianas, de metabolismo homofermentativo, mais adaptadas no transcorrer dos ciclos. Estas alterações nas capacidades metabólicas das bactérias resultam em populações com diferentes agressividades no processo fermentativo. Tanto assim, que no último ciclo fermentativo (VIII), os níveis de contaminação média foram de $0,817 \times 10^7$, $15,667 \times 10^7$ e $11,867 \times 10^7$ células/mL, para os tratamentos homofermentativo, heterofermentativo e a mistura (Figura 90), enquanto os rendimentos de lactato calculados em média foram de 2,069%, 2,112% e 2,364% respectivamente (Figura 89). Tais observações, vêm a reforçar a afirmação que o número de bactérias, nem sempre se relaciona com o impacto da contaminação. Assim, a contaminação será mais bem avaliada pela atividade metabólica das bactérias contaminantes, como sugerido por Costa et al. (2008).

Figura 90 – Evolução da população bacteriana ao longo dos 8 ciclos fermentativos [$\times 10^7$ células/mL].

A contaminação bacteriana, expressa em população bacteriana (células/mL) mostrou que o tratamento Controle manteve-se sem contaminação durante o experimento (células/mL $\leq 0,045 \times 10^7$). No tratamento com as bactérias homofermentativas, observou-se que a população foi drasticamente diminuída durante os ciclos, finalizando os ciclos com contagem média de $0,817 \times 10^7$ células/mL, embora estas bactérias tenham sido inoculados numa concentração inicial (ciclo I) de $1,33 \times 10^8$ células/mL.

O contrário ocorreu quando da presença das bactérias do tipo heterofermentativas, sendo que a população das mesmas manteve-se sempre elevada, quer na presença ou

ausência das bactérias do tipo homofermentativo. Por outro lado, com exceção do ciclo IV, a tendência da população da mistura de bactérias foi menor que o tratamento Hetero.

Gomes (2009), mostrou que, isoladamente, as bactérias heterofermentativas crescem com mais facilidade no meio fermentativo, quando comparadas com as do tipo homofermentativo. Porém, neste trabalho, quando os dois tipos de bactérias estão presentes, o que ocorre no processo industrial, percebe-se uma redução na população das bactérias totais, porém com maior produção de lactato.

Observa-se também que as populações das bactérias, em todos os tratamentos, foram mais reduzidas no experimento da cinética da fermentação (ciclo IV). Estes resultados estão coerentes, pois que nestas condições igualmente verifica-se reduções nas produções de metabólitos bacterianos como o manitol e o lactato, mas com exceção do acetato. Como neste experimento de cinética, o meio fermentativo foi agitado para manter a amostra representativa e homogênea durante a amostragem e para manter em suspensão as leveduras.

Tanto a remoção do CO₂, quanto a oxigenação foram favorecidas, alterando o metabolismo tanto das bactérias como das próprias leveduras. Basso e Amorin (1988), puderam observar que o arejamento da fermentação acarreta menor formação de etanol e lactato, mas aumenta a produção de acetato, sendo tal incremento atribuído principalmente à levedura (ALVES, 1994).

Durante o ciclo IV, houve diferença percentual significativa entre a proliferação de células bacterianas dos tratamentos Homo+Hetero ($5,3 \times 10^7$ células/mL) e Hetero ($3,2 \times 10^7$ células/mL) (Figura 90). Isso sugere que, pelo fato de a bactéria homofermentativa ter sua taxa de crescimento favorecida pela aeração, há predominância da biomassa dessa bactéria.

Porém, o tratamento Homo isolado terminou com uma população pequena ($0,32 \times 10^7$ células/mL). Esta análise, mostra que é necessário explicar a possível sinergia das bactérias Homo e Hetero na presença de aeração ou outro fator do ciclo IV. Ao mesmo tempo, é importante considerar nas metodologias futuras a quantificação das bactérias antes de cada ciclo e verificar a perda de biomassa bacteriana pela centrifugação.

Quanto à cinética da produção de lactato, a aeração não apresentou efeito significativo, em concordância com Basso e Amorin (1988). Além disso, observa-se na Figura 91, uma velocidade de formação de lactato semelhante entre os tratamentos Hetero e Homo+Hetero, sem que haja propriamente uma divergência entre o rendimento final deste analito 1,506% para o tratamento Hetero e 1,566 % para o tratamento Homo+Hetero. Há portanto, um contraste evidente entre a quantidade de bactérias homofermentativas e heterofermentativas necessárias para produzir uma quantidade semelhante de lactato.

Figura 91 – Produção de acetato durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.

4.3.9 Manitol

Na Figura 92 apresenta-se o *box plot* para cada tratamento, considerando os rendimentos médios de manitol em cada ciclo.

Depois da análise exploratória em função da Figura 92, realizou-se o teste t (paramétrico) e o Teste WMW (não paramétrico). Os resultados são apresentados na Tabela 37.

De acordo com os dados da Tabela 37, tem-se que as hipóteses alternativas Controle $>$ Homo, Homo $<$ Hetero, Homo $<$ Homo + Hetero e Hetero $>$ Homo + Hetero não são rejeitadas ($p\text{-valor} \leq 0,05$) em ambos os testes e considerando 7 ou 8 ciclos.

Na abordagem bayesiana, o presente trabalho, considera um modelo Log-Normal com dados correlacionados para representar o rendimento do manitol, assim como para os outros analitos. A escolha da distribuição Log-Normal se deve ao fato de os rendimentos em estudo assumirem somente valores positivos. Porém, é importante lembrar que os rendimentos de manitol calculados tiveram alguns valores negativos, no entanto o valor médio de cada ciclo, aplicado no modelo, foi positivo. Teve-se uma exceção no caso do ciclo IV no tratamento Homo, onde o rendimento de manitol calculado foi de $-0,00006$, uma vez que obteve-se um valor muito baixo, foi normalizado para $0,00001$.

Em relação à abordagem bayesiana, tem-se na Tabela 38 um sumário *a posteriori* dos parâmetros destransformados do modelo.

Podem ser observados nas Figuras 93, 94, 95 e 96 os gráficos de linhas e o histogramas dos parâmetros μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y para cada um dos 4 tratamentos. Houve a convergência em

Figura 92 – *Box plot* dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Manitol.

Tabela 37 – Teste t e WMW: teste entre médias - Manitol.

Hipótese Alternativa	Sem ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	2,6404	0,9849	0,9945
Controle > Homo	2,6404	0,0151	0,0087
Controle > Hetero	-2,9853	0,9890	1,0000
Controle < Homo + hetero	-0,9311	0,1894	0,3100
Controle > Homo + hetero	-0,9311	0,8106	0,7325
Homo < Hetero	-3,6559	0,0052	0,0003
Homo < Homo + Hetero	-2,1886	0,0344	0,0003
Homo > Homo + Hetero	-2,1886	0,9656	1,0000
Hetero > Homo + Hetero	2,2630	0,0251	0,0087
Hipótese Alternativa	Com ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	2,6553	0,9879	0,9926
Controle > Homo	2,6553	0,0121	0,0103
Controle > Hetero	-2,9888	0,9909	0,9998
Controle < Homo + hetero	-1,0257	0,1649	0,2209
Controle > Homo + hetero	-1,0257	0,8351	0,8089
Homo < Hetero	-3,6885	0,0037	0,0001
Homo < Homo + Hetero	-2,3990	0,0223	0,0001
Homo > Homo + Hetero	-2,3990	0,9777	1,0000
Hetero > Homo + Hetero	2,2569	0,0236	0,0035

todos os casos e para todos os parâmetros.

Na Figura 97, apresenta-se os *box plots* dos 4 tratamentos considerando os 5.000 valores gerados do parâmetro μ_Y .

Tabela 38 – Sumário *a posteriori* para os parâmetros destransformados do modelo - Manitol.

Tratamento	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	I. C. (95%)
Controle	μ_Y	$1,23 \times 10^{-3}$	$1,51 \times 10^{-4}$	$(9,49 \times 10^{-4} ; 1,55 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$2,17 \times 10^{-7}$	$8,24 \times 10^{-8}$	$(1,06 \times 10^{-7} ; 4,26 \times 10^{-7})$
	ρ_Y	$-9,37 \times 10^{-2}$	$1,61 \times 10^{-1}$	$(-4,00 \times 10^{-1} ; 2,20 \times 10^{-1})$
Homo	μ_Y	$4,36 \times 10^{-4}$	$1,10 \times 10^{-4}$	$(2,71 \times 10^{-4} ; 6,89 \times 10^{-4})$
	σ_Y^2	$1,13 \times 10^{-7}$	$9,13 \times 10^{-8}$	$(3,29 \times 10^{-8} ; 3,31 \times 10^{-7})$
	ρ_Y	$1,70 \times 10^{-2}$	$1,15 \times 10^{-1}$	$(-2,10 \times 10^{-1} ; 2,39 \times 10^{-1})$
Hetero	μ_Y	$4,64 \times 10^{-3}$	$4,88 \times 10^{-4}$	$(3,81 \times 10^{-3} ; 5,76 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$2,04 \times 10^{-6}$	$7,12 \times 10^{-7}$	$(1,10 \times 10^{-6} ; 3,87 \times 10^{-6})$
	ρ_Y	$-9,02 \times 10^{-2}$	$1,90 \times 10^{-1}$	$(-4,51 \times 10^{-1} ; 2,93 \times 10^{-1})$
Homo + Hetero	μ_Y	$1,90 \times 10^{-3}$	$2,74 \times 10^{-4}$	$(1,46 \times 10^{-3} ; 2,54 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$3,60 \times 10^{-7}$	$1,59 \times 10^{-7}$	$(1,74 \times 10^{-7} ; 7,68 \times 10^{-7})$
	ρ_Y	$2,21 \times 10^{-1}$	$1,91 \times 10^{-1}$	$(-1,73 \times 10^{-1} ; 5,63 \times 10^{-1})$

Figura 93 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Manitol (Controle).

À luz da bioquímica, o manitol é produzido em maior quantidade por bactérias heterofermentativas, mas no conjunto Homo+Hetero, essa produção é reduzida. Além disso, existe maior produção no controle do que a quantidade encontrada na homofermentativa. Essa fato confere um indício de consumo de manitol por parte da bactéria homofermentativa.

Tem sido observado que o manitol é gerado em menor quantidade quando na presença da bactéria homofermentativa (GOMES, 2009). O presente trabalho evidencia esta observação. Mostra também que no ciclo IV houve um consumo quase que total do manitol do meio fermentativo (presente no mosto e no pé-de-cuba, pois que a levedura não pro-

Figura 94 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Manitol (Homo).

Figura 95 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Manitol (Hetero).

duz este metabolito), sugerindo que a maior oxigenação efetuada neste tratamento, tenha favorecida a metabolização deste analito.

Figura 96 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Manitol (Homo + Hetero).

Figura 97 – Box plot para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y \cdot 100$ - Manitol.

A produção máxima de manitol foi encontrada quando na presença das bactérias heterofermentativas (GOMES, 2009), mas os teores inferiores observados no tratamento correspondente à mistura das bactérias vem sugerir uma atividade metabólica intensa por parte

Figura 98 – Rendimento (%) de manitol ao longo dos 8 ciclos fermentativos.

das bactérias homofermentativas quando em combinação com as bactérias heterofermentativas. Tal afirmativa, pode ser reforçada quando se observa inclusive maiores teores de lactato (produzido por ambas as bactérias) no tratamento Homo+Hetero (Figura 89). No entanto, existem indícios que as bactérias homofermentativas e heterofermentativas agiriam de forma sinérgica, hipótese que, de ser confirmada por novos estudos, teria grande impacto nos processos de controle da contaminação no processo industrial.

Mostra-se na Figura 99, a cinética da produção de manitol, onde encontra-se indícios de que a bactéria homofermentativa consome manitol, visto que a taxa de crescimento do conjunto Homo+Hetero é menor que o valor produzido pela bactéria heterofermentativa.

4.3.10 Succinato

Na Figura 100, mostra-se o *box plot* considerando as médias do rendimento na produção de succinato para cada tratamento nos 7 reciclos fermentativos (sem inclusão do ciclo IV).

Na Tabela 39, apresenta-se os resultados teste *t* e o Teste WMW.

Após análise dos dados da Tabela 39, tem-se que as hipóteses alternativas Controle < Hetero, Controle < Homo + Hetero, Homo < Hetero e Homo < Homo + Hetero não são rejeitadas em ambos os testes, quando considera-se apenas 7 ciclos ($p\text{-valor} \leq 0,005$). Já, quando considera-se os valores dos 8 ciclos, tem-se que as hipóteses Controle < Hetero, Controle < Homo + Hetero e Homo < Homo + Hetero não são rejeitadas no teste WMW,

Figura 99 – Produção de manitol durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.

Figura 100 – *Box plot* dos tratamentos considerando o rendimento [%] ou [g/100g] médio em cada ciclo analisado (exceto ciclo IV) - Succinato.

enquanto que apenas as hipóteses alternativas $\text{Controle} < \text{Homo} + \text{Hetero}$ e $\text{Homo} < \text{Homo} + \text{Hetero}$ não são rejeitadas no teste t .

Em relação à abordagem bayesiana, tem-se na Tabela 40, um sumário dos parâmetros

Tabela 39 – Teste t e WMW: teste entre médias - Succinato.

Hipótese Alternativa	Sem ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	-0,497	0,314	0,355
Controle > Homo	-0,497	0,686	0,690
Controle < Hetero	-2,676	0,010	0,013
Controle < Homo + Hetero	-2,772	0,009	0,013
Homo < Hetero	-2,401	0,017	0,036
Homo < Homo + Hetero	-2,506	0,014	0,027
Hetero < Homo + Hetero	-0,142	0,445	0,645
Hetero > Homo + Hetero	-0,142	0,555	0,402
Hipótese Alternativa	Com ciclo IV		
	teste t		Teste WMW
	Estatística	p-valor	p-valor
Controle < Homo	-0,248	0,404	0,360
Controle > Homo	-0,248	0,596	0,677
Controle < Hetero	-1,219	0,122	0,032
Controle < Homo + Hetero	-2,603	0,012	0,007
Homo < Hetero	-1,011	0,165	0,065
Homo < Homo + Hetero	-2,383	0,018	0,014
Hetero < Homo + Hetero	-0,904	0,194	0,478
Hetero > Homo + Hetero	-0,904	0,806	0,567

do modelo, para os 4 tratamentos, considerando os 5.000 valores gerados pelo algoritmo MCMC.

Tabela 40 – Sumário *a posteriori* para os parâmetros destransformados do modelo - Succinato.

Tratamento	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	I. C. (95%)
Controle	μ_Y	$2,28 \times 10^{-3}$	$2,48 \times 10^{-4}$	$(1,84 \times 10^{-3} ; 2,82 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$6,98 \times 10^{-7}$	$2,56 \times 10^{-7}$	$(3,64 \times 10^{-7} ; 1,34 \times 10^{-6})$
	ρ_Y	$-1,86 \times 10^{-1}$	$1,32 \times 10^{-1}$	$(-4,29 \times 10^{-1} ; 8,26 \times 10^{-2})$
Homo	μ_Y	$2,46 \times 10^{-3}$	$2,50 \times 10^{-4}$	$(2,02 \times 10^{-3} ; 3,01 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$6,61 \times 10^{-7}$	$2,30 \times 10^{-7}$	$(3,52 \times 10^{-7} ; 1,23 \times 10^{-6})$
	ρ_Y	$-1,85 \times 10^{-1}$	$1,43 \times 10^{-1}$	$(-4,49 \times 10^{-1} ; 1,02 \times 10^{-1})$
Hetero	μ_Y	$2,95 \times 10^{-3}$	$2,82 \times 10^{-4}$	$(2,43 \times 10^{-3} ; 3,56 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$8,95 \times 10^{-7}$	$3,05 \times 10^{-7}$	$(4,93 \times 10^{-7} ; 1,63 \times 10^{-6})$
	ρ_Y	$-1,76 \times 10^{-1}$	$1,44 \times 10^{-1}$	$(-4,51 \times 10^{-1} ; 1,12 \times 10^{-1})$
Homo + Hetero	μ_Y	$2,89 \times 10^{-3}$	$3,18 \times 10^{-4}$	$(2,32 \times 10^{-3} ; 3,60 \times 10^{-3})$
	σ_Y^2	$1,13 \times 10^{-6}$	$4,21 \times 10^{-7}$	$(5,78 \times 10^{-7} ; 2,14 \times 10^{-6})$
	ρ_Y	$-1,77 \times 10^{-1}$	$1,35 \times 10^{-1}$	$(-4,27 \times 10^{-1} ; 9,86 \times 10^{-2})$

Em relação ao parâmetro ρ_Y , pela Tabela 40 observa-se que o valor zero pertence ao intervalo de confiança em todos os tratamentos considerados. Assim, há indícios de que não há correlação entre o ciclo atual e o anterior, para o succinato.

Nas Figuras 101, 102, 103 e 104 podem ser observados os gráficos de linhas e o histogramas dos parâmetros μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y para cada um dos 4 tratamentos. Percebe-se, pelo gráfico de linha, que houve a convergência em todos os casos.

Apresenta-se na Figura 105, o *box plot* dos 4 tratamentos considerando os 5.000 valores gerados do parâmetro μ_Y .

Figura 101 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Succinato (Controle).

Figura 102 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Succinato (Homo).

O succinato é mencionado como um ácido orgânico produzido predominantemente pela levedura (ALVES, 1994; BASSO; ALVES; AMORIN, 1997), que estudaram fermentações

Figura 103 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Succinato (Hetero).

Figura 104 – (a), (c) e (e): gráfico de linhas para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente; (b), (d) e (f): histograma para μ_Y , σ_Y^2 e ρ_Y , respectivamente - 5.000 iterações MCMC - Succinato (Homo + Hetero).

deliberadamente contaminadas. No entanto, observa-se na Figura 106, que na maioria dos ciclos fermentativos as produções deste ácido, foram mais elevado na presença

Figura 105 – *Box plot* para cada tratamento considerando 5.000 iterações MCMC - parâmetro $\mu_Y * 100$ - Succinato.

Figura 106 – Rendimento (%) de succinato ao longo dos 8 ciclos fermentativos.

das bactérias heterofermentativas, sugerindo que nas condições do presente ensaio (contaminações na ordem de 10^8 células/mL), o metabolismo bacteriano tenha contribuído significativamente para a formação do succinato encontrado. Outra possibilidade seria a levedura, mais estressada pela condição contaminada, ser induzida a produzir mais

succinato. Considera-se também que, Basso, Alves e Amorin (1997) e Klerk (2010), pesquisaram a ação deste ácido e concluíram que atua sinergicamente com o etanol como antibacteriano natural, nesse sentido, poderia ser uma reação proporcionalmente maior para um ataque também maior das bactérias heterofermentativas.

Figura 107 – Produção de succinato durante o ciclo IV para os 4 tratamentos.

Quanto à cinética de succinato, observa-se velocidades de formação semelhantes para os quatro tratamentos, a maior produção foi pela bactéria heterofermentativo. Não foi explicada, no entanto, a causa da menor produção deste metabólito pelo tratamento Homo+Hetero respeito do tratamento Homo, diferente ao resultado dos outros ciclos mostrado na Figura 100.

4.4 Teste Kruskal Wallis

O objetivo de se aplicar o teste de KW, em cada analito para os 4 tratamentos analisados, é tentar identificar em quais situações (analitos e tratamentos) os ciclos apresentam comportamentos semelhantes, isto é, em quais situações a produção, em média, é semelhante. Para este teste foram considerados as observações médias em 7 ciclos (o ciclo IV não foi considerado). Segue na Tabela 41 os resultados.

A hipótese nula da igualdade de médias dos rendimentos de um dado analito ao longo dos 7 ciclos, indica que pertencem à mesma população. Assim, concluímos que existem evidências estatísticas altamente significantes de que as amostras são de populações dife-

rentes se: $p\text{-valor} \leq 0,05$. Caso $p\text{-valor} > 0,05$, a evidência indica que a hipótese de igualdade não é rejeitada.

Tabela 41 – Teste Kruskal Wallis

		Controle	Homo	Hetero	Homo + Hetero
Acetato	Estatística	15,766	18,165	17,743	18,944
	$p\text{-valor}$	0,015	0,006	0,007	0,004
Biomassa	Estatística	18,211	14,794	16,413	16,389
	$p\text{-valor}$	0,006	0,022	0,012	0,012
CO ₂	Estatística	15,446	17,022	12,952	11,636
	$p\text{-valor}$	0,017	0,009	0,044	0,071
DeltaCO ₂	Estatística	15,862	15,065	10,978	13,039
	$p\text{-valor}$	0,015	0,020	0,089	0,042
Etanol	Estatística	11,533	18,078	17,316	10,338
	$p\text{-valor}$	0,073	0,006	0,008	0,111
Glicerol	Estatística	15,429	14,840	17,697	15,411
	$p\text{-valor}$	0,017	0,022	0,007	0,017
Lactato	Estatística	16,485	18,909	17,004	18,442
	$p\text{-valor}$	0,011	0,004	0,009	0,005
Manitol	Estatística	12,294	3,990	15,879	9,403
	$p\text{-valor}$	0,056	0,678	0,014	0,152
Succinato	Estatística	18,372	13,043	16,632	16,712
	$p\text{-valor}$	0,005	0,042	0,011	0,010

Os resultados da Tabela 41 indicam que o analito CO₂, somente no tratamento Homo + Hetero os ciclos produzem em média a mesma concentração de CO₂. Já para o DeltaCO₂, a produção é semelhante apenas no tratamento Hetero. Para o Etanol, o teste detecta semelhança nos ciclos para os tratamentos Controle e Homo + Hetero. Por fim, o teste t , também detecta semelhanças nos tratamentos Controle, Homo e Homo + Hetero para o Manitol. Nos demais tratamentos e analitos analisados nesta tese, o teste indica que há diferenças significativas de um ciclo em relação ao outro (lembrando que para executar o teste, tem-se que os ciclos pertencem ao mesmo analito e mesmo tratamento).

4.5 FBST

Na Secção 4.3, foram apresentados os resultados do modelo de dados correlacionados proposto com uma abordagem bayesiana na Secção 3.5.5. A forma apresentada para testar a convergência até agora foram em forma visual, considerando os gráficos de linhas dos resultados das cadeias geradas com o algoritmo MCMC. Entende-se que a convergência é dada quando os dados gerados pelas cadeias apresentam dispersão em torno de um valor, mostrando justamente a convergência para este valor.

Considera-se que um teste de convergência teórico, e não só visual, é necessário para garantir a coerência do modelo, assim foi aplicado para todos os modelos bayesianos (acetato, biomassa, DeltaCO₂, etanol, glicerol, lactato, manitol, succinato). Aplico-se o critério de Geweke (GEWEKE, 1992), para verificar a convergência de (μ_X, σ_X^2) , $(\rho_X, \mu_Y, \sigma_Y^2)$ e (ρ_Y) .

O diagnóstico de convergência de Geweke foi verdadeiro para todos os casos. Com este resultado, iniciamos o FBST. Apenas com as cadeias de Markov geradas na Seção 4.3, não é possível ter uma evidência puramente bayesiana para as hipóteses propostas para os testes da abordagem clássica. O teste t de Student e WMW foram aplicados, mesmo sem ter definidos os pressupostos tanto para o teste paramétrico como para o teste não paramétrico. Considera-se que os 8 dados fornecidos pelos rendimentos de cada ciclo são uma população amostral pequena.

Neste sentido, é importante aplicar um teste às cadeias de Markov e comparar com os resultados do teste clássico. Mesmo sendo uma prática não indicada, neste trabalho comparamos a abordagem clássica e bayesiana.

Escolhe-se dois analitos de interesse para aplicar o FBST. O etanol pela relevância, ao ser o principal produto da fermentação, o mesmo que apresentou diferenças em cada tratamento. A biomassa por mostrar-se semelhante nos 4 tratamentos.

Os resultados apresentados na Figuras 108 e 109 foram semelhantes ao dos testes clássicos. Mostra-se as fontes em **negrito** para as hipóteses alternativas não foram rejeitadas. Assim mesmo, apresenta-se os valores das a taxa de aceitação dos parâmetros que encontra-se, entre 20% e 50% (GILKS; RICHARDSON; SPIEGELHALTER, 1996). Para o caso do etanol, a taxa de aceitação superou, inclusive, o valor de 50%.

ETANOL						
	Taxa de aceitação -			FBST	Teste T	Teste Mann Whitney
	Metrópolis-Hastings		Valores		Evidência > 90%	95% de Confiança
	Média_X	Theta	Mediana Y	Média Y	Controle > Homo	Controle = Homo
Controle	33,84%	57,86%	46,95	46,94	Controle > Hetero	Controle > Hetero
Homo	28,71%	57,97%	46,910	46,910	Controle > Homo + Hetero	Controle = Homo + Hetero
Hetero	23,03%	58,57%	45,990	45,990	Homo > Hetero	Homo > Hetero
Homo + Hetero	26,17%	58,83%	46,340	46,340	Homo > Homo + Hetero	Homo = Homo + Hetero
					Hetero < Homo + Hetero	Hetero = Homo + Hetero

Figura 108 – Resultados comparativos do FBST com os testes t e WMW - Etanol.

Pode-se concluir que a abordagem bayesiana, juntamente com o FBST, forneceram uma contribuição para pesquisas que lidam com pequena quantidade de amostras.

BIOMASSA							
	Taxa de aceitação -				FBST	Teste T	Teste Mann Whitney
	Metrópolis-Hastings		Valores		Evidência > 90%	95% de Confiança	
	Média X	Theta	Mediana Y	Média Y	Controle = Homo	Controle = Homo	Controle = Homo
Controle	20,21%	31,17%	1,847	1,858	Controle = Hetero	Controle = Hetero	Controle = Hetero
Homo	21,16%	28,53%	1,740	1,751	Controle = Homo + Hetero	Controle = Homo + Hetero	Controle = Homo + Hetero
Hetero	20,34%	28,87%	1,858	1,870	Homo = Hetero	Homo = Hetero	Homo = Hetero
Homo + Hetero	21,38%	36,22%	1,838	1,849	Homo = Homo + Hetero	Controle = Homo + Hetero	Controle = Homo + Hetero
					Hetero = Homo + Hetero	Hetero = Homo + Hetero	Hetero = Homo + Hetero

Figura 109 – Resultados comparativos do FBST com os testes t e WMW - Biomassa.

4.6 Validação do modelo

Após a primeira avaliação dos resultados dos VIII ciclos, concluiu-se que as bactérias de metabolismo heterofermentativo produzem um impacto maior no rendimento fermentativo a mantém uma população majoritária e mais estável ao longo dos ciclos. Em virtude destas premissas, foi definido fazer um ensaio com contaminação de bactérias heterofermentativas.

Com o objetivo verificar o desempenho do modelo e validá-lo, foi planejado um ensaio adicional. Foi conduzido com condições propositalmente diferentes dos anteriores 8 ciclos. Mudaram-se os seguintes parâmetros do processo: volume, nível de contaminação, concentração de substrato.

Logo de um reciclo de aclimação, foi conduzida a fermentação com uma alimentação de 18.58% de ART (comparada com 17,5 % de concentração no tratamento Hetero na fase de modelagem), iniciou-se com uma carga bacteriana de $13,3 \times 10^7$ células/mL (comparada com $7,04 \times 10^7$ células/mL no tratamento Hetero inicial) e 436,6 mL de volume de pé-de-cuba para finalizar com 1466,6 mL (o volume final da fase de modelagem finalizou com 177,8 mL)

Calcula-se a média ponderada descrita, e aplicando o algoritmo de minimização da função objetivo, encontrou-se os valores apresentados na Tabela 43.

Houve, portanto, uma diminuição no erro que se comete pela modelagem dos parâmetros, posteriormente à introdução do vetor de Efeito Fixo, redução relativa de 91,16%. A

Tabela 42 – Matriz de ponderação do tratamento Hetero de validação - Valores para Pad, Xad e Sad.

	Pad	Xad	Sad
$umax_{ad}$	1.02570	1.01790	1.01360
$Y_{xs_{ad}}$	1.35950	1.35070	1.31360
$Y_{ps_{ad}}$	0.97560	0.97380	0.96720

Tabela 43 – Vetor $\vec{E}_f$ para o tratamento Hetero de validação.

	B1	B2	B3	ϵ
Sem Ef	1.00000	1.00000	1.00000	0.0509
Com Ef	1.02349	1.34756	0.97374	0.0045

influência do Efeito Fixo no modelo pode ser observada nas Figuras 110, 111 e 112.

Figura 110 – Ajuste do vetor $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Produto no tratamento Hetero de validação.

O modelo apresentou um desempenho satisfatório na validação do tratamento escolhido. Os valores obtidos na Tabela 43 mostram que a taxa máxima de crescimento $umax_{ad}$ teve um aumento de 2.35%. O rendimento na produção de biomassa $Y_{xs_{ad}}$ teve um aumento de 34,76 % e o rendimento fermentativo de etanol $Y_{ps_{ad}}$ teve uma queda de 2.63%. Desta forma, a interferência das bactérias heterofermentativas é modelada, em função da referência do tratamento Controle.

Para verificar a validade destes parâmetros ($Y_{xs_{ad}}$ e $Y_{ps_{ad}}$), o resultado foi comparado com o resultado do balanço de massa. Na Figura 113, se observa a forma como o substrato foi consumido para produzir os diferentes metabólitos. A parcela do açúcar utilizada para gerar biomassa $Y_{xs_{ad}}$ foi de 0,02552; o parâmetro Y_{ps} foi 0,45302. No modelo proposto, em função do valor adimensional do Efeito Fixo, calculamos o valor absoluto $Y_{X/S} =$

Figura 111 – Ajuste do vetor $\vec{E}_f$ aos dados experimentais do Substrato no tratamento Hetero de validação.

Figura 112 – Ajuste do vetor $\vec{E}_f$ aos dados experimentais da Biomassa no tratamento Hetero de validação.

0,02365; o erro relativo é de 7,29% e $Y_{P/S} = 0.45348$ com um erro relativo de 0.10%.

Em virtude destes resultados considera-se que o modelo do processo fermentativo, onde a interferência é calculado em função do vetor de Efeito Fixo, foi apropriado para

Figura 113 – Balanço de massa do tratamento Hetero de validação.

descrever o processo nas condições de condução dos ensaios.

Conclusões

No presente trabalho foi desenvolvido um modelo não linear, baseado na estimativa de parâmetros que fossem congruentes com dados experimentais obtidos para diferentes tratamentos fermentativos. Nesse modelo cinético foi possível representar de maneira adequada características da fermentação, como a velocidade de metabolização do substrato e a formação do produto, aproximando as curvas experimentais ao modelo numérico por intermédio de parâmetros. Apesar de a utilização de um software voltado para estimação de parâmetros, por meio de algoritmos evolutivos diferenciais, ter se mostrado útil e eficiente ao trabalho, a maior dificuldade foi encontrada na integração numérica das equações diferenciais, o mesmo que alimentava a função objetivo (erro quadrático) e o algoritmo de evolução diferencial. Associado ao algoritmo ED, utilizou-se um vetor de efeito fixo que representou satisfatoriamente o impacto da contaminação bacteriana nos parâmetros $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$. Toda a metodologia empregada no modelo foi corretamente justificada pela análise estatística feita posteriormente, que serviu como forma de validação dos parâmetros escolhidos. Para tanto, foi necessário primeiramente superar as dificuldades de se obter um tamanho amostral grande e garantir independência dos dados. Nessa esfera, a abordagem bayesiana mostrou-se necessária para conferir solidez ao trabalho.

Nesse âmbito, torna-se relevante dizer que a metodologia para estimação de parâmetros exige, sobretudo, uma justificativa do significado físico de cada parâmetro, incluindo nessa avaliação uma análise de correlação entre eles, pois dado parâmetro pode aproximar bem uma dada função, com maior facilidade caso muitos sejam os parâmetros ajustáveis, mas não confere significado físico à aproximação. Dessa forma, não se pode desassociar aspectos experimentais dos resultados numéricos.

Na abordagem bayesiana, o modelo proposto apresentou um desempenho apropriado, o teste de convergência e o FBST forneceram uma opção valiosa à abordagem clássica para descrever e mostrar evidência nas conclusões, utilizando as pequenas amostras dos ciclos.

A metodologia dos ensaios para simular o processo industrial apresenta-se como uma opção, mesmo que restrita, para estudar o processo industrial altamente complexo.

Do ponto de vista bioquímico, a condução dos ensaios e coletas mostra-se de difícil controle, pois a manipulação das amostras necessária provoca distúrbios fermentativos, que em nível laboratorial - a baixa magnitude - não permite reproduzir numericamente o reciclo. Uma dessas dificuldades pode ser descrita pelo processo de aeração, que provocou indução da produção de glicerol, acetato e biomassa, reduzindo o rendimento, além de ter promovido um desvio, não explicado e que necessita ser aprofundado - no que tange as vias pentoses fosfato e a formação de outros subprodutos -, nos valores de substrato (maiores, em geral, em 5%). O saldo de massa de CO_2 é desconhecido e negativo depois da aeração, sugerindo que as leveduras estocam analitos em seu interior e extrapolam o balanço de massa. Sobretudo, torna-se difícil manter uma fermentação sem contaminação ao longo dos reciclos, fato demonstrado por variações nos teores de acetato e lactato no tratamento de controle, a partir do ciclo VI.

Observou-se ainda diferentes comportamentos quanto às bactérias contaminantes. Quando se avalia a bactéria heterofermentativa, nota-se que ela produz um impacto maior no rendimento fermentativo, ao passo que se instala no processo e tem um crescimento superior ao da homofermentativa, formando uma população maior e mais estável. Entretanto, o efeito da bactéria homofermentativa é maior durante o tempo da alimentação, condizente com a baixa tolerância que possui à concentração de etanol.

Em relação aos analitos e sua formação ao longo da fermentação, quando associados aos elementos contaminantes, observou-se, no tratamento com bactéria homofermentativa, que a concentração de manitol apresentou decréscimo, mesmo que mínimo, e a essa diferença associa-se um indício de consumo de manitol por essa bactéria. Ao fato de haver baixo índice de manitol, também se associa um favorecimento, advindo da aeração, ao metabolismo elevado e crescimento da bactéria homofermentativa.

Quanto à produção de lactato, nota-se que a bactéria homofermentativa consegue manter uma produção de lactato independente do tamanho de sua população, mantendo níveis elevados mesmo com uma população inferior. Além disso, observou-se que no tratamento em conjunto com homofermentativa e heterofermentativa, houve produção maior de lactato do que o produzido pela bactéria homofermentativa. Dessa forma, sugere-se que a sinergia entre essas duas bactérias auxilia a produção de lactato.

Para o succinato, foi possível observar que sua produção é inferior na presença de oxigênio e remoção de CO_2 , fato associado ao fenômeno de aeração.

5.1 Trabalhos futuros

A sensibilidade e correlação de parâmetros podem ser utilizadas como ferramentas para validar a qualidade dos modelos, assim pode-se escolher outros modelos propostos na literatura, para comparar e escolher o mais adequado, não em função de incluir os efeitos e inibições mais completas, se não, na unicidade, estabilidade e baixa correlação

dos seus parâmetros.

O modelo da cinética proposto, é utilizado para descrever a fase de batelada alimentada e não alimentada (batelada simples), no entanto tem-se argumentos fisiológicos e metabólicos para escolher um modelo diferente para cada fase, ou ajustar os parâmetros em forma independente para cada fase.

O ranking da FIM não inclui nos três mais relevantes o parâmetro K_s , que mostrou-se relevante nos resultados das curvas de sensibilidade isoladas para cada variável de estado. Neste sentido, pode-se incluir no vetor de Efeito Fixo um quarto parâmetro associado à constante de saturação de Monod.

Comparação dos parâmetros estimados diretamente para os tratamentos com bactérias com aqueles obtidos indiretamente com o Efeito Fixo, podem mostrar a utilidade e o aporte deste trabalho.

A evolução do rendimento na produção de lactato pelas bactérias homofermentativas, permitiu ver que pode-se encontrar diferentes agressividades metabólicas numa mesma linhagem de bactéria. Futuros ensaios poderiam realizar a identificação das bactérias ao final dos ciclos para verificar esta hipótese.

Nas análises estatísticas, verificou-se o impacto do ciclo IV no resultado dos testes, é importante estudar o impacto relativo de cada ciclo nas conclusões de evidência estatística. Pode-se estudar o efeito do ciclo I, o mesmo que apresenta diferenças respeito dos outros ciclos pelos meios de cultura inoculados.

O estudo da aeração na bactéria homofermentativa poderá explicar alguns dos fenômenos apresentados neste trabalho. Assim mesmo, o impacto destas bactérias nos indícios de inibição na produção de glicerol é um estudo de relevância para entender o ecossistema das usinas. Esta bactéria também mostrou indícios de consumir manitol, a sinergia de ambas bactérias considera-se como um trabalho de impacto para a indústria sucroenergética.

Referências

- ABRAHAM, A.; GROSAN, C.; ISHIBUCHI, H. **Hybrid Evolutionary Algorithms**. [S.l.]: Springer, 2007.
- AGUIRRE, L. A. **Introdução à Identificação de Sistemas: Técnicas Lineares e Não Lineares Aplicadas a Sistemas Reais**. [S.l.]: Editora UFMG, 2007.
- AIBA, S.; NAGAI, S.; NISHIZAWA, Y. Fed batch culture of *saccharomyces cerevisiae*: a perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation. **Biotechnology and bioengineering**, 1976. vol XVII, p. 1001–1016, 1976. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260180712/references>>.
- ALEXANDER, M. **Microbial ecology**. London, United Kingdom: John Wiley & Sons Inc, 1971.
- ALVARENGA, V. O. **Modelagem preditiva do crescimento/morte de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura com *Lactobaculus fermentum***. Dissertação (Mestrado) — Faculdade Engenharia Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- ALVES, D. **Fatores que afetam a produção de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestrado) — Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, 1994.
- AMORIM, H.; LEÃO, R. **Fermentação Alcoólica – ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. ISBN 8599011-0104.
- ANDRADE, R. R. de et al. Study of kinetic parameters in a mechanistic model for bioethanol production through a screening technique and optimization. **Bioprocess and biosystems engineering**, 2009. Springer, v. 32, n. 5, p. 673–680, 2009.
- ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, 1968. Wiley Online Library, v. 10, n. 6, p. 707–723, 1968.
- ANDRIETTA, S.; FERREIRA, E.; ANDRIETTA, M. Avaliação da influência da velocidade de alimentação sobre o rendimento e produtividade dos processos de produção de etanol operando em batelada alimentada. **SINAFERM Simpósio Nacional de Fermentações**, 2003. 2003.

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

AUSUBEL, F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. [S.l.]: John Wiley Sons Inc, 1998.

BASSO, L. C. **Técnicas de análise e quantificação para ensaios laboratoriais de fermentação etanólica**. [S.l.], 2010.

BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIN, H. V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, 1997. v. 28, p. 77–82, 1997.

BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. **Efeitos do arejamento sobre a fermentação**. [S.l.], 1988. P. 22–25.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. Rijeka, Croácia: InTech, 2011. p. 86–100. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/how-to-link/biofuel-production-recent-developments-and-prospects>>.

BASSO, T. O. **Manitol e Metabolismo Bacteriano**. [S.l.], 2006.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2004. Springer, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.

BECKNER, M.; IVEY, M.; PHISTER, T. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, 2011. v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.

BERNARDO, J. M.; SMITH, A. F. M. **Bayesian Theory**. [S.l.]: John Wiley & Sons Inc, 1994.

BIOSENS. **The Doyle Group - UCSB BioSens**. 2011. Disponível em: <<http://thedoylegroup.org/research/biosens/biosens-users-guide/>>. Acesso em: 2 jul. 2011.

BIROL, G. et al. Mathematical description of ethanol fermentation by immobilized *saccharomyces cererisiae*. **Process Biochemistry**, 1998. v. 33, n. 7, p. 763–771, 1998.

BOCCARA, N. **Modeling Complex Systems**. [S.l.]: Springer, 2010.

BORGES, P. C. S. **Otimização Dinâmica da Fermentação Alcoólica no Processo em Batelada Alimentada**. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Engenharia Química/ Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

BORZANI, W. Fermentação alcoólica contínua. **Semana da fermentação alcoólica**, 1960. p. 263–276, 1960.

BRANCO, F. J. dos S. **Investigação Experimental: Potência estatística dos testes de aleatorização na comparação de dois grupos independentes**. Tese (Doutorado) — Universidade Aberta, 2010.

- BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, 2010. Elsevier, v. 101, n. 13, p. 4862–4874, 2010.
- BULL, A. T.; SLATER, J. H. Microbial interactions and community structure. In: BULL, A.; SLATER, J. (Ed.). **Microbial interactions and communities**. London: Academic Press, 1982.
- BUSSAB, W. d. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica; Basic statistics**. [S.l.]: Saraiva, 2010.
- CARI, E. P. T. **Metodologia de estimação de parâmetros de sistemas dinâmicos não-lineares com aplicação em geradores síncronos**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2009.
- CARMELO, V. et al. Modification of *Saccharomyces cerevisiae* thermotolerance following rapid exposure to acid stress. **International Journal of Food Microbiology**, 1998. v. 42, p. 225–230, 1998.
- CARRERA, J. et al. Computational and conceptual issues in the calibration of seawater intrusion models. **Hydrogeology Journal**, 2010. v. 18, p. 131–145, 2010.
- CARRERA, J.; NEUMAN, S. P. Estimation of aquifer parameters under transient and steady state conditions: 2. uniqueness, stability, and solution algorithms. **Water Resources Research**, 1986. Wiley Online Library, v. 22, n. 2, p. 211–227, 1986.
- CASELLA, G.; BERGER, R. L. **Statistical inference**. [S.l.]: Duxbury Press Belmont, CA, 1990.
- CHEN, D. et al. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. **Molecular Biology of the Cell**, 2003. v. 14, n. 214–229, 2003.
- CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Tese (Doutorado) — Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- CLEWLEY, R. **An elementary XPP-Matlab interface**. [S.l.], 2004. Disponível em: <<http://www2.gsu.edu/~matrhc/XPP-Matlab.html>>.
- COHEN, S. D.; HINDMARSH, A. C. **CVODE user guide**. [S.l.], 1994.
- COSTA, V. M. et al. Production of acetic acid, ethanol and optical isomers of lactic acid by lactobacillus strains isolated from industrial ethanol fermentations. **Ciencia e Agrotecnologia**, 2008. v. 32, n. 2, p. 503–509, 2008.
- CRONWRIGHT, G. R.; ROHWER, J. M.; PRIOR, B. A. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002. v. 68, n. 9, p. 4448–4456, 2002.
- de ANDRADE, R. R. et al. Estimation of temperature dependent parameters of a batch alcoholic fermentation process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2007. Springer, p. 753–763, 2007.

- DEAK, T. Environmental factors influencing yeasts. In: **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. [S.l.]: Springer, 2006. p. 155–174.
- DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. [S.l.]: Access Online via Elsevier, 1995.
- DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* PE 2 e M26**. Tese (Doutorado) — Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2006.
- DRAPCHO, C. M.; NHUAN, N. P.; WALKER, T. H. **Biofuels engineering process technology**. [S.l.]: McGraw-Hill New York, NY, 2008.
- DUTTA, S.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, P. Parametric sensitivity in bioreactor: an analysis with reference to phenol degradation system. **Chemical engineering science**, 2001. v. 56, n. 17, p. 5103–5110, 2001.
- EGEA, J. A. L. **New Heuristics for Global Optimization of Complex bioprocesses**. Tese (Doutorado) — Universidad Politécnica de Cartagena, 2008.
- EGGLESTON, G. et al. Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. **Sugar Industry/Zuckerindustrie**, 2007. v. 132, n. 1, p. 33–39, 2007.
- ENFORS, S.-O.; HAGGSTROM, L. **Bioprocess technology : fundamentals and applications**. Stockholm: Royal Institute of Technology, 1999.
- ENITAN, A. M.; ADEYEMO, J. Food processing optimization using evolutionary algorithms. **African Journal of Biotechnology**, 2011. v. 10, n. 72, p. 16120–16127, 2011.
- ERMENTROUT, G. B. **XPPaut 7.0**. [S.l.], 2011. Disponível em: <<http://www.pitt.edu/~phase/>>.
- FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: **Biotecnologia Industrial. Vol 2**. [S.l.]: Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 223–246.
- FALCÃO, A. et al. Aplicação de métodos reml e bayesiano via amostrador de gibbs na estimação de componentes de variância para produção de leite no estado do paraná. in: Simpósio da sociedade brasileira de melhoramento animal. **Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, 2004. v. 5, p. 1–4, 2004.
- FARIA, C. U. d. et al. Inferência bayesiana e sua aplicação na avaliação genética de bovinos da raça nelore: revisão bibliográfica. **Ciência Animal Brasileira**, 2007. v. 8, n. 1, p. 75–86, 2007.
- FERREIRA, E. **Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada**. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.
- FINGUERUT, J. et al. Fermentação contínua em múltiplos estágios. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba.**, 1992. v. 10, n. 3, p. 41–42, 1992.

FRANCKE, C.; SIEZEN, R. J.; TEUSINK, B. Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. **Trends Microbiol**, 2005. v. 13, p. 550–558, 2005.

FREDRICKSON, A. G. Behaviour of mixed cultures of microorganisms. **Annual Reviews in Microbiology**, 1977. v. 31, n. 1, p. 63–88, 1977.

GALLO, C. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Tese (Doutorado) — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1989.

GASCH, A. P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, 2000. v. 11, n. 12, p. 4241–4257, 2000.

GELFAND, A. E.; SMITH, A. F. Sampling-based approaches to calculating marginal densities. **Journal of the American statistical association**, 1990. Taylor & Francis Group, v. 85, n. 410, p. 398–409, 1990.

GEMAN, S.; GEMAN, D. Stochastic relaxation, gibbs distributions, and the bayesian restoration of images. **Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on**, 1984. IEEE, n. 6, p. 721–741, 1984.

GENTLEMAN, R.; IHAKA, R. e. a. R. D. C. T. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

GEWEKE, J. Evaluating the accuracy of sampling-based approaches to calculating posterior moments. In: **Bayesian Statistics 4**. New York, USA: Oxford University, 1992. p. 625–631.

GHOSE, T. K.; TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. ii. product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. **Biotechnology and Bioengineering**, 1979. v. 21, n. 8, p. 1401–1420, 1979.

GIBBONS, J. D.; CHAKRABORTI, S. **Nonparametric statistical inference**. [S.l.]: CRC press, 2003.

GILKS, W. R.; RICHARDSON, S.; SPIEGELHALTER, D. J. **Markov Chain Monte Carlo in Practice**. New York: CRC Press, 1996.

GOFFIN, P. et al. Understanding the physiology of lactobacillus plantarum at zero growth. **Molecular systems biology**, 2010. Nature Publishing Group, v. 6, n. 1, p. 413, 2010.

GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestrado) — Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, 2009.

GRAVES, T. et al. Effect of ph and lactic or acetic acid on ethanol productivity by saccharomyces cerevisiae in corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2006. Springer, v. 33, n. 6, p. 469–474, 2006.

- GUNAWAN, R.; TAYLOR, S. R.; DOYLE, F. J. Sensitivity analysis in biological modeling: an application in the model development of staphylococcal enterotoxin b pre-apoptotic pathways. In: **Proceedings of the AIChE Annual Meeting**. [S.l.: s.n.], 2005.
- GUUS, C.; BOENDER, E.; ROMEIJN, H. E. Stochastic methods. In: HORST, R.; PARDALOS, P. (Ed.). **Handbook of global optimization**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 829—869.
- HALDANE, J. B. S. **Enzymes**. London: Longmans Green and Co., 1930.
- HASTINGS, W. K. Monte carlo sampling methods using markov chains and their applications. **Biometrika**, 1970. v. 57, n. 1, p. 97–109, 1970.
- HERRGÅRD, M. J. et al. A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. **Nature biotechnology**, 2008. v. 26, n. 10, p. 1155–1160, 2008.
- HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16s rrna and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, 1997. Am Soc Microbiol, v. 63, n. 8, p. 3233–3241, 1997.
- HOAGLIN, D. C.; MOSTELLER, F.; TUKEY, J. W. **Exploring data tables, trends, and shapes**. [S.l.]: Wiley, 2006.
- HOCALAR, A. et al. Comparison of different estimation techniques for biomass concentration in large scale yeast fermentation. **ISA transactions**, 2011. Elsevier, v. 50, n. 2, p. 303–314, 2011.
- HOLLANDER, M.; WOLFE, D. **Nonparametric Statistical Methods**. [S.l.]: John Wiley and Sons, 1999.
- INÊS, A. F. H. **Abordagem polifásica na caracterização e selecção de bactérias do ácido láctico de vinhos da Região Demarcada do Douro**. Tese (Doutorado) — Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2007.
- IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 2011. v. 38, n. 10, p. 1619–1634, 2011.
- JIN, C. K.; CHIANG, H. L.; WANG, S. S. Steady-state analysis of the enhancement in ethanol productivity of a continuous fermentation process employing a protein-phospholipid complex as a protective agent. **Enzyme and Microbial Technology**, 1981. v. 3, n. 3, p. 249–257, 1981.
- JONES, R. P.; GREENFIELD, P. F. Kinetics of apparent cell death in yeasts induced by ethanol. **Biotechnology Letters**, 1984. v. 6, n. 7, p. 471–476, 1984.
- KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, 1983. Springer, v. 49, n. 3, p. 209–224, 1983.

- KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, non-sporing gram-positive rods. In: SNEATH, P. H. A. et al. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1986. p. 1209–1234.
- KELSALL, D. R.; LYONS, T. P. Practical management of yeast: conversion of sugars to ethanol. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th. ed. Norfolk: N. University Press, 2003.
- KENNES, C. et al. Trophic relationships between *saccharomyces cerevisiae* and *lactobacillus plantarum* and their metabolism of glucose and citrate. **Applied and Environmental Microbiology**, 1991. v. 57, n. 4, p. 1046–1051, 1991.
- KIRTADZE, E.; NUTSUBIDZE, N. Metabolic potential of alcoholic fermentation yeasts. **Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences**, 2009. v. 3, n. 1, 2009.
- KLEEREBEZEM, M. et al. Complete genome sequence of *lactobacillus plantarum* wcf. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2003. v. 100, n. 4, p. 1990–1995, 2003.
- KLERK, J.-L. D. **Succinic acid production by wine yeasts**. Tese (Doutorado) — Stellenbosch: University of Stellenbosch, 2010.
- KOMIVES, C.; PARKER, R. S. Bioreactor state estimation and control. **Current Opinion in Biotechnology**, 2003. v. 14, n. 5, p. 468—474, 2003.
- KORTE, G. et al. Structured model for cell growth and enzyme production by recombinant *escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, 1991. v. 35, n. 2, p. 185–188, 1991.
- LAURETTO, M. d. S. **Seleção de Modelos Através de um Teste de Hipótese Genuinamente Bayesiano: Misturas de Normais Multivariadas e Hipóteses Separadas**. Tese (Doutorado) — Programa interunidades em Bioinformática da Universidade de São Paulo, 2007.
- LEE, J.; PAGAN, R.; ROGERS, P. Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *zymomonas mobilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, 1983. v. 25, n. 3, p. 659–669, 1983.
- LEI, F.; ROTBØLL, M.; JØRGENSEN, S. A biochemically structured model for *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of biotechnology**, 2001. v. 88, n. 3, p. 205–221, 2001.
- LENSKI, R.; TRAVISANO, M. Dynamics of adaptation and diversification: a 10000-generation experiment with bacterial populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1994. v. 91, n. 15, p. 6808–6814, 1994.
- LEVENSPIEL, O. The monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnology and Bioengineering**, 1980. v. 22, n. 8, p. 1671–1687, 1980.
- LEWIS, J.; LEARMONTH, R.; WATSON, K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, 1995. v. 141, n. 3, p. 687–694, 1995.

- LIAO, J. et al. Application of characteristic reaction paths: Rate-limiting capability of phosphofructokinase in yeast fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, 1988. v. 31, n. 8, p. 855–868, 1988.
- LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1975.
- LIMA, U. D. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. de. Produção de etanol. In: SCHMIDELL, W. et al. (Ed.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001. v. 3.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006. v. 69, n. 6, p. 627–642, 2006.
- LINTON, J. D.; DROZD, J. W. Microbial interactions and communities in biotechnology. In: BULL, A. T.; SLATER, J. H. (Ed.). **Microbial interactions and communities**. London: Academic, 1982. p. 357—406.
- LJUNG, L. **System identification**. [S.l.]: Wiley Online Library, 1999.
- LOBATO, F. S.; STEFFEN JR, V.; NETO, A. S. Resolução de problemas inversos em processos difusivos e transferência radiativa usando o algoritmo de evolução diferencial. In: **Computação Evolucionária em Problemas de Engenharia**. [S.l.]: Omnipax Editora Ltda., 2011.
- LONGO, V. D.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *saccharomyces cerevisiae* - mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. **J Biol Chem**, 1996. v. 271, n. 21, p. 12275–12280, 1996.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FINN, B. Modes of fermenter operation. In: MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. (Ed.). **Practical fermentation technology**. West Sussex, England: John Wiley and Sons Ltda., 2008. p. 69–95.
- MAEDA, A. H. **Estudo de bactérias acéticas de usina de açúcar e álcool**. Tese (Doutorado) — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1997.
- MANN, H. B.; WHITNEY, D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **The annals of mathematical statistics**, 1947. Institute of Mathematical Statistics, v. 18, n. 1, p. 50–60, 1947.
- MANTOVANELI, I. C. C. **Modelagem híbrido neuronal de um processo de fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.
- METROPOLIS, N. et al. Equations of state calculations by fast computing machines. **The journal of chemical physics**, 1953. v. 21, p. 1087–1092, 1953.
- MOALA, F. A. Elicitação da distribuição a priori para o risco de fratura em pacientes com osteoporose. **Revista Brasileira de Estatística**, 2009. v. 70, n. 233, p. 57–74, 2009. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/111/rbe_2009_v70_n233.pdf>.

- MOLES, C. G.; MENDES, P.; BANGA, J. R. Parameter estimation in biochemical pathways: a comparison of global optimization methods. **Genome research**, 2003. v. 13, n. 11, p. 2467–2474, 2003.
- MORI, A.; KONNO, N.; TERUI, G. Kinetic studies on submerged acetic acid fermentation i. behaviors of acetobacter rancens cells towards dissolved oxygen. **J Ferment Technol**, 1970. v. 48, p. 203–212, 1970.
- MRWEBI, M. **Testing Monod: growth rate as a function of glucose concentration in Saccharomyces cerevisiae**. Dissertação (Mestrado) — Stellenbosch: University of Stellenbosch, 2004.
- MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, 2011. v. 37, n. 3, p. 351–370, 2011.
- NARENDRANATH, N. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th. ed. Norfolk: N. University Press, 2003.
- NARENDRANATH, N. et al. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, 1997. v. 63, n. 11, p. 4158–4163, 1997.
- NARENDRANATH, N.; POWER, R. Relationship between ph and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and saccharomyces cerevisiae during ethanol production. **Applied and environmental microbiology**, 2005. v. 71, n. 5, p. 2239–2243, 2005.
- NARENDRANATH, N.; THOMAS, K.; INGLEDEW, W. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of saccharomyces cerevisiae in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2001. v. 26, n. 3, p. 171–177, 2001.
- NETO, V. B.; COURI, S. Instrumentação para automação de processo de fermentação semi-sólida. **Embrapa Instrumentação Agropecuária. Pesquisa em andamento**, 1996. p. 1–4, 1996.
- NEVES, L. **Tecnologia da fabricação do álcool**. [S.l.]: Rev. Bras. de Química, 1938.
- NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Modelling of microbial kinetics. **Chemical Engineering Science**, 1992. Elsevier, v. 47, n. 17, p. 4225–4270, 1992.
- NORDSTROM, K. Yeast growth and glycerol formation. **Acta Chemica Scandinavica**, 1966. v. 20, n. 4, p. 1016–1025, 1966.
- OH, K.-K. et al. Bioconversion of cellulose into ethanol by nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, 2000. v. 89, n. 1, p. 15–30, 2000.
- OLIVA-NETO, P. de. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Engenharia de Alimentos- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

OLIVA-NETO, P. de. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras. Campinas, 1995. 183p.** Tese (Doutorado) — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

OLIVEIRA, A. J. et al. **Métodos para o controle microbiológico na produção de açúcar e álcool.** [S.l.], 1996.

ORLA-JENSEN, S. The lactic acid bacteria. **Host & Son, Copenhagen, 1919.** p. 1–118, 1919.

OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. i. factors affecting the type of metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, 1974. v. 16, n. 9, p. 1197–1212, 1974.

_____. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry**, 1977. v. 12, p. 19–21, 1977.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

PADILHA, A. H. **Parâmetros genéticos para características produtivas e comportamentais em abelhas africanizadas Apis mellifera via abordagem bayesiana.** Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 2011.

PARAZZI, J. O. **Metabolização de açúcares em linhagens de Saccharomyces cerevisiae com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase.** Dissertação (Mestrado) — Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz .Universidade de São Paulo, 2006.

PAULINO, C. D.; AMARAL-TURKMAN, M. A.; MURTEIRA, B. **Estatística Bayesiana.** [S.l.]: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

PEREIRA, C.; J.M.STERN. Evidence and credibility: full bayesian significance test for precise hypotheses. **Entropy**, 1999. v. 1, n. 4, p. 99–110, 1999.

PEREIRA, C. A. de B.; STERN, J. M. Evidence and credibility: full bayesian significance test for precise hypotheses. **Entropy**, 1999. Molecular Diversity Preservation International, v. 1, n. 4, p. 99–110, 1999.

PERINGER, P.; BLACHERE, H. T. Modeling and optimal control of baker's yeast production in repeated fed-batch culture. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, 1979. v. 9, p. 205–213, 1979.

PHILLIPS, R.; KONDEV, J.; THERIOT, J. **Physical Biology of the Cell.** New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2009.

PIRT, S. J. The theory of fed batch culture with reference to the penicillin fermentation. **Journal of Applied Chemistry and Biotechnology**, 1974. Wiley Online Library, v. 24, n. 7, p. 415–424, 1974.

- POPOVA, P.; BOYADJIEV, C. Hierarchical approach for parameter identification of multiparameter models. **Biochemical Engineering Journal**, 2008. v. 39, n. 2, p. 397–402, 2008.
- RAINEY, P. B. Bacterial populations adapt- genetically, by natural selection- even in the lab! **Microbiology Today**, 2004. v. 31, p. 160–162, 2004.
- RAINEY, P. B.; TRAVISANO, M. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. **Nature**, 1998. v. 394, n. 6688, p. 69–72, 1998.
- RAMON-PORTUGAL, F. et al. Kinetic study and mathematical modelling of the growth of *s. cerevisiae* 522d in presence of k2 killer protein. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 1997. Wiley Online Library, v. 68, n. 2, p. 195–201, 1997.
- REYNDERS, M.; RAWLINGS, D.; HARRISON, S. Studies on the growth, modelling and pigment production by the yeast *phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. **Biotechnology letters**, 1996. Springer, v. 18, n. 6, p. 649–654, 1996.
- RFA. **Statistics - Renewable Fuels Association**. 2011. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org>>. Acesso em: 17 fev. 2011.
- RIZZI, M. et al. In vivo analysis of metabolic dynamics in *saccharomyces cerevisiae*: Ii. mathematical model. **Biotechnology and bioengineering**, 1997. v. 55, n. 4, p. 592–608, 1997.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. [S.l.]: Casa do Pão Editora, 2005.
- ROELS, J. A. Application of macroscopic principles to microbial metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, 1980. v. 22, n. 12, p. 2457–2514, 1980.
- ROSA, H. **Estudo da produção e purificação de enzimas carboidrases com atividade de desfloculação celular**. Dissertação (Mestrado) — Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, 2008.
- ROSALES, S. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes**. Tese (Doutorado) — Ciências Biológicas)- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1989.
- RUIS, S.; SCHULLER, C. Stress signaling in yeast. **Bioessays**, 1995. v. 17, n. 11, p. 959–965, 1995.
- RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KESALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4. ed. [S.l.]: Nottingham University Press, 2003.
- SANSONETTI, S. et al. A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: A batch fermentation and kinetic study. **Bioresource Technology**, 2011. v. 102, n. 16, p. 7513–7520, 2011.

SANZ, E.; VOSS, C. I. Inverse modeling for seawater intrusion in coastal aquifers: Insights about parameter sensitivities, variances, correlations and estimation procedures derived from the henry problem. **Advances in Water Resources**, 2006. v. 29, n. 3, p. 439—457, 2006.

SEVELY, Y. et al. Modelling, identification and control of the alcohol fermentation in a cascade reactor. In: **Proceedings of 8th IFAC World Congress, Kyoto, Japan**. [S.l.: s.n.], 1981. p. 177–184.

SHARPE, M. The genus *Lactobacillus*. In: STARR, M. P. et al. (Ed.). **The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. New York: Springer-Verlag, 1981.

SIARRY, P.; MICHALEWICZ, Z. **Advances in metaheuristics for hard optimization**. [S.l.]: Springer, 2008.

SIDERIUS, M.; MAGER, W. M. General stress response: in search of a common denominator. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Ed.). **Yeast stress responses**. Austin TX: R. G. Landes Company, 1997.

SIEZEN, R. J. et al. Complete resequencing and reannotation of the lactobacillus plantarum wcfsl genome. **Journal of bacteriology**, 2012. v. 194, n. 1, p. 195–196, 2012.

SIEZEN, R. J.; VLIEG, J. van H. Genomic diversity and versatility of lactobacillus plantarum, a natural metabolic engineer. **Microb Cell Fact**, 2011. v. 10, n. Suppl 1, p. S3, 2011.

SIGMON, K.; DAVIS, T. A. **MATLAB primer**. [S.l.]: Chapman and Hall/CRC, 2004.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2004. Springer, v. 31, n. 9, p. 401–408, 2004.

SMETS, I. Y. M.; VERSYCK, K. J. E.; Van IMPE, J. F. M. Optimal control theory: a generic tool for identification and control of (bio-) chemical reactors. **Annual Reviews in Control**, 2002. v. 26, n. 1, p. 57–73, 2002.

SONNLEITNER, B.; ROTHEN, A. S.; KURIYAMA, H. Dynamics of glucose consumption in yeast. **Biotechnology progress**, 1997. v. 13, n. 1, p. 8–13, 1997.

STAHL, U.; KÜES, U.; ESSER, K. Flocculation in yeast, an assay on the inhibition of cell aggregation. **European journal of applied microbiology and biotechnology**, 1983. Springer, v. 17, n. 3, p. 199–202, 1983.

STANLEY, D. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of saccharomyces cerevisiae. **Journal of applied microbiology**, 2010. v. 109, n. 1, p. 13–24, 2010.

STEWART, G.; RUSSELL, I.; GARRISON, I. Some considerations of the flocculation characteristics of ale and lager yeast strains*. **Journal of the Institute of Brewing**, 1975. Wiley Online Library, v. 81, n. 3, p. 248–257, 1975.

- STORN, R.; PRICE, K. Differential evolution—a simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces. **Journal of global optimization**, 1997. Springer, v. 11, n. 4, p. 341–359, 1997.
- SUN, J.; GARIBALDI, J. M.; HODGMAN, C. Parameter estimation using metaheuristics in systems biology: a comprehensive review. **Computational Biology and Bioinformatics, IEEE/ACM Transactions on**, 2012. IEEE, v. 9, n. 1, p. 185–202, 2012.
- TAN, Y.; WANG, Z.-X.; MARSHALL, K. C. Modelling substrate inhibition of microbial growth. **Biotechnology and Bioengineering**, 1996. v. 52, n. 5, p. 602–608, 1996.
- TEUSINK, B. et al. In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. **Applied and environmental microbiology**, 2005. v. 71, n. 11, p. 7253–7262, 2005.
- _____. Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* wfs1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. **Journal of Biological Chemistry**, 2006. v. 281, n. 52, p. 40041–40048, 2006.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: An Introduction**. 10. ed. New York: Pearson Benjamin Cummings, 2010.
- TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de Etanol**. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- TUKEY, J. W. **Exploratory Data Analysis**. Preliminary. [S.l.]: Addison–Wesley, 1970.
- _____. **Exploratory Data Analysis**. [S.l.]: Addison–Wesley, 1977.
- UNICA. **FAQ - União da Indústria de cana de açúcar**. 2011. Disponível em: <<http://english.unica.com.br/FAQ>>. Acesso em: 1 dez. 2011.
- VERACHTERT, H.; KUMARA, H. M. C. S.; DAWOUD, E. Yeasts in mixed cultures with emphasis on lambic beer brewing. In: VERACHTERT, H.; MOT, R. D. (Ed.). **Yeast biotechnology and biocatalysis**. New York, USA: Marcel Dekker, 1990.
- VILLADSEN, J.; NIELSEN, J.; LIDÂEN, G. **Bioreaction engineering principles**. [S.l.]: Springer, 2011.
- VISSER, D. et al. Tendency modeling: A new approach to obtain simplified kinetic models of metabolism applied to *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, 2000. v. 2, n. 3, p. 252–275, 2000.
- WANG, F.-S.; SU, T.-L.; JANG, H.-J. Hybrid differential evolution for problems of kinetic parameter estimation and dynamic optimization of an ethanol fermentation process. **Industrial & engineering chemistry research**, 2001. ACS Publications, v. 40, n. 13, p. 2876–2885, 2001.
- WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in biotechnology**, 1999. Elsevier, v. 17, n. 12, p. 482–487, 1999.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, 1976. v. 82, n. 2, p. 84–92, 1976.

WILCOXON, F. Individual comparisons by ranking methods. **Biometrics bulletin**, 1945. JSTOR, v. 1, n. 6, p. 80–83, 1945.

WRIGHT, A. V.; AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: An introduction. In: SLAHTINEN, S. et al. (Ed.). **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. [S.l.]: CRC Press Taylor & Francis Group, 2011.

YOKOYA, F.; MANFIO, G.; VARIANE, S. Curso de treinamento: bactérias lácticas na fermentação alcoólica. **Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello**, 1997. 1997.