

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA TERMO-TOLERÂNCIA E
PARÂMETROS CINÉTICOS DA
*SACCHAROMYCES CEREVISAE***

Marise Tenório Wanderley
Engenheira Química, PUC-RJ, 1994

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por MARISE TENÓRIO WANDERLEY e aprovada pela Comissão Julgadora em 26.03.97.

Campinas, 26 de março de 1997.


Prof^aDr^a MARIA ISABEL RODRIGUES
Presidente da Banca

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

CAMPINAS

1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	W183e
V.	Es.
TOMBO BC/	30637
PROC.	28197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/05/97
N.º CPD	

CM-00097981-1

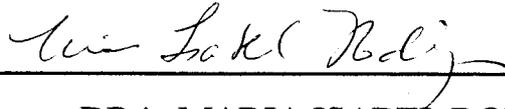
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

W183e Wanderley, Marise Tenório
Estudo da termo-tolerância e parâmetros cinéticos da
Saccharomyces cerevisiae / Marise Tenório Wanderley. -- Campinas,
SP: [s.n], 1997.

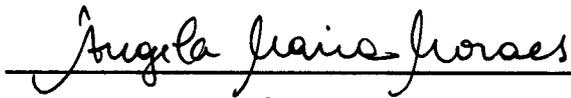
Orientador : Maria Isabel Rodrigues
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Tolerância. 2. Álcool. 3. Cinética. 4. Leveduras.
I. Rodrigues, Maria Isabel. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

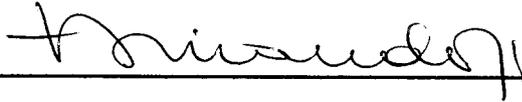
BANCA EXAMINADORA



DRA. MARIA ISABEL RODRIGUES
(ORIENTADORA)
(FEA-UNICAMP)



DRA. ÂNGELA MARIA MORAES
(MEMBRO)
(FEQ- UNICAMP)



DR. EVERSON ALVES MIRANDA
(MEMBRO)
(FEQ-UNICAMP)

DR. FRANCISCO MAUGERI FILHO
(MEMBRO)
(FEA-UNICAMP)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Paulo e Maria Luiza,
pelo carinho e apoio em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues, por estar sempre presente em todas as etapas de elaboração deste trabalho, não só como orientadora, mas também como amiga.
- Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho, pelo grande auxílio prestado durante a elaboração deste trabalho.
- À Banca Examinadora, pelas sugestões e correções.
- Ao CNPq, pelo apoio financeiro, na forma de bolsa de estudo.
- À minha tia Lia, pela ajuda nas correções de inglês e português.
- À Fifa, pela valiosa orientação no Laboratório de Bioengenharia e pela amizade.
- Ao pessoal do Laboratório de Bioengenharia, Susana, Miriam, Ezequias, Lia, Eliana, Belzinha, Flávio, Marlei, Tomaz, Marco, Roger, Vanessa, Zé Guilherme, Bruno, Daniela, Érica, Adriana, Simara, Maria Eugênia, Fábria e André, por todo apoio e incentivo.
- Ao Gabriel, pelo auxílio nas ilustrações da tese.
- Aos amigos, especialmente Alessandra, Edméia, Priscila, Rose e Valéria, pelo apoio, companhia e momentos alegres compartilhados.
- À Soely, Mara e Esmeralda do Laboratório de Bioquímica Nutricional (DEPAN), pela disposição para ajudar.
- Ao Guilherme, pelo carinho e atenção nestes dois anos de mestrado.
- À minha irmã Denise, por uma vida compartilhada juntas, com muito amor.
- Aos professores Edmar e Aloísio da PUC-RJ, por todo apoio e incentivo.
- Aos colegas, funcionários e professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

SUMÁRIO

	Página
Nomenclatura	v
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1 - INTRODUÇÃO	01
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 - Variáveis importantes no estudo da álcool-termo-tolerância em leveduras	03
2.1.1 - Introdução.....	03
2.1.2 - Efeito da temperatura	05
2.1.3 - Função da acumulação de etanol intracelular	09
2.1.4 - Função da membrana do plasma	11
2.1.5 - Influência da composição do meio	13
2.1.6 - Efeito da pressão osmótica	15
2.2 - Processos para produção de etanol via fermentação	16
2.2.1 - Processo clássico ou batelada	16
2.2.2 - Processo batelada alimentada	17

2.2.3 - Processo contínuo	17
2.3 - Cinética da fermentação alcoólica	18
2.3.1 - Modelos cinéticos	18
2.3.1.1 - Relação linear	21
2.3.1.2 - Relação exponencial	21
2.3.1.3 - Relação hiperbólica	22
2.3.1.4 - Relação parabólica	22
2.3.2 - Efeito da temperatura nos parâmetros do modelo cinético	25
2.4 - Viabilidade celular	28
2.5 - Conclusões	31
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 - Condução da fermentação alcoólica	32
3.1.1 - Microrganismo	32
3.1.2 - Metodologia para o estudo do efeito da temperatura associado a concentração de etanol	32
3.2 - Metodologia para determinação da tolerância do etanol em leveduras	34
3.2.1 - Metodologia para obtenção da curva do pH final versus concentração de etanol	35
3.3 - Determinação dos açúcares redutores totais	37
3.3.1 - Preparo do reagente DNS	37
3.3.2 - Preparo da solução de tartarato duplo de sódio e potássio	37

3.3.3 - Preparo da curva padrão	37
3.3.4 - Preparo das amostras	38
3.4 - Determinação do etanol produzido	39
3.4.1 - Preparo da curva padrão	39
3.4.2 - Preparo da amostra	40
3.5 - Determinação da viabilidade celular das leveduras.....	40
3.5.1 - Composição do reagente azul de metileno	40
3.5.2 - Metodologia	41
3.6 - Determinação da massa seca (MS) produzida	41
3.6.1 - Metodologia	41
3.6.2 - Preparo da curva padrão	42
3.6.3 - Preparo das amostras	44
3.7 - Metodologia para determinação da relação de densidade versus concentração de açúcares redutores totais residuais (ARTR)	44
3.8 - Balanço de massa para o cálculo do consumo do substrato, produção de etanol e produção de massa seca	45
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 - Cinética da fermentação alcoólica para as diferentes temperaturas estudadas.....	46
4.2 - Resultados da termo-tolerância das leveduras ao etanol	51
4.3 - Resultados dos parâmetros cinéticos em função da temperatura	55

4.3.1 - Determinação de ΔCO_2 produzido / ΔARTR consumido, ΔCO_2 produzido / ΔEtanol produzido e $Y_{P/S}$	
4.3.2 - Determinação da concentração de etanol acima da qual não ocorre crescimento celular (P_m).....	65
4.3.3 - Determinação dos parâmetros da cinética de morte celular	68
5 - CONCLUSÃO	74
6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
APÊNDICE A	85
APÊNDICE B	98
APÊNDICE C	107

NOMENCLATURA

Símbolo	Significado	Unidade
a	constante definida na equação (2.9)	1/h
A	constante empírica	
A ₁ ,A ₃ ,A ₄	constante de ajuste da dependência de μ_{max} com a temperatura	
A ₂	constante de ajuste da dependência de P _m com a temperatura	
A ₅	constante de ajuste da dependência de K _s com a temperatura	
A ₆	constante de ajuste de dependência de K _d (T) com a temperatura	
ARTR	açúcar redutor total residual	g/L
b	constante definida na equação (2.9)	g/L
C ₀	valor da constante de difusão na concentração zero de etanol ou na ausência de etanol	mol/L
C ₁	constante empírica definida na equação (2.24)	
C ₂	constante empírica definida na equação (2.24)	
E,E ₁ ,E ₂ ,E ₃ , E ₄ ,E ₅ ,E ₆	energia de ativação	cal/mol
F _p (P,T)	função que expressa a inibição da fermentação alcoólica pela concentração de etanol e pela temperatura	
F _x (P,T)	função que expressa a inibição do crescimento celular pela concentração de etanol e pela temperatura	

$G_p(S,T)$	função que expressa a inibição da fermentação alcoólica pela concentração de substrato e pela temperatura	
$G_x(S,T)$	função que expressa a inibição do crescimento celular pela concentração de substrato e pela temperatura	
$[H^+]_f$	concentração de prótons no pH final	M
I_x	termo de contribuição da inibição pela concentração celular	
k	constante exponencial de difusão de prótons	M^{-1}
k_p	taxa de liberação de prótons ativos	M^{-1}
K	constante de velocidade da reação	
K_1	constante empírica definida na equação (2.5)	
K_2	constante empírica definida na equação (2.6)	
K_3	constante empírica definida na equação (2.7)	
K_4	constante empírica definida na equação (2.13) e (2.14)	
K_5	constante empírica definida na equação (2.14)	
K_b	constante de Boltzmann	
$K_d(T,P)$	constante cinética de morte em função da temperatura e concentração de etanol	
K_{dp}	constante de morte como função da concentração de etanol	L/g
K_{dt}	constante de morte como função da temperatura	1/h
K_i	constante de inibição pelo substrato	g/L
K_s	constante de Monod	g/L

m	constante empírica	
m_s	coeficiente de manutenção	
MS	massa seca	g/L
n	constante empírica	
N_o	número total de células no tempo t	
N_v	número de células vivas no tempo t	
N_{t0}	número de colônias no tempo zero	
N_t	número de colônias no tempo t	
pH_f	pH final	
P	concentração de etanol	g/L
P_m	concentração de etanol acima da qual não ocorre crescimento celular	g/L
r_x	taxa de crescimento da fase viável	g/L.h
R	constante universal dos gases	
S	concentração de substrato	g/L
t	tempo	h
T	temperatura	°C ou K
T_{min}	constante empírica definida na equação (2.24)	
T_{max}	constante empírica definida na equação (2.24)	
X	concentração de células	g/L
X_d	concentração de células mortas	g/L

X_m	concentração de células acima da qual não ocorre crescimento celular	g/L
X_t	concentração de células totais	g/L
X_v	concentração de células viáveis	g/L
$Y_{P/S}$	fração mássica entre etanol produzido e açúcar consumido (rendimento de etanol)	
$Y_{X/S}$	fração mássica entre células produzidas e açúcar consumido	

LETRAS GREGAS

Simbolo	Significado	Unidade
γ	constante empírica definida na equação (2.32)	
β	constante empírica definida na equação (2.32)	
μ	velocidade específica de crescimento	1/h
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento	1/h
$\mu_{max,i}$	velocidade específica máxima de crescimento na presença de etanol	1/h
ρ	densidade	g/L
τ_c	tempo de residência	h
ΔH^\ddagger	entalpia de ativação de morte térmica	kcal/kmol
ΔS^\ddagger	entropia de ativação de morte térmica	kcal/kmol K

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras		Página
2.1	Morte exponencial a 10°C da <i>S. cerevisiae</i> IGC 3507 em meio mineral líquido com glicose, vitaminas e etanol	07
2.2	Efeito do magnésio na produção de etanol e no crescimento pela linhagem <i>S. cerevisiae</i> 3001	14
3.1	Esquema do frasco utilizado na fermentação	33
3.2	Curva padrão de MS versus D.O.	43
3.3	Curva padrão de ρ versus [ARTR]	45
4.1	Produção de CO ₂ com o tempo para as diferentes temperaturas	47
4.2	Produção de massa seca com o tempo para as diferentes temperaturas	47
4.3	Consumo de ARTR com o tempo para as diferentes temperaturas	49
4.4	Produção de etanol com o tempo para as diferentes temperaturas	49
4.5	Comportamento da viabilidade com o tempo para as diferentes temperaturas	50
4.6	Variação de k com a temperatura da fermentação	53
4.7	Variação de k com a concentração de etanol e as correspondentes temperaturas de fermentação	54
4.8	Determinação de CO ₂ (g)/ARTR (g) para 30 (a), 32(b), 34 (c), 36 (d), 38 (e) e 40°C (f)	57-58
4.9	Determinação de CO ₂ (g)/Etanol (g) para 30 (a), 32(b), 34 (c), 36 (d), 38 (e) 40°C (f)	59-60

4.10	Determinação de $Y_{P/S}$ para 30 (a), 32 (b), 34 (c), 36 (d), 38 (e) e 40°C (f)	61-62
4.11	Variação de CO_2 prod/ARTR cons com a temperatura	63
4.12	Variação de CO_2 prod/Etanol prod com a temperatura	64
4.13	Variação de $Y_{P/S}$ com a temperatura	64
4.14	Variação de Pm com a temperatura	66
4.15	Comparação dos dados obtidos para Pm com os dados reportados por ALVES (1996) e SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1986)	67
4.16	Determinação de Kdt em função da temperatura	69
4.17	Determinação da energia de ativação (E_6) e da constante (A_6)	69
4.18	Variação de Kdp com a temperatura	71
4.19	Comparação dos dados de viabilidade para 30 (a), 32 (b), 34 (c), 36 (d), 38 (d) e 40°C (f)	72-73
B1	Produção de CO_2 com o tempo para 30 (a), 32 (b), 34 (c), 36 (d), 38 (e) e 40°C (f)	99-100
B2	Produção de MS com o tempo para 30 (a), 32 (b), 34 (c), 36 (d), 38 (e) e 40°C (f)	101-102
B3	Consumo de ARTR com o tempo para 30 (a), 32 (b), 34 (c), 36 (d), 38 (e) e 40°C (f)	103-104
B4	Produção de etanol com o tempo para 30 (a), 32 (b), 34 (c), 36 (d), 38 (e) e 40°C (f)	105-106
C1	Determinação da tolerância ao etanol para viabilidade de 98% para	108-109

C2 Determinação da tolerância ao etanol para viabilidade de 50% para 110-111
30 (a), 32 (b), 34 (c), 36 (d), 38 (e) e 40°C (f)

ÍNDICE DE TABELAS

Tabelas		Página
4.1	Resultados do teste de VAN UDEN de termo-tolerância para cada temperatura realizado em células com 80% de viabilidade	51
4.2	Resultados do teste de VAN UDEN de termo-tolerância para cada temperatura realizado em células com 98% e 50% de viabilidade	52
4.3	Determinação de ΔCO_2 produzido, ΔARTR consumido e ΔEtanol produzido para a temperatura de 32°C (teste B)	55
4.4	Resultados de ΔCO_2 prod/ ΔARTR cons, ΔCO_2 prod/ ΔEtanol prod e $Y_{P/S}$ para as temperaturas de 30, 32, 34, 36, 38 e 40°C	56
4.5	Valores de P_m obtidos experimentalmente neste trabalho e de P_m obtidos por ALVES (1996)	65
4.6	Valores de K_{dt} (h^{-1}) em função da temperatura	68
4.7	Valores de K_{dp} (L/g) em função da temperatura	70
A1	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 30^\circ\text{C}$ (Teste A)	86
A2	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 30^\circ\text{C}$ (Teste B)	87
A3	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 32^\circ\text{C}$ (Teste A)	88
A4	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 32^\circ\text{C}$ (Teste B)	89
A5	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 34^\circ\text{C}$ (Teste A)	90
A6	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 34^\circ\text{C}$ (Teste B)	91
A7	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 36^\circ\text{C}$ (Teste A)	92

A8	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 36^{\circ}\text{C}$ (Teste B)	93
A9	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 38^{\circ}\text{C}$ (Teste A)	94
A10	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 38^{\circ}\text{C}$ (Teste B)	95
A12	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 40^{\circ}\text{C}$ (Teste A)	96
A13	Resultados da fermentação alcoólica para $T = 40^{\circ}\text{C}$ (Teste B)	97

RESUMO

Verifica-se na literatura um grande interesse no estudo de álcool-tolerância (k) de leveduras, principalmente quanto aos mecanismos bioquímicos envolvidos neste parâmetro. No entanto, não foi encontrado nenhum estudo deste parâmetro em função da temperatura e concentração de etanol para leveduras de processos industriais de produção de etanol.

Assim, este trabalho teve como objetivo o estudo do parâmetro k e de parâmetros cinéticos P_m (concentração de etanol onde o crescimento celular cessa), $Y_{P/S}$ (rendimento em etanol), e $K_d(T,P)$ (constante cinética de morte em função da temperatura e concentração de etanol) para uma faixa de temperatura usualmente utilizada em processos industriais (30 a 40°C) usando uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* isolada na Usina Santa Adélia / SP. O meio de cultivo para as fermentações foi a base de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura que mais se aproxima do meio industrial.

Verificou-se que o teste de álcool-tolerância, proposto por JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985) só é válido em condições de alta viabilidade celular. Não é possível a utilização deste teste para alta temperatura e alta concentração de etanol, quando geralmente a viabilidade celular é baixa, dificultando a análise do efeito associado da álcool-termo-tolerância conjuntamente. Constatou-se que o parâmetro k permanece inalterado para temperaturas de 30 e 32°C, aumentando linearmente de 32 a 40°C, indicando o aumento da sensibilidade das leveduras com o aumento da temperatura.

Foi obtido um modelo cinético para P_m em função da temperatura, que expressa a queda exponencial dos mesmos para temperaturas superiores a 32°C. A cinética de morte celular foi verificada através da equação de DALE et *alli* (1990) em função do tempo de fermentação, da temperatura e concentração de etanol. O ajuste obtido entre os dados experimentais e os previstos pela equação foi consideravelmente bom, podendo ser utilizado em estudos de projeto e otimização de processos industriais.

ABSTRACT

One can observe that there is a great interest in literature in the study of alcohol tolerance (k) of yeasts, especially with respect to the biochemical mechanisms involved in such a parameter. However, no study of this parameter was found related to temperature and ethanol concentration for yeasts of industrial processes of ethanol production.

Thus, this work had the objective of studying k parameter and kinetic parameter P_m (ethanol concentration where cellular growth ceases), $Y_{P/S}$ (yield in ethanol), and K_d (T,P) (kinetic constant of death with respect to temperature and ethanol concentration) for a temperature range usually utilized in industrial processes (30 to 40°C), using a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated at Santa Adélia/SP. The culture medium for fermentation was sugar cane molasses and yeast extract which was closest to the industrial culture medium.

It has been found that the alcohol tolerance test, proposed by JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985), is only valid in high cellular viability conditions. The utilization of this test for both high temperature and high ethanol concentration is not possible, when cellular viability is low, making it difficult the analysis of the associated effect of alcohol thermo-tolerance jointly. It has been observed that k parameter remains unaltered for temperatures of 30 and 32°C, increasing linearly from 32 to 40°C, indicating the increase of yeasts sensibility with the increase of temperature.

A kinetic model for P_m was obtained relating to temperature which expresses the exponential fall of the same for temperatures above 32°C. The kinetics of cellular death was verified through the equation of DALE *et alli* (1990) regarding time of fermentation, temperature and ethanol concentration. The adjustment obtained between experimental data and those foreseen through the equation was considerably good, enabling its utilization in studies relating to design and optimization of industrial processes.

1. INTRODUÇÃO

Com a crise do petróleo no início dos anos 70, o uso do etanol como combustível carburante foi uma alternativa encontrada para países de grandes extensões territoriais e carência de óleo, tendo se tornado muito atrativo o álcool obtido por fermentação de caldo de cana-de-açúcar. Muito se investiu neste setor desde então e, como consequência, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de aumentar o rendimento e a produtividade global do processo, diminuindo o custo final do produto.

Quanto à condução da fermentação, o sistema batelada-alimentada é ainda o processo mais utilizado pela maioria das unidades industriais. No entanto, com o avanço tecnológico e a necessidade de uma maior produtividade com altos rendimentos tem-se elevado o número das instalações com processos contínuos, atualmente correspondendo a 30% das instalações industriais.

Independente do tipo de processo e condução da fermentação uma questão é bastante clara: é impossível conduzir o processo de obtenção de álcool em condições estéreis de trabalho devido à magnitude do volume da produção. A quantidade de vapor necessária e, conseqüentemente, o custo energético, inviabilizariam a obtenção deste produto. Assim, as principais alternativas adotadas pelas usinas para manter o grau de contaminação em condições mais controladas foram:

- trabalhar com alta concentração de leveduras nas dornas (através do reciclo de leveduras);
- trabalhar com alto teor alcoólico para evitar infecção e aumentar a produtividade.

Além disso, devido as condições climáticas do nosso país, é necessário conduzir o processo em temperaturas elevadas (freqüentemente na faixa de 33 a 38°C), pois a implantação de equipamentos de troca de calor implica num custo fixo e operacional muito alto. Portanto, é importante que se trabalhe com leveduras álcool-termo-tolerantes.

Dentre as principais variáveis de processo (concentração de açúcares redutores totais residuais (ARTR) no meio de alimentação, taxa de reciclo, concentração de células no reciclo, concentração de células no vinho delevedurado, tempo de residência nas dornas), a

temperatura de operação tem um papel muito importante nos parâmetros cinéticos: velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}) e concentração de etanol onde o crescimento celular cessa (P_m).

Embora algumas leveduras sejam capazes de produzir alta concentração de etanol, a sensibilidade ao álcool ainda é um sério problema em fermentações industriais e esta sensibilidade aumenta com a temperatura.

O estudo da álcool-termo-tolerância das leveduras e dos parâmetros cinéticos para uma faixa de temperatura utilizada nas usinas nacionais de produção de álcool é, portanto, de grande importância para a otimização dos processos para produção de álcool e para a elaboração de uma estratégia de controle eficiente nas usinas, visando maior produtividade e rendimento da fermentação alcoólica e menor custo para o processo.

Assim, neste trabalho o objetivo foi estudar o efeito da temperatura e da concentração de etanol na fermentação alcoólica utilizando-se uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*, isolada no final da safra da Usina Santa Adélia-SP, e um meio de cultivo à base de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura. Verificou-se então o índice de álcool-tolerância (k) pela metodologia proposta por JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985), a determinação dos parâmetros cinéticos P_m e $Y_{P/S}$ (rendimento de etanol) em função da temperatura. Observou-se a evolução da fermentação alcoólica através dos índices $g \Delta CO_2/g \Delta ARTR$ e $g \Delta CO_2/g \Delta Etanol$. Objetivou-se também, estabelecer um modelo da cinética de morte celular em função da temperatura, concentração de etanol e tempo de fermentação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Variáveis importantes no estudo da álcool-termo-tolerância em leveduras

2.1.1 - Introdução

As leveduras são, sem dúvida alguma, o grupo mais importante de microrganismos explorado pelo homem. Suas contribuições ao progresso estão relacionadas com a capacidade de converter açúcares em álcool e dióxido de carbono (STEWART & RUSSEL, 1983). A *Saccharomyces cerevisiae* é uma das leveduras de maior importância industrial. Ela tem a capacidade de absorver e fermentar uma grande variedade de açúcares, como por exemplo, sacarose, glicose, frutose, galactose e maltose. O uso de bactérias para a produção de etanol industrial vem recebendo atenção ultimamente, como por exemplo a *Zymomonas mobilis*, sendo porém menos tolerante à concentração de etanol do que a levedura, colocando em dúvida seu potencial de uso em fermentações industriais (LAWFORD *et alli* e ROGERS *et alli*, citado por D'AMORE & STEWART, 1987).

As leveduras são microrganismos eucarióticos e suas estruturas correspondem basicamente àquelas de outras células eucarióticas. As células da *Saccharomyces cerevisiae* têm entre 2 a 8 micrômetros de diâmetro e 3 a 15 micrômetros de comprimento. O protoplasma de uma célula de levedura é envolvido por uma membrana e esta por uma parede. Ele contém um núcleo, um grande vacúolo e glóbulos de gordura e numerosas outras estruturas reveladas por técnicas específicas de coramento e/ou de microscopia. A parede celular confere rigidez à célula, definindo sua forma e sua resistência ao movimento. No caso da *Saccharomyces cerevisiae*, a parede tem entre 6 a 8% em massa de proteína, a maior parte dela na forma de enzimas como a invertase, a fosfatase, a amino-peptidase e a glucoamilase. A concentração de lipídios varia entre 8,5 e 13,5% e a quantidade de quitina de 1 a 2%. As leveduras apresentam uma membrana citoplasmática que tem permeabilidade seletiva, regulando a entrada e saída de materiais da célula. A membrana tem uma espessura de 8 nm, sendo constituída, principalmente, de fosfolipídios com inclusões eventuais de proteínas,

polissacarídeos e de outros lipídios, como os esteróis. O tipo e a quantidade destas inclusões dependem das condições de cultivo e determinam propriedades importantíssimas como resistência ao efeito tóxico de diversas substâncias, como o próprio etanol e diversos biocidas (COPERSUCAR, 1987).

As leveduras foram os primeiros microrganismos encontrados capazes de crescer na ausência de oxigênio. Pasteur observou que em anaerobiose (ausência de oxigênio), o açúcar era convertido, principalmente em álcool e dióxido de carbono, enquanto que em aerobiose (presença de oxigênio) os produtos formados eram dióxido de carbono e água. A multiplicação de leveduras é mais rápida e produz-se mais células sob condições de aerobiose. As equações que expressam empiricamente a reação global de completa oxidação e fermentação alcoólica de um açúcar simples:



As leveduras necessitam dos mesmos elementos químicos que as outras formas de vida: carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, ferro, zinco, etc. e, também, de fatores de crescimento tais como vitaminas, que são ativos em concentrações muito baixas. As leveduras crescem melhor em meios ácidos, com pH entre 4.5 e 5.0, faixa esta que inibe a maioria das bactérias e numa faixa ampla de temperatura ótima (0 a 47°C), porém a temperatura ótima para a maior parte das leveduras está entre 20°C e 30°C (COPERSUCAR, 1987).

Antes de se começar a entender completamente a concepção de tolerância ao etanol, é imperativo que princípios ou parâmetros sejam estabelecidos para permitir que se meça e defina a tolerância ao etanol. Tais parâmetros são: temperatura, acumulação de etanol intracelular, membrana plasmática, composição do meio e pressão osmótica.

2.1.2 - Efeito da temperatura

Apesar de muitos estudos realizados, os processos de produção, excreção e regulação do etanol não são ainda bem conhecidos. O interesse sobre a tolerância ao etanol em leveduras aumentou a partir dos trabalhos de GRAY & TRAYER entre 1940 e 1950 (D'AMORE & STEWART, 1987). Eles relataram que a tolerância ao etanol não é limitada pelo gênero ou espécie da levedura e que elas são menos tolerantes a altas temperaturas.

A maioria dos trabalhos relatados na literatura são conduzidos a 30°C (ROSE & HARRISON, 1971 e 1989). Em temperaturas acima da ótima, ocorrem reduções na velocidade de crescimento que, por sua vez, dependem dos nutrientes inibidores presentes no meio de cultivo, níveis de aeração e agitação, preparo e tamanho dos inóculos e solubilidade do oxigênio.

D'AMORE & STEWART (1987) relataram que há dois tipos de morte térmica da levedura, uma associada ao aumento da temperatura, onde o alvo de morte térmica é localizado na membrana plasmática, e a outra associada ao aumento da concentração de etanol no interior da célula, onde o alvo de morte térmica é localizado no interior da membrana mitocondrial. Ou seja, o fator determinante da morte das leveduras é a concentração de etanol, o qual se agrava com o aumento da temperatura, ocorrendo um fenômeno sinérgico destas duas variáveis. Neste mesmo trabalho, os autores propõe que a tolerância ao etanol da *Saccharomyces cerevisiae* com respeito a morte em temperaturas intermediárias está associada a composição lipídica da membrana plasmática.

A levedura pode responder ao efeito físico de temperaturas altas (fluidez da membrana aumentada), mudando-se sua composição de ácido graxo. Com o aumento da temperatura, a proporção de ácidos graxos saturados esterificados dentro da membrana aumenta devido a presença de cadeias acil insaturadas. Em geral, quanto maior a temperatura de fermentação, maior o efeito inibitório do etanol e menor a sua taxa de produção. Entretanto, a suplementação de nutrientes já demonstrou melhorar a fermentação de glicose em temperaturas mais altas (D'AMORE, 1992).

Em temperaturas altas de crescimento, o etanol afeta a viabilidade das células de *Saccharomyces cerevisiae* e leveduras similares, ocorrendo morte térmica. Entretanto, há

evidência de que a viabilidade da levedura pode também ser afetada por etanol a temperaturas mais baixas (SÁ-CORREIA & VAN UDEN, 1986).

O aumento da temperatura de fermentação também causa aumento na acumulação de etanol intracelular. NAVARRO (1980) concluiu que as concentrações de etanol intracelular altas foram uma consequência da resistência à difusão através da membrana do etanol para o exterior da célula. Portanto, em temperaturas elevadas, a taxa de produção de etanol aumentou mais rapidamente do que a taxa de sua excreção.

SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1986) estudaram o comportamento da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* IGC 3507 em temperaturas de crescimento baixas e intermediárias num meio com sais minerais, vitaminas e 2% de glicose. Observou-se que nas combinações de temperatura e concentração de etanol que estavam fora do perfil de temperatura de tolerância ao etanol máxima da linhagem, ocorreu morte exponencial, acentuada com o aumento da concentração de etanol (figura 2.1). Nas combinações de temperatura e concentração de etanol dentro dos limites do perfil de tolerância ao etanol máxima, o crescimento exponencial começou depois da fase "lag", e nenhuma morte foi observada. Os resultados sugeriram que as taxas específicas de morte em temperaturas baixas e intermediárias foram a soma de duas taxas específicas de morte, uma correspondendo a morte térmica aumentada pelo etanol, tendo a sua contribuição aumentado com o aumento da temperatura, e o outro correspondendo a morte induzida por etanol, tendo a sua contribuição aumentado com o decréscimo da temperatura.

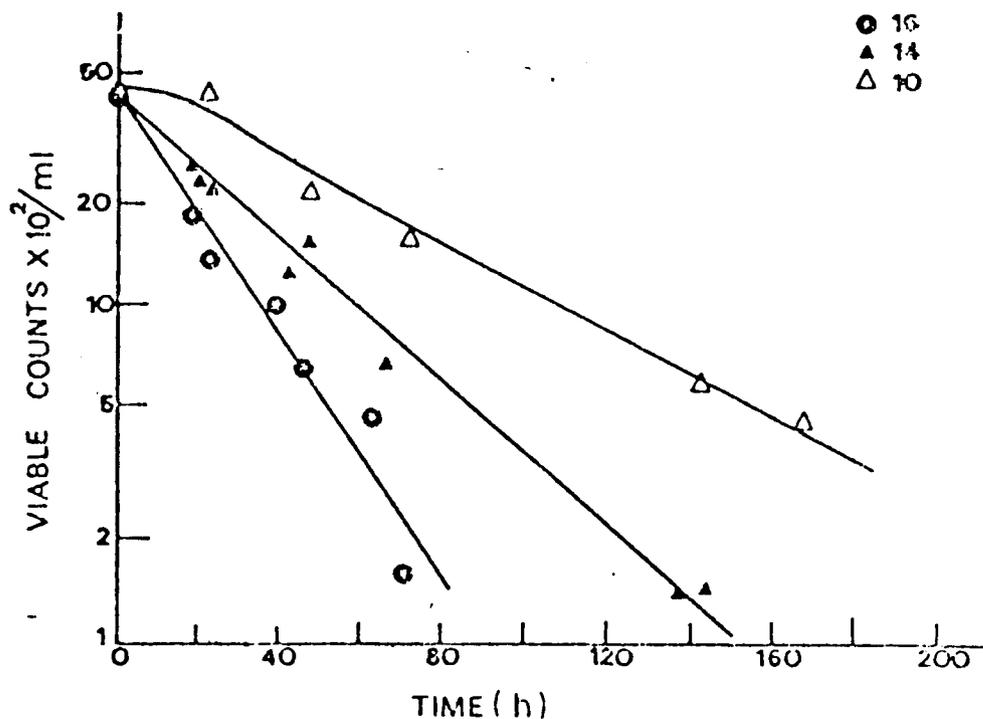


Figura 2.1 - Morte exponencial a 10°C da *S. cerevisiae* IGC 3507 em meio mineral líquido com glicose, vitaminas e etanol. Os números indicam as concentrações de etanol (% v/v) (SÁ-CORREIA & VAN UDEN, 1986).

AGUILERA & BENÍTEZ (1989) investigaram os efeitos sinérgicos do etanol e da temperatura no crescimento e na viabilidade das células de linhagens Rho⁺ e Rho⁻ de *Saccharomyces cerevisiae*, onde as células foram incubadas a 22, 26, 30 e 37°C, com concentrações de etanol variando de zero a 3,5 M. Verificou-se que a temperatura na qual o crescimento celular diminuiu ao máximo foi 37°C sem nenhum etanol e 30°C com 0,35 M (16,12 g/L) de etanol em ambas as linhagens. A concentração de etanol em que a fermentação cessou foi sempre cerca de 0,5 M (23,04 g/L) mais alta do que aquela relativa ao crescimento. Os valores para estes parâmetros permaneceram inalterados acima de 30°C. A temperatura de 26°C foi a única na qual os efeitos sinérgicos do etanol e da temperatura foram mínimos, logo os experimentos para investigar a adaptação das linhagens ao etanol foram feitos nesta temperatura. Concluiu-se que não houve adaptação na faixa de concentração de etanol de

zero a 3,5 M em nenhuma das linhagens e além disso, a linhagem Rho⁻ tornou-se mais sensível na presença de etanol por um longo período.

HACKING *et alli* (1984) compararam a termo-tolerância de 55 linhagens de leveduras pertencentes a 7 gêneros diferentes. Obtiveram-se rendimentos maiores que 90% (nível final de etanol maior que 8%, v/v) para linhagens de *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis*, todas fermentando glucose a 40°C. LALUCE *et alli* (1987) isolaram onze linhagens de leveduras termo-tolerantes de amostras coletadas em destilarias em final de safra. Estas linhagens foram capazes de produzir altos níveis de etanol a 40°C. Mais recentemente, D'AMORE *et alli* (1989) compararam 65 linhagens de vários gêneros quanto à termo-tolerância. Uma das linhagens utilizadas (*Saccharomyces diastaticus*) produziu níveis de etanol de 8% (v/v) mantendo uma retenção de viabilidade de 80% após 24 h a 40°C (citado por LALUCE, 1991).

LALUCE (1991) utilizou técnicas de genética clássica e conseguiram obter em laboratório híbridos melhorados, ou seja, com maior capacidade de converter açúcar a etanol a 40°C. Um destes híbridos mostrou-se mais tolerante ao etanol e à pressão osmótica que as outras linhagens. Submetendo-se as linhagens isoladas a crescimentos e fermentações sucessivos a 40°C, com reutilização de células, verificou-se o aparecimento de colônias menores com e sem deficiência respiratória.

BROWN & OLIVER (1982) estudaram o efeito do etanol adicionado a levedura *Saccharomyces uvarum*. O efeito do etanol pode ser modificado tanto pelo meio ambiente como por fatores genéticos. Verificou-se este efeito com modificação de temperatura, observando-se que quanto mais alta a temperatura maior era o efeito inibitório. A fermentação por *Saccharomyces uvarum* apresentou uma temperatura ótima maior que a temperatura de crescimento (35°C). A levedura apresentou maior resistência ao etanol a temperaturas de 5°C e 10°C, porém a temperaturas entre 25°C e 35°C o efeito inibitório do etanol foi muito mais pronunciado.

Concentrações máximas de etanol produzidas por *Kloeckera apiculata* e *Candida stellata* são registradas como 4 a 6% e 5 a 10% (SOUFLEROS & BERTRAND, 1979; MARGARETH, 1981; SHIMAZU & WATANABE 1981; citado por GAO & FLEET, 1988) e estes valores são seus níveis máximos de tolerância ao etanol. A contribuição de leveduras

não-*Saccharomyces* para fermentação do vinho é significativamente influenciada pela temperatura a medida que a temperatura da fermentação diminui. A 10°C, *Kloeckera apiculata* competiu com *Saccharomyces cerevisiae* como espécie dominante de fermentação, ocorrendo em 10⁶ a 10⁸ células/ml em vinhos contendo de 10-13% de etanol. Estas descobertas sugerem que a tolerância ao etanol das leveduras do vinho, que não sejam *Saccharomyces*, é substancialmente aumentada em temperaturas mais baixas, capacitando-as desta forma a dar maior contribuição à fermentação do vinho e, conseqüentemente, à sua qualidade (GAO & FLEET, 1988).

2.1.3 - Função da acumulação de etanol intracelular

CASEY *et alii* (1984) reportaram que o fator limitante para a produção de altos níveis de etanol estaria mais relacionado com dificuldades nutricionais da levedura do que com o efeito tóxico do mesmo. No entanto, há muita controvérsia quanto aos efeitos tóxicos do acúmulo intracelular ou extracelular do etanol (LALUCE, 1991). GUIJARRO & LAGUNAS (1984) (citado por FURLAN & RODRIGUES, 1996) chegaram a sugerir que não seria possível o acúmulo de etanol intracelular.

NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976) observaram que a adição exógena de etanol em culturas de *Saccharomyces cerevisiae* é menos tóxica que o etanol endógeno produzido pelas leveduras. Isto foi confirmado por BEAVEN *et alii* (1982) e LOUREIRO *et alii* (1983), além de notar que a taxa de produção de etanol dentro das células excedia a taxa que poderia ser excretada. Foi proposto, então, por BENÍTEZ *et alii* (1983), VAN UDEN & LEÃO (1985) e LIGMANN & MARGALITH (1986), que a concentração de etanol dentro das células pode ser maior do que a de fora em determinadas condições de experimento (fermentação rápida, alta temperatura, alta pressão osmótica). Aumentos da temperatura e/ou pressão osmótica estão relacionados com o aumento da concentração intracelular de etanol e diminuição da tolerância de etanol das células. Por outro lado, PANCHAL & STEWART (1980) e NAVARRO (1980) sugerem que a concentração intracelular de etanol em suspensões fermentativas de leveduras são menores ou iguais àquelas do meio extracelular.

Esta discrepância nos resultados observados a partir de vários estudos é provavelmente devido à controvérsia existente em torno da precisão das técnicas empregadas para medir a concentração de etanol intracelular. Estas diferenças resultam a partir de pelo menos três problemas básicos: lavagem das células antes da medição de etanol intracelular, suposição de um volume de água intracelular constante ao longo da fermentação, e erros surgidos durante a coleta de amostra e as diversas etapas de diluição e suspensão de células comuns a todos os métodos (D'AMORE & STEWART, 1987).

Outro fator que poderia contribuir para os resultados conflitantes estaria nos diferentes procedimentos experimentais utilizados (por exemplo: tempo de amostragem, temperatura, concentração de substrato, etc.). Foi demonstrado por NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976), NAVARRO (1980), PANCHAL & STEWART (1982) e LEGMANN & MARGALITH (1986) que as concentrações de etanol intracelular são maiores nos estágios iniciais de fermentação e começam a cair, conforme a fermentação prossegue para um nível similar à concentração extracelular. Isto indicaria que a excreção de etanol se dá por difusão passiva. Em alguns casos, a concentração intracelular de etanol eventualmente cai abaixo da concentração extracelular, sugerindo alguma forma de transporte ativo de etanol. Portanto, o tempo de amostragem pode ser um fator importante na determinação da concentração intracelular de etanol (D'AMORE & STEWART, 1987).

Aumentando-se a pressão osmótica e/ou a temperatura, eleva-se a concentração de etanol intracelular. Além disso, a tolerância ao etanol de algumas leveduras tem sido atribuída à sua excreção eficiente de etanol para dentro do ambiente, reduzindo assim níveis intracelulares de etanol. A adição de lipídios insaturados à cultura da levedura aumentou a fluidez da membrana e aumentou a excreção de etanol a partir das células (D'AMORE & STEWART, 1987).

JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985) propuseram um método baseado na acidificação extracelular para testes rápidos sobre tolerância ao etanol. Neste método, as leveduras tolerantes ao etanol exibem um valor menor de pH extracelular que as leveduras não-tolerantes. Isto se baseia no fato de que o etanol causa reentrada passiva de próton para dentro das células, o que teria o efeito total de reerguer o pH extracelular. As células

tolerantes ao etanol seriam menos afetadas pelo etanol e, portanto, teriam um pH extracelular menor que as células não-tolerantes.

2.1.4 - Função da membrana plasmática

A membrana da célula da levedura é o alvo principal para a inibição alcoólica e implica que resíduos acil graxo da membrana são determinantes importantes de resistência ao álcool (JIMÉNEZ & BENÍTEZ, 1987). O interior da membrana mitocondrial foi determinado como a região alvo do aumento de morte térmica provocada pelo etanol. O etanol interage com a membrana, possivelmente pela inserção dentro do interior hidrofóbico, aumentando a polaridade desta região, enfraquecendo a barreira hidrofóbica para a troca livre de moléculas polares e interações hidrofóbicas, e afetando o posicionamento das proteínas dentro da membrana. Portanto, a alteração estrutural da membrana deve estar entre os mecanismos básicos ou implícitos na toxicidade ao etanol, e a ATPase da membrana do plasma deve ser um alvo crítico (ROSA & SÁ-CORREIA, 1991).

Observou-se que a razão lipídio-proteína de células incubadas em meio contendo etanol cai à medida que a concentração de etanol se eleva. Além disso, o aumento no pH final causado por etanol é devido a um aumento na difusão passiva de próton através da membrana da célula. A composição da membrana celular exerce um papel importante na tolerância ao etanol de espécies de levedura (JIMÉNEZ & BENÍTEZ, 1987).

Existe considerável evidência indicando que os ácidos graxos insaturados e esteróis na membrana são importantes para aumentar a tolerância e/ou produção de etanol em vários microrganismos. Estudos realizados principalmente com *Escherichia coli* têm mostrado que a inclusão de etanol no meio de crescimento resulta em algumas mudanças na composição da membrana. Além disso, um estudo comparando as membranas plasmáticas de leveduras altamente tolerantes ao etanol com leveduras fermentativas menos tolerantes demonstrou que leveduras tolerantes ao etanol continham uma percentagem maior de ácidos graxos insaturados. Estas observações sugeriram que a tolerância ao etanol está relacionada ao aumento no comprimento da cadeia de acil-graxo e um aumento na proporção de ácidos graxos insaturados e esteróis encontrados na membrana. Isto resulta num aumento da fluidez

da membrana em resposta aos efeitos físicos do etanol. Deve ser observado que, sob condições anaeróbicas, as leveduras não são capazes de sintetizar ácidos graxos insaturados (D'AMORE & STEWART, 1987).

CURTAIN *et alli* (1985) (citado por D'AMORE & STEWART, 1987), usando espectroscopia de ressonância de spin de elétrons, verificaram o efeito do etanol na membrana plasmática de protoplastos a partir de duas linhagens de *Saccharomyces* para determinar o efeito de etanol nas vesículas fosfolipídicas. Observou-se que o aumento nas concentrações de etanol tem um efeito fluidizante muito mais forte na membrana plasmática do protoplasto da levedura do que nas vesículas da membrana com menos proteína. Eles interpretaram a fluidização como sendo devida ao deslocamento de fosfolipídios anular a partir de proteínas da membrana, que podem executar uma função no mecanismo básico da tolerância ao etanol.

ROSA & SÁ-CORREIA (1991) estudaram o efeito do etanol na atividade da ATPase da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* IGC 3507 III na temperatura de 30°C e pH de crescimento igual a 5,4. Verificou-se que o valor máximo da enzima ativada nas células crescidas na presença de 6 a 8 % (v/v) de etanol era três vezes superior ao valor de ATPase basal das células crescidas na ausência de etanol. Além disso, observou-se que o aumento no rendimento de etanol e o leve decréscimo simultâneo no rendimento de biomassa induzido pelas concentrações de etanol abaixo de 6% (v/v) foram consistentes com o aumento da atividade da ATPase nas células crescidas ou cultivadas na presença do etanol, quando comparado com células cultivadas na sua ausência, sugerindo assim, que eles poderiam estar relacionados. Para concentrações de etanol acima de 7% (v/v), foram observados decréscimos significativos tanto no crescimento celular como na concentração de etanol. Foi também dentro da faixa de concentração de etanol de 7 a 10% (v/v) que a inibição pelo etanol na atividade da ATPase basal e ativada conduziram a valores de atividade idênticos e muito baixos. Os autores concluíram que em concentrações de etanol acima de 7% (v/v), as células não conseguem reduzir eficientemente o efeito tóxico do etanol.

JIMÉNEZ & BENÍTEZ (1987) utilizaram o método de curvas de acidificação para testar a capacidade da membrana da célula de adaptar-se ao etanol em uma linhagem de levedura FSP6 (linhagem de vinho, *Saccharomyces pretoriensis*) altamente tolerante ao etanol e uma linhagem de levedura 0517-4B (linhagem de laboratório *Saccharomyces*

cerevisae) menos tolerante ao etanol. Observou-se que ambas as linhagens de levedura alteram sua tolerância depois do crescimento na presença de etanol (8% v/v). Entretanto, as membranas da linhagem menos tolerante ao etanol se tornaram mais sensíveis do que as da linhagem mais tolerante, indicando que a capacidade da membrana da célula a adaptar-se ao etanol depende da linhagem estudada.

2.1.5 - Influência da composição do meio

CASEY *et alli* (1983 e 1984) observaram que o fator limitante para alta concentração de etanol pelas leveduras fermentáveis é uma deficiência nutricional ao invés da toxicidade do etanol, no caso da produção de cerveja. Se os requisitos nutricionais são atingidos, um aumento no rendimento da fermentação alcoólica e um aumento na concentração final de etanol poderiam ser esperados. A favor disto, JIN *et alli* (1981), PANCHAL & STEWART (1981) e JANSSENS *et alli* (1983) vem observando aumentos na fermentação alcoólica e concentração final de etanol pela suplementação do mosto. Tais aditivos incluem lipídios, proteínas e vitaminas.

O maior sucesso obtido no aumento do desempenho da levedura e no aumento da tolerância ao etanol tem sido através da suplementação do mosto do meio de crescimento com ácidos graxos insaturados e esteróis (D'AMORE & STEWART, 1987). A suplementação nutricional atua aumentando o comprimento e o nível das novas sínteses da massa da célula da levedura acima daqueles vistos em mostos não suplementados (CASEY, 1985).

Na opinião de CASEY *et alli* (1984), a concentração dos nutrientes mais prováveis para limitar o crescimento (por exemplo, oxigênio e nitrogênio assimiláveis) deve certamente ser aumentada em mostos com alta concentração de açúcar. O método mais usado para preparar mostos com alta concentração de açúcar é a adição de melaços de milho. Tais melaços são virtualmente destituídos de alguns nutrientes nitrogenados, e seu uso decresce efetivamente na mesma proporção de todos nutrientes não carboidratados no mosto. O oxigênio é requerido pelas células na fermentação para a síntese de esteróis e ácidos graxos insaturados. Tais lipídios estão presentes em concentrações subótimas, mesmo em mostos

com concentração de açúcar normal. Em mostos com alta concentração de açúcar, a disponibilidade de oxigênio é diminuída, mesmo posteriormente, devido à solubilidade decrescente de oxigênio com concentração de açúcar crescente.

Estudos recentes demonstraram que, aumentando-se a concentração de magnésio no meio de fermentação, a produção de etanol aumentaria a partir de 20% de glicose por uma linhagem cervejeira de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados apresentados na figura 2.2 demonstram que, aumentando-se a concentração de magnésio no meio, haverá um aumento de três a quatro vezes na produção de etanol e no crescimento da levedura. Os efeitos benéficos da adição de magnésio resultam a partir do fato de que algumas enzimas glicolíticas envolvidas na fermentação alcoólica têm uma necessidade de magnésio. Além disso, o magnésio tem demonstrado aumentar o rendimento da fermentação, aumentando o crescimento da levedura e a sua viabilidade. Aumentando-se a concentração de cálcio no meio também resultou num acréscimo das taxas e extensões de crescimento da levedura e produção de etanol, apesar de não ser na mesma extensão que o magnésio (D'AMORE, 1992).

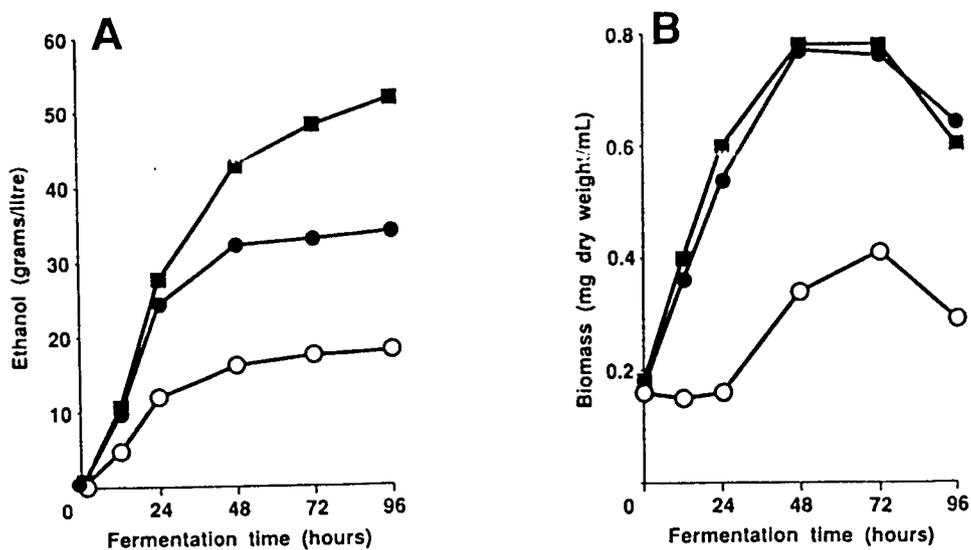


Figura 2.2 : Efeito do magnésio na produção de etanol e no crescimento pela linhagem *Saccharomyces Cerevisiae* 3001. As fermentações foram conduzidas em meio PYN contendo 20% de glicose a 21°C. Magnésio foi adicionado a : (○) 5 ppm, (●) 120 ppm, e (■) 240 ppm. (A) Produção de etanol. (B) Biomassa (D'AMORE, 1992).

MISHRA & PRASAD (1988) investigaram a função de fosfolipídios na membrana plasmática com relação a tolerância ao etanol usando transporte de aminoácido e fluxos de H^+ . O microrganismo usado foi *Saccharomyces cerevisiae* $\alpha ade 5$ e seu mutante derivativo KA101. A temperatura utilizada nos experimentos foi de 30°C. Observou-se que a adição de maiores concentrações de etanol resultou em um aumento no pH extracelular, decrescendo-se o efluxo de próton. Conclui-se que a reversão de efluxo de H^+ induzida por etanol é afetada na presença de fosfolipídios, oferecendo alguma proteção contra a toxicidade do etanol.

MISHRA & PRASAD (1989) estudaram a resposta física e fisiológica da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* KD115 a temperatura constante de 30°C, com diferentes graus de insaturação de ácido graxo. Foi observado que células enriquecidas com ácidos graxos polinsaturados adquiriram mais tolerância ao etanol quando comparadas com os ácidos graxos monoinsaturados. Variando-se o grau de insaturação de ácido graxo suplementado, alcançou-se uma inserção sequencial de ligações duplas nos lipídios da membrana da levedura. Os resultados demonstraram que a *Saccharomyces cerevisiae* se tornou mais resistente ao etanol com um aumento do grau de insaturação e que a fluidez da membrana poderia ser um determinante importante de tolerância ao etanol.

2.1.6 - Efeito da pressão osmótica

Fermentações a alta pressão osmótica implicam em um aumento da eficiência global da planta de processamento, redução de energia, mão-de-obra e custos de capital, e aumento do rendimento de etanol. Além disso, aumentos dos rendimentos de etanol são importantes na produção de etanol industrial como combustível. Entretanto, concentrações altas de etanol têm demonstrado inibir o crescimento da levedura e a fermentação, como resultado de alta pressão osmótica e baixa atividade de água (D'AMORE & STEWART, 1987).

A pressão osmótica alta inibe a difusão de etanol produzido para o meio externo e este etanol intracelular é tóxico às células da levedura. Para manter a viabilidade da célula, seria necessário reduzir a pressão osmótica do meio. Um modo efetivo para vencer este problema é alterar as concentrações de alimentação do substrato durante a fermentação (D'AMORE & STEWART, 1987).

Segundo D'AMORE (1992), quando nutrientes suficientes estão disponíveis existe pouca diferença na produção de etanol entre as fermentações de batelada simples e de batelada alimentada, mesmo se as pressões osmóticas do meio são diferentes. Isto novamente apoia a conclusão de que a limitação de nutrientes é um fator de grande importância no decréscimo da atividade da fermentação observada em pressão osmótica mais alta.

CASEY & INGLEDEW (1985) observaram que a adição sequencial de adjunto (cereal não maltado) sob condições de fermentação de alta pressão melhorou significativamente a concentração de etanol, no caso da produção de cerveja. Por exemplo, a adição de extrato de melado de trigo a vários tempos durante o processo de fermentação resultou em concentrações de etanol final mais altas. Estas melhorias foram atribuídas ao aumento do crescimento da levedura.

2.2- Processos para produção de etanol via fermentação

Em termos gerais, a fermentação alcoólica pode ser através de três processos distintos: batelada, batelada alimentada (Melle-Boinot) e contínuo. As usinas de álcool mais recentes utilizam o processo contínuo.

2.2.1 - Processo clássico ou batelada

A fermentação alcoólica convencional é feita usualmente a partir de mostos contendo 100 a 200 g/L de açúcar, geralmente glicose ou sacarose. Adiciona-se o mosto ao tanque de fermentação, inoculando-se, então, o fermento. O etanol é produzido até obter-se o máximo rendimento. A fermentação é encerrada quando não há mais variação na concentração de etanol e liberação de CO₂, e o etanol é recuperado por destilação. Procede-se, então, à limpeza e assepsia do tanque de fermentação de modo a dar início a um novo ciclo (ALVES, 1996). Utilizando um baixo teor inicial de substrato sob condições operacionais adequadas é possível atingir um rendimento de até 92-94% do máximo teórico. Este processo tem como principal desvantagem a baixa produtividade, que dificilmente é superior a 5 g etanol/(L.h).

Além disso, o teor alcoólico máximo no mosto fermentado é da ordem de 80 a 90 g/L, devido ao efeito inibidor do substrato e principalmente do etanol (MAUGERI, 1995).

2.2.2 - Processo batelada alimentada

O processo batelada alimentada consiste em promover a alimentação do substrato ao mosto de modo parcelado (intermitente ou contínuo), de modo que o teor de substrato no fermentado nunca ultrapasse um valor pré-fixado. Em geral, este valor corresponde à concentração a partir da qual inicia-se uma significativa inibição pelo substrato (MAUGERI, 1995). No tanque de fermentação, o mosto e o fermento são alimentados simultaneamente. Depois do término da fermentação, o vinho (mosto fermentado) é bombeado para as centrífugas, onde ocorre a separação do fermento (creme de leveduras). Este é diluído com água, passando por um tratamento ácido com o objetivo de eliminar os contaminantes e ativar as leveduras. Terminado o tratamento, o creme de leveduras diluído permanece cerca de quatro horas em repouso, dando início a um novo ciclo de fermentação. Este processo pode apresentar uma produtividade três vezes maior (ou até mais) do que o processo em batelada (ALVES, 1996).

2.2.3 - Processo contínuo

Os processos contínuos de fermentação requerem uma retirada permanente de parte do mosto contido no tanque de fermentação. O efluente é submetido a um sistema de separação da biomassa (centrifugação, filtração em membrana, etc.), que é reintroduzida no fermentador, após um tratamento ácido para eliminação de bactérias. O mosto isento de biomassa é extraído continuamente como produto final (CARIOCA *et alli*, 1985).

O efeito inibitório do substrato no processo contínuo é menor do que no processo de batelada, dado que há uma alimentação contínua do mosto, sendo mantida a concentração de substrato em níveis mais baixos. A produtividade deste processo é maior do que no processo descontínuo, por motivo da ausência de paradas para carga, descarga e limpeza dos tanques de fermentação e, também da maior adaptação das células ao meio. No entanto, a flexibilidade

apresentada neste processo contínuo é menor, fazendo-se necessária a sua automatização para a obtenção de melhores resultados (ALVES, 1996).

Uma característica comum a processos contínuos é a operação a altas densidades celulares no fermentador, requisito indispensável à garantia de alta produtividade em etanol (20-80 g/(L.h)). A operação a alta densidade celular, por sua vez, introduz padrões metabólicos e fisiológicos peculiares, com o aparecimento de efeitos inibidores que não são observáveis nas fermentações convencionais e que requerem uma análise pormenorizada para correlacionar as condições operacionais com as possíveis causas das restrições ao metabolismo normal (CARIOCA *et alli*, 1985).

2.3 - Cinética da fermentação alcoólica

Os objetivos do estudo da cinética da fermentação alcoólica são: a medida das velocidades instantâneas e médias da transformação de glicose em etanol e em material celular (crescimento celular), e o estudo da influência de diversos parâmetros nestas velocidades, como as concentrações de glicose, álcool e células e a temperatura.

2.3.1 - Modelos cinéticos

Um modelo cinético é um conjunto de relações, geralmente na forma de equações, entre as variáveis de interesse cinético no sistema a ser estudado. As variáveis de interesse cinético, no caso da fermentação alcoólica, são as concentrações de substrato, de etanol, de células e de oxigênio, além de fatores como temperatura e pH.

De acordo com BAILEY & OLLIS (1986) pode-se classificar os modelos cinéticos geralmente utilizados em processos fermentativos como se segue:

- não-estruturados e não-segregados → as células dos microrganismos são consideradas como soluto;

- estruturados e não-segregados→as células são tratadas como espécies de múltiplos componentes, mas com uma composição média semelhante;
- não-estruturados e segregados→as células são tratadas como seres individuais distintos, porém formadas por um único componente;
- estruturados e segregados→as células dos microrganismos são consideradas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes.

Por ser mais simples e fácil de ser tratado, tanto física quanto matematicamente e, também, por representar o processo satisfatoriamente, o modelo mais utilizado em fermentação é o não-estruturado e não-segregado.

Embora o crescimento de microrganismos seja um fenômeno muito complexo, a taxa de crescimento específico μ é expressa normalmente como uma função da concentração do substrato limitante S pela equação de Monod:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (2.1)$$

onde μ_{\max} é a taxa de crescimento máximo específico, K_s a constante de etanol e S a concentração de substrato.

Esta equação é válida somente para sistemas que não possuam interferências significativas de inibidores. Para a fermentação alcoólica, esta é válida somente em condições onde há baixa concentração de etanol no meio fermentativo.

A equação 2.1 pode ser reescrita (ajuste de Lineaweaver-Burk) como:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{S} \quad (2.2)$$

Se o valor de $1/\mu$ for plotado versus $1/S$, obter-se-á uma linha reta. A intersecção desta linha reta com a ordenada representa $1/\mu_{\max}$ enquanto que aquela com a abcissa é igual a $-1/K_s$.

Durante o curso de um processo de fermentação, o etanol acumula-se no caldo de tal forma que a atividade metabólica dos microrganismos é reprimida. Visto que a presença do etanol diminui o valor da taxa de crescimento específico, a equação 2.1 deve ser estendida de modo a incluir a concentração de etanol P, isto é :

$$\mu = f(S,P) \quad (2.3)$$

Em estudos da cinética do etanol feitos por AÍBA *et alli* (1968), BAZUA & WILKE (1977) e GHOSE (1979b), gráficos de Lineaweaver-BurK foram construídos para analisar o comportamento de inibição do etanol. Observou-se repetidamente que quando $1/\mu$ foi plotado versus $1/S$ em concentrações de etanol diferentes, resultou uma série de linhas retas, convergendo as mesmas sobre a abcissa. Tal observação indica que a inibição do produto (etanol) afeta apenas μ_{\max} mas não K_s ; isto é, a taxa de crescimento do microorganismo parece ser inibida pelo etanol de um modo não-competitivo.

A taxa de crescimento específico, portanto, pode ser representada pela equação

$$\mu = \mu_{\max,i} \frac{S}{K_s + S} \quad (2.4)$$

onde $\mu_{\max,i}$ é o valor da taxa de crescimento máximo na presença de etanol.

A partir das equações 2.1 e 2.4, quando a presença do etanol não tem interferência, $\mu_{\max,i}$ aproxima-se de μ_{\max} . Por outro lado, quando o crescimento do microrganismos é completamente inibido pela presença de etanol, $\mu_{\max,i}$ aproxima-se de zero. Esta é a razão de muitos pesquisadores terem tentado estabelecer uma correlação entre $\mu_{\max,i}/\mu_{\max}$ e a concentração de etanol produzida ao longo da fermentação.

Quatro tipos de dependência de $\mu_{\max,i}$ com relação à concentração de etanol P estão registrados na literatura.

2.3.1.1 - Relação linear

A equação 2.5 representa a relação linear para $\mu_{max,i}$:

$$\mu_{max,i} = \mu_{max} - K_1P = \mu_{max} \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \quad (2.5)$$

onde K_1 é uma constante empírica e P_m (μ_{max}/K_1) é a concentração de etanol acima da qual não ocorre mais crescimento celular.

A equação 2.5 foi originalmente proposta por HINSHELWOOD (1946), a partir de experimentos com *Bact. lactis aerogenes*. HOLZBERG *et alli* (1967) confirmaram posteriormente que a equação 2.5 foi aplicável em seus dados experimentais enquanto estudavam o efeito do etanol produzido por células de levedura na taxa de formação do etanol. Além disso, eles sugeriram que existia uma concentração limitante de etanol abaixo da qual não existia inibição (26 g/l) e acima da qual exibia-se uma relação linear entre crescimento e formação de produto para uma dada linhagem de levedura. GHOSE & TYAGI (1979b) também observaram uma relação linear para crescimento e formação de etanol enquanto estudavam a cinética de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* onde o substrato usado foi celulose hidrolisada.

A relação linear entre $\mu_{max,i}$ e P só é aplicável quando a fermentação não é limitada por algum nutriente ou substrato. Como consequência, foram propostos modelos exponenciais e hiperbólicos para apresentar as cinéticas da fermentação de etanol.

2.3.1.2 - Relação Exponencial

A partir de experimentos em fermentação alcoólica com um mutante deficiente respiratório de *S. cerevisiae*, AIBA *et alli* (1968) propuseram uma relação exponencial para $\mu_{max,i}$:

$$\mu_{max,i} = \mu_{max} \cdot e^{(-K_2 \cdot P)} \quad (2.6)$$

onde a constante empírica K_2 parece depender do método de cultivo (batelada ou contínuo).

Posteriormente, MOULIM *et alli* (1980) usaram a equação (2.6) para descrever a cinética de *C. pseudotropicalis*, onde os substratos usados foram glicose e lactose.

2.3.1.3 - Relação Hiperbólica

Na tentativa de reavaliar o modelo cinético da fermentação alcoólica da *S. cerevisiae*, AIBA & SHODA (1969) propuseram uma relação hiperbólica entre $\mu_{max,i}$ e P, como mostra a equação 2.7.

$$\mu_{max,i} = \mu_{max} \frac{1}{1 + P / K_3} \quad (2.7)$$

onde K_3 é uma constante empírica.

NOVAK *et alli* (1981) também aplicaram a equação 2.7 para correlacionar seus dados experimentais. O microorganismo usado também foi *S. cerevisiae*.

Para uma determinada concentração de células e de substrato, as equações 2.6 e 2.7 prevêm uma diminuição contínua da velocidade de crescimento com o aumento da concentração de álcool. Entretanto, estas equações também implicam que as células são capazes de crescer e de produzir etanol indefinidamente, o que não se observa experimentalmente. Na prática, existem concentrações limites de etanol, acima das quais cessam o crescimento e a fermentação.

2.3.1.4 - Relação Parabólica

BAZUA & WILKE (1977) propuseram uma relação parabólica entre $\mu_{max,i}$ e P, conforme a equação 2.8, para descrever o modelo cinético de inibição do produto da linhagem *S. cerevisiae* desde que não existia uma relação linear, o grafico apresentava uma curva com concavidade para baixo, entre $\mu_{max,i}$ e P.

$$\mu_{max,i} = \mu_{max} \sqrt{1 - \frac{P}{P_m}} \quad (2.8)$$

Entretanto, o ajuste dos dados experimentais obtidos por BAZUA & WILKE (1977) não foi suficientemente bom, de forma que eles propuseram uma segunda expressão:

$$\mu_{\max,i} = \mu_{\max} - \frac{ab}{b - P} \quad (2.9)$$

onde a e b são constantes.

LEVENSPIEL (1980) propôs uma equação não-linear generalizada para justificar a influência do etanol produzido.

$$\mu_{\max,i} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)^n \quad (2.10)$$

Posteriormente, LUONG (1985), baseado no modelo de LEVENSPIEL (1980), obteve também um modelo generalizado, onde o microorganismo utilizado foi *S. cerevisiae* AECC No 4126:

$$\mu_{\max,i} = \mu_{\max} \left[1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^n \right] \quad (2.11)$$

A constante empírica n permite que as equações 2.10 e 2.11 possam ser aproximadas às equações 2.5 e 2.8. Quando n for igual a 1, as equações 2.10 e 2.11 tornam-se lineares e se reduzem à equação 2.5. Quando n for maior que 1, as equações 2.10 e 2.11 podem ser aproximadas às equações 2.6 e 2.7, pois uma rápida queda inicial na velocidade de crescimento é seguida por uma lenta aproximação a P_m . Já quando n for menor que 1, as equações 2.10 e 2.11 podem ser aproximadas à equação 2.8 e uma lenta queda inicial na velocidade de crescimento é seguida por uma rápida aproximação a P_m .

Os modelos propostos por LEVENSPIEL (1980) e LUONG (1985) são os mais aceitos, podendo ser usados para qualquer concentração de etanol.

A fermentação alcoólica é também inibida pelo substrato, porém geralmente este fenômeno é menos importante do que a inibição pelo etanol. GHOSE & TYAGI (1979b) propuseram um modelo que inclui a inibição pelo substrato:

$$\mu = \mu_{\max,i} \frac{S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_i} \right)} \quad (2.12)$$

onde K_i é a constante de inibição pelo substrato e $\mu_{\max,i}$ possui uma relação linear com a concentração de etanol (eq. 2.5).

MOULIN *et alli* (1980) propuseram duas expressões para representar a inibição pelo substrato:

$$\mu = \mu_{\max,i} e^{[K_4 (S - 100)]} \quad (2.13)$$

$$\mu = \mu_{\max,i} e^{[K_4 (S - 100)]} \cdot e^{[K_5 (S - 100) P]} \quad (2.14)$$

A equação 2.13 é aplicada quando S for maior que 100 g/L e P for menor que 32 g/L e a equação 2.14 quando S for maior que 100 g/L e P for maior que 32 g/L, quando um efeito sinérgico aparece. Nas equações 2.13 e 2.14, K_4 e K_5 são constantes empíricas e $\mu_{\max,i}$ possui uma dependência exponencial com P, conforme a equação 2.6.

Para fermentação com alta concentração de células, existe também o efeito inibidor sobre o crescimento celular pela própria concentração de células em processo. Este efeito foi estudado por CYSEWSKY & WILKE (1977). Nos trabalhos de AIBA & SHODA (1969) e GHOSE & TYAGI (1979b) foi utilizado um termo de inibição que relaciona linearmente a concentração de células com taxa específica de crescimento. CYSEWSKY & WILKE (1977) mostraram que esta relação linear não é válida para concentrações de células muito elevadas e que a maior produtividade é atingida com concentrações de células entre 60 e 100 g/l. Assim, com base em dados experimentais, estes autores propuseram um termo de inibição pela concentração de células, análogo ao proposto por GHOSE & TYAGI (1979b) e LEVENSPIEL (1980) para o produto.

$$I_x = \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)^m \quad (2.15)$$

onde I_x é o termo de contribuição da inibição pela concentração celular, X_m a máxima concentração celular a partir da qual não há crescimento e m um coeficiente empírico.

LEE *et alli* (1983) propuseram um modelo englobando os três termos de inibição na forma do modelo de LEVENSPIEL (1980):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(S + K_s)} \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^m \quad (2.16)$$

Este método possui a vantagem de ser bastante simples, o que facilita muito sua resolução para um processo complexo como é o de batelada-alimentada, e que é aplicável a todas as condições de processo deste sistema. Tal modelo foi utilizado na modelagem e simulação de sistemas contínuos de múltiplos estágios em escala industrial por ANDRIETTA & STUPIELLO (1990 b) e ANDRIETTA (1994).

JARZERBSKI *et alli* (1989) também propuseram um modelo englobando os três termos de inibição, porém na forma de LUONG (1985):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(S + K_s)} \left[1 - \left(\frac{P}{P_m}\right)^n\right] \left[1 - \left(\frac{X}{X_m}\right)^m\right] \quad (2.17)$$

2.3.2 - Efeito da temperatura nos parâmetros do modelo cinético

Apesar de muitos artigos já terem sido publicados sobre os efeitos da temperatura na velocidade de crescimento e produção do álcool para vários microrganismos, como por exemplo, os de RAMOS & MADEIRA-LOPES (1990), GAO & FLEET (1988) e BAJPAI & MARGARIES (1987), poucos descreveram a relação existente entre a temperatura e os parâmetros dos modelos cinéticos para fermentação alcoólica.

As reações individuais que ocorrem dentro da célula são influenciadas pela temperatura, comumente seguindo a equação de Arrhenius:

$$K = A e^{(-E/RT)} \quad (2.18)$$

onde K é a constante de velocidade da reação, A uma constante, E a energia de ativação, R a constante universal dos gases e T a temperatura absoluta.

Geralmente os parâmetros das equações cinéticas são expressos como funções da temperatura do tipo Arrhenius num modelo não-estruturado. Escreve-se a equação de Monod para crescimento celular na forma abaixo:

$$\mu = \mu_{\max}(T) \frac{S}{[S + K_s(T)]} \quad (2.19)$$

onde μ_{\max} e K_s são funções da temperatura.

DALE *et alli* (1990) apresentaram μ_{\max} e P_m como uma função da temperatura tipo Arrhenius:

$$\mu_{\max}(T) = A_1 \cdot \exp\left(-\frac{E_1}{RT}\right) \quad (2.20)$$

$$P_m(T) = A_2 \cdot \exp\left(-\frac{E_2}{RT}\right) \quad (2.21)$$

onde, A_1 e A_2 , são constantes de ajuste da dependência com a temperatura de μ_{\max} e P_m , respectivamente. E_1 e E_2 correspondem a energia de ativação da equação de Arrhenius.

SINCLAIR & KRISTIANSEN (1987) verificaram que a dependência de μ_{\max} e K_s em relação à temperatura pode ser expressa pelas seguintes equações:

$$\mu_{\max}(T) = A_3 e^{(-E_3/RT)} - A_4 e^{(-E_4/RT)} \quad (2.22)$$

$$K_s(T) = A_5 e^{(-E_5/RT)} \quad (2.23)$$

onde, na equação 2.22, o primeiro termo à direita corresponde à ativação térmica e o segundo, cuja energia de ativação E_4 é muito maior que E_3 , corresponde à inativação térmica das enzimas constituintes do microrganismo.

De acordo com MOHR e KRAWIEC (1980), a equação 2.22 é aplicada somente para microrganismos com temperatura ótima de crescimento inferior a 37°C. Uma outra expressão para os casos não previstos na equação 2.22 foi proposta por MCMEEKIN *et alli* (1988), que se ajustou bem para crescimento de muitas bactérias e fungos:

$$[\mu_{\max}(T)]^{1/2} = C_1 (T - T_{\min}) [1 - e^{C_2(T - T_{\max})}] \quad (2.24)$$

onde C_1 , C_2 , T_{\min} e T_{\max} são constantes empíricas, ajustáveis através de regressão não linear.

A equação 2.24 foi utilizada com bons resultados por SHU & YANG (1991) para modelar o efeito da temperatura na produção de goma xantana por *Xantomonas campestri*. HUANG & CHEN (1988) estudaram o efeito da temperatura na cinética de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*. O modelo utilizado é expresso como se segue:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S} \right) F_x(P, T) G_x(S, T) X \quad (2.25)$$

$$\frac{dP}{dt} = Q_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S} \right) F_p(P, T) G_p(S, T) X \quad (2.26)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \right) \frac{dP}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{x/s}} \right) \frac{dX}{dt} + m_s X \quad (2.27)$$

onde $F_x(P, T)$, $F_p(P, T)$, $G_x(S, T)$ e $G_p(S, T)$ são funções que expressam, no caso dos dois primeiros termos, a inibição do crescimento e da produção de álcool pelo etanol e temperatura e, nos dois últimos, pelo substrato e temperatura.

ALVES (1996) estudou a cinética do crescimento anaeróbico de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* cedida pela Usina Santa Adélia/S.P, em meio de cultura industrial a base de melão de cana-de-açúcar e 2,5 g/L de extrato de levedura, levando-se em consideração a concentração do substrato e a temperatura. Foram realizados ensaios com fermentação contínua em um reator tipo CSTR para as temperaturas de 28, 30, 32, 34, 36 e 38°C. Ajustando-se os dados obtidos experimentalmente à relação proposta por SINCLAIR & KRISTIANSEN (1987), obteve-se a seguinte equação:

$$\mu_{\max} = 4,181 \cdot 10^4 \cdot e^{(-3535/T)} - 5,397 \cdot 10^{69} \cdot e^{(-50475/T)} \quad (2.28)$$

Foram obtidos por ALVES (1996) alguns outros modelos matemáticos expressando os parâmetros cinéticos P_m , $Y_{X/S}$ (rendimento celular) em função da temperatura, listados a seguir:

$$P_m = 638,1 \cdot e^{(-0,05741 \cdot T)} \quad , \text{ para } 30 < T < 38^\circ\text{C} \quad (2.29)$$

$$Y_{X/S} = 0,098 \text{ g c\u00e9l. seca /g ARTR} \quad , \text{ para } 28 < T < 34^\circ\text{C} \quad (2.30)$$

$$Y_{X/S} = 0,292 \cdot e^{(-0,032T)} \quad , \text{ para } 34 < T < 38^\circ\text{C} \quad (2.31)$$

Obteve-se tamb\u00e9m um valor m\u00e9dio para K_s igual a 4,1 g ARTR/L em uma faixa de temperatura de 28 a 38°C.

2.4 - Viabilidade celular

Segundo MAUGERI (1995), os fatores que influenciam a viabilidade celular s\u00e3o a quantidade de oxig\u00eanio dissolvido, a temperatura da fermenta\u00e7\u00e3o, a quantidade de in\u00f3culo, a concentra\u00e7\u00e3o de substrato e de etanol, a velocidade de produ\u00e7\u00e3o de etanol e o tempo de contato entre as c\u00e9lulas e o etanol.

CYSEWSKI & WILKE (1977) estudaram a fermenta\u00e7\u00e3o do etanol usando um sistema de fermenta\u00e7\u00e3o a v\u00e1cuo e reciclo de c\u00e9lulas. Os estudos foram conduzidos com *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC n\u00b0 4126) em uma temperatura de fermenta\u00e7\u00e3o de 35°C. Foi observado que a viabilidade celular diminui continuamente em anaerobiose, mas permanece acima de 95% em aerobiose. Isto se deve ao fato de que as leveduras utilizam o oxig\u00eanio para produzir \u00e1cidos graxos poli-insaturados e seus precursores, compostos necess\u00e1rios para a bioss\u00edntese de lip\u00eddios constituintes das membranas plasm\u00e1ticas e mitocondriais. Como j\u00e1 foi visto no item 2.1, a adi\u00e7\u00e3o ao meio de cultura de \u00e1cidos graxos insaturados ou ester\u00f3is melhora a toler\u00e2ncia das leveduras ao etanol e, assim, aumenta a viabilidade celular.

Segundo ALVES (1996), aumentos da temperatura de fermenta\u00e7\u00e3o produzem uma forte diminui\u00e7\u00e3o da viabilidade celular, devido ao aumento das taxas de produ\u00e7\u00e3o e ac\u00famulo de etanol no meio e nas c\u00e9lulas.

MILANESE-RUBILAR & MAUGERI (1990) verificaram que a viabilidade celular dependia da concentra\u00e7\u00e3o de etanol e do tempo de resid\u00eancia celular, segundo a express\u00e3o:

$$X_v = \frac{\exp[-\gamma(\tau_c \cdot P)]^\beta}{(P_m - P)} \quad (2.32)$$

onde X_v é a fração viável de células, τ_c o tempo de residência celular, γ e β constantes empíricas.

SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1986) trabalharam com *Saccharomyces cerevisiae* IGC 3507, um mutante deficiente respiratório, e determinaram a taxa de morte celular, K_d , e sua função com a temperatura utilizando as seguintes relações matemáticas:

$$\ln N_t = \ln N_{t_0} - K_d \cdot t \quad (2.33)$$

onde, N_{t_0} e N_t representam o número médio de colônias no tempo zero e t , respectivamente, e K_d uma função da equação modificada de Arrhenius:

$$\ln \frac{K_d}{T} = \ln \frac{K_b}{h} + \frac{\Delta S^\#}{R} - \frac{\Delta H^\#}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (2.34)$$

onde, T é a temperatura absoluta, K_b é a constante de Boltzmann, h é a constante de Planck, R a constante dos gases, $\Delta S^\#$ a entropia de morte térmica e $\Delta H^\#$ a entalpia de ativação de morte térmica.

JARZEBSKI *et alli* (1989) verificaram a importância da viabilidade celular na cinética da fermentação alcoólica com alta concentração de células. Tal conceito foi incorporado a um modelo intrínscio tipo Monod, utilizando os termos X_v para representar a concentração de células viáveis e X_d para representar a concentração de células mortas. Portanto, a taxa de crescimento da fase viável é:

$$r_x = \mu_{\max} \cdot \left[1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^n \right] \cdot \left[1 - \left(\frac{X_t}{X_m} \right)^m \right] \cdot \frac{S \cdot X_v}{K_s + S} \quad (2.35)$$

onde, X_t é a concentração total de células ($X_t = X_d + X_v$).

DALE *et alli* (1990) estudaram a modelagem de bioreatores para a produção de etanol a partir de lactose com *Kluyveromyces fragiles* e definiram a cinética de morte através da seguinte relação:

$$\frac{N_v}{N_0} = e^{-K_d(T,P) \cdot t} \quad (2.36)$$

onde, K_d é a constante de morte que depende da temperatura e da concentração de etanol, N é o número de células viáveis e N_0 é o número inicial de células viáveis. Neste modelo a viabilidade celular fica expressa como sendo função do tempo de fermentação, da temperatura e da concentração de etanol, onde:

$$K_d(T,P) = K_d(T) \cdot K_d(P) \quad (2.37)$$

$$K_d(T) = A_6 \cdot \exp\left(-\frac{E_6}{RT}\right) \quad (2.38)$$

$$K_d(P) = \exp(K_{dp} \cdot P) \quad (2.39)$$

Nas equações acima, A_6 é o fator de frequência da equação de Arrhenius, E_6 é a energia de ativação (cal/mol) e K_{dp} é a constante da taxa de morte em função do etanol (L/g).

CARVALHO *et alli* (1996) determinaram a equação que representa a cinética de morte celular de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* cedida pela Usina Santa Adélia/SP, seguindo o modelo proposto por DALE *et alli* (1990):

$$\frac{N_v}{N_0} = \exp\left\{[-9,00227 \cdot 10^{23} \cdot \exp\left(-\frac{39666}{RT}\right) \cdot \exp(0,07425 \cdot P)] \cdot t\right\} \quad (2.40)$$

onde:

$$A_6 = -9,00227 \cdot 10^{23}$$

$$E_6 = 39666$$

$$K_{dp} = 0,07425$$

Ajustando-se o modelo proposto por DALE *et alli* (1990) aos dados experimentais obtidos por CARVALHO *et alli* (1996), observou-se que o modelo tende a superestimar a morte celular para altas concentrações de etanol e subestimar à concentrações inferiores. Verificou-se também uma falta de ajuste para algumas curvas, pois o modelo proposto

expressa somente a fração viável a partir do momento em que começa a ocorrer morte celular. Porém, em alguns dados práticos, principalmente nos de baixas temperaturas e concentrações de etanol, foi notado a existência de um patamar de estabilidade por um breve período de tempo, onde não ocorre crescimento e a morte celular é desprezível.

2.5 - Conclusões

Através da revisão bibliográfica pode se verificar uma grande preocupação do efeito da temperatura, da concentração do etanol, do meio de cultivo e da pressão osmótica, na tolerância das leveduras e nos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica. Nota-se um extenso estudo em relação aos mecanismos bioquímicos envolvidos na membrana plasmática, tentando lucidar o porque que certas linhagens de microrganismos são mais ou menos tolerantes as variações do meio. Além disso, observa-se que a maioria dos trabalhos são conduzidos isotermicamente e em meios de cultivo sintéticos.

Neste capítulo fica claro ainda, que não existem trabalhos numa faixa de temperatura (30 a 40°C) e composição do meio (melaço e extrato de levedura) similares as condições da fermentação alcoólica das usinas nacionais. Assim, o estudo de uma metodologia de determinação do parâmetro da tolerância ao etanol que possa ser implementada nas análises de rotina industrial e da determinação dos parâmetros cinéticos, utilizando cepa isolada de uma usina alcooleira, é importante quando se deseja conhecer melhor o processo. Estes parâmetros podem ser muito úteis nos estudos de otimização de rendimento e produtividade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Condução da fermentação alcoólica

3.1.1 - Microrganismo

Foi utilizada uma *Saccharomyces cerevisiae* doada da Usina Santa Adélia/S.P em fim de safra. Este microrganismo foi escolhido por já ter sido usado no trabalho de tese de mestrado por Alves (1996) para a caracterização de parâmetros cinéticos, no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

3.1.2 - Metodologia para o estudo do efeito da temperatura associado à concentração de etanol:

Foram preparados frascos de cultivo para a obtenção do vinho fermentado. No sobrenadante eram realizadas análises de concentração de ARTR e de etanol e a massa celular era usada para o teste de tolerância ao etanol (item 3.2).

O meio de cultivo utilizado foi à base de melaço de cana-de-açúcar, contendo 40 g ARTR/L para pré-fermentação e 80 g ARTR/L para fermentação, suplementado com 2,5 g/L de extrato de levedura.

O meio de cultivo foi distribuído em erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 g de meio para pré-fermentação, e em frascos de 1000 mL, com 300 g de meio para a fermentação. Os frascos de pré-fermentação foram fechados com tampão de algodão, coberto com papel impermeável e esterilizados por 15 minutos a 121°C. Os frascos de fermentação foram fechados com rolha de borracha com um aparato de vidro para saída de CO₂ (figura 3.1). Após a esterelização, colocava-se ácido sulfúrico concentrado neste aparato com a finalidade de evitar contaminação e reter a possível água evaporada, liberando apenas o CO₂.

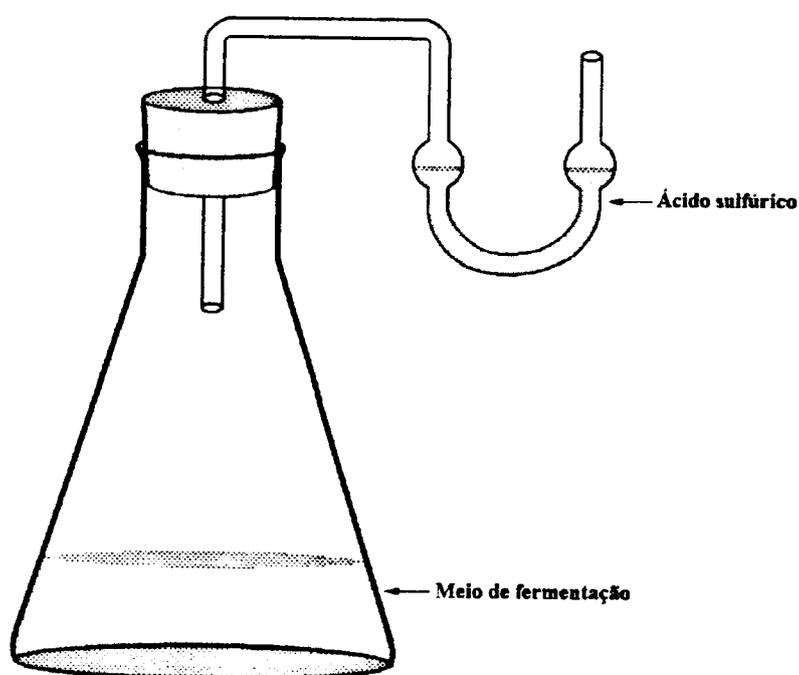


Figura 3.1 - Esquema do frasco utilizado na fermentação.

Neste trabalho, foi feita uma alimentação intermitente do açúcar, determinada pela diminuição da velocidade de liberação de CO_2 , que é medida pela variação de peso do frasco, segundo ANDRIETTA & STUPIELLO (1990a).

A partir de “slants” do microrganismo isolado com 2 dias de crescimento em meio PDA a 32°C , inoculava-se 2 frascos de 500 mL contendo meio de pré-fermentação estéril e estes eram, então, incubados em shaker a 32°C , 200 rpm, durante aproximadamente 24 horas. Encerrada a pré-fermentação, inoculava-se 30 mL do meio de pré-fermentação em 2 frascos de 1000 mL, contendo meio de fermentação estéril, e estes eram incubados em shaker a 200 rpm nas temperaturas estudadas: 30, 32, 34, 36, 38 e 40°C .

Os testes foram feitos em duplicata, para verificar a reprodutibilidade da metodologia. Fazia-se as leituras das massas dos frascos vazios e das massas iniciais dos frascos com as amostras. Os frascos eram pesados periodicamente e, a partir do momento em que não havia mais uma alteração significativa nas massas dos frascos, era feita uma nova alimentação, com

uma concentração de açúcares de forma a se ter 80 g ARTR/L no volume total de meio do frasco. O volume de meio adicionado ao frasco era limitado para não causar uma variação muito grande no volume total. Eram feitas novas alimentações, até que não houvesse mais variação significativa no peso do frasco após a adição de mais meio de cultivo e, também, verificando-se que a viabilidade era praticamente nula, significando o término da fermentação. Em intervalos de tempos espaçados durante a fermentação, retirava-se amostras de 10 mL do meio de fermentação que eram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante era estocado a -20°C para, posteriormente, serem feitos testes para a quantificação da concentração de etanol e de açúcares redutores totais residuais. As células eram suspensas em 10 mL de água destilada e centrifugadas duas vezes por 5 minutos a 5000 rpm para os testes de massa seca e viabilidade.

3.2 - Metodologia para determinação da tolerância do etanol em leveduras

JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985) desenvolveram um método baseado no abaixamento do pH extracelular para testes rápidos de tolerância de etanol em leveduras. Neste método, as leveduras tolerantes ao etanol apresentaram um maior abaixamento do pH extracelular em relação às leveduras menos tolerantes. Isto está baseado no fato de que o etanol causa retorno passivo de prótons para a célula, ocasionando o aumento de pH extracelular.

A tolerância ou sensibilidade das leveduras ao etanol é expressa pelo parâmetro k , sendo este uma constante exponencial de difusão de prótons. Este parâmetro é determinado através da queda do pH em função da concentração de etanol.

Para a determinação do valor de k , uma suspensão de levedura é colocada na presença de solução de glicose e de etanol nas concentrações finais de etanol 0 a 10% (v/v). As amostras são agitadas durante 2 hs a 32°C , fazendo-se a leitura do pH final da solução.

Quando as células são suspensas em água contendo glicose, prótons são liberados e o pH extracelular cai segundo uma curva característica de acidificação. O valor do pH final é balanceado pela expulsão ativa e pela entrada passiva de prótons até uma condição de equilíbrio.

LEÃO & VAN UDEN (1984) estudaram a influência da concentração de etanol na entrada passiva de prótons na levedura e propuseram a seguinte equação::

$$k_p = C_0 \cdot e^{kX} \cdot [H^+]_f \quad (3.1)$$

onde k_p é a taxa de liberação ativa de prótons, $[H^+]_f$ a concentração de prótons no pH final, C_0 a constante de difusão na concentração zero de etanol, X a concentração de etanol e k a constante de entrada passiva de prótons. Aplicando logaritmo e rearranjando a equação 3.1, obtém-se a seguinte relação que expressa o pH final e a concentração de etanol:

$$pH_f = kX \log_{10} e + (\log_{10} C_0 - \log_{10} k_p) \quad (3.2)$$

A equação 3.2 é do tipo $y = ax + b$ onde:

y = pH final

x = concentração do etanol em molaridade $X \log_{10} e$

a = coeficiente angular = $k (M^{-1})$

b = coeficiente linear = $\log_{10} C_0 - \log_{10} k_p$

NABAIS *et alli* (1988) confirmaram que em condições experimentais até 10% (v/v) de concentração de etanol, esta relação se mantém linear. Assim o valor de k é determinado através de uma correlação linear entre pH_f versus $X \log_{10} e$. Quanto maior o valor de k , maior será a sensibilidade da levedura ao etanol, ou seja, menor será sua tolerância ao mesmo. Isto indica que os valores de pH finais para as diversas concentrações de etanol são maiores devido a entrada passiva de prótons.

3.2.1 - Metodologia para obtenção da curva do pH final versus concentração de etanol

A metodologia para obtenção da curva do pH_f versus concentração de etanol e, conseqüentemente, o índice de tolerância (k) que foi usada neste trabalho foi a desenvolvida por JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985). No entanto, para se adaptar ao meio de cultivo

utilizado nos experimentos, esta metodologia sofreu algumas alterações e está descrita a seguir:

a - seguia-se o procedimento para a condução da fermentação (item 3.1), porém esta era interrompida quando a viabilidade era aproximadamente 98% e 50%;

b - o vinho fermentado era centrifugado em frascos de 250 mL a 10°C, 5000 rpm por 10 minutos;

c- as células eram suspensas em água destilada duas vezes com o mesmo volume de vinho fermentado e centrifugadas a 10°C, 5000 rpm por 5 minutos. Isto foi feito para a retirada de sais minerais para destampionar a solução;

d - preparava-se uma suspensão de leveduras 30% (p/p) em água destilada;

e - preparava-se soluções de etanol nas concentrações de 0; 2,4; 4,8; 7,2; 9,6 e 12%(v/v). Essas soluções eram preparadas nessas concentrações para que as concentrações finais na suspensão fossem respectivamente 0, 2, 4, 6, 8 e 10% (v/v) de etanol;

f - preparava-se solução de glicose a 20%.

Em frascos de vidros (capacidade de 20 mL) adicionava-se:

- 10 mL de solução de etanol 0 a 12% (v/v)
- 1 mL de solução de levedura a 30% (p/p)
- 1 mL de solução de glicose à 20%

Os frascos eram incubados em shaker a 200 rpm, 32°C por 2 horas e, então, retirados para fazer a medida do pH final.

Os testes foram conduzidos em duplicata.

Graficava-se pH_f versus $X_{\log_{10}e}$, e fazia-se uma regressão linear para obtenção do parâmetro k . O coeficiente de correlação deve ser superior a 0,95 para um resultado satisfatório.

3.3 - Determinação dos açúcares redutores totais residuais (ARTR)

Para a determinação do açúcar residual na fermentação foi utilizada a metodologia desenvolvida por MILLER (1959):

3.3.1 - Preparo do reagente DNS

- Dissolveu-se com aquecimento 10,6 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico adicionando-se 19,8 g de NaOH em 1416 mL de água destilada.

- Adicionou-se 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C) e 8,3 g de metabissulfeto de sódio.

3.3.2 - Preparo da solução de tartarato duplo de sódio e potássio

- Dissolveu-se 15,1 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado (4 H₂O) em água destilada.

- Ajustou-se o volume para 1000 mL.

3.3.3 - Preparo da curva padrão:

- Preparou-se tubos com 2 mL de soluções de sacarose nas concentrações de 0,9; 1,8; 2,7; 3,6; 4,5 e 5,4 g/L.

- Fez-se uma hidrólise destas soluções. Para isto, adicionou-se 2 mL de HCl 2N em cada tubo e estes foram colocados num banho-maria em ebulição por 5 minutos. Resfriou-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 2 mL de NaOH 2N em cada tubo.

- As soluções foram homogeneizadas e preparou-se novos tubos com 1 mL das soluções de sacarose hidrolisada que estavam nas concentrações de 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 e 1,8 g/L. Utilizou-se ainda um branco com 1 mL de água para zerar o espectrofotômetro.

- Adicionou-se em cada um dos tubos 1 mL do reagente DNS.
- Homogeneizou-se as amostras e os tubos foram colocados num banho-maria em ebulição por 5 minutos.
- Resfriou-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 16 mL de solução de tartarato de sódio e potássio para estabilização da cor. Mediu-se a absorbância das amostras em espectrofotômetro a 546 nm.

3.3.4 - Preparo das amostras

- Preparou-se as amostras (fazendo-se as diluições necessárias) de modo que a concentração final estivesse dentro da faixa utilizada na construção da curva padrão (até uma faixa de 3,0 g/L).
- Fez-se uma hidrólise destas amostras, adicionando-se 2 mL de HCl 2N em 2 mL destas diluições. Colocou-se os tubos num banho-maria em ebulição por 5 minutos, resfriando-os em seguida num banho de gelo e adicionando-se 2 mL de NaOH 2N em cada tubo.
- Colocou-se em um tubo de ensaio 1 mL da amostra diluída hidrolizada adicionando-se 1 mL do reagente DNS.
- As amostras foram homogeneizadas e os tubos foram colocados num banho-maria em ebulição por 5 minutos.
- Resfriou-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 16 mL de solução de tartarato de sódio e potássio. Mediu-se a absorbância das amostras em espectrofotômetro a 546 nm.
- Para cada amostra foi feito um branco com 1 mL da solução diluída hidrolizada adicionando-se 1 mL do reagente DNS e 16 mL de solução de tartarato de sódio e potássio.

- A partir da equação que relaciona a concentração de açúcares redutores versus densidade ótica obtida pela construção da curva padrão, determinou-se a concentração de cada amostra.

As análises foram feitas sempre em duplicatas.

3.4 - Determinação do etanol produzido

Para a determinação do etanol produzido na fermentação foi utilizada a metodologia de cromatografia gasosa segundo CARVALHO *et Alli* (1996). Das amostras do vinho fermentado recolheu-se uma alíquota de 5 mL. Este volume foi destilado em microdestilador até a obtenção de 10 mL recolhido em proveta. O material obtido se encontrava na proporção de 1:2 (v/v).

A análise de etanol foi feita por cromatografia gasosa, usando acetona (2% v/v) como padrão interno. Foi utilizado o cromatógrafo VARIAN 3400, com coluna (1,0 m de comprimento e 3,2 mm de diâmetro externo) empacotada com Porapack-Q, 120 mesh e detector de ionização de chama. O injetor e o detector foram mantidos a 250 e 50°C, respectivamente, e a coluna foi operada isotermicamente a 160°C. Nitrogênio foi usado como gás de arraste, a uma vazão de 30 ml/min. Os gases de combustão foram hidrogênio e ar. Amostras de 0,5 µL foram injetadas e as análises foram feitas em triplicata.

3.4.1 - Preparo da curva padrão

- Preparou-se soluções hidroalcoólicas nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 % de etanol em volume (% v/v).

- Destas soluções tomou-se 1 ml e adicionou-se 1 mL de acetona (2 % v/v).

- Homogeneizou-se as amostras e injetou-se 0,5 µL das amostras no cromatógrafo gasoso.

- Obteve-se uma curva padrão que relaciona a concentração de etanol versus a razão da área do etanol pela área da acetona (Aet/Aacet).

3.4.2 - Preparo da amostra

- Tomou-se 1 mL da amostra a ser analisada (vinho destilado) e adicionou-se 1 mL de acetona (2 % v/v).

- Homogeneizou-se a amostra e injetou-se 0,5 µL da amostra no cromatógrafo gasoso.

- A razão das áreas do etanol pela acetona é usada na equação obtida da curva padrão para o cálculo da concentração de etanol da amostra.

3.5 - Determinação da viabilidade celular das leveduras

Para a determinação da viabilidade celular das leveduras foi utilizado o método de coloração por azul de metileno segundo LEE *et alli* (1981).

3.5.1 - Composição do reagente azul de metileno

- Azul de metileno	0,125 g
- NaCl	4,5 g
- CaCl ₂ .6 H ₂ O	0,24 g
- NaHCO ₃	0,1 g
- Glicose	5 g
- H ₂ O destilada	500 mL

3.5.2 - Metodologia

As amostras retiradas ao longo da fermentação (10 mL) eram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. As células eram ressuspensas duas vezes em 10 mL de água destilada e centrifugadas a 5000 rpm, por 5 minutos. Após a lavagem, as células eram ressuspensas em 10 mL e, a partir desta solução, preparava-se uma suspensão de levedura adequadamente diluída (amostra). Misturava-se 0,1 mL da amostra com 0,9 mL da solução corante (azul de metileno). As células com alta atividade fisiológica não se coloriam, enquanto as células inativas (mortas) apresentavam-se coloridas de azul. A porcentagem de células viáveis era determinada transferindo-se com uma pipeta de Pasteur a amostra para a câmara de Neubauer. Nesta, eram contadas as células incolores e as coloridas de azul em microscópio de campo claro utilizando-se a objetiva de imersão (40 x). Para maior precisão da análise, a diluição da amostra deveria ser tal que cerca de setenta células de levedura fossem encontradas por quadrículo da câmara, que eram escolhidos intercaladamente para serem contados (total de treze quadrículos contados). Eram contadas então, cerca de 900 células por câmara.

A porcentagem de células viáveis (IV %) era calculada pela seguinte equação:

$$IV (\%) = \frac{n^{\circ}\text{total de células incolores (vivas)}}{n^{\circ}\text{total de células incolores} + n^{\circ}\text{total de células coloridas}} \times 100 (\%) \quad (3.3)$$

3.6 - Determinação da massa seca (MS) produzida

Na determinação da massa celular produzida na fermentação, o método indireto (curvas que correlacionam densidade ótica versus massa seca) foi o escolhido.

3.6.1 - Metodologia

- Uma fermentação foi conduzida em 2 erlenmeyers de 1000 mL com 300 mL de meio estéril, conforme descrito anteriormente, a 32°C , 200 rpm, por 24 horas, porém sem alimentação de açúcares ao meio.

- Pesou-se previamente o papel de filtro Millipore (1,2 µm) juntamente com uma placa de petri (recipiente que lhe deu suporte) obtendo-se um peso P_1 .

- Juntou-se os dois meios fermentados, pesou-se 500g destes meios e centrifugou-se por 10 min, a 5000 rpm em tubos de 250 mL.

- As células foram ressuspensas duas vezes em 500 mL de água destilada e centrifugadas por 5 minutos , a 5000 rpm.

- Ressuspendeu-se as células em 100 mL de água destilada e filtrou-se a vácuo, utilizando o filtro previamente pesado.

- Colocou-se as amostras numa estufa a 60°C até que o peso permanecesse constante (P_2) (aproximadamente 6 horas).

- Calculou-se o valor da massa seca pela diferença de peso (P_2-P_1), convertendo o valor final em g de massa seca / 500 g de vinho fermentado (porcentagem peso/peso).

3.6.2 - Preparo da curva padrão

- Centrifugou-se 50 mL do vinho fermentado (o mesmo do item anterior) a 5000 rpm, por 10 minutos.

- As células foram ressuspensas 2 vezes em 50 mL de água destilada e centrifugadas a 5000 rpm, por 5 minutos.

- Após a lavagem das células, estas foram ressuspensas em 50 mL de água destilada e, a partir desta solução, foram feitas diluições convenientes para a construção da curva de calibração.

- Leu-se a absorvância das amostras em espectrofotômetro a 600 nm.

- A partir da massa seca total determinou-se indiretamente as concentrações de massa seca para cada diluição e construiu-se a curva padrão que relaciona a concentração de massa seca em g/l versus densidade ótica.

A curva padrão obtida para correlacionar a massa seca em função da densidade ótica foi:

$$MS = -0,203 + 2,155 D.O \quad (3.4)$$

$$r = 0,992$$

Utilizou-se esta curva padrão para se obter os valores de MS ao longo de todas as fermentações que está apresentada na figura 3.2.

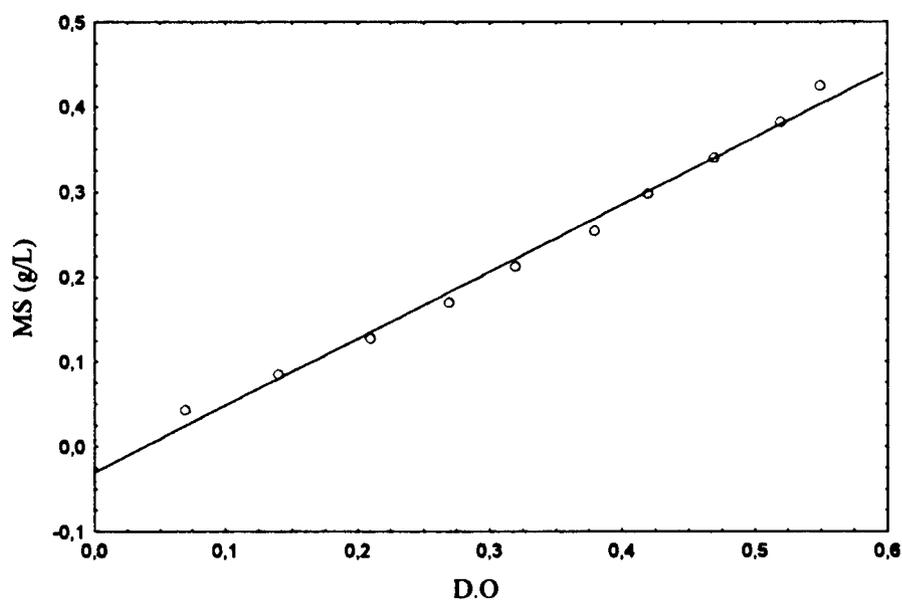


Figura 3.2 - Curva padrão de MS versus D.O.

3.6.3 - Preparo das amostras

As amostras retiradas ao longo da fermentação (10 mL) foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos . As células foram ressuspensas duas vezes em 10 mL de água destilada e centrifugadas a 5000 rpm, por 5 minutos. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 10 mL e, a partir desta solução, foi feita uma diluição para que a leitura da absorbância a 600 nm estivesse dentro da faixa da curva de calibração. A partir da equação da curva de calibração determinou-se a concentração de massa seca de cada amostra.

3.7 - Metodologia para determinação da relação de densidade versus concentração de açúcares redutores totais residuais (ARTR)

- Preparou-se soluções de melado de cana-de-açúcar nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 g ARTR/L.

- Cada solução foi colocada em um picnômetro com capacidade de 25 mL, pesando-se o picnômetro vazio (P_1) e cheio (P_2).

- Calculou-se o valor da massa de cada solução pela diferença de peso ($P_2 - P_1$).

- Calculou-se a densidade de cada solução pela razão da massa pelo volume (25mL):

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (3.5)$$

- Construiu-se a equação que relaciona densidade versus concentração de ARTR: curva padrão.

- Sabendo-se a concentração de ARTR de uma dada amostra, foi possível determinar a sua densidade a partir da curva padrão.

A curva padrão obtida para correlacionar a densidade em função da concentração de ARTR foi:

$$\rho = 0,6278 \cdot [\text{ARTR}] (\text{g/L}) + 1030,028$$

(3.6)

$$r = 0,9992$$

Utilizou-se esta curva para se obter os valores da densidade ao longo de todas as fermentações e que está apresentada na figura 3.3.

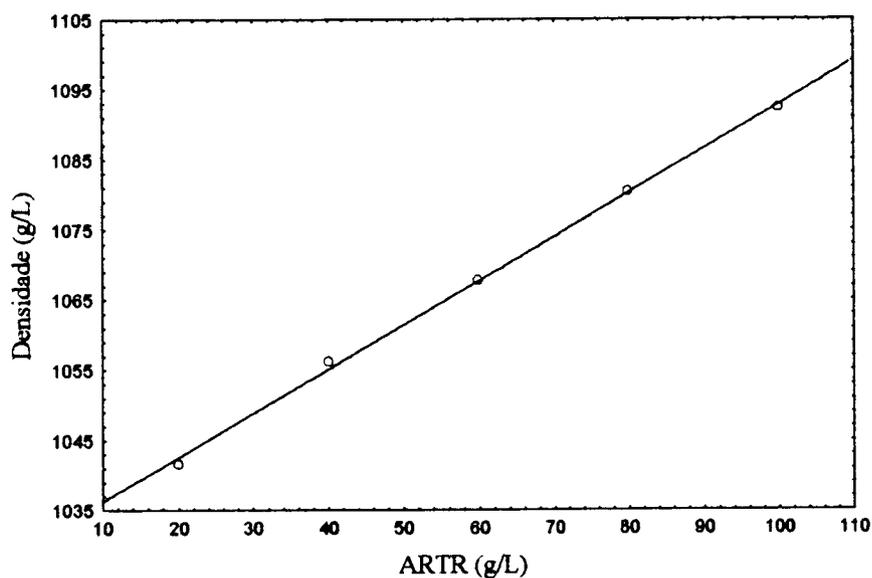


Figura 3.3 - Curva padrão de ρ (g/L) versus [ARTR] (g/L).

3.8 - Balanço de massa para o cálculo do consumo do substrato, produção de etanol e produção de massa seca.

$$\text{ARTR (g)} = [\text{ARTR}] (\text{g/L}) \cdot \text{peso do meio (g)} \cdot 1/\rho (\text{g/L}) \quad (3.7)$$

$$\text{etanol (g)} = [\text{etanol}] (\text{g/L}) \cdot \text{peso do meio (g)} \cdot 1/\rho (\text{g/L}) \quad (3.8)$$

$$\text{MS (g)} = [\text{MS}] (\text{g/L}) \cdot \text{peso do meio (g)} \cdot 1/\rho (\text{g/L}) \quad (3.9)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como citado no capítulo anterior, todas as fermentações foram conduzidas em duplicata para a obtenção do vinho fermentado para as diferentes temperaturas. Foram realizadas análises ao longo da fermentação obtendo-se os dados de:

- Parâmetro de tolerância ao etanol (k)
- Concentração de etanol
- Concentração de ARTR
- Concentração de massa seca
- CO₂ produzido
- Viabilidade

Todos os resultados calculados estão apresentados em tabelas no apêndice A.

4.1 - Cinética da fermentação alcoólica para as diferentes temperaturas estudadas

Para facilitar a visualização dos resultados apresentados neste item, apenas uma fermentação por temperatura foi graficada. No entanto, todas as fermentações foram realizadas em duplicatas sendo que os resultados estão apresentados em figuras análogas no apêndice B. As figuras 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, e 4.5 apresentam os resultados de CO₂ produzido(g), massa seca (g/L), ARTR (g/L), etanol (g/L) e viabilidade(%), em função da temperatura, respectivamente.

A figura 4.1 apresenta o CO₂ (g) produzido ao longo da fermentação para as diferentes temperaturas. Verifica-se uma produção exponencial para todas as temperaturas nas primeiras 30 horas de fermentação. Para as temperaturas de 30, 32 e 34°C a produção de CO₂ ao longo da fermentação comportou-se de uma forma semelhante, provavelmente devido ao fato de que esta linhagem de levedura é resistente até a temperatura de 34°C. Para as temperaturas de 36, 38 e 40°C, observa-se que a produção de CO₂ diminui com o aumento da

temperatura. Nota-se que ao redor de 80 horas não há mais produção de CO_2 , indicando o término da fermentação para todas as temperaturas estudadas.

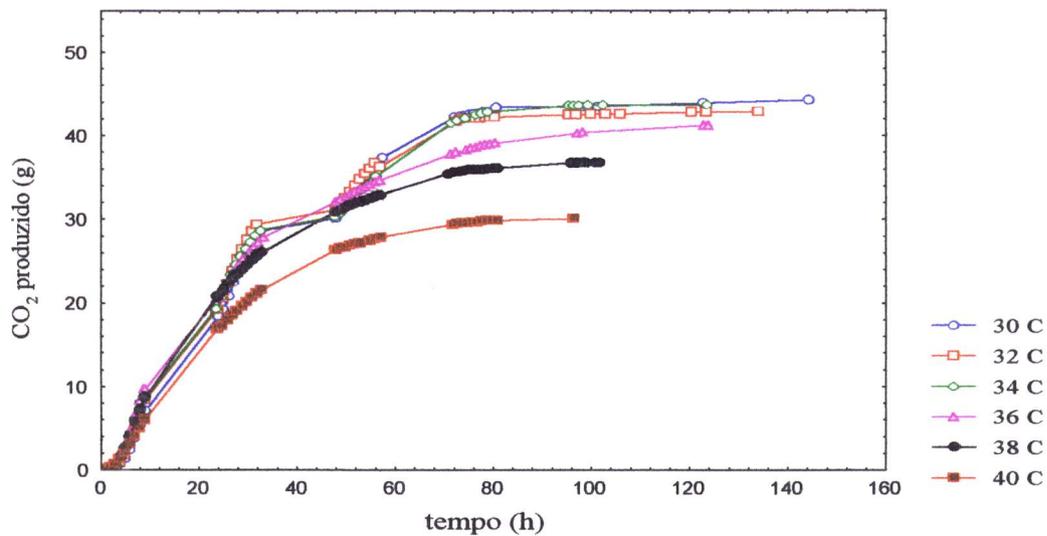


Figura 4.1 - Produção de CO_2 com o tempo para as diferentes temperaturas.

Para a produção de massa seca (g/L) a figura 4.2 ilustra que quanto menor a temperatura, maior foi a massa seca produzida. Porém, constata-se que para a temperatura de 40°C , ocorre uma queda significativa da produção de massa seca em relação às outras temperaturas. A produção de massa seca se comporta exponencialmente como a produção de CO_2 , atingindo uma concentração praticamente constante após 30 horas de fermentação.

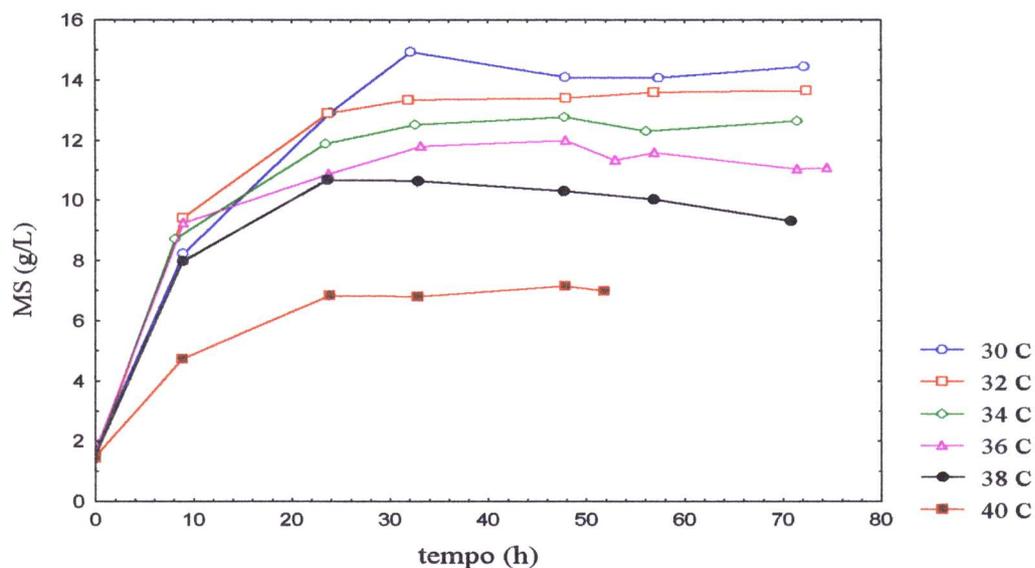


Figura 4.2 - Produção de MS com o tempo para as diferentes temperaturas.

A figura 4.3 mostra a concentração de ARTR (g/L) ao longo da fermentação para as diferentes temperaturas. Os picos de concentração de ARTR devem-se à alimentação de açúcares ao meio. Em todas as temperaturas a concentração inicial ARTR ficou na faixa de 80 a 90 g ARTR/L. Tentou-se alimentar o meio de forma a obter esta concentração inicial de ARTR, porém em algumas temperaturas, como a de 32 e 40°C, a concentração de ARTR do meio após alimentação ficou na faixa de 100 a 120 g/L. Observa-se que as concentrações de ARTR ao longo da fermentação foram muito parecidas para as temperaturas de 30, 32 e 34°C respectivamente; principalmente no final, quando não se teve mais alimentação, ficando na faixa de 15 a 20 g ARTR/L. Nas temperaturas de 36 e 38°C, nota-se que as concentrações de ARTR (g/L) ao longo da fermentação foram parecidas até a última alimentação do meio. Porém comportou-se de forma diferente após esta última alimentação, onde o consumo de ARTR na temperatura de 36°C foi maior do que na temperatura de 38°C. A concentração de ARTR (g/L) no final da fermentação a 36°C ficou em torno de 40 g ARTR/L, enquanto que na temperatura de 38°C ficou em torno de 70 g ARTR/L. A temperatura de 40°C foi a que a concentração de ARTR se comportou de forma mais distinta ao longo da fermentação. O consumo de ARTR após o início da fermentação e após a alimentação do meio foi bem menor quando comparado com as outras temperaturas. Além disso, a concentração de ARTR (g/L) no final da fermentação na temperatura de 40°C ficou em torno de 100 g ARTR/L. Tal comportamento deve ser devido ao fato de que a 40°C as células das leveduras estão bastante estressadas e também porque após a alimentação, a concentração de ARTR do meio ficou numa faixa maior do que nas outras temperaturas.

A figura 4.4 ilustra que a concentração de etanol ao longo da fermentação foi muito parecida para as temperaturas de 30, 32 e 34°C, respectivamente. Nas temperaturas de 36, 38 e 40°C, nota-se que a produção de etanol ao longo da fermentação foi menor com o aumento da temperatura. No entanto, em todas as curvas da figura 4.4, nota-se que a concentração de etanol (g/L) no final da fermentação (Pm) foi maior quanto menor era a temperatura, variando muito pouco nas temperaturas de 30, 32 e 34°C e mais significativamente nas temperaturas de 36, 38 e 40°C. Para as temperaturas estudadas, 30, 32, 34, 36, 38 e 40°C, a concentração final de etanol (Pm) foi respectivamente 104,01; 102,08; 96,51; 82,32; 71,72 e 65,02 g/L. Em todas as curvas da figura 4.4 observa-se picos de queda de concentração de etanol, que são devido à diluição do meio pela adição de mosto.

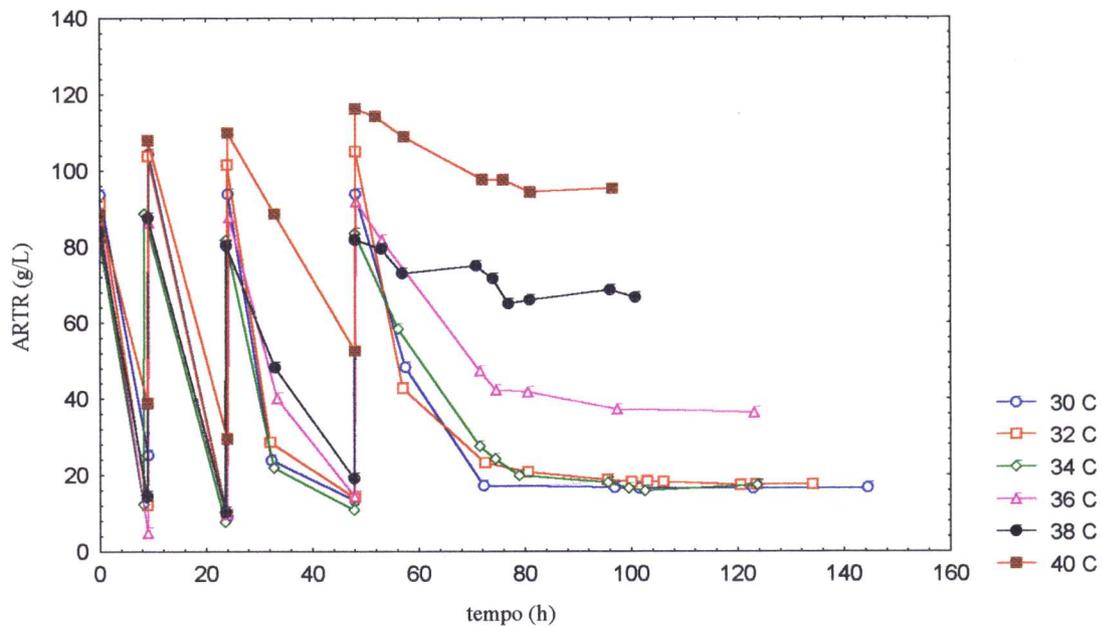


Figura 4.3 - Consumo de ARTR com o tempo para as diferentes temperaturas

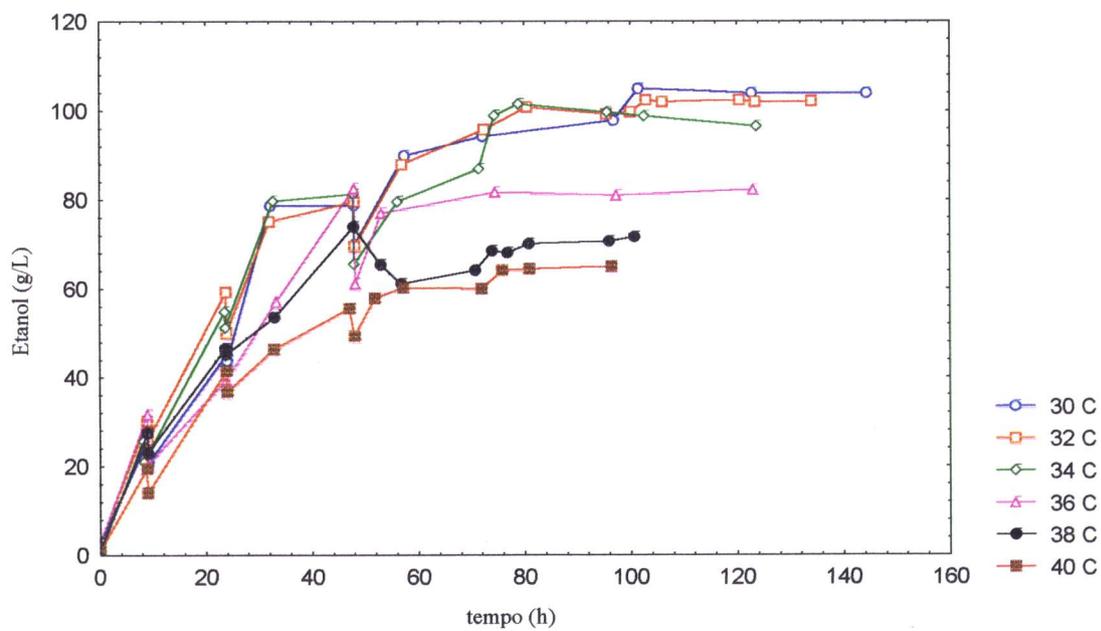


Figura 4.4 - Produção de etanol com o tempo para as diferentes temperaturas

A figura 4.5 mostra a viabilidade (%) ao longo da fermentação para as diferentes temperaturas. Observa-se que quanto maior a temperatura, mais brusca é a queda da viabilidade. A 30°C a viabilidade se mantém a 98% ao redor de 90 horas, enquanto que a 40°C a viabilidade começa a apresentar uma queda exponencial ao redor de 40 horas. Tal fato constata o que foi apresentado na literatura, onde em fermentações conduzidas na faixa mais alta de temperatura de crescimento, o etanol afeta a viabilidade das células de *Saccharomyces cerevisiae* pelo aumento da morte térmica.

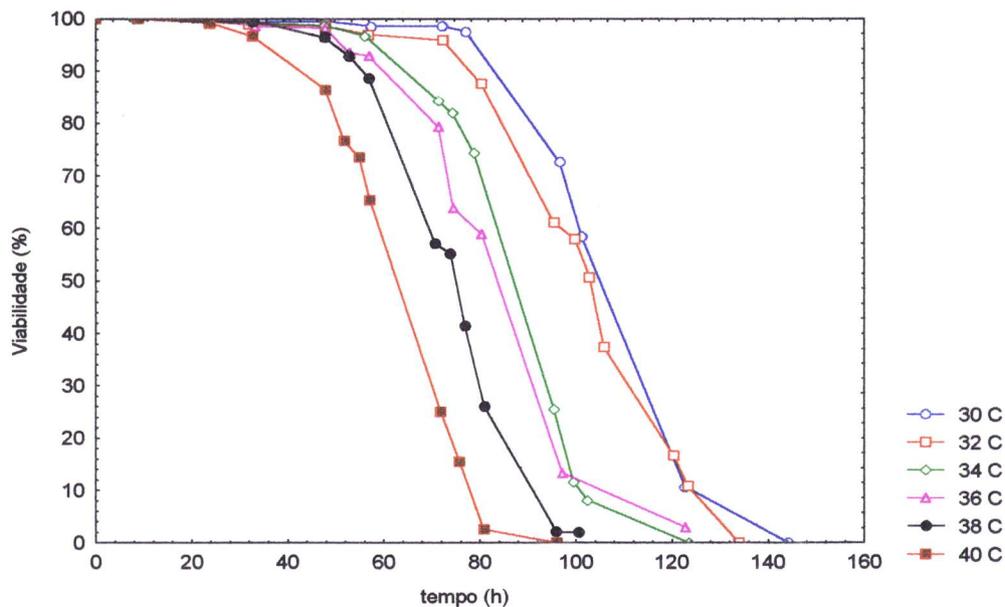


Figura 4.5 - Comportamento da viabilidade em função do tempo para as diferentes temperaturas

Estes valores de viabilidade serão utilizados no item 4.3.3, no qual será estudado um modelo da cinética de morte celular.

4.2 - Resultados da termo-tolerância das leveduras ao etanol

Numa primeira etapa de trabalho foram conduzidas fermentações em batelada com alimentação de açúcares como descrito no item 3.2 para as temperaturas de 30, 32, 34, 36, 38 e 40°C. Todas as fermentações foram realizadas em duplicatas. Uma delas permanecia até o final para a obtenção de Pm e a outra era encerrada no momento em que praticamente a produção de CO₂ era estável (a viabilidade se encontrava ao redor de 80%) para que fosse feito o teste de termo-tolerância segundo VAN UDEN em duplicata. A média dos resultados (\bar{k}) para cada temperatura está apresentada na tabela 4.1. Em todos os testes o coeficiente de correlação foi maior que 0,95.

Tabela 4.1 - Resultados do teste de VAN UDEN de termo-tolerância para cada temperatura realizado em células com 80% de viabilidade.

T (°C)	\bar{k} (80%) (M ⁻¹)	r
30	0,51	0,95
32	0,87	0,97
34	0,58	0,98
36	0,52	0,98
38	0,51	0,99
40	0,56	0,99

Analisando-se a tabela 4.1, verifica-se que com exceção da temperatura de 32°C, onde o \bar{k} medido provavelmente não está correto, não há uma grande variação de k nesta faixa de temperatura. Portanto, não foi evidenciada nenhuma relação de k com a temperatura, sendo questionada a validade da metodologia quando a viabilidade das células estava por volta de 80%.

Decidiu-se, então, numa segunda etapa de trabalho, verificar a metodologia do teste de termo-tolerância. Para isto, repetiu-se as fermentações para cada temperatura da mesma forma que anteriormente, porém fazendo-se o teste de termo-tolerância quando a viabilidade das células estava ao redor de 98% e 50%. Novamente os testes foram realizados em duplicatas para cada temperatura. As figuras que ilustram a determinação dos parâmetros de termo-tolerância (k) para cada temperatura estudada na viabilidade das células de 98 e 50%,

respectivamente, estão apresentadas no apêndice C. Como pode ser observado, todos os coeficientes de correlação foram superiores a 0,95.

A média dos resultados (\bar{k}) para cada temperatura e para as viabilidades de 98 e 50% está apresentada na tabela 4.2. A concentração de etanol (P) e o tempo (t) apresentados na tabela correspondem, respectivamente, à concentração de etanol e ao tempo de fermentação no momento em que o teste foi realizado.

Tabela 4.2 - Resultados do teste de VAN UDEN de termo-tolerância para cada temperatura realizado em células com 98% e 50% de viabilidade.

T (°C)	\bar{k} (98%) (M ⁻¹)	P (98 %) (g Etanol/l)	t (98%) (h)	\bar{k} (50 %) (M ⁻¹)	P (50%) (g Etanol/l)	t (50 %) (h)
30	0,49	95,77	73,91	0,54	99,43	99,04
32	0,48	94,28	62,82	0,46	96,74	97,05
34	0,58	86,97	52,97	0,48	94,62	95,92
36	0,66	85,18	49,63	0,50	90,78	79,4
38	0,73	73,23	47,53	0,50	76,40	76,77
40	0,82	45,08	30,21	0,46	63,53	73,4

Observa-se na tabela 4.2 que os valores de k na viabilidade de 50% quase não variam nesta faixa de temperatura. Porém, na viabilidade de 98% os valores de k variam significativamente em relação à temperatura, sendo evidenciada uma relação de k com a temperatura. Verifica-se, portanto, que o teste de termo-tolerância só é válido quando realizado em células com viabilidade de 98%. Este resultado encontrado para o teste de termo-tolerância é interessante a nível de laboratório, onde é possível controlar a viabilidade das células. A nível industrial, se o teste for realizado como acompanhamento de uma fermentação alcoólica em condições de alta temperatura e alta concentração de etanol, onde as células do microrganismo se encontram numa condição de “stress” e baixa viabilidade, o resultado não terá nenhuma validade.

A figura 4.6 mostra a relação de k na viabilidade de 98% com a temperatura. Observa-se que para as temperaturas de 30 e 32°C o valor de k é aproximadamente estável, existindo um patamar para k em torno de 0,485. Para as temperaturas mais altas que 32°C verifica-se um aumento linear de k com a temperatura. Portanto, quanto mais elevada a temperatura, maior a sensibilidade das células da levedura, ou seja, menor a tolerância ao etanol. Testou-se um ajuste linear a partir da temperatura de 32°C para descrever esse aumento de k com a temperatura. A equação 4.1 mostra o modelo encontrado, juntamente com a regressão obtida, onde T é a temperatura em °C:

$$k = 0,0415.T - 0,84 \quad , \text{ para } 32 < T < 40^\circ\text{C} \quad (4.1)$$

$$r^2 = 0,9967$$

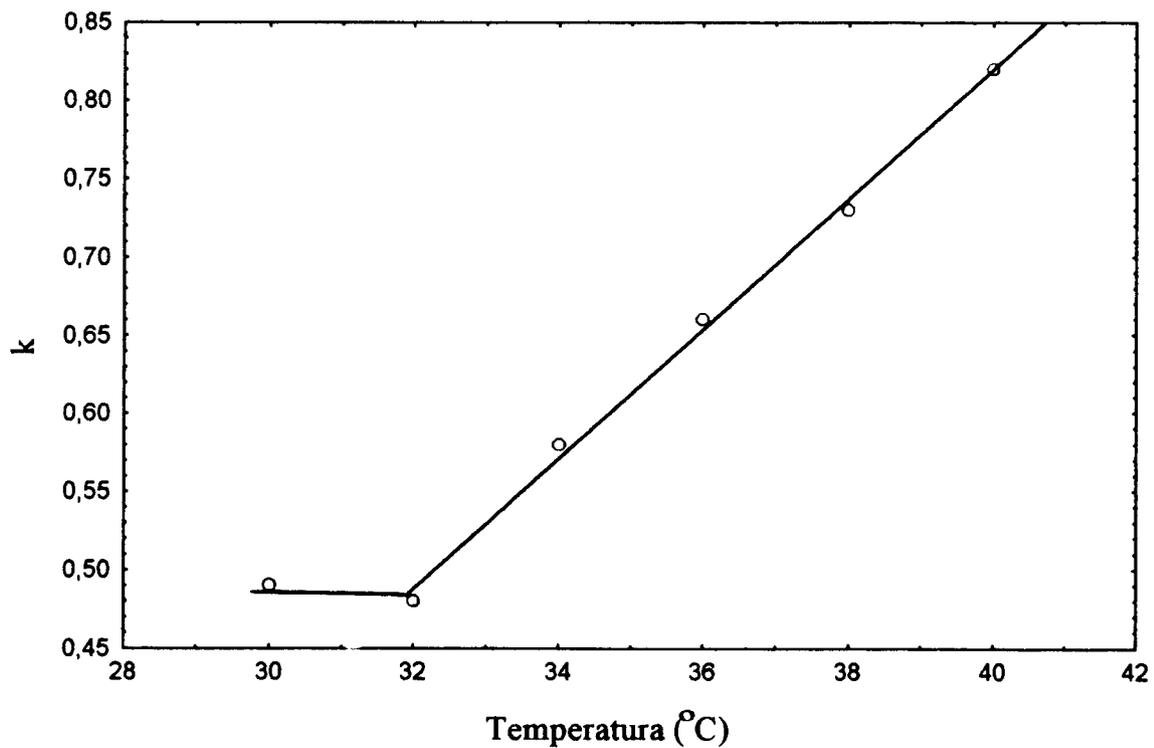


Figura 4.6 - Variação de k com a temperatura da fermentação.

A figura 4.7 ilustra a relação de k na viabilidade de 98% com a concentração de etanol. Este resultado a princípio pode parecer incorreto, pois ele relata que quanto maior a concentração de etanol, menor o valor de k , ou seja, maior a tolerância ao etanol. Porém, é importante lembrar que as fermentações foram interrompidas quando a viabilidade começou a cair (98%). Neste momento para as temperaturas de 30, 32, 34, 36, 38 e 40°C as concentrações de etanol eram de 99,43; 97,05; 95,92; 79,04; 76,77 e 73,4 g/L, respectivamente. Ou seja, quanto maior a temperatura, menor era a concentração de etanol quando foi interrompida a fermentação para realização do teste. Portanto, verifica-se que a temperatura da fermentação alcoólica tem um papel mais significativo do que a concentração de etanol produzido pela levedura no parâmetro k .

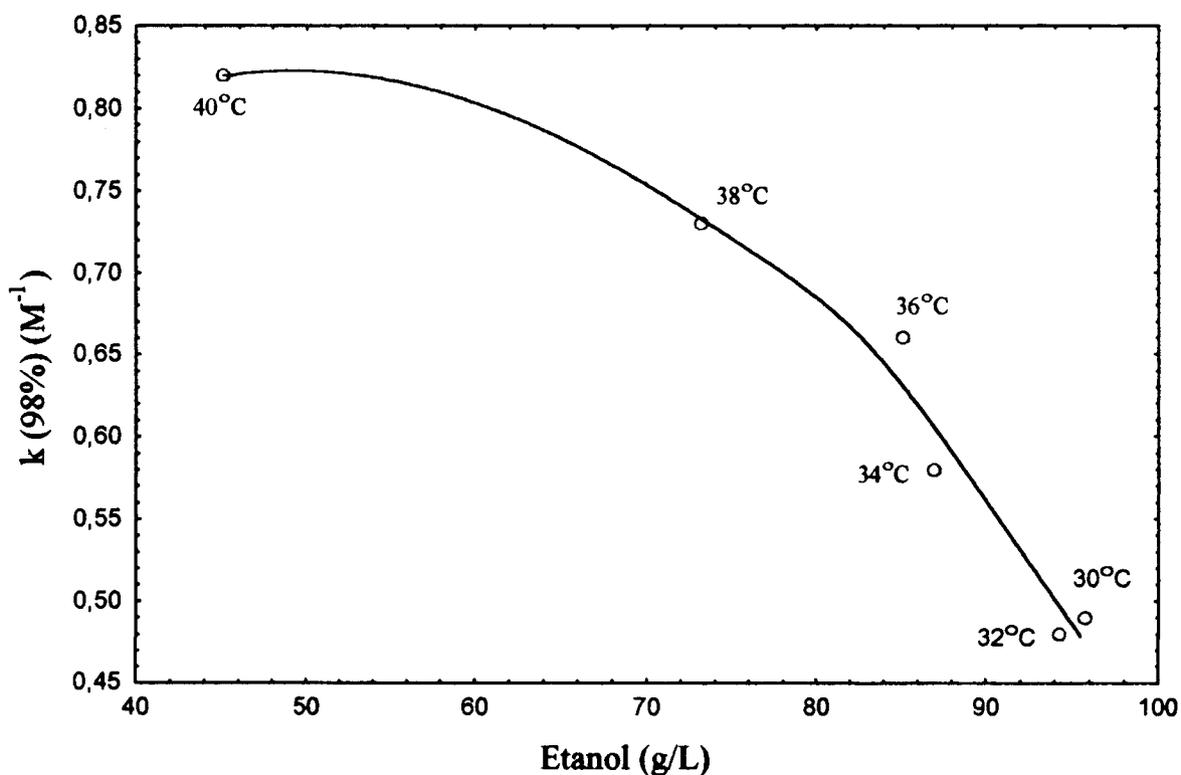


Figura 4.7 - Variação de k com a concentração de etanol e as correspondentes temperaturas.

4.3 - Parâmetros cinéticos obtidos em função da temperatura

4.3.1 - Determinação de ΔCO_2 produzido / ΔARTR consumido, ΔCO_2 produzido / ΔEtanol produzido e rendimento de etanol ($Y_{P/S}$)

O cálculo de ΔCO_2 produzido, ΔARTR consumido e ΔEtanol produzido foi feito pela diferença em massa (g) de cada um dos três parâmetros ao longo da fermentação, antes e depois das alimentações de açúcares ao meio, sendo este Δ acumulativo. A tabela 4.3 exemplifica estes cálculos para a temperatura de 32°C, sendo que o mesmo procedimento foi feito para as outras temperaturas. $Y_{P/S}$ foi determinado pela razão ΔEtanol produzido / ΔARTR consumido para cada temperatura. Na tabela 4.3, as três últimas colunas foram as utilizadas para a construção dos gráficos 4.8, 4.9 e 4.10.

Tabela 4.3 - Determinação de ΔCO_2 produzido, ΔARTR consumido e ΔEtanol produzido para a temperatura de 32°C (teste B).

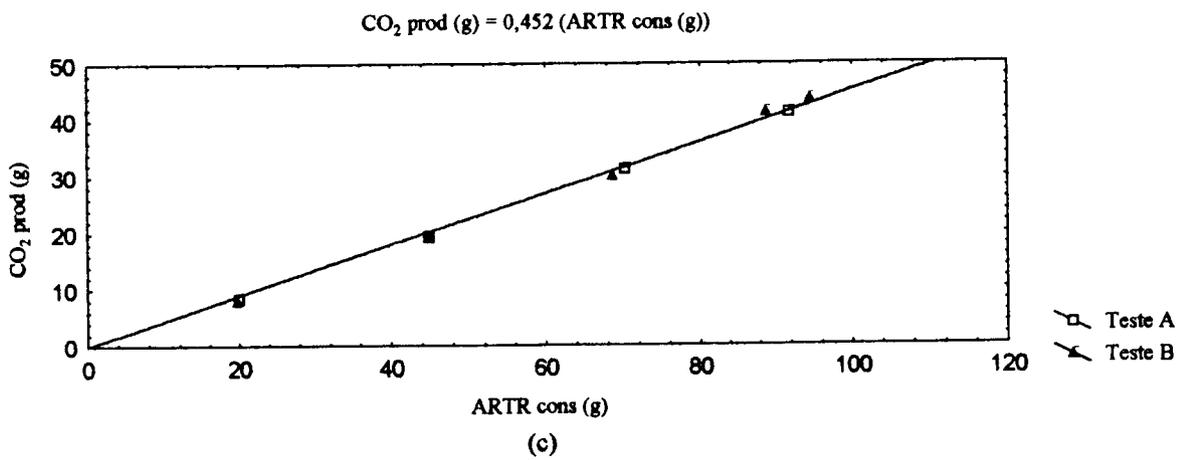
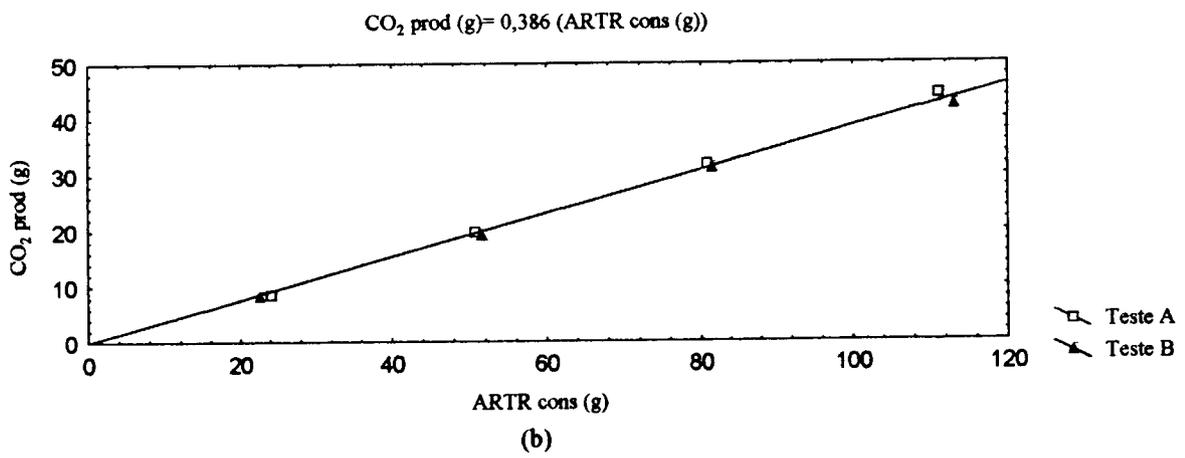
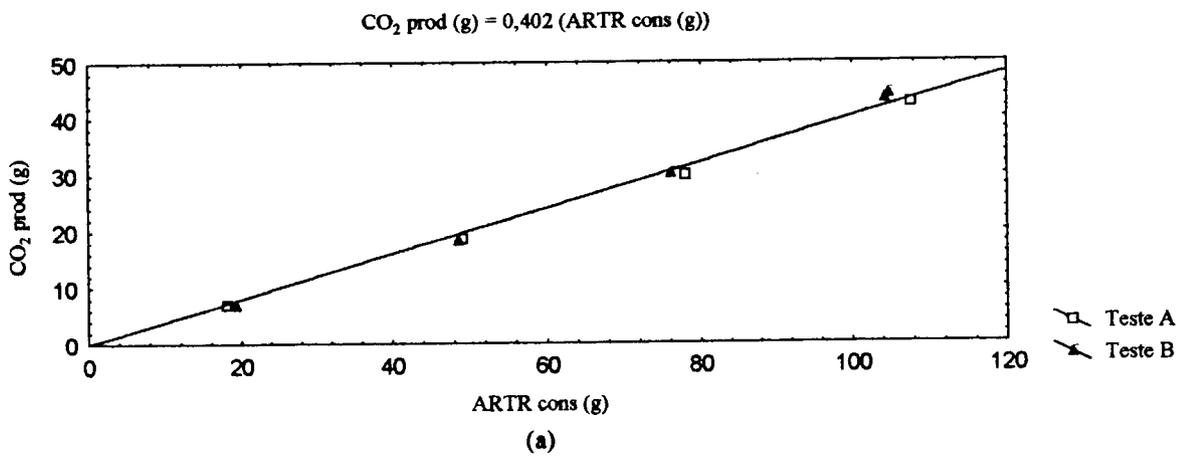
	Δt (h)	ΔCO_2 (g)	ΔARTR (g)	ΔEt (g)	t(h)		ΔCO_2 (g)	ΔARTR (g)	ΔEt (g)
Δ_1	8,95	8,4	22,55	7,92	8,95	Δ_1	8,4	22,55	7,92
Δ_2	14,69	10,8	28,98	10,71	23,77	$\Delta_1 + \Delta_2$	19,2	51,53	18,63
Δ_3	24,03	12,0	29,91	9,76	47,98	$\Delta_2 + \Delta_3$	31,2	81,44	28,39
Δ_4	47,41	11,3	31,72	8,45	95,53	$\Delta_3 + \Delta_4$	42,5	113,16	36,84

Encontra-se na tabela 4.4 os resultados em duplicata de ΔCO_2 produzido / ΔARTR consumido, ΔCO_2 produzido / ΔEtanol produzido e $Y_{P/S}$ para cada temperatura.

Tabela 4.4 - Resultados de ΔCO_2 produzido/ ΔARTR consumido, ΔCO_2 produzido/ ΔEtanol produzido e $Y_{P/S}$ para as temperaturas de 30, 32, 34, 36, 38 e 40°C. A e B se referem ao teste A e ao teste B, respectivamente.

T (°C)	$\Delta\text{CO}_2 / \Delta\text{ARTR}$	$\Delta\text{CO}_2 / \Delta\text{Etanol}$	$Y_{P/S}$
30	A = 0,391 (r2 = 0,999)	A = 1,144 (r2 = 0,997)	A = 0,342 (r2 = 0,993)
	B = 0,412 (r2 = 0,994)	B = 1,248 (r2 = 0,992)	B = 0,330 (r2 = 0,995)
32	A = 0,396 (r2 = 0,998)	A = 1,19 (r2 = 0,995)	A = 0,333 (r2 = 0,998)
	B = 0,377 (r2 = 0,999)	B = 1,118 (r2 = 0,993)	B = 0,337 (r2 = 0,991)
34	A = 0,448 (r2 = 0,999)	A = 1,179 (r2 = 0,989)	A = 0,378 (r2 = 0,985)
	B = 0,457 (r2 = 0,995)	B = 1,158 (r2 = 0,989)	B = 0,391 (r2 = 0,998)
36	A = 0,420 (r2 = 1,0)	A = 1,160 (r2 = 0,993)	A = 0,362 (r2 = 0,992)
	B = 0,447 (r2 = 0,998)	B = 1,170 (r2 = 0,962)	B = 0,376 (r2 = 0,965)
38	A = 0,472 (r2 = 0,998)	A = 1,230 (r2 = 0,990)	A = 0,383 (r2 = 0,990)
	B = 0,496 (r2 = 0,991)	B = 1,537 (r2 = 0,925)	B = 0,353 (r2 = 0,970)
40	A = 0,418 (r2 = 0,986)	A = 1,451 (r2 = 0,981)	A = 0,306 (r2 = 0,989)
	B = 0,438 (r2 = 0,991)	B = 1,270 (r2 = 0,99)	B = 0,356 (r2 = 0,995)

As figuras 4.8, 4.9 e 4.10 apresentam as razões entre as variações de ΔCO_2 produzido/ ΔARTR consumido, ΔCO_2 produzido/ ΔEtanol produzido e $Y_{P/S}$, respectivamente, para as temperaturas de 30 (a), 32 (b), 34 (c), 36 (d), 38 (e) e 40°C (f). O valor apresentado na curva de ajuste em todos os gráficos é a média dos valores dos testes em duplicatas (teste A e teste B). Como era de se esperar, verifica-se a linearidade existente entre $\Delta\text{CO}_2/\Delta\text{ARTR}$, $\Delta\text{CO}_2/\Delta\text{Etanol}$ e $Y_{P/S}$ ($\Delta\text{Etanol}/\Delta\text{ARTR}$), respectivamente. Estes resultados são importantes para prever a evolução da fermentação alcoólica. O ΔCO_2 produzido é um parâmetro interessante, indicando rapidamente (através de pesagem) o desempenho e o término da fermentação.



**Figura 4.8 - Determinação de $\text{CO}_2 \text{ (g)}/\text{ARTR (g)}$ para 30°C (a) ,
 32°C (b) e 34°C (c)**

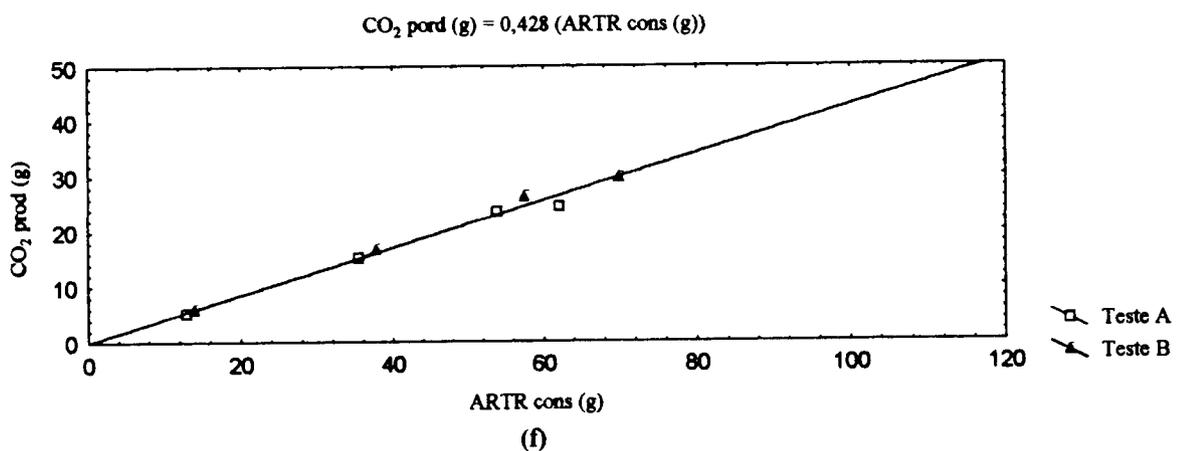
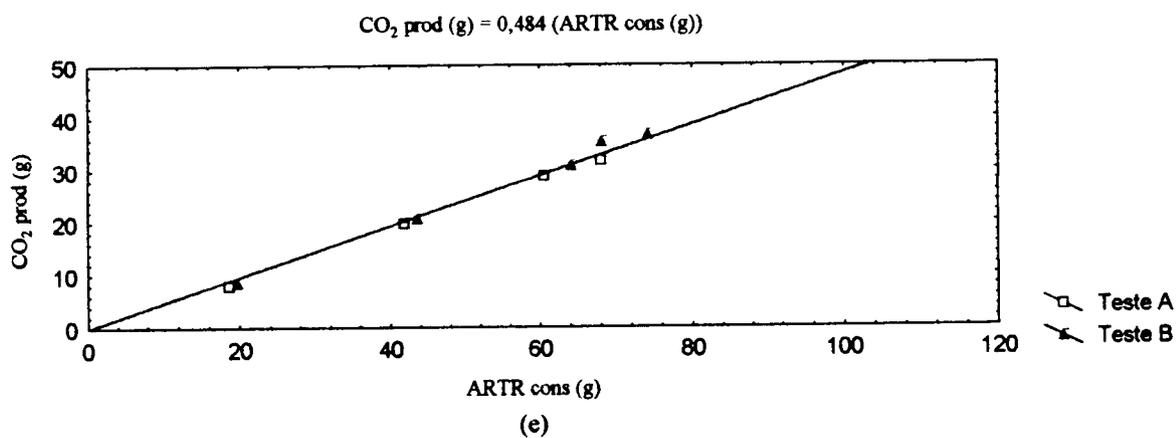
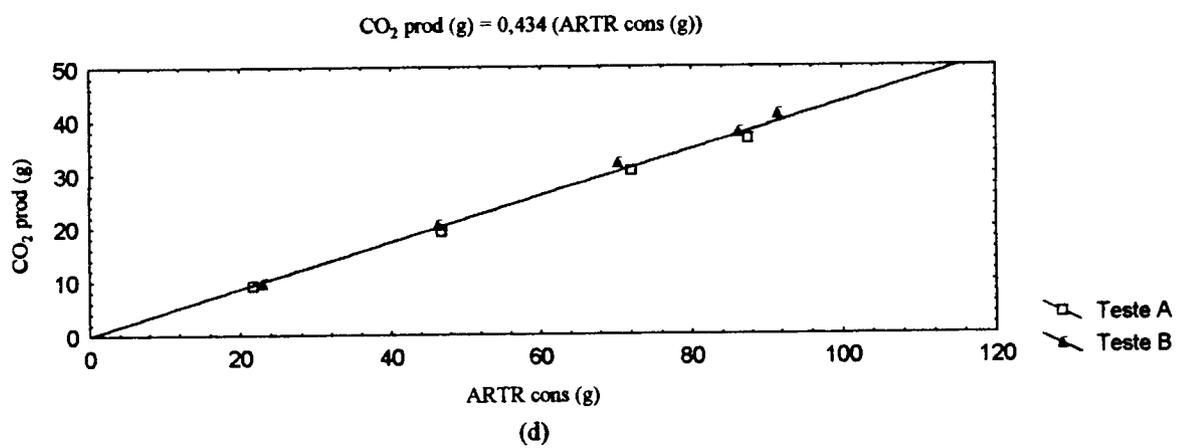


Figura 4.8 - Determinação de CO_2 (g)/ARTR (g) para 36°C (d), 38°C (e) e 40°C (f)

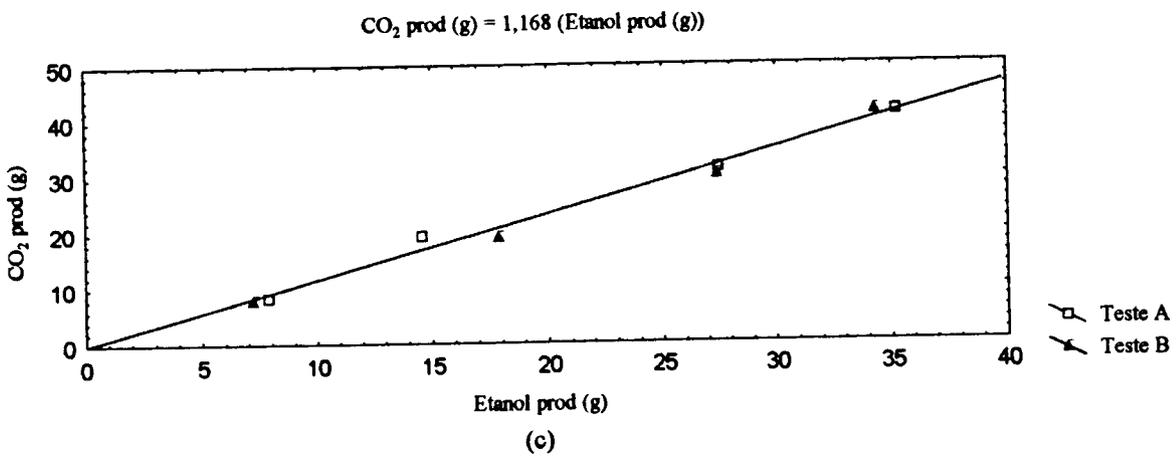
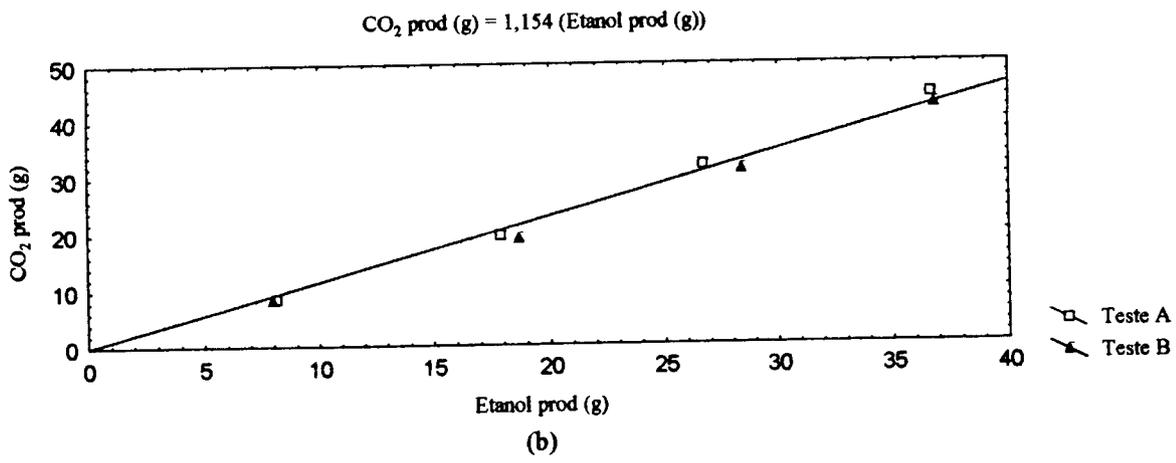
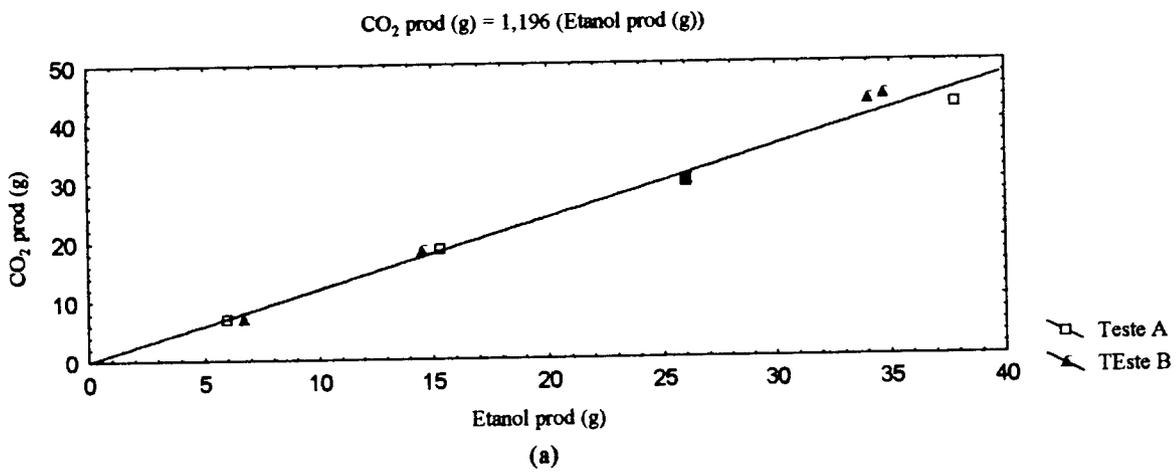


Figura 4.9 - Determinação de CO₂ (g)/Etanol (g) para 30°C (a), 32°C (b) e 34°C (c)

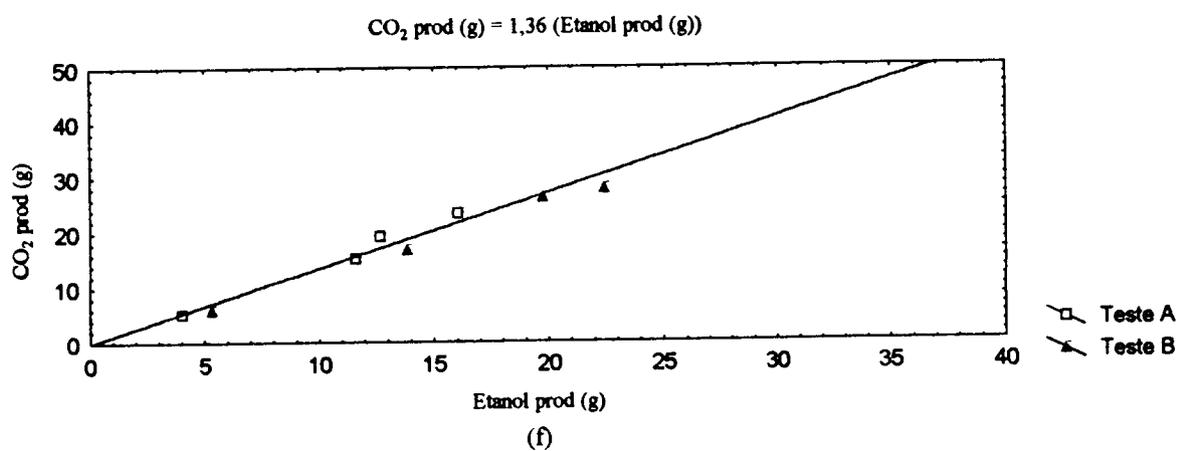
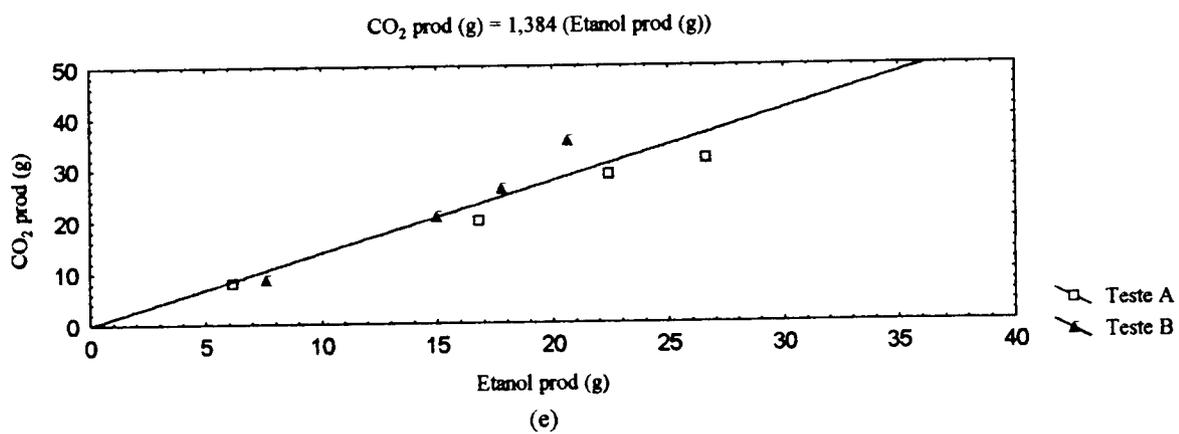
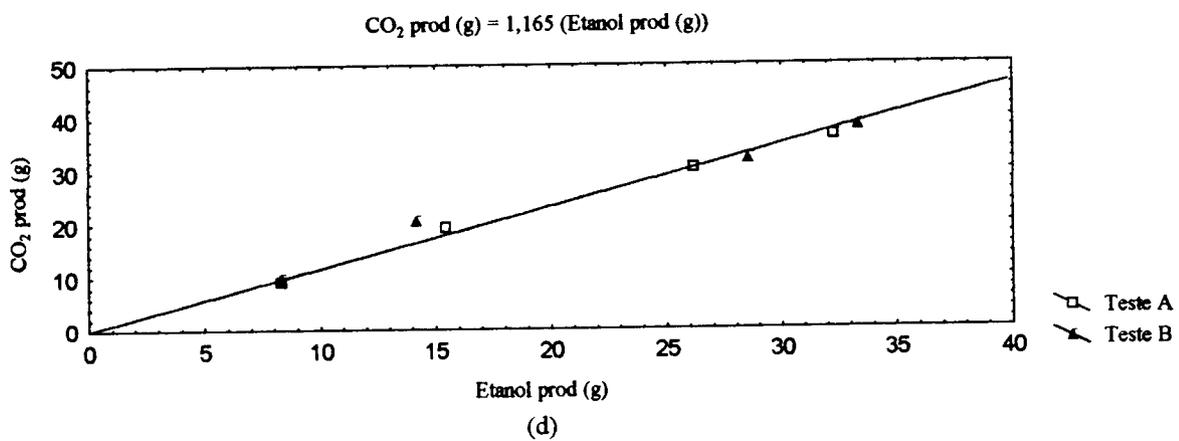
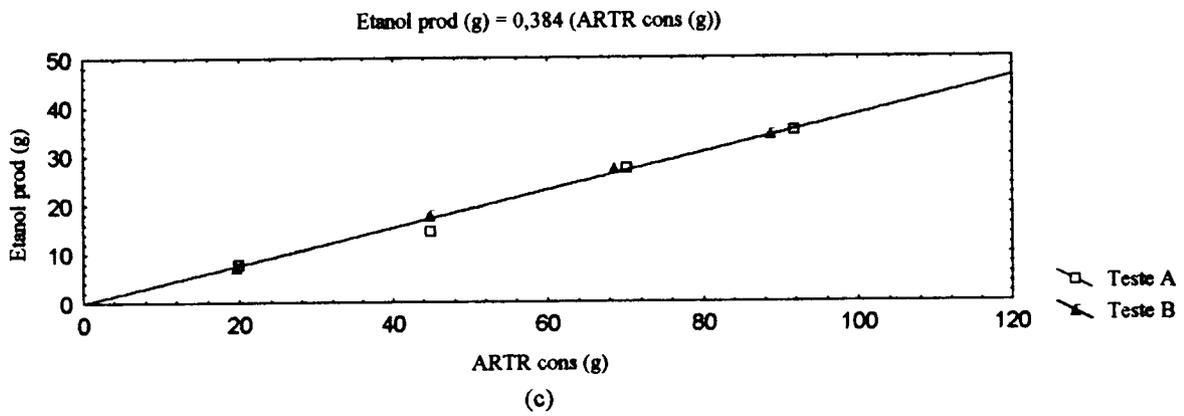
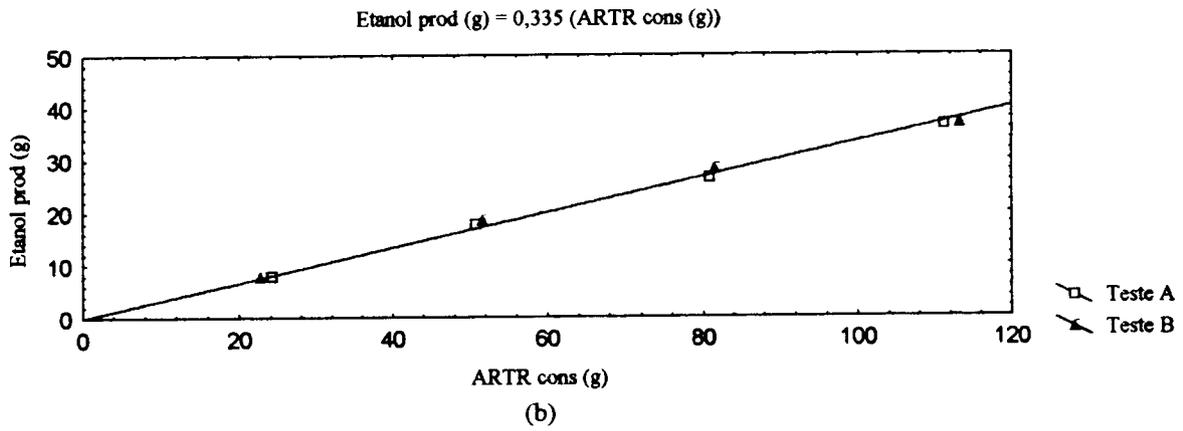
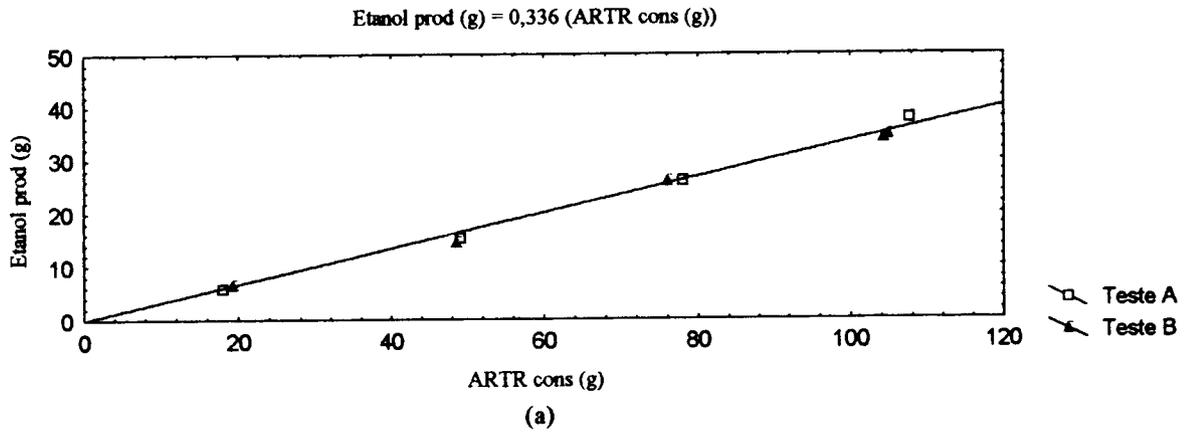


Figura 4.9 - Determinação de CO_2 (g)/Etanol (g) para 36°C (d), 38°C (e) e 40°C (f)



**Figura 4.10 - Determinação de $Y_{P/S}$ para 30°C (a),
32°C (b) e 34°C (c)**

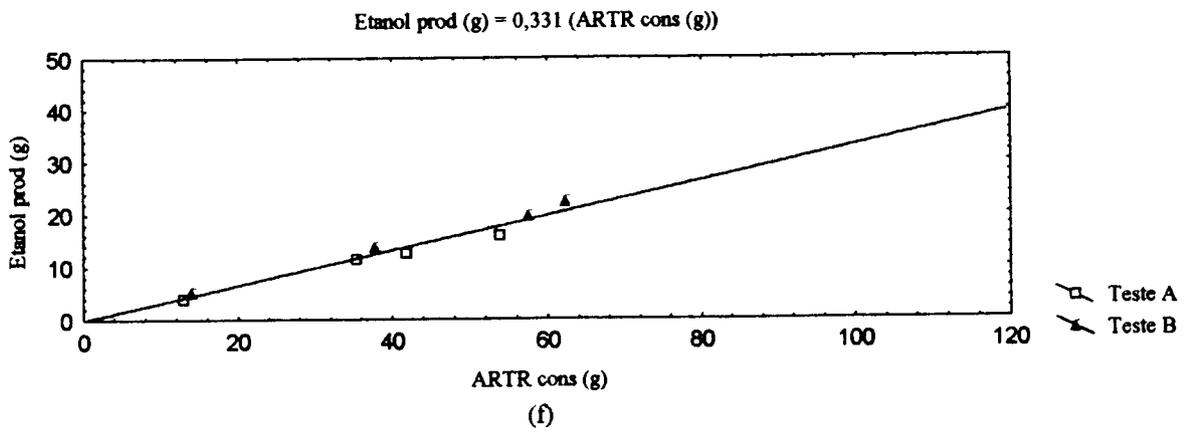
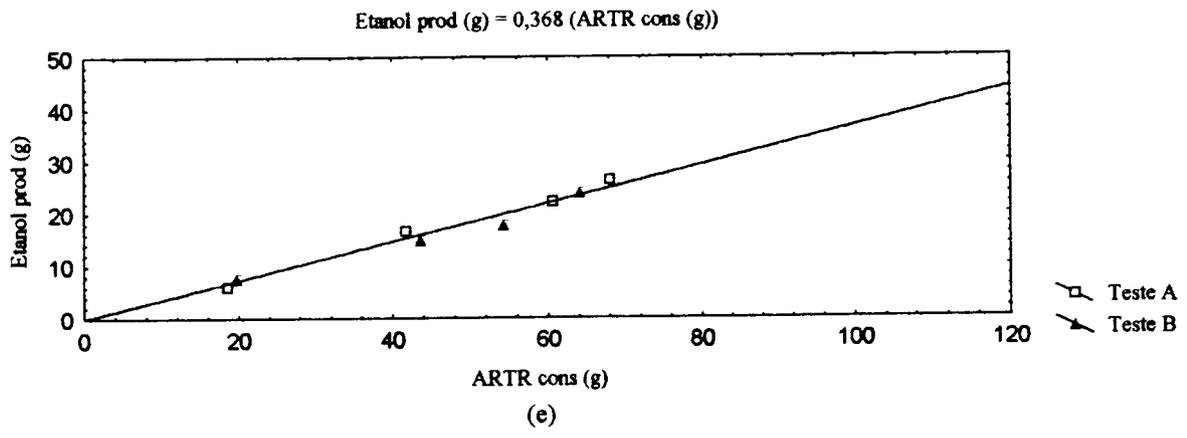
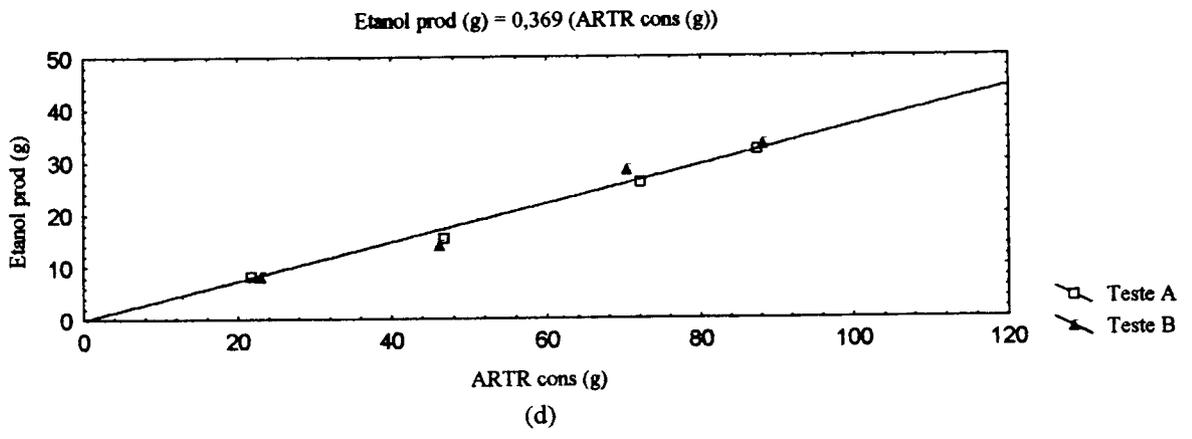


Figura 4.10 - Determinação de $Y_{P/S}$ para 36°C (d), 38°C (e) e 40°C (f)

As figuras 4.11, 4.12 e 4.13 mostram a razão de $\Delta \text{ g CO}_2/\Delta \text{ ARTR}$, $\Delta \text{ g CO}_2/\Delta \text{ Etanol}$ e $Y_{P/S}$ ($\Delta \text{ g Etanol}/\Delta \text{ g ARTR}$) em função da temperatura, respectivamente. Verifica-se que não há uma grande variação destas razões com a temperatura, não sendo evidenciada nenhuma relação destes índices com esta variável. Calculando-se um valor médio de $\Delta \text{ CO}_2/\Delta \text{ ARTR}$, $\Delta \text{ CO}_2/\Delta \text{ Etanol}$ e $Y_{P/S}$ para a faixa de temperatura de 30 a 40°C, obtêm-se os valores de 0,431 g $\text{CO}_2/\text{ g ARTR}$, 1,238 g $\text{CO}_2/\text{g Etanol}$ e 0,354 g Etanol/g ARTR, respectivamente.

Verifica-se que o rendimento em etanol encontrado é baixo e bem menor do que o valor citado na literatura por ALVES (1996), $Y_{P/S}$ igual a 0,505. Tal fato pode ser devido à metodologia empregada, pois neste trabalho utilizou-se fermentação em batelada e ALVES utilizou processo de fermentação contínua para a obtenção deste rendimento.

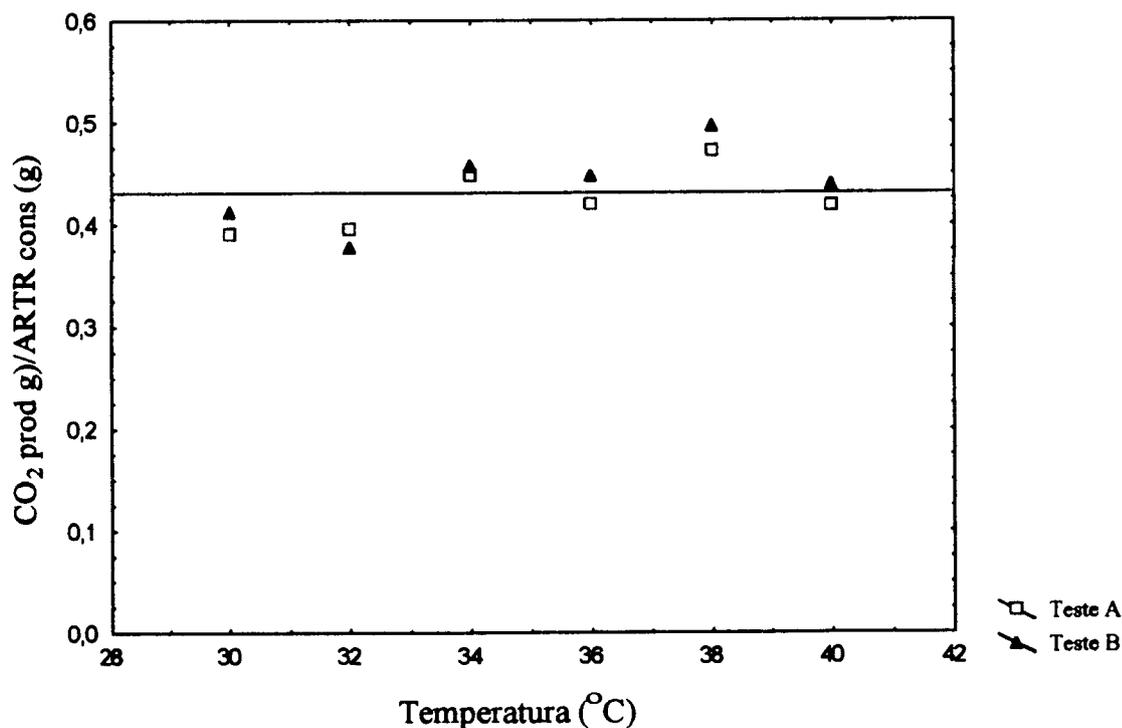


Figura 4.15 - Variação de $\text{CO}_2 \text{ prod (g)}/\text{ARTR cons (g)}$ com a temperatura.

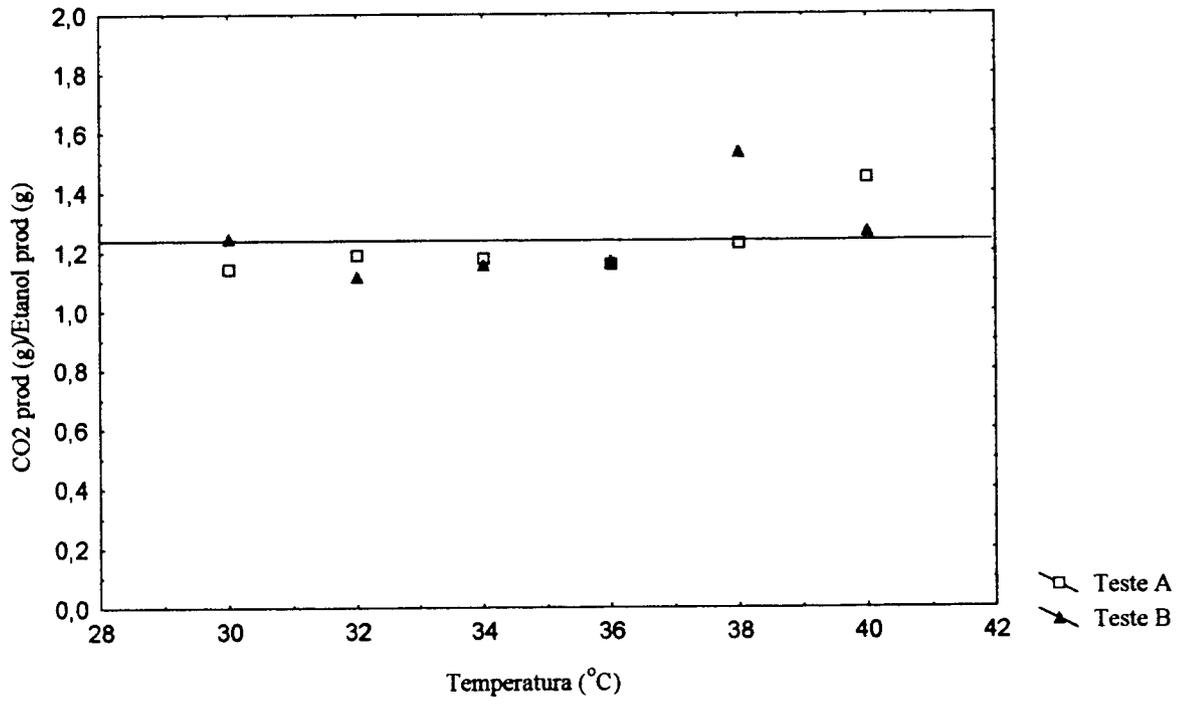


Figura 4.12 - Variação de CO₂ (g)/Etanol (g) com a temperatura

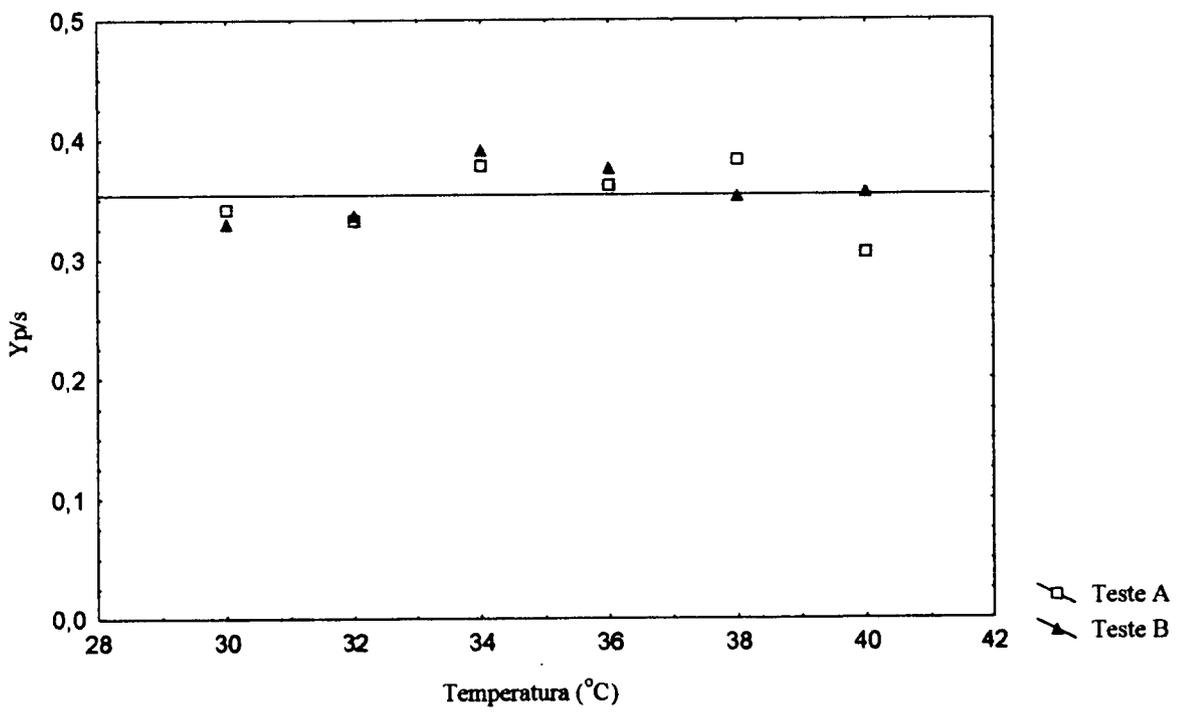


Figura 4.13 - Variação de Y_p/s com a temperatura

4.3.2 - Determinação da concentração de etanol acima da qual não ocorre crescimento celular (Pm)

Foram determinados os valores de Pm para as temperaturas de 30, 32, 34, 36, 38 e 40°C. Os resultados obtidos experimentalmente são mostrados na tabela 4.5, juntamente com os valores de Pm reportados no trabalho de ALVES (1996).

Tabela 4.5 - Valores de Pm obtidos experimentalmente neste trabalho e de Pm obtidos por ALVES (1996).

T (°C)	Pm (g Etanol / l)	Pm (g Etanol / l) (ALVES, 1996)
30	104,01	111,3
32	102,08	100,2
34	96,51	98,7
36	82,32	78,1
38	71,72	71,0
40	65,02	

Através dos resultados da tabela 4.5, verifica-se que Pm decresce com o aumento da temperatura, sendo que este decréscimo é pequeno até a temperatura de 34°C e maior a partir desta temperatura. Foram testados inicialmente dois ajustes para descrever essa diminuição de Pm com a temperatura: um ajuste linear e um ajuste exponencial. As equações 4.2 e 4.3 mostram as regressões obtidas, onde T é a temperatura em °C.

$$Pm = 237,05 - 4,289.T \quad (4.2)$$

$$r^2 = 0,957 \text{ e } r = 0,978$$

$$Pm = 509,35.e^{-0,051.T} \quad (4.3)$$

$$r^2 = 0,948 \text{ e } r = 0,974$$

Tentou-se um novo ajuste não linear, do tipo exponencial, acrescentado de um termo quadrático (equação 4.4).

$$P_m = 5,1 \cdot \exp(0,22 \cdot T - 0,0039 \cdot T^2) \quad (4.4)$$

$$r^2 = 0,98 \text{ e } r = 0,99$$

Este ajuste apresentou um coeficiente de correlação de 0,99 e portanto foi o ajuste escolhido para o decréscimo de P_m com a temperatura. A figura 4.16 apresenta os dados experimentais obtidos neste trabalho e o modelo ajustado pela equação 4.4.

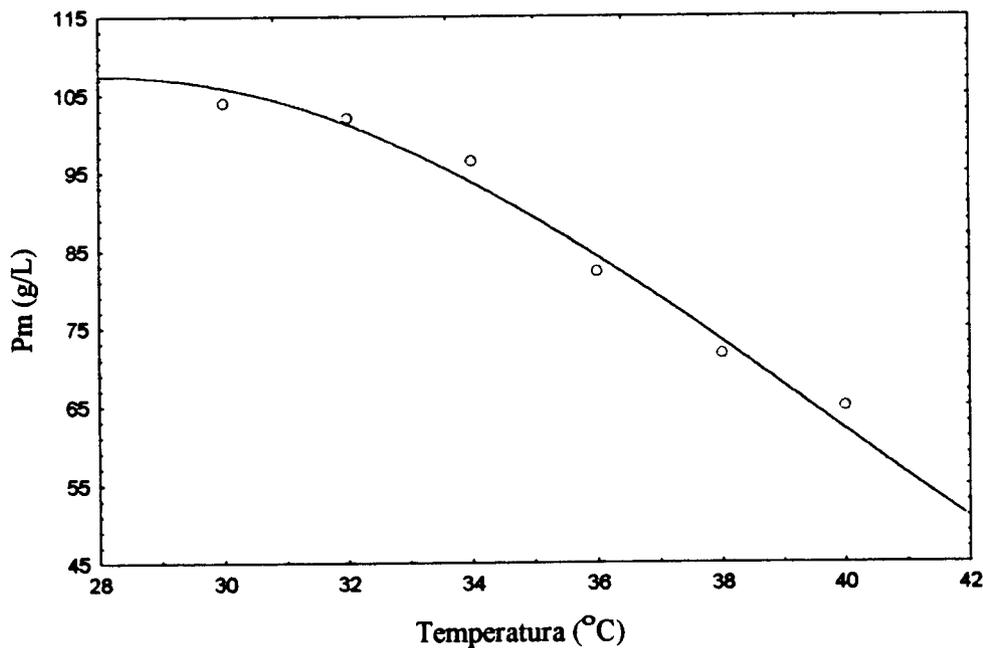


Figura 4.14 - Variação de P_m com a temperatura

A figura 4.15 ilustra uma comparação entre os resultados obtidos experimentalmente neste trabalho e os reportados no trabalho de ALVES (1996) e SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1983). Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os reportados por ALVES (1996), verifica-se que os valores de P_m estão próximos nos dois trabalhos. Isto se explica devido ao fato de que utilizou-se nos dois trabalhos a mesma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* e o mesmo meio de cultivo. Comparando os resultados obtidos neste trabalho e no trabalho de ALVES (1996) com os reportados por SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1983),

nota-se que os valores de Pm nos dois primeiros são sistematicamente mais altos. Isto pode ser explicado pelas diferenças das cepas de *Sccharomyces cerevisiae* e de meio de cultivo, lembrando-se que a cepa utilizada neste trabalho é proveniente de usina de álcool, com uma tolerância ao etanol supostamente maior. Ocorre uma dispersão entre os dados deste trabalho e os de ALVES (1996), porém os resultados quase se duplicam. Observa-se que o perfil da queda da concentração de etanol em função da temperatura é muito similar ao dos outros dois trabalhos, ocorrendo apenas um deslocamento nas curvas.

Segundo SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1986) existe um patamar para Pm em torno de 87 g Etanol/l entre as temperaturas de 13 a 27°C, utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae*. Acima de 27°C, Pm cai significativamente. Analisando os resultados obtidos neste trabalho, observa-se que para 30 e 32°C o valor de Pm é aproximadamente estável, existindo um patamar para Pm em torno de 103 g Etanol/l. Tal fato pode explicar porque o ajuste exponencial obtido para os dados experimentais não é muito bom.

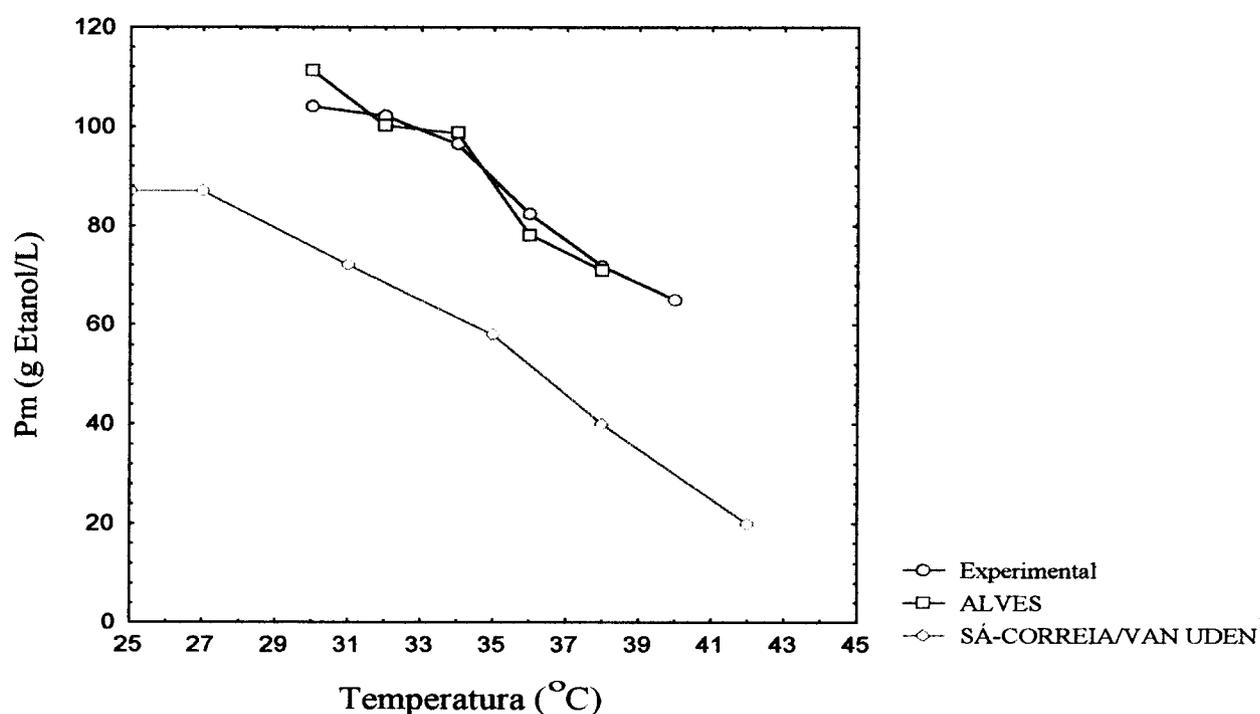


Figura 4.15 - Comparação dos dados obtidos para Pm com os dados reportados por ALVES (1996) e SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1986)

4.3.3 - Determinação dos parâmetros da cinética de morte celular

O modelo utilizado para a obtenção da cinética de morte celular foi o proposto por DALE *et alli* (1990) segundo a equação (2.36). O procedimento matemático para o cálculo dos parâmetros cinéticos foi o seguinte:

1ª) Graficou-se $\ln(N_v/N_o)$, ou seja \ln (viabilidade) versus tempo para as diferentes temperaturas. O coeficiente angular das curvas obtidas é a constante cinética de morte em função da temperatura (K_{dt}). Os valores de K_{dt} e as curvas obtidas se encontram na tabela 4.6 e na figura 4.16, respectivamente. Para a construção do gráfico $\ln(N_v/N_o)$ versus tempo, utilizou-se os pontos iniciais de viabilidade, nos quais esta era alta e o efeito tóxico do etanol não era pronunciado.

Tabela 4.6 - Valores de K_{dt} (h^{-1}) em função da temperatura.

T (°C)	K_{dt} (h^{-1})
30	$1,128 \times 10^{-4}$
32	$1,712 \times 10^{-4}$
34	$2,124 \times 10^{-4}$
36	$3,497 \times 10^{-4}$
38	$7,882 \times 10^{-4}$
40	$9,233 \times 10^{-4}$

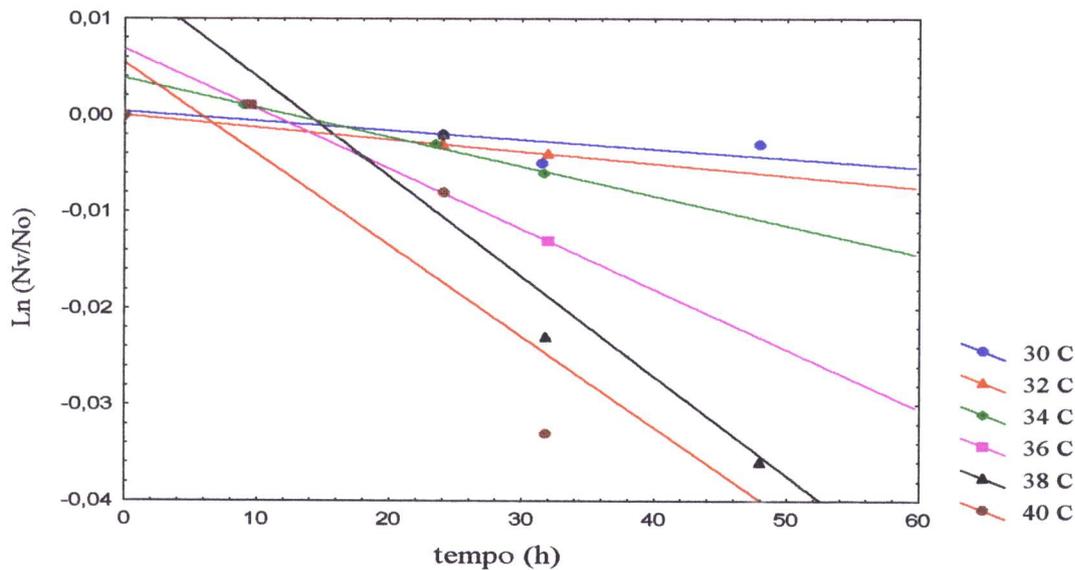


Figura 4.16 - Determinação de Kdt em função da temperatura

2ª) Graficou-se $\ln(Kdt)$ versus $1/T$. O coeficiente angular da curva obtida é $(-E_6/R)$ e o linear é $(Kdp.P + \ln A_6)$. Como os dados utilizados para a construção da curva estavam em concentrações de etanol baixas, desprezou-se o termo $(Kdp.P)$ e o coeficiente linear passou a ser portanto $(\ln A_6)$. O gráfico $\ln(Kdt)$ versus $1/T$ é apresentado na figura 4.17. A partir desta figura obtém-se valores de 41947 cal/mol K e $1,87 \cdot 10^{26} \text{ h}^{-1}$ para E_6 e A_6 , respectivamente.

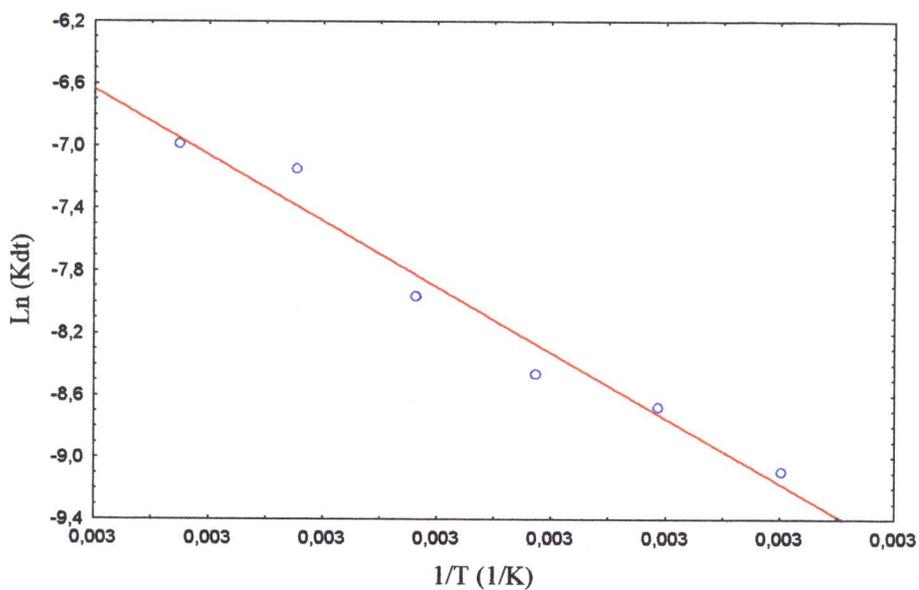


Figura 4.17 - Determinação da energia de ativação (E_6) e da constante (A_6)

3ª) A obtenção da constante de morte como função da concentração de etanol (Kdp) foi feita através de regressão não linear, mantendo-se E_6 constante e variando A_6 e Kdp. Encontrou-se um valor de $A_6 = 1,77 \times 10^{14}$ que se ajustou em todas as temperaturas. Foi notado que Kdp cresceu com o aumento da temperatura. Os valores de Kdp para cada temperatura encontram-se na tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Valores de Kdp (L/g) em função da temperatura.

T (°C)	T (K)	Kdp
30	303	0,301
32	305	0,305
34	307	0,309
36	309	0,369
38	311	0,430
40	313	0,469

A figura 4.18 mostra a relação de Kdp com a temperatura. Testou-se um ajuste exponencial para descrever esse aumento de Kdp com a temperatura. Este ajuste foi escolhido uma vez que há uma tendência geral de que os parâmetros cinéticos variem exponencialmente com a temperatura e também porque os demais ajustes testados não resultaram em uma correlação adequada. A equação 4.4 mostra o modelo encontrado, juntamente com a regressão obtida, onde T é a temperatura em K.

$$Kdp = 1,02 \cdot 10^{-7} e^{0,049T} \quad (4.4)$$

$$r^2 = 0,906$$

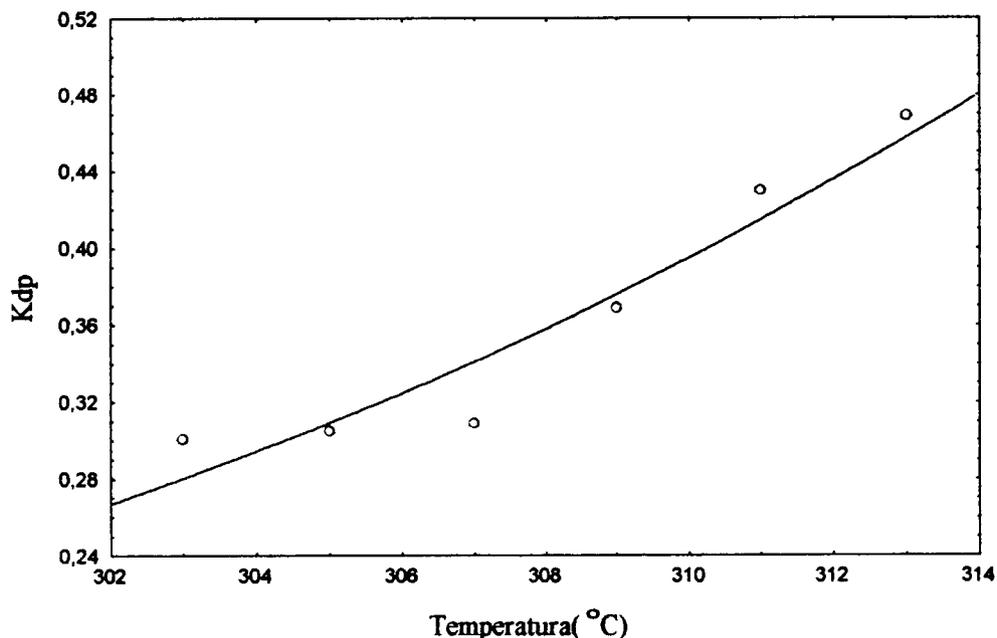


Figura 4.18 - Variação de Kdp com a temperatura

Substituindo-se os valores dos parâmetros E_6 , A_6 e K_{dp} na equação (2.36), obtém-se o seguinte modelo para a cinética de morte celular:

$$\frac{N_v}{N_o} = \exp \left\{ \left[1,77 \cdot 10^{14} \cdot \exp \left(-\frac{41947}{RT} \right) \cdot \exp \left((1,02 \cdot 10^{-7} \cdot e^{0,049 \cdot T}) \cdot P \right) \right] \cdot t \right\} \quad (4.5)$$

A figura 4.19 faz uma comparação entre os dados experimentais e os obtidos pela equação (4.5). Observa-se que para as temperaturas de 30 (a), 32 (b) e 40°C (f), o modelo se ajusta bem. Porém para as temperaturas de 34 (c), 36 (d) e 38°C (e), não há um bom ajuste do modelo. Tal fato pode ser decorrente de erros nas análises de álcool e de viabilidade, pois este modelo é bastante sensível à concentração de etanol.

A obtenção destes dados da cinética de morte celular é importante em projetos de modelagem e otimização de processos de produção de etanol. Recentemente, KALIL (1997), fez um estudo para otimizar um produto industrial e verificou que os resultados obtidos através de simulações estavam muito mais coerentes com aqueles obtidos na prática.

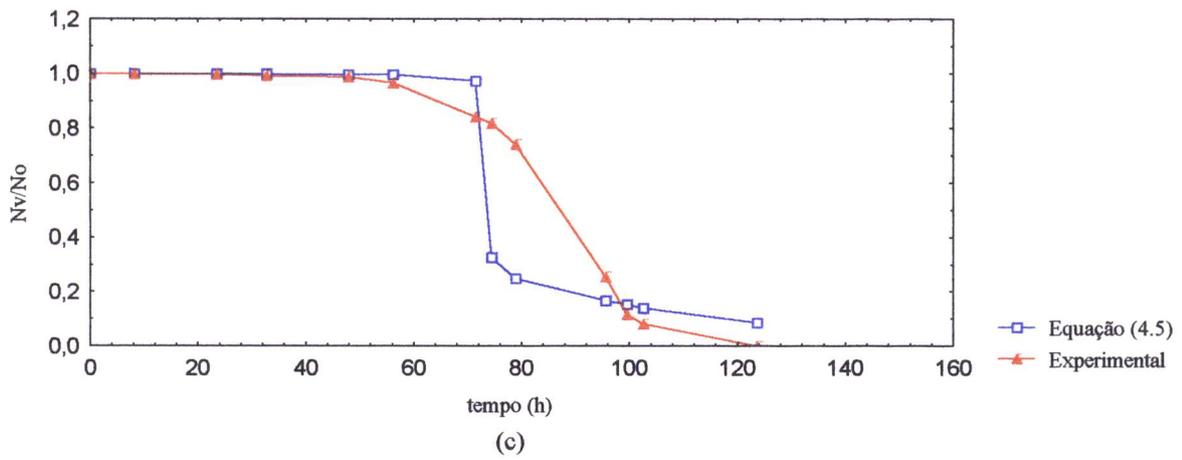
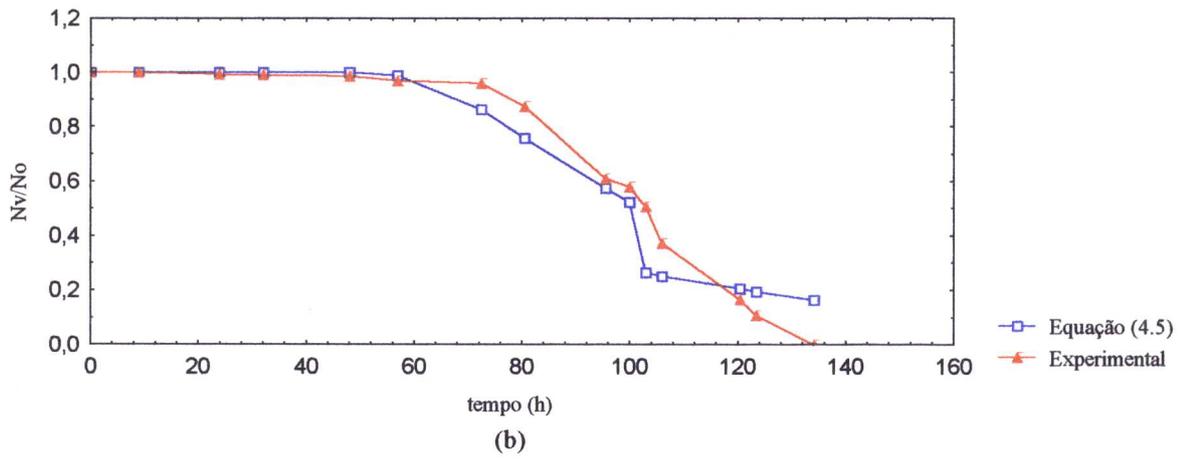
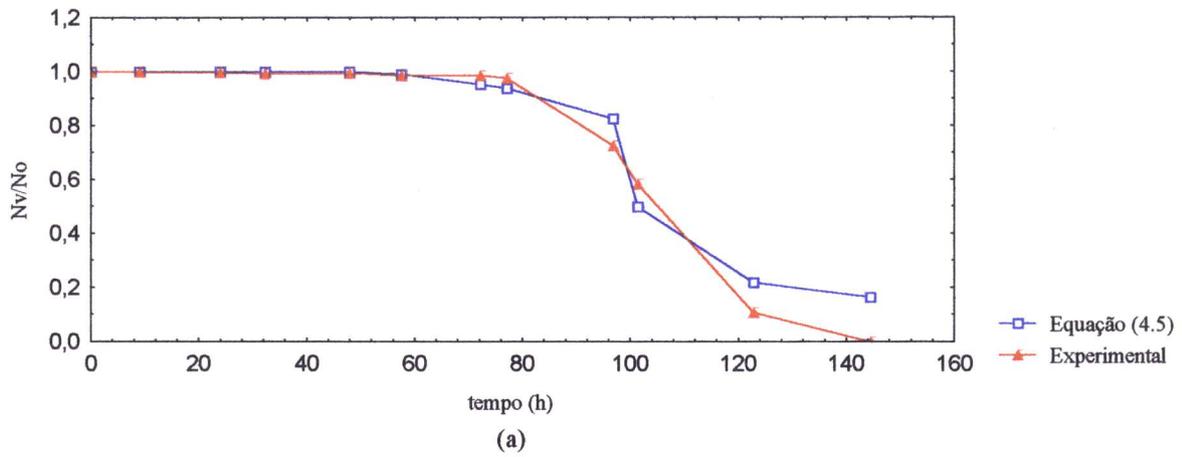


Figura 4.19 - Comparação dos dados de viabilidade para 30°C (a), 32°C (b) e 34°C (c)

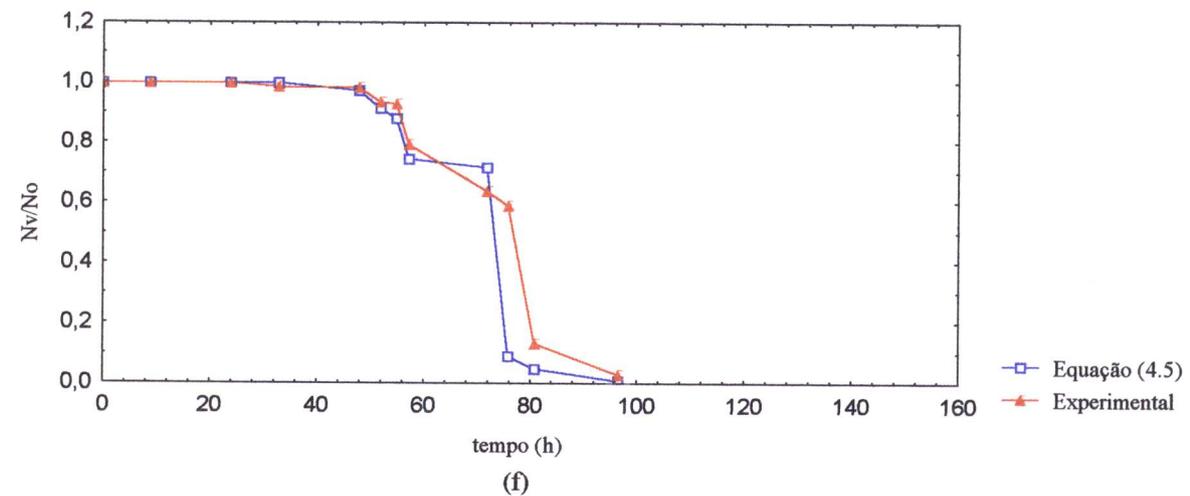
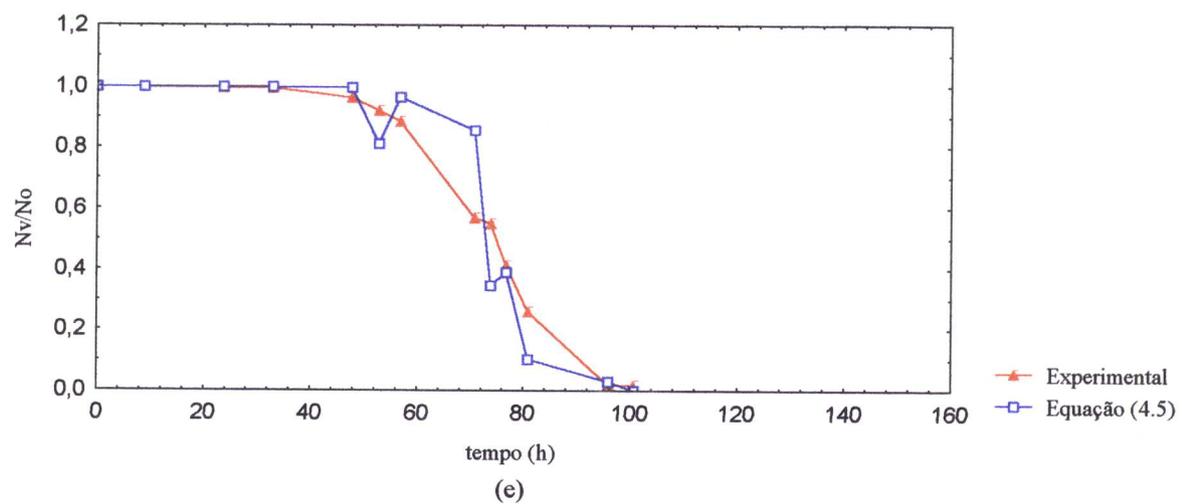
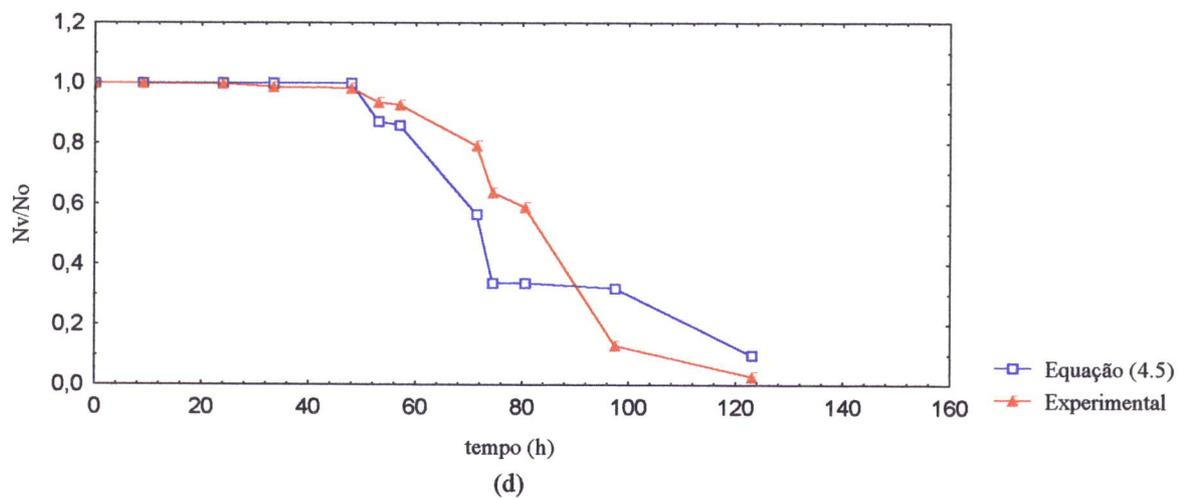


Figura 4.19 - Comparação dos dados de viabilidade para 36°C (d), 38°C (e) e 40°C (f)

5 - CONCLUSÃO

- Verificou-se que o teste de álcool-tolerância só é válido quando realizado em células com viabilidade alta. Observou-se que para viabilidade de 80% os valores de k quase não variaram na faixa de temperatura estudada. Portanto, este teste é interessante a nível de laboratório, onde é possível controlar a viabilidade das células. Porém, ele se torna inviável a nível industrial, se for realizado como acompanhamento da fermentação alcoólica em condições de alta temperatura e alta concentração de etanol, onde as células do microorganismo se encontram numa condição de “stress” com baixa viabilidade. Os valores de k obtidos na viabilidade de 98% aumentaram com a temperatura, mostrando o aumento da sensibilidade das células da levedura para este parâmetro. Foi proposto o seguinte modelo para k em função da temperatura:

$$k = 0,0415 \cdot T - 0,84 \quad , \text{ para } 32 < T < 40^{\circ}\text{C}$$

$$k = 0,485 \quad , \text{ para } 30 < T < 32^{\circ}\text{C}$$

- Os dados de Pm (concentração máxima de etanol acima da qual não há mais crescimento celular), a diferentes temperaturas, mostraram uma tendência a diminuir com a temperatura. Foi proposto o seguinte modelo para Pm:

$$Pm = 5,1 \cdot \exp(0,22 \cdot T - 0,0039 \cdot T^2) \quad , \text{ para } 30 < T < 40^{\circ}\text{C}$$

- Observou-se que a razão de $\Delta \text{CO}_2/\Delta \text{ARTR}$ e a razão de $\Delta \text{CO}_2/\Delta \text{Etanol}$ mantiveram-se constantes na faixa de temperatura estudada, sendo igual a 0,431 g CO_2/g ARTR e 1,238 g CO_2/g Etanol, respectivamente.

- Observou-se que o rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) obtido em fermentação de batelada foi baixo e bem menor que o máximo teórico e que não é influenciado pela temperatura na faixa de 30 a 40°C, sendo igual a 0,354 g Etanol/g ARTR.

- Verificou-se que a produção de CO_2 ao longo da fermentação comportou-se de uma forma semelhante na faixa de 30 a 34°C e, após esta faixa, diminuiu com o aumento da temperatura. O mesmo ocorreu para o consumo de ARTR e a produção de etanol ao longo

da fermentação. A produção de massa seca durante a fermentação alcoólica foi maior quanto menor era a temperatura.

- Obteve-se o seguinte modelo para a cinética de morte celular:

$$\frac{N_v}{N_0} = \exp \left\{ [-1,77 \cdot 10^{14} \cdot \exp \left(-\frac{41947}{RT} \right) \cdot \exp (K_{dp} \cdot P)] \cdot t \right\}$$

onde K_{dp} aumenta exponencialmente com a temperatura, segundo a equação:

$$K_{dp} = 1,02 \cdot 10^{-7} \cdot e^{(0,049 T)} \quad \text{para } 30 < T < 40^\circ\text{C}$$

Observou-se que este modelo ajustou-se bem, de forma geral, para todas as temperaturas, havendo pequena discrepância para as temperaturas de 34, 36 e 38°C. Além disso, notou-se que quanto maior a temperatura, mais brusca é a queda da viabilidade.

- Os resultados obtidos neste trabalho poderão ser muito úteis para a otimização dos processos para a produção de álcool, adequando-se melhor à realidade das condições de operação do nosso país, e visando maior rendimento e produtividade da fermentação alcoólica e menor custo para o processo.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

-Tentar conduzir a fermentação alcoólica de forma a obter uma maior concentração de etanol nas temperaturas de 34 a 40°C, mantendo alta viabilidade, para estudar a álcool-termo-tolerância.

- Tentar um ajuste fenomenológico de k com a concentração de etanol e a temperatura.

- Determinar o valor de P_m para temperaturas abaixo de 30°C para verificar se há a existência de um patamar para P_m em temperaturas mais baixas que a faixa que foi estudada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILERA, A.; BENÍTEZ, T. Synergistic effects of ethanol and temperature on yeast mitochondria. Current Microbiology, New York, v. 18, p. 179-188, 1989.
2. AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 10, p. 845-864, 1968.
3. AIBA, S.; SHODA, M. Reassessment of the product inhibition in alcohol fermentation J. Ferment. Technol., v. 47, p. 790-794, 1969.
4. ALVES, J. G. L. F. Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*. Campinas, 1996. 69 p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
5. ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, J.P. Simulação e modelagem para processo de fermentação alcoólica (I) Batelada alimentada. Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 8, p. 36-40, mai./ago., 1990a.
6. ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, J.P. Simulação e modelagem para processo de fermentação alcoólica (II) Contínua. Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 9, p. 45-51, set./dez., 1990b.
7. ANDRIETTA, S. R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial. Campinas, 1994. 178p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
8. BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2. ed. New York: McGraw-Hill International Editions, 1986. 984 p.
9. BAJPAI, P. K.; MARGARITIS, A. The effect of temperature and pH on ethanol production by free and immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem artichoke extract. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 30, p. 306-313, 1987.

10. BAZUA, C. D.; WILKE, C.R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York, v. 7, p. 105-118, 1977.
11. BEAVEN, M. J.; CHARPENTIER, B. C.; ROSE, A. H. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acy composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. Journal of General Microbiology, v. 128, p. 1447-1455, 1982.
12. BENÍTEZ, T.; CASTILHO, L.; AGUILERRA, A.; CONDE, J.; OLMEDO, E. C. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. Applied and Environmental Microbiology, Washington, D. C., v. 45, n. 5, p. 1429-1436, maio, 1983.
13. BROWN, S. W.; OLIVER, S. G. The effect of temperature on the ethanol tolerance of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters, Kew, v. 4, n. 4, p. 269-274, 1982.
14. CARIOCA, J. O. B.; SELVAM, P. V.; ROCHA, E. S. Análise e perspectivas de processos de fermentação alcoólica. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2. 1985, Maringá. Anais. p. 198-213.
15. CARVALHO, B. S.; ALVES, J. G. L. F.; MAUGERI-FILHO, F. Modelagem de fermentação alcoólica em função da temperatura. In: Simpósio Nacional de Fermentações, 11. 1996, São Carlos. Anais. Universidade Federal de São Carlos, 1996, v.2, p. 658-663.
16. CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity brewing: nutrient enhanced production of high concentration of ethanol by brewing yeast. Biotechnology Letters, Kew, v. 5, n. 6, p. 429-434, 1983.
17. CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, W. M. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. Applied and Environmental Microbiology, Washington, D. C., v. 48, p. 639 - 646, set., 1984.

18. CASEY, G. P.; INGLEDEW, W. M. Reevaluation of alcohol synthesis and tolerance in brewer's yeast. Master Brew. Assoc. Am. (Tech. Q), v. 22, p.133-141, 1985.
19. CASEY, G. P. Fermentation of high gravity worts by *Saccharomyces uvarum* brewers' yeast. Dissertation Abstracts International, v. 46, n. 5, p. 1451-B, nov., 1985.
20. CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR-CTC. Fermentação; 1. ed. São Paulo: CTDI, 1987.
21. CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR-CTC. I reunião técnica sobre fermentação alcoólica; São Paulo: CTDI, 1989.
22. CURTAIN, C. C.; ATWELL, J. L.; LOONEY, F. D.; ZAJAC-CADE, A. Proc. Conv. Inst. Brew. v. 18, p. 236-243, 1985. Apud: Enzyme and Microbial Technology, v. 9, n. 6, p. 322-330, 1987.
23. CYSEWSKI, G. R.; WILKE, C. R. Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 19, n. 8, p. 1125-1143, ago., 1977.
24. DALE, M. C.; CHEN, C.; OKOS, M. R. Cell growth and death rates as factors in the long-term performance, modelling, and design of immobilized cell reactors. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 36, n. 10, p. 983-992, dez., 1990.
25. D'AMORE, T.; STEWART, G. G. Ethanol tolerance of yeast-reviews. Enzyme and Microbial Technology, Stoneham, v. 9, n. 6, p. 322-330, jun., 1987.
26. D'AMORE, S. Improving yeast fermentation performance. Journal of the Institute of Brewing, London, v. 98, p. 375 - 382, set.-out. 1992.
27. FURLAN, E. L. P.; RODRIGUES, M. I. Estudo da influência da temperatura e concentração de etanol: teste de tolerância de etanol em leveduras, Relatório Final / PIBIC-CNPQ, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996.

28. GAO, C.; FLEET, G. H. The effects of temperature and pH on the wine yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. Journal of Applied Bacteriology, v. 65, p. 405-409, jun., 1988.
29. GHOSE, T. K.; TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate - I. Batch versus continuous systems. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 21, p. 1387-1400, 1979a.
30. 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, New York, v. 21, p. 1401-1420, 1979b.
31. GRAY, W. D. J. Bacteriology, v. 42, p. 561-574, 1941. Apud: Enzyme and Microbial Technology, v. 9, n. 6, p. 322-330, 1987.
32. GUIJARRO, J. M.; LAGUNAS, R. J. Bacteriol., v. 160, p. 874, 1984. Apud: Relatório Final / PIBIC-CNPQ, Universidade de Campinas, 1995.
33. HACKING, A. J.; TAYLOR, I. W. F.; HANAS, C. M. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 19, p. 361, 1984. Apud: Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos, p. 40-43, jul-ago, 1991.
34. HINSHELWOOD, C. N. The chemical kinetics of the bacterial cells. Oxford University Press, London, 1946.
35. HOLZBERG, I.; FINN, R. K.; STEINKRAUS, K. H. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 9, p. 413-427, 1967.
36. HUANG, S. Y.; CHEN, J. C. Analyses of the kinetics of ethanol fermentation with *Zymomonas mobilis* considering temperature effect. Enzyme Microb. Technol., v. 10, p. 431-439, jul., 1988.
37. JANSSENS, J. H; BURRIS, N.; WOODWARD, A.; BAILEY, R. B. Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, D. C.; v. 45, n. 2, p. 598-602, fev., 1983.

38. JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at the high yeast concentration. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 34, n. 9, p. 1225-1230, nov., 1989.
39. JIMÉNEZ, J; VAN UDEN, N. Use of extracellular acidification for the rapid testing of ethanol tolerance in yeast. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 27, p. 1596 - 1598, 1985.
40. JIMÉNEZ, J. M.; BENÍTEZ, T. Adaptation of yeast cell membranes to etanol. Applied and Environmental Microbiology, Washington, D. C., v. 53, p 1196 - 1198, maio, 1987.
41. JIMÉNEZ, J; BENÍTEZ, T. Selection of ethanol-tolerant yeast hybrids in pH-regulated continuous culture. Applied and Environmental Microbiology, Washington, D.C., v. 54, n. 4, p. 917 - 922, abr., 1988.
42. KALIL, S. J. Modelagem, simulação e otimização de um processo de fermentação alcoólica contínua com reciclo de células, em reator cascata. Campinas, 1997. 93 p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
43. LALUCE, C.; BERTOLINI, M. C.; ERNANDES, J. R.; MARTINI, A.; MARTINI, A. V. Ann. Microbiol. Enzimol., v. 37, p. 151, 1987. Apud: Stab. Açúcar, e Subprodutos, p. 40-43, jul-ago, 1991.
44. LALUCE, C. Leveduras termotolerantes. Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, p. 40-43, jul.-ago., 1991.
45. LAWFOR, G. R.; LAVERS, B. H.; GOOD, D.; CHARLEY, R.; FEIN, J. Ethanol from Biomass. Duckworth, H. E. & Thompson, E. A., eds. Royal Society of Canada, Ottawa, 1983, p. 482-507. Apud: Enzyme and Microbial Technology, v. 9, n. 6, p. 322-330, 1987.
46. LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta, v. 774, p. 43-48, 1984.

47. LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisae*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 22, p. 359-363, 1986.
48. LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 25, n. 2, p. 497-511, fev., 1983.
49. LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. Biotechnology and Bioengineering Symposium, n. 11, p. 641-649, 1981.
50. LEGMANN, R.; MARGALITH, P. Ethanol formation by hybrid yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 23, p. 198-202, 1986.
51. LEVENSPIEL, O. The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 22, n. 8, p. 1671-1687, ago., 1980.
52. LOUREIRO, V.; FERREIRA, H. G. On the intracellular accumulation of ethanol in yeast. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 25, p. 2263-2269, 1983.
53. LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 27, n. 3, p. 280-285, mar., 1985.
54. MAUGERI-FILHO, F. Modelagem da fermentação alcoólica com alta densidade celular. Relatório Científico Final / Projeto FAPESP; 92/4961-7, Campinas: FEA/UNICAMP, 1995. 36p.
55. MCMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; RATKOWISKY, D. A. In: BAZIN, M. J.; PROSSER, J. I. Physiological Models in Microbiology. CRC Press Boca Raton, 1988. v. 1, p. 75.
56. MILANESE-RUBILAR, A. A.; MAUGERI, F. Modelling alcohol and viability in a cascade reactor with immobilized cells. Revista de Microbiologia, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 79-84, jan./mar., 1990.

57. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chem., v. 31, p. 426-428, 1959.
58. MISHRA, P.; PRASAD, R. Role of phospholipid head groups in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology, London, v. 134, p. 3205-3211, 1988.
59. MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 30, p 294-298, 1989.
60. MOHR, P. W.; KRAWIEC, S. Temperature characteristics and Arrhenius plots for nominal psychrophiles, mesophiles and thermophiles. Journal of General Microbiology, London, v. 121, p 311-317, 1980.
61. MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 22, n. 11, p. 2375-2381, dez., 1980.
62. NABAIS, R. C.; SÁ-CORREIA, I; VIEGAS, C. A.; NOVAIS, S. M. Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. Applied and Environmental Microbiology, Washington, D. C., v. 54, n. 10, p. 2439-2446, out., 1988.
63. NAGODAWITHANA, T. W.; STEINKRAUS, K. H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". Applied and Environmental Microbiology, Washington, D. C., v. 31, n. 2, p. 158 - 162, fev., 1976.
64. NAVARRO, J. M. Fermentation alcoolique: influence des conditions de culture sur l'inhibition par l'ethanol. Cellular and Molecular Biology, Oxford, v.26, n. 2, p. 241-246, 1980.
65. NOVAK, M.; STREHAJANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 23, p. 201-211, 1981.

66. PANCHAL, C. J.; STEWART, G. G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. Journal of the Institute of Brewing, London, v. 86, p. 207-210, set-out, 1980.
67. PANCHAL, C. J.; STEWART, G. G. Ethanol production by a highly flocculent brewing yeaststrain. Dev. Ind. Microbiol., v. 22, p. 711-717, 1981.
68. RAMOS, M. T.; MADEIRA-LOPES, A. Effects of acetic acid on the temperatura profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters, v. 12, n. 3, p. 229-234, jan., 1990.
69. ROGERS, P. L.; LEE, K. L.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E. Adv. Biochem. Eng., v. 23, p. 37-84, 1982. Apud: Enzyme and Microbial Technology, v. 9, n. 6, p. 322-330, 1987.
70. ROSA, M.F.; SÁ-CORREIA, I. In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, Washigton, D. C., v. 57, n. 3, p. 830 - 835, mar., 1991.
71. ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. The Yeasts; Academic Press, Londres., v. 2, 1971.
72. ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. The Yeasts; Academic Press, Londres., v. 3, 1989.
73. SÁ-CORREIA, I; VAN UDEN, N. Ethanol-induced death of *Saccharomyces cerevisiae* at low and intermediate growth temperatures. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 28, n. 2, p. 301 - 303, fev., 1986.
74. SHIMAZU, Y.; WATANABE, M. Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids im must during fermentation. Journal of Fermentation Technology, v. 59, p. 27-32, 1981. Apud: Journal of Applied Bacteriology, v. 65, p. 405-409, 1988.
75. SHU, C. H.; YANG, S. T. Kinetics and modeling of temperature effects on batch xantham gum fermentation. Biotechnology and Bioengineering., v. 37, p. 567-574, mar., 1991.

76. SINCLAIR, C. G.; KRISTIANSEN, B. Fermentation Kinetics and Modelling. New York: Taylor & Francis, 1987. 113 p. (Open University Press Biotechnology Series).
77. SOUFLEROS, E.; BERTRAND, A. Connaissance Vigne Vin, v. 13, p. 181-198, 1979. Apud: Journal of applied Bacteriology, v. 65, p. 405-409, 1988.
78. STEWART, G.G.; RUSSEL, I. Yeast genetics: fundamental and applied aspects; Springer-Verlog, N.Y., p. 461-484, 1983.
79. TROYER, J. R. Ohio J. Sci., v. 55, p. 185, 187, 1955. Apud: Enzyme and Microbial Technology, v. 9, n. 6, p. 322-330, 1987.

**APÊNDICE A : RESULTADOS OBTIDOS DURANTE A
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Tabela A1: Resultados da fermentação alcoólica para T = 30°C (Teste A)

Tempo (h)	Meio (g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab. (%)	dens. (g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	307,7	0,0	89,04	0,99	100,00	1085,93	25,23	0,28	1,57	0,44
1,00	307,6	0,1								
2,00	307,5	0,2								
3,00	307,3	0,4								
4,00	307,0	0,7								
5,00	306,3	1,4								
6,00	305,3	2,4								
7,00	303,9	3,8								
8,00	302,4	5,3								
9,00	300,6	7,1	25,16	21,60	100,00	1045,82	7,23	6,21	8,42	2,42
9,12	337,3	7,1	110,18	19,43		1099,20	33,81	5,96		
23,97	325,7	18,7	8,88	48,80	99,78	1035,60	2,79	15,35	12,58	3,96
24,10	372,0	18,7	97,69	49,75		1091,36	33,30	16,96		
25,20	371,0	19,7								
26,20	369,4	21,3								
27,20	367,8	22,9								
28,20	366,4	24,3								
29,20	365,0	25,7								
30,20	363,7	27								
31,20	362,8	27,9								
32,20	362,0	28,7	21,37	69,02	99,64	1043,44	7,41	23,95	14,58	5,06
47,93	349,3	29,9	13,03	82,19	99,36	1038,21	4,38	27,65	14,28	4,80
48,05	395,0	29,9	97,48	62,39		1091,23	35,29	22,59		
49,07	394,2	30,7								
50,00	393,3	31,6								
51,00	392,4	32,5								
52,00	391,6	33,3								
53,00	390,8	34,1								
54,00	390,0	34,9								
55,00	389,4	35,5								
56,00	388,7	36,2								
57,45	387,9	37,0	45,83	87,08	98,91	1058,80	16,79	31,90	14,09	5,16
72,23	372,4	41,8	16,86	96,39	98,72	1040,61	6,03	34,50	14,11	5,05
73,25	361,8	41,9								
74,25	361,7	42,0								
75,25	361,6	42,1								
76,17	361,5	42,2								
77,17	361,5	42,2			97,71					
78,17	356,2	42,2								
79,17	356,1	42,3								
80,75	356,1	42,3								
96,80	355,7	42,7	16,26	100,69	83,61	1040,24	5,56	34,43	14,00	4,79
98,05	345,2	42,8								

Tabela A2: Resultados da fermentação alcoólica para T = 30°C (Teste B)

Tempo (h)	Meio (g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab. (%)	dens. (g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	308,0	0,0	93,70	2,83	100,00	1088,85	26,50	0,80	1,61	0,46
1,00	307,9	0,1								
2,00	307,8	0,2								
3,00	307,6	0,4								
4,00	307,3	0,7								
5,00	306,6	1,4								
6,00	305,6	2,4								
7,00	304,2	3,8								
8,00	302,6	5,4								
9,00	300,9	7,1	25,24	25,96	100,00	1045,87	7,26	7,47	8,23	2,37
9,12	337,1	7,1	104,33	20,72		1095,53	32,10	6,37		
23,97	325,8	18,4	9,04	45,29	99,80	1035,70	2,84	14,24	12,92	4,06
24,10	371,8	18,4	93,83	43,84		1088,93	32,03	14,97		
25,20	371,0	19,2								
26,20	369,4	20,8								
27,20	367,7	22,5								
28,20	366,1	24,1								
29,20	364,7	25,5								
30,20	363,5	26,7								
31,20	362,5	27,7								
32,20	361,6	28,6	23,83	78,74	99,37	1044,99	8,24	27,24	14,95	5,17
47,93	348,8	30,2	13,39	78,86	99,60	1038,43	4,50	26,48	14,11	4,74
48,05	394,2	30,2	93,83	69,97		1088,93	33,96	25,33		
49,07	393,4	31,0								
50,00	392,5	31,9								
51,00	391,6	32,8								
52,00	390,7	33,7								
53,00	390,0	34,4								
54,00	389,2	35,2								
55,00	388,6	35,8								
56,00	387,9	36,5								
57,45	387,0	37,4	48,22	89,93	98,61	1060,30	17,60	32,82	14,07	5,13
72,23	371,6	42,2	17,22	94,35	98,63	1040,84	6,15	33,68	14,45	5,16
73,25	360,9	42,3								
74,25	360,8	42,4								
75,25	360,7	42,5								
76,17	360,6	42,6								
77,17	360,5	42,7			97,63					
78,17	355,3	42,8								
79,17	355,2	42,9								
80,75	355,1	43,4								
96,80	354,6	43,5	16,78	97,88	72,59	1040,56	5,72	33,35	12,95	4,41
98,05	344,1	43,5								
99,47	344,1	43,5								
101,42	344,1	43,5	16,58	105,02	58,44	1040,44	5,48	34,73	12,54	4,15
122,85	333,3	43,9	16,58	103,99	10,71	1040,44	5,31	33,31		
144,43	322,4	44,3	16,66	88,66	0,00	1040,49	5,16	27,47		

Tabela A3: Resultados da fermentação alcoólica para T = 32°C (Teste A)

Tempo (h)	Meio (g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab. (%)	dens. (g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	310,0	0,0	94,66	2,88	100,00	1089,46	26,94	0,82	1,37	0,39
0,95	310,0	0,0								
1,95	309,9	0,1								
2,95	309,7	0,3								
3,95	309,1	0,9								
4,95	308,2	1,8								
5,95	306,9	3,1								
6,95	305,1	4,9								
7,95	303,1	6,9								
8,95	301,4	8,6	9,77	30,61	100,00	1036,16	2,84	8,90	9,48	2,76
9,08	337,8	8,6	96,07	27,46		1090,34	29,76	8,51		
23,77	326,6	19,8	10,13	57,97	99,76	1036,39	3,19	18,27	12,84	4,05
23,95	372,6	19,8	103,83	52,09		1095,21	35,32	17,72		
24,95	371,2	21,2								
25,95	369,6	22,8								
26,95	368,0	24,4								
27,95	366,5	25,9								
28,95	365,3	27,1								
29,95	364,2	28,2								
30,95	363,3	29,1								
31,95	362,5	29,9	27,20	73,03	99,16	1047,10	9,42	25,28	13,38	4,63
47,98	349,8	32,0	15,63	78,93	98,42	1039,84	5,26	26,55	13,42	4,51
48,12	395,5	32,0	101,94	66,28		1094,03	36,85	23,96		
49,00	394,9	32,6								
49,98	394,2	33,3								
50,95	393,5	34,0								
51,95	392,7	34,8								
52,95	392,0	35,5								
53,95	391,3	36,2								
54,95	390,6	36,9								
55,95	390,0	37,5								
56,95	389,4	38,1	40,81	85,56	98,25	1055,65	15,05	31,56	13,70	5,05
72,47	373,5	43,4	23,50	95,57	95,68	1044,78	8,40	34,17	13,78	4,93
73,45	362,8	43,5								
74,45	362,8	43,5								
75,45	362,7	43,6								
76,45	362,6	43,7								
77,45	362,6	43,7								
78,45	362,5	43,8								
79,45	362,5	43,8								
80,45	362,4	43,9	21,27	97,38	89,58	1043,38	7,39	33,82		
95,53	351,5	44,4	19,05	100,77	57,32	1041,99	6,43	33,99		
97,05	341,0	44,5								

Tabela A4: Resultados da fermentação alcoólica para T = 32°C (Teste B)

Tempo (h)	Meio (g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab.(%)	dens. (g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	310,8	0,0	91,37	3,04	100,00	1087,39	26,12	0,87	1,43	0,41
0,95	310,7	0,1								
1,95	310,6	0,2								
2,95	310,4	0,4								
3,95	309,9	0,9								
4,95	309,0	1,8								
5,95	307,7	3,1								
6,95	306,1	4,7								
7,95	304,2	6,6								
8,95	302,4	8,4	12,24	30,17	100,00	1037,71	3,57	8,79	9,41	2,74
9,08	338,3	8,4	103,83	25,89		1095,21	32,07	8,00		
23,77	327,5	19,2	9,77	59,19	99,45	1036,16	3,09	18,71	12,90	4,08
23,95	373,7	19,2	101,47	50,14		1093,73	34,67	17,13		
24,95	372,3	20,6								
25,95	370,6	22,3								
26,95	369,0	23,9								
27,95	367,6	25,3								
28,95	366,4	26,5								
29,95	365,3	27,6								
30,95	364,3	28,6								
31,95	363,5	29,4	28,61	75,07	99,07	1047,99	9,92	26,04	13,34	4,63
47,98	351,1	31,2	14,08	79,56	98,70	1038,87	4,76	26,89	13,40	4,53
48,12	397,2	31,2	105,00	69,65		1095,95	38,05	25,24		
49,00	396,6	31,8								
49,98	395,8	32,6								
50,95	395,1	33,3								
51,95	394,3	34,1								
52,95	393,6	34,8								
53,95	392,9	35,5								
54,95	392,3	36,1								
55,95	391,7	36,7								
56,95	391,1	36,3	42,69	87,93	97,03	1056,83	15,80	32,54	13,59	5,03
72,47	375,1	41,7	23,18	95,80	95,96	1044,58	8,32	34,40	13,66	4,90
73,45	364,4	42,0								
74,45	364,3	42,1								
75,45	364,3	42,1								
77,45	364,3	42,1								
79,45	364,2	42,2								
80,45	364,2	42,2	20,78	100,88	87,63	1043,07	7,26	35,22		
95,53	353,4	42,5	18,66	99,30	61,14	1041,74	6,33	33,69		
97,05	342,9	42,5								
99,95	342,8	42,6	18,17	99,68	57,98	1041,44	5,98	32,81		
102,95	332,3	42,6	18,38	102,44	50,79	1041,57	5,86	32,68		
105,95	321,8	42,6	18,25	101,98	37,47	1041,49	5,64	31,51		
120,47	311,2	42,8	17,46	102,43	16,77	1040,99	5,22	30,62		
123,45	300,7	42,8	17,53	101,95	10,85	1041,03	5,06	29,45		
134,08	290,2	42,9	17,47	102,08	0,00	1041,00	4,87	28,46		

Tabela A5: Resultados da fermentação alcoólica para T = 34°C (Teste A)

Tempo (h)	Meio (g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab.(%)	dens.(g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	307,7	0,0	82,01	1,09	100,00	1081,51	23,33	0,31	1,68	0,48
1,00	307,7	0,0								
2,00	307,6	0,1								
3,17	307,1	0,6								
4,17	306,3	1,4								
5,17	304,9	2,8								
6,17	303,2	4,5								
7,17	301,3	6,4								
8,17	299,3	8,4	11,93	28,18	100,00	1037,52	3,44	8,13	8,83	2,55
8,37	336,3	8,4	89,51	22,32		1086,22	27,71	6,91		
23,50	325,2	19,5	8,69	43,13	99,58	1035,48	2,73	13,54	11,83	3,71
23,67	361,8	19,5	90,03			1086,55	29,97			
24,67	360,5	20,8								
25,67	359,0	22,3								
26,67	357,6	23,7								
27,67	356,4	24,9								
28,67	355,3	26,0								
29,67	354,4	26,9								
30,67	353,5	27,8								
31,67	352,8	28,5								
32,67	352,1	29,2	23,03	68,67	98,93	1044,49	7,76	23,15	13,38	4,51
47,83	339,3	31,5	14,38	80,93	99,08	1039,06	4,70	26,42	12,54	4,09
47,91	385,7	31,5	87,87	64,62		1085,19	31,23	22,96		
48,91	385,3	31,9								
49,91	384,8	32,4								
50,91	384,3	32,9								
51,99	383,6	33,6								
53,16	382,9	34,3								
54,36	382,3	34,9								
55,16	381,9	35,3								
56,16	381,4	35,8	57,96		95,68	1066,42	20,73		12,36	4,42
71,50	365,2	41,4	27,43	88,16	86,39	1047,25	9,56	30,74	12,28	4,28
72,62	354,2	41,7								

Tabela A6: Resultados da fermentação alcoólica para T = 34°C (Teste B)

Tempo (h)	meio (g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab. (%)	dens.(g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	307,9	0,0	81,40	1,03	100,00	1081,13	23,18	0,29	1,53	0,44
1,00	307,8	0,1								
2,00	307,7	0,2								
3,17	307,3	0,6								
4,17	306,5	1,4								
5,17	305,2	2,7								
6,17	303,5	4,4								
7,17	301,7	6,2								
8,17	299,8	8,1	12,34	25,76	100,00	1037,78	3,56	7,44	8,72	2,52
8,37	337,1	8,1	88,64	21,12		1085,68	27,52	6,56		
23,50	325,9	19,3	7,63	54,74	99,74	1034,82	2,40	17,24	11,89	3,74
23,67	362,2	19,3	81,55	51,28		1081,23	27,32	17,18		
24,67	360,9	20,6								
25,67	359,4	22,1								
26,67	358,1	23,4								
27,67	356,9	24,6								
28,67	355,9	25,6								
29,67	355,0	26,5								
30,67	354,2	27,3								
31,67	353,4	28,1								
32,67	352,8	28,7	21,97	79,69	99,29	1043,82	7,43	26,94	12,52	4,23
47,83	340,7	30,3	10,87	81,26	98,78	1036,85	3,57	26,70	12,77	4,20
47,91	386,8	30,3	83,40	65,52		1082,39	29,80	23,41		
48,91	386,3	30,8								
49,91	385,7	31,4								
50,91	385,1	32,0								
51,99	384,4	32,7								
53,16	383,6	33,5								
54,36	383,0	34,1								
55,16	382,7	34,4								
56,16	382,0	35,1	58,27	79,54	96,79	1066,61	20,87	28,49	12,30	4,41
71,50	365,0	41,5	27,56	87,04	84,30	1047,33	9,61	30,33	12,64	4,41
72,62	354,0	41,8								
74,45	353,7	42,1	24,19	99,03	81,95	1045,21	8,19	33,51		
76,67	342,8	42,5								
77,67	342,6	42,7								
78,95	342,5	42,8	19,84	101,53	74,30	1042,48	6,52	33,36		
95,58	331,2	43,6	18,13	99,73	25,61	1041,41	5,77	31,72		
96,58	320,7	43,6								
97,58	320,7	43,6								
99,58	320,6	43,7	16,47		11,66	1040,37	5,08			
102,58	310,2	43,7	15,81	98,80	8,13	1039,95	4,72	29,47		
123,70	299,7	43,7	17,39	96,51	0,00	1040,95	5,01	27,79		

Tabela A7: Resultados da fermentação alcoólica para T = 36°C (Teste A)

Tempo (h)	Meio (g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab.(%)	dens.(g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	303,4	0,0	82,57	2,73	100,00	1081,87	23,16	0,77	1,40	0,39
1,03	303,2	0,2								
2,03	303,0	0,4								
3,03	302,6	0,8								
4,03	301,7	1,7								
5,03	300,5	2,9								
6,03	298,8	4,6								
7,03	297,1	6,3								
8,03	295,3	8,1								
9,03	294,2	9,2	5,34	31,77	100,00	1033,38	1,52	9,05	8,77	2,50
9,15	331,1	9,2	92,73	20,01		1088,24	28,22	6,09		
23,87	320,9	19,4	10,15	42,75	99,86	1036,40	3,14	13,24	11,03	3,42
24,30	356,4	19,4	92,41			1088,04	30,27			
25,30	355,4	20,4								
26,30	354,4	21,4								
27,30	353,4	22,4								
28,30	352,6	23,2								
29,30	351,9	23,9								
30,30	351,2	24,6								
31,30	350,6	25,2								
32,30	350,0	25,8								
33,30	349,5	26,3	46,29	57,66	97,49	1059,09	15,28	19,03	11,48	3,79
47,97	334,4	30,6	15,34	74,48	98,09	1039,66	4,93	23,96	11,74	3,78
48,16	370,0	30,6	95,43	58,36		1089,94	32,40	19,81		
49,04	369,7	30,9								
50,04	369,3	31,3								
51,04	369,0	31,6								
52,04	368,7	31,9								
53,04	368,4	32,2	86,22	74,99	96,17	1084,16	29,30	25,48	11,27	3,83
54,04	357,5	32,5								
55,04	357,2	32,8								
56,04	357,0	33,0								
57,04	356,7	33,3			94,62				11,87	
71,48	342,6	36,6	52,88	80,48	83,77	1063,23	17,04	25,94	11,03	3,55
72,58	331,7	36,8								

Tabela A8 : Resultados da fermentação alcoólica para T = 36°C (Teste B)

Tempo (h)	Meio (g)	CO2(g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab.(%)	dens. (g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	304,1	0,0	86,7	2,88	100,00	1084,46	24,31	0,81	1,62	0,45
1,03	304,0	0,1								
2,03	303,8	0,3								
3,03	303,4	0,7								
4,03	302,5	1,6								
5,03	301,2	2,9								
6,03	299,5	4,6								
7,03	297,7	6,4								
8,03	295,8	8,3								
9,03	294,4	9,7	4,86	31,71	100,00	1033,08	1,39	9,04	9,24	2,63
9,15	330,6	9,7	86,22	20,46		1084,16	26,29	6,24		
23,87	319,7	20,6	9,78	39,44	99,85	1036,17	3,02	12,17	10,88	3,36
24,30	355,7	20,6	87,65			1085,05	28,73			
25,30	354,7	21,6								
26,30	353,6	22,7								
27,30	352,6	23,7								
28,30	351,7	24,6								
29,30	351,0	25,3								
30,30	350,3	26,0								
31,30	349,6	26,7								
32,30	349,0	27,3								
33,30	348,4	27,9	40,15	57,09	98,68	1055,23	13,26	18,85	11,80	3,90
47,97	333,7	32,1	14,43	82,56	98,31	1039,09	4,63	26,51	11,98	3,85
48,16	369,0	32,1	91,78	61,08		1087,65	31,14	20,72		
49,04	368,7	32,4								
50,04	368,4	32,7								
51,04	368,1	33,0								
52,04	367,8	33,3								
53,04	367,5	33,6	81,62	76,96	93,58	1081,27	27,74	26,16	11,33	3,85
54,04	356,5	33,9								
55,04	356,2	34,2								
56,04	355,9	34,5								
57,04	355,7	34,7			92,93				11,59	
71,48	341,8	37,8	47,32		79,32	1059,74	15,26		11,05	3,56
72,58	330,9	38,0								
74,53	330,6	38,3	42,24	81,64	63,96	1056,55	13,22	25,55	11,09	3,47
75,53	319,7	38,5								
76,53	319,6	38,6								
77,53	319,4	38,8								
78,53	319,3	38,9								
79,53	319,2	39,0								
80,53	319,1	39,1	41,67		58,99	1056,19	12,59			
97,36	307,4	40,3	37,17	81,04	13,36	1053,36	10,85	23,65		
98,36	286,6	40,4								
123,00	285,8	41,2	36,39	82,32	2,96	1052,87	9,88	22,35		
124,03	284,8	41,2								

Tabela A9 : Resultados da fermentação alcoólica para T = 38°C (Teste A)

Tempo (h)	Meio (g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab. (%)	dens. (g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	308,2	0,0	80,87	1,04	100,00	1080,80	23,06	0,30	1,53	0,44
0,90	308,1	0,1								
1,90	307,9	0,3								
2,90	307,5	0,7								
3,95	306,6	1,6								
4,90	305,6	2,6								
5,90	304,4	3,8								
6,90	302,9	5,3								
7,90	301,5	6,7								
8,90	300,1	8,1	15,55	22,29	100,00	1039,79	4,49	6,43	7,75	2,24
9,02	335,8	8,1	84,66	24,14		1083,18	26,24	7,48		
23,67	324,0	19,9	9,73	57,98	99,40	1036,14	3,04	18,13	10,02	3,13
23,80	359,7	19,9	81,14	48,53		1080,97	27,00	16,15		
24,90	358,9	20,7								
25,90	358,3	21,3								
26,90	357,7	21,9								
27,90	357,1	22,5								
28,90	356,7	22,9								
29,90	356,2	23,4								
30,90	355,7	23,9								
31,90	355,3	24,3								
32,90	355,0	24,6	51,97	62,39	99,62	1062,65	17,36	20,84	10,10	3,37
47,78	340,0	28,9	25,36	67,01	98,58	1045,95	8,24	21,78	10,36	3,37
47,93	376,3	28,9	94,84	55,48		1089,57	32,75	19,16		
48,90	376,1	29,1								
49,90	375,9	29,3								
50,90	375,7	29,5								
51,90	375,5	29,7								
52,90	375,4	29,8	83,85	60,01	93,33	1082,67	29,07	20,81		
53,90	364,3	30,0								
54,90	364,2	30,1								
55,90	364,0	30,3								
56,90	363,8	30,5	81,41	63,96	87,74	1081,14	27,39	21,52	9,97	3,35
70,78	351,6	31,9	77,34	71,57	59,89	1078,58	25,21	23,33	9,33	3,04
71,8	340,5	32,0								

Tabela A10 : Resultados da fermentação alcoólica para T = 38°C (Teste B)

Tempo (h)	Meio (g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab.(%)	dens. (g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	309,5	0,0	83,72	1,40	100,00	1082,59	23,93	0,40	1,55	0,44
0,90	309,4	0,1								
1,90	309,2	0,3								
2,90	308,8	0,7								
3,95	307,9	1,6								
4,90	306,8	2,7								
5,90	305,5	4,0								
6,90	303,8	5,7								
7,90	302,3	7,2								
8,90	300,8	8,7	14,62	27,48	100,00	1039,21	4,23	7,95	7,99	2,31
9,02	335,9	8,7	87,65	23,03		1085,05	27,13	7,13		
23,67	323,8	20,8	10,30	46,50	99,81	1036,49	3,22	14,53	10,68	3,34
23,80	359,3	20,8	80,32	45,27		1080,45	26,71	15,05		
24,90	358,6	21,5								
25,90	357,8	22,3								
26,90	357,1	22,9								
27,90	356,5	23,5								
28,90	355,9	24,1								
29,90	355,4	24,6								
30,90	354,8	25,2								
31,90	354,3	25,7								
32,90	353,9	26,1	48,31	53,50	99,64	1060,36	16,12	17,85	10,64	3,55
47,78	338,5	30,9	19,20	73,97	96,44	1042,08	6,24	24,03	10,30	3,35
47,93	375,0	30,9	81,82			1081,39	28,37			
48,90	374,8	31,1								
49,90	374,5	31,4								
50,90	374,2	31,7								
51,90	374,0	31,9								
52,90	373,8	32,1	79,51	65,43	92,28	1079,94	27,52	22,65	9,61	
53,90	362,7	32,3								
54,90	362,5	32,5								
55,90	362,3	32,7								
56,90	362,1	32,9	73,03	61,09	88,67	1075,88	24,58	20,56	10,02	3,37
70,78	348,9	35,4	75,03	64,06	57,18	1077,13	24,30	20,75	9,30	3,01
71,80	338,0	35,6								
73,07	337,9	35,7								
73,90	337,8	35,8	71,64	68,48	55,21	1075,00	22,51	21,52		
74,90	327,0	35,9								
75,77	326,9	35,9								
76,85	326,9	35,9	64,99	68,10	41,45	1070,83	19,84	20,79		
77,85	316,2	35,9								
79,90	316,0	36,1								
80,90	316,0	36,1	65,94	70,04	26,08	1071,43	19,45	20,66		
95,93	304,7	36,7	68,58	70,61	2,12	1073,08	19,47	20,05		
96,93	294,1	36,7								
97,90	294,0	36,8								
98,90	294,0	36,8								
100,70	294,0	36,8	66,62	71,72	1,96	1071,85	18,27	19,67		

Tabela A11 - Resultados da fermentação alcoólica para T = 40°C (Teste A)

Tempo (h)	Meio(g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab. (%)	dens. (g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	305,3	0,0	89,58	0,89	100,00	1086,27	25,17	0,25	1,48	0,42
0,88	305,1	0,2								
1,88	305,0	0,3								
2,88	304,6	0,7								
3,88	304,0	1,3								
4,88	303,3	2,0								
6,05	302,3	3,0								
6,91	301,6	3,7								
7,89	300,8	4,5								
8,89	300,0	5,3	43,35	14,97	99,60	1057,24	12,30	4,25	4,10	1,16
9,05	335,9	5,3	119,22	12,05		1104,87	36,24	3,66		
23,90	325,8	15,4	44,7	36,88	98,92	1058,09	13,76	11,35	6,20	1,91
24,06	370,7	15,4	117,3	36,36		1103,67	39,40	12,21		
24,88	370,3	15,8								
25,88	369,8	16,3								
26,91	369,2	16,9								
27,88	368,7	17,4								
28,88	368,3	17,8								
29,80	367,8	18,3								
30,88	367,4	18,7								
31,88	367,0	19,1								
32,88	366,7	19,4	97,82	39,51	95,40	1091,44	32,86	13,27	6,36	2,14
47,90	351,8	23,6	63,79	50,63	89,24	1070,08	20,97	16,64	6,74	2,22
48,05	394,7	23,6	116,58	47,67		1103,22	41,71	17,05		
48,88	394,5	23,8								
49,88	394,3	24,0								
50,93	394,1	24,2								
51,88	393,9	24,4			82,20				6,80	
52,95	382,9	24,5								
53,28	382,8	24,6	95,19	45,30		1089,79	33,43	15,91		

Tabela A12 - Resultados da fermentação alcoólica para T = 40°C (Teste B)

Tempo (h)	Meio (g)	CO2 (g)	ARTR (g/l)	Etanol (g/l)	Viab. (%)	dens. (g/l)	g ARTR	g Etanol	MS(g/l)	g MS
0,00	305,9	0,0	88,55	1,08	100,00	1085,62	24,95	0,30	1,48	0,42
0,88	305,8	0,1								
1,88	305,6	0,3								
2,88	305,2	0,7								
3,88	304,6	1,3								
4,88	303,7	2,1								
6,05	302,6	3,3								
6,91	301,8	4,1								
7,89	300,9	5,0								
8,89	299,9	6,0	38,91	19,67	100,00	1054,46	11,07	5,59	4,72	1,34
9,05	335,9	6,0	107,91	14,09		1097,77	33,02	4,31		
23,90	325,0	16,9	29,50	41,44	99,21	1048,55	9,14	12,85	6,84	2,12
24,06	369,7	16,9	109,93	36,72		1099,04	36,98	12,35		
24,88	369,3	17,3								
25,88	368,7	17,9								
26,91	368,0	18,6								
27,88	367,5	19,1								
28,88	366,9	19,7								
29,80	366,4	20,2								
30,88	365,9	20,7								
31,88	365,4	21,2								
32,88	365,0	21,6	88,70	46,38	96,76	1085,71	29,82	15,59	6,80	2,29
47,90	349,5	26,4	52,65	55,53	86,48	1063,08	17,31	18,26	7,15	2,35
48,05	394,8	26,4	116,24	49,36		1103,00	41,61	17,67		
48,88	394,6	26,6								
49,88	394,5	26,7								
50,93	394,3	26,9								
51,88	394,1	27,1	114,14	57,86	76,67	1101,69	40,83	20,70	6,99	
52,95	383,3	27,2								
54,98	383,1	27,5			73,46					
55,91	382,8	27,7								
57,23	371,6	27,9	108,87	60,19	65,42	1098,38	36,83	20,36		
71,95	359,1	29,4	97,64	59,97	25,07	1091,33	32,13	19,73		
72,85	348,3	29,5								
73,78	348,2	29,6								
74,78	348,2	29,6								
75,88	348,1	29,7	97,47	64,06	15,49	1091,22	31,09	20,44		
76,78	337,5	29,7								
77,78	337,4	29,8								
78,78	337,3	29,9								
79,78	337,3	29,9								
80,95	337,3	29,9	94,30	64,41	2,55	1089,23	29,20	19,95		
96,51	315,9	30,1	95,36	65,02	0,00	1089,90	27,64	18,85		

**APÊNDICE B: FIGURAS COMPLEMENTARES DA EVOLUÇÃO DA
FERMENTAÇÃO OBTIDAS PARA AS DIFERENTES
TEMPERATURAS**

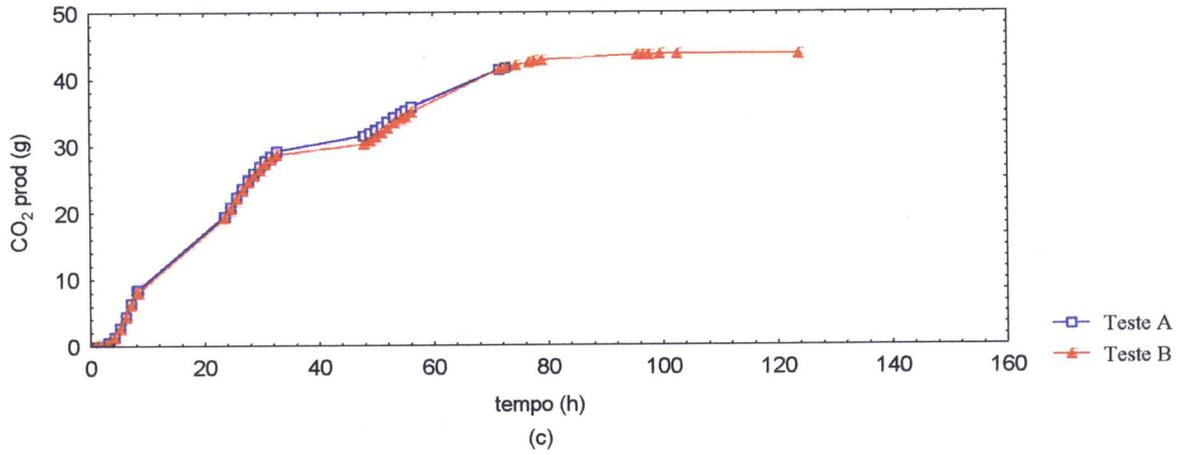
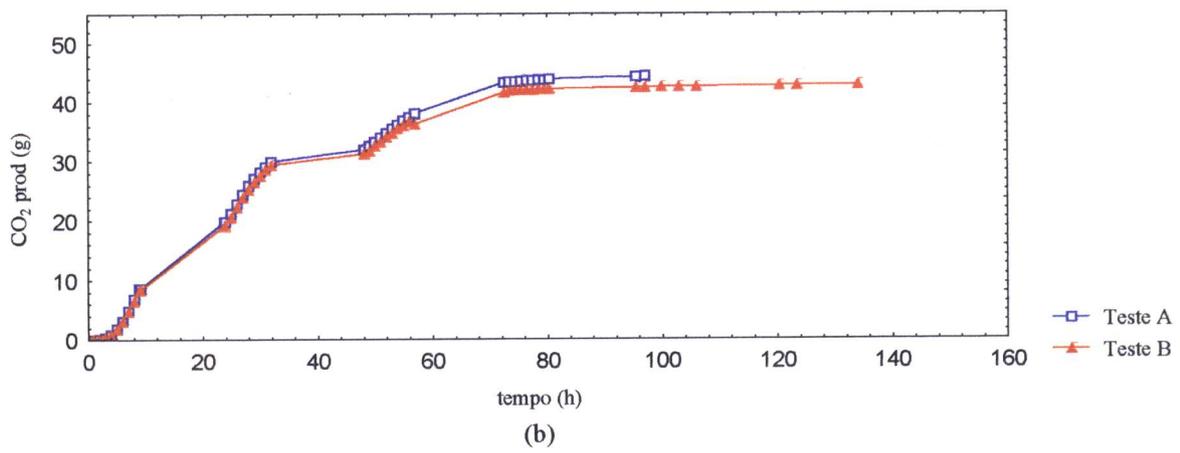
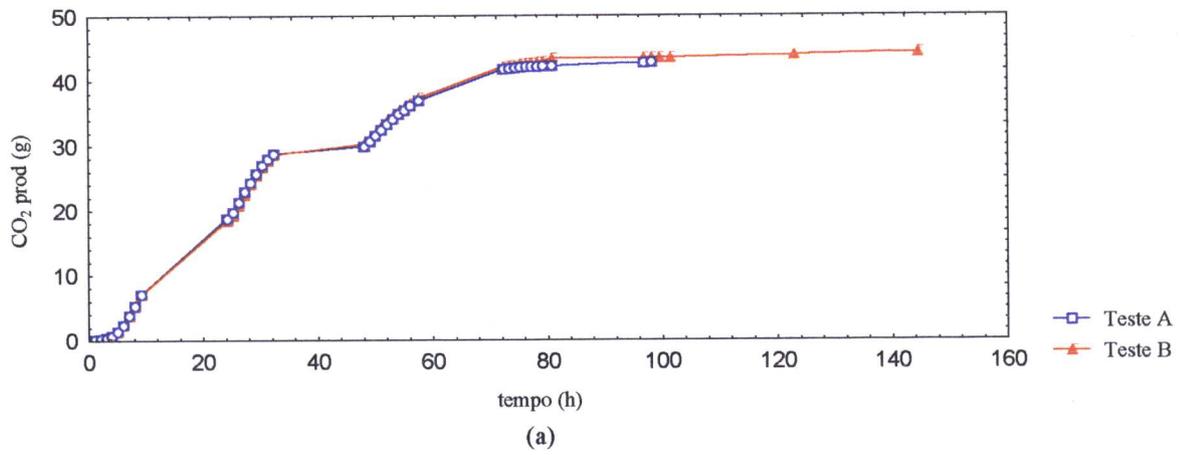


Figura B1 - Produção de CO₂ com o tempo para 30°C (a), 32°C (b) e 34°C (c)

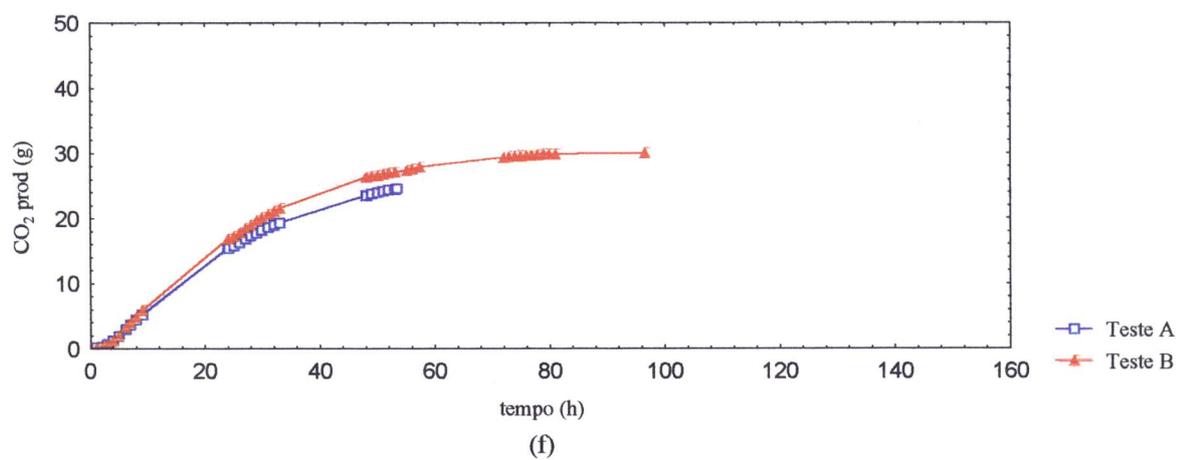
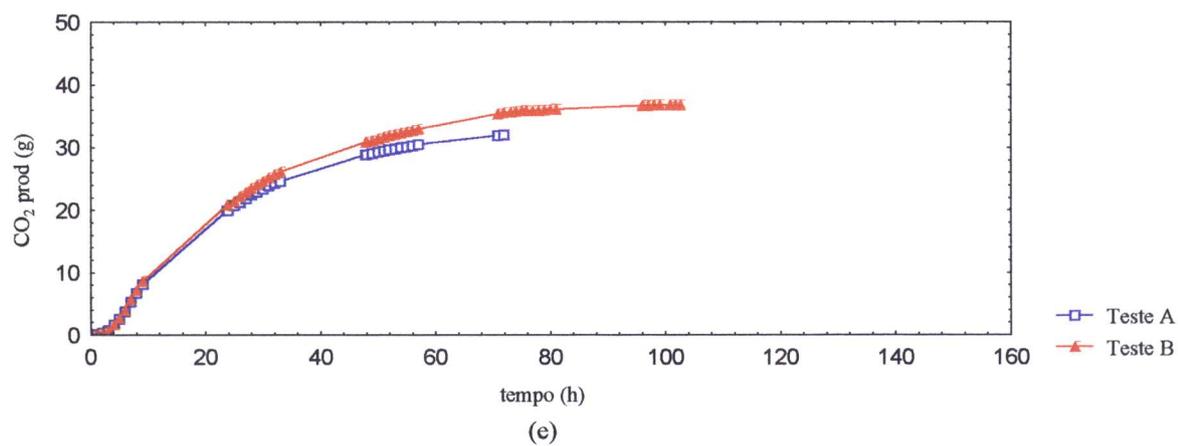
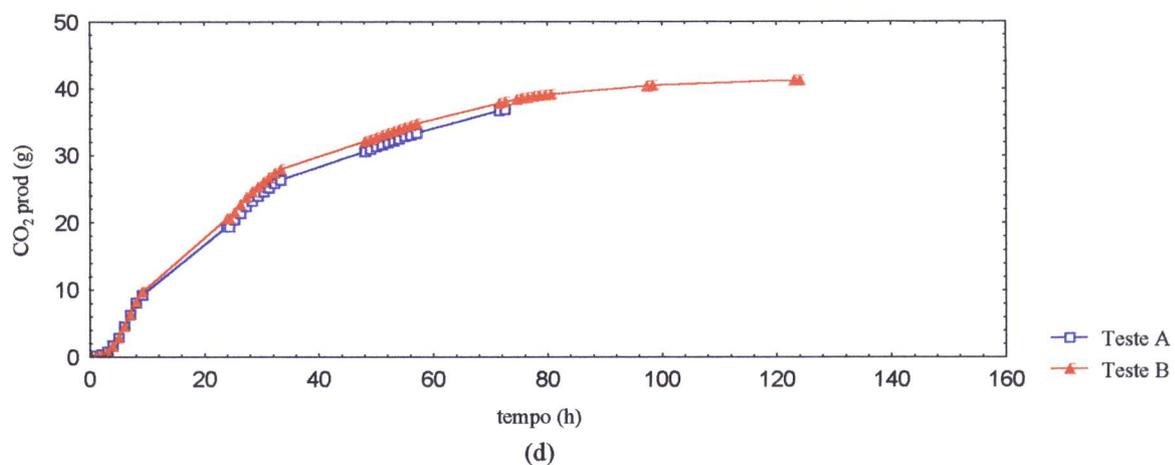


Figura B1 - Produção de CO₂ com o tempo para 36°C (d),
38°C (e) e 40°C (f)

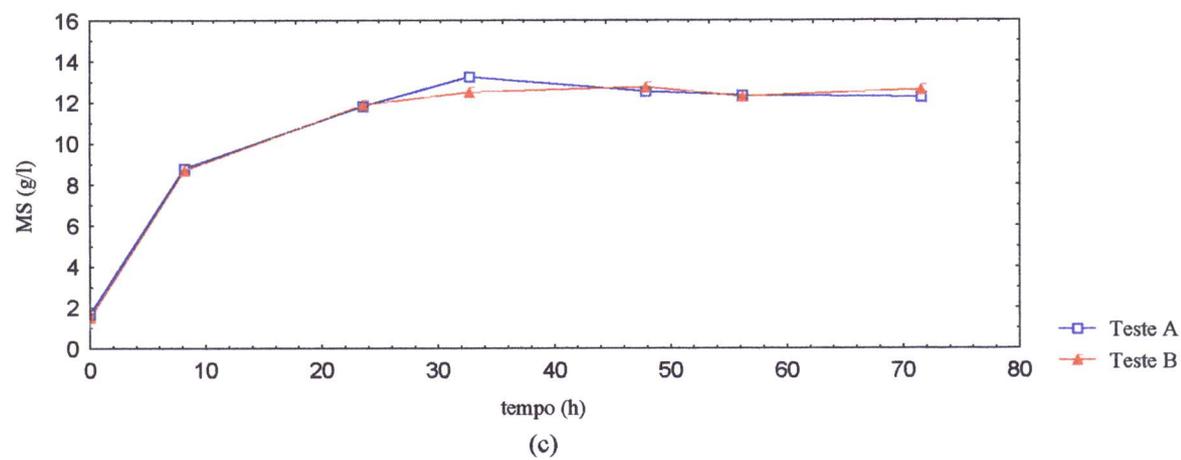
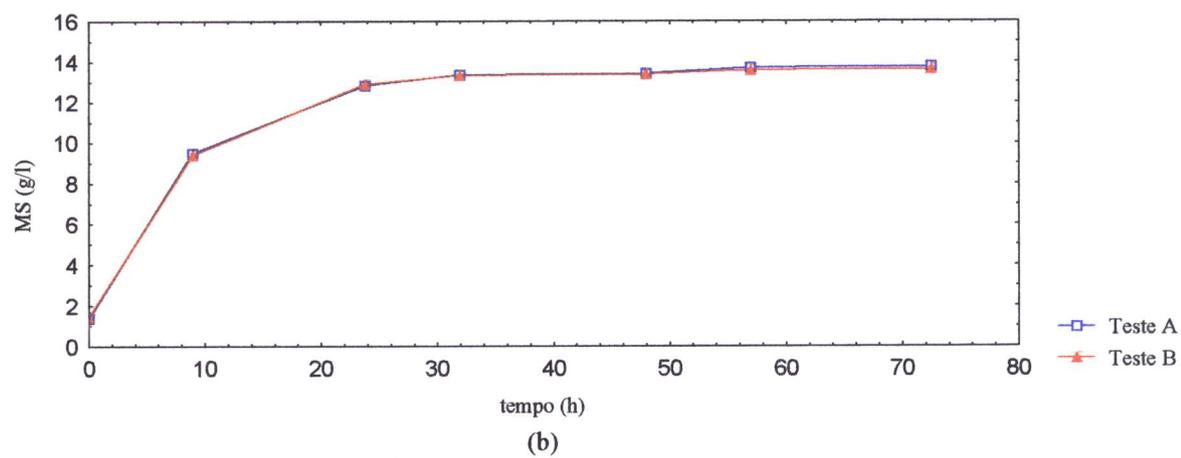
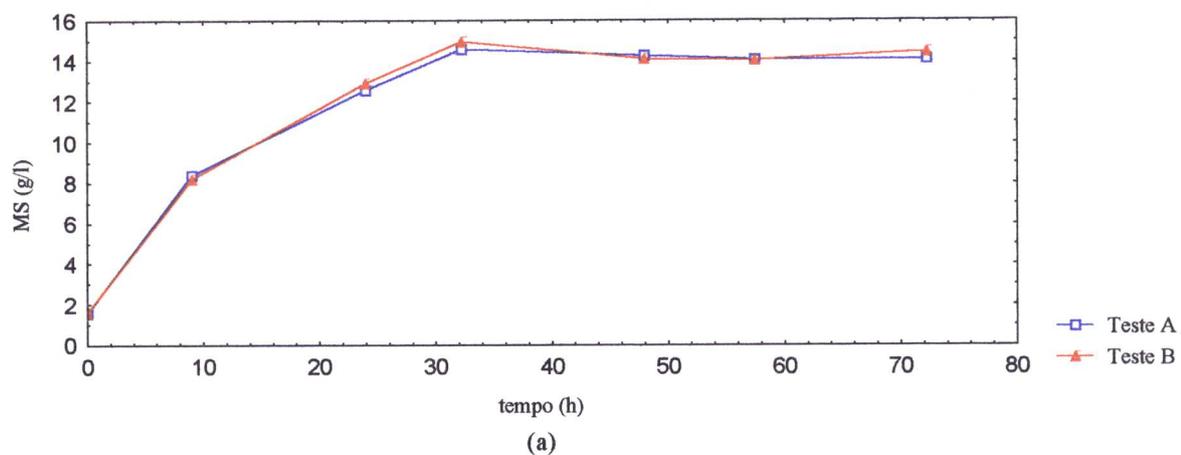


Figura B2 - Produção de MS com o tempo para 30°C (a), 32°C (b) e 34°C (c)

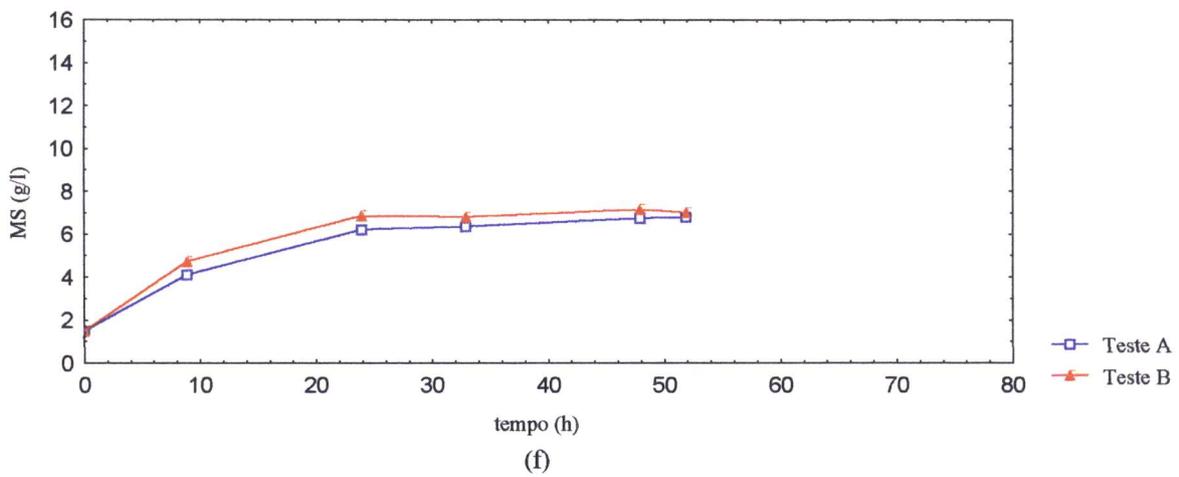
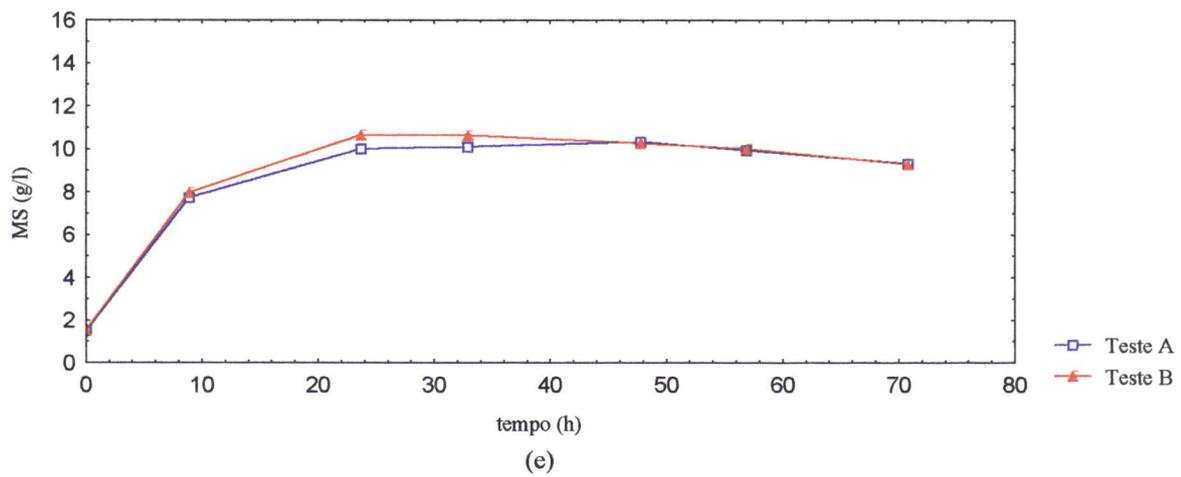
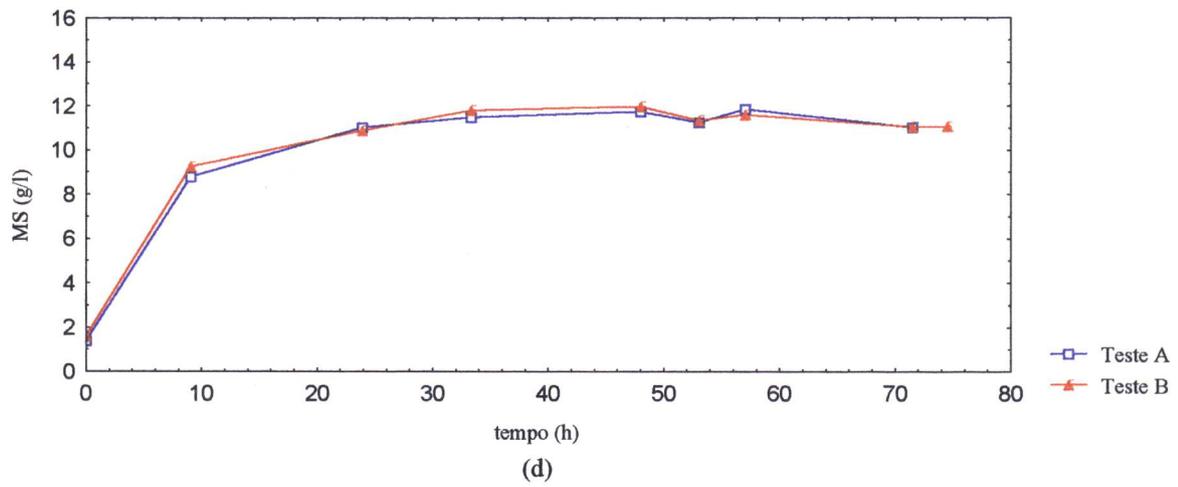


Figura B2 - Produção de MS com o tempo para 36°C (d),
38°C (e) e 40°C (f)

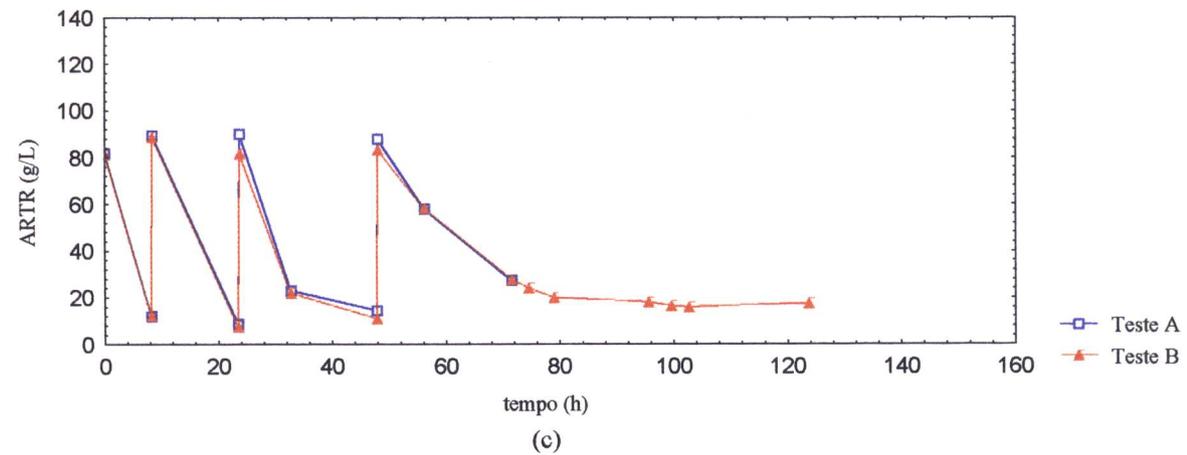
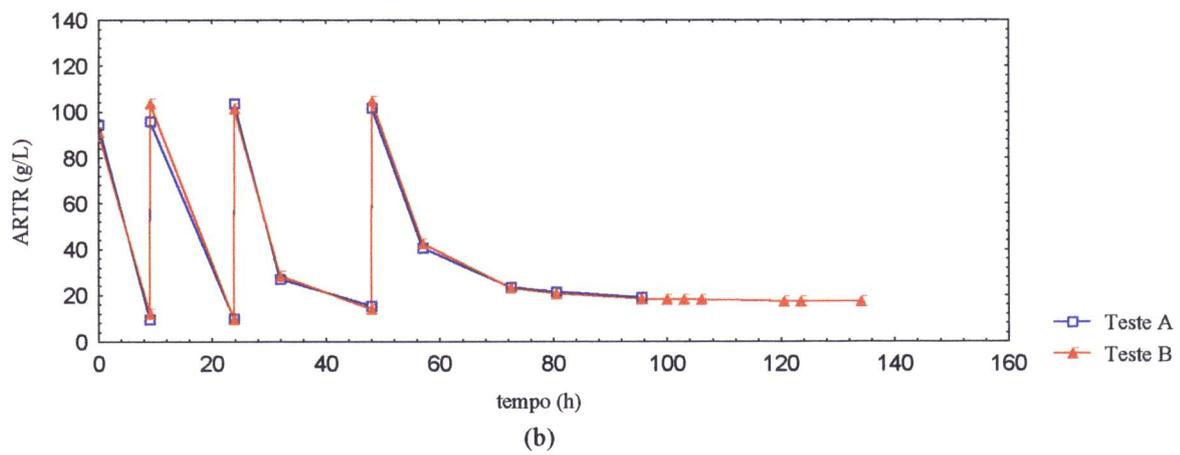
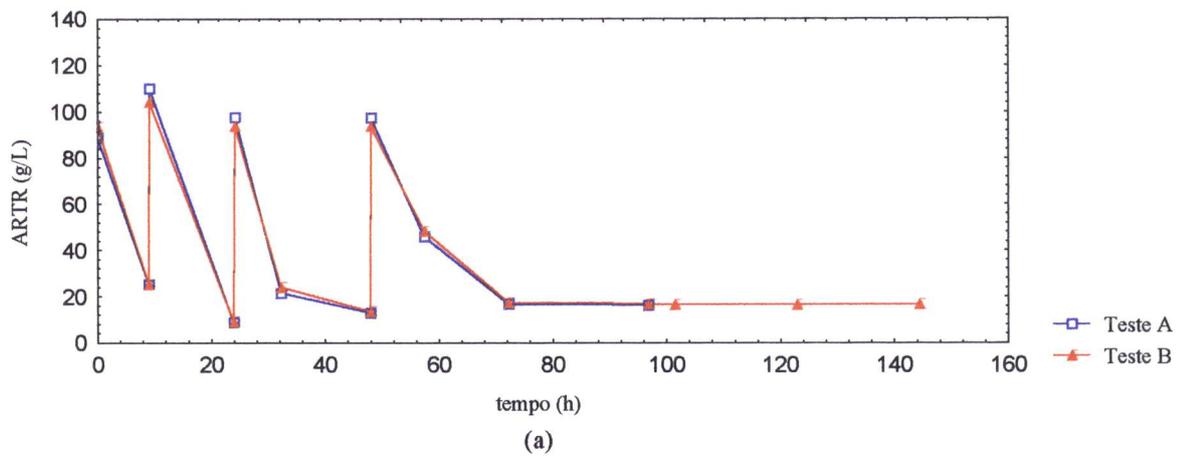
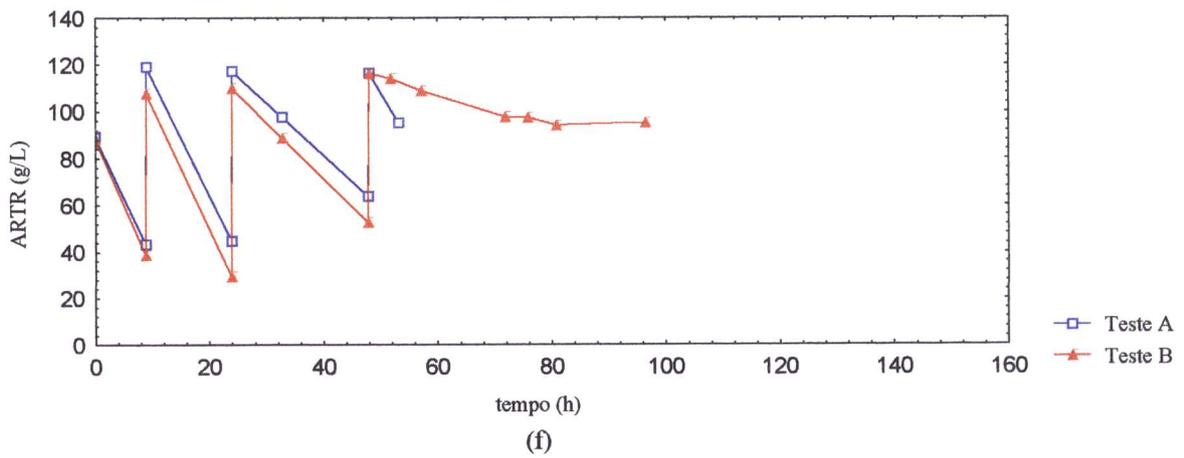
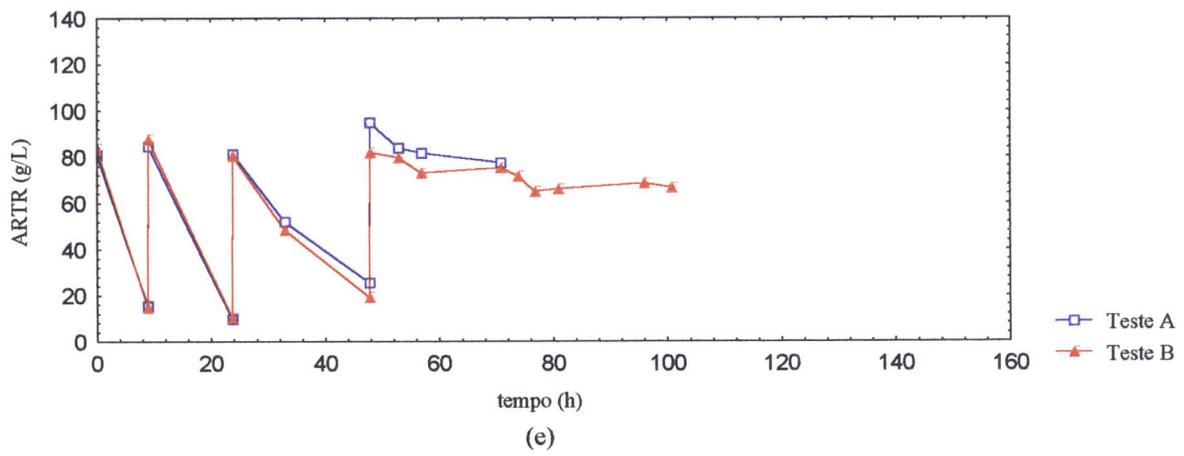
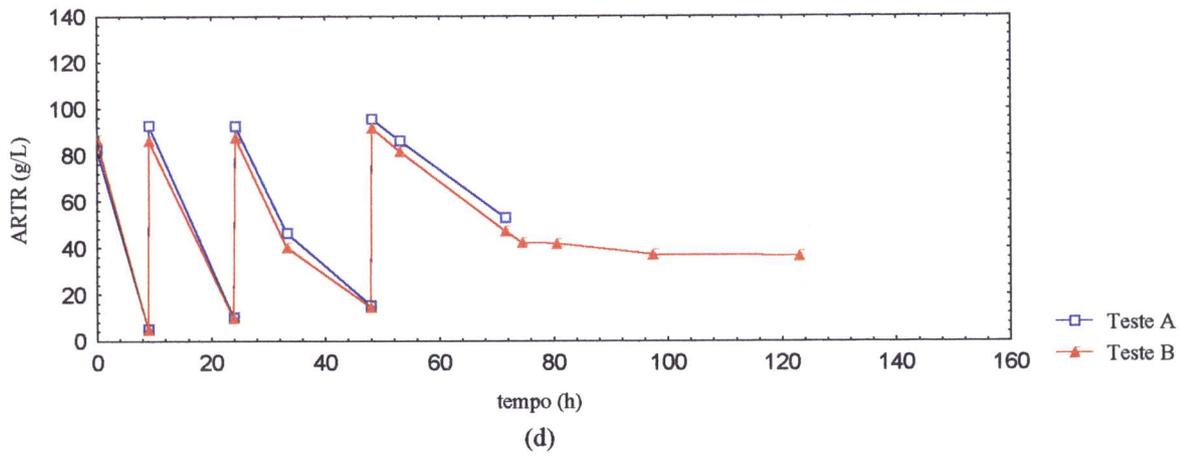
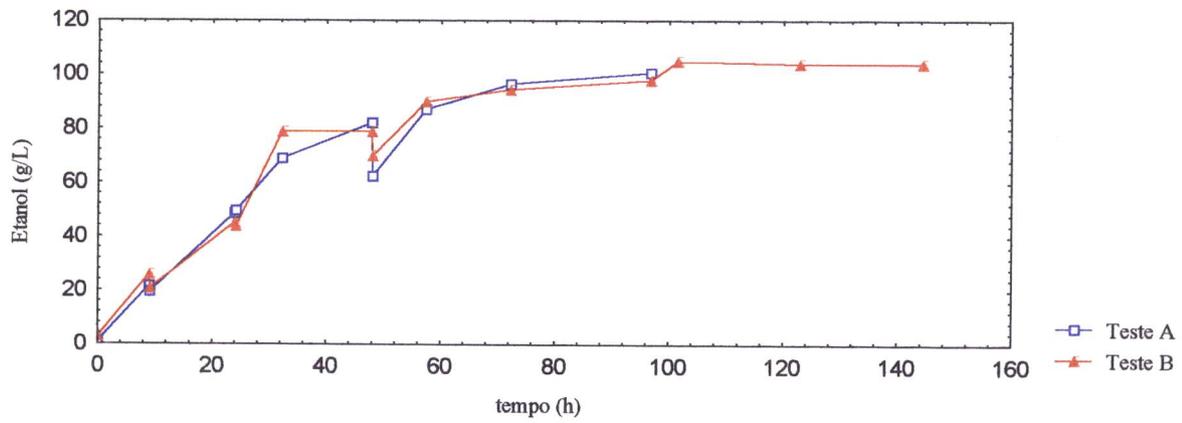


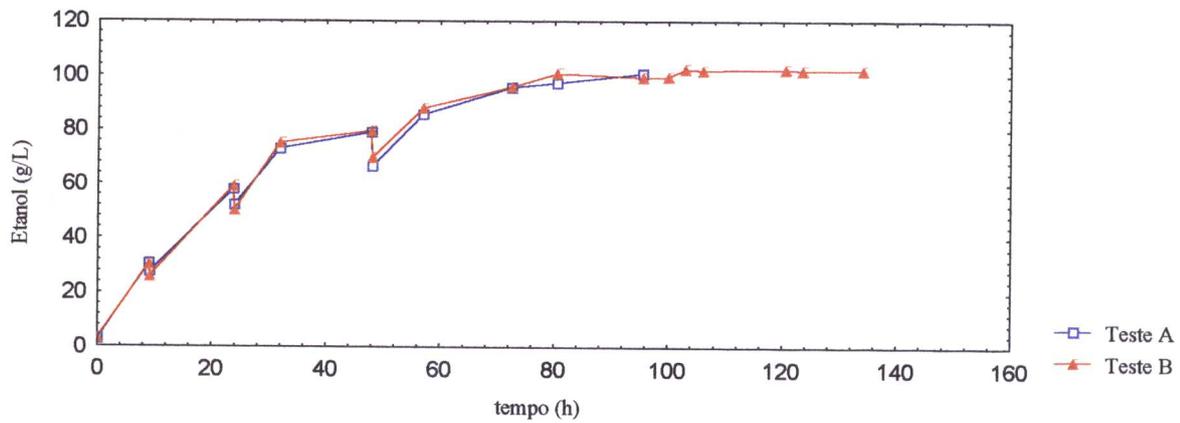
Figura B3 - Consumo de ARTR com o tempo para 30°C (a), 32°C (b) e 34°C (c)



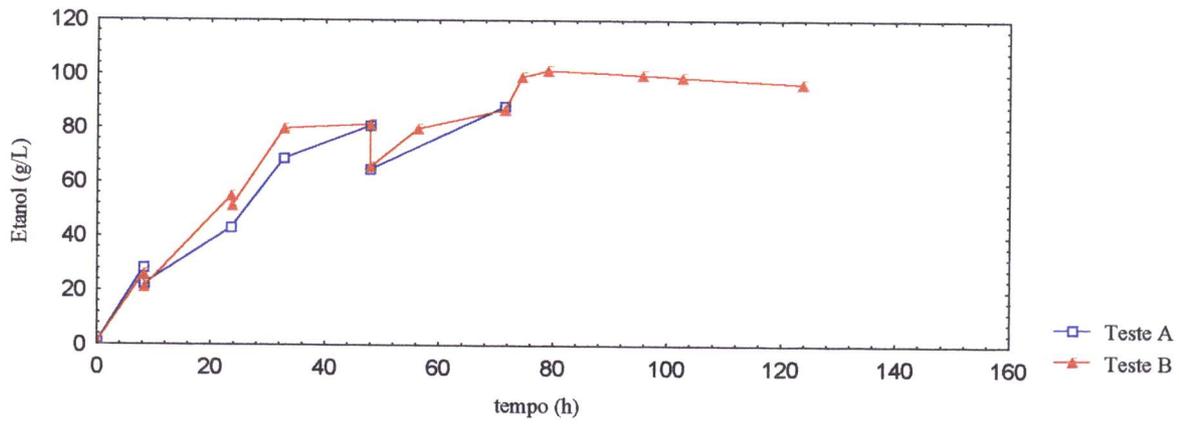
**Figura B3 - Consumo de ARTR com o tempo para 36°C (d),
38°C (e) e 40°C (f)**



(a)



(b)



(c)

Figura B4 - Produção de etanol com o tempo para 30°C (a), 32°C (b) e 34°C (c)

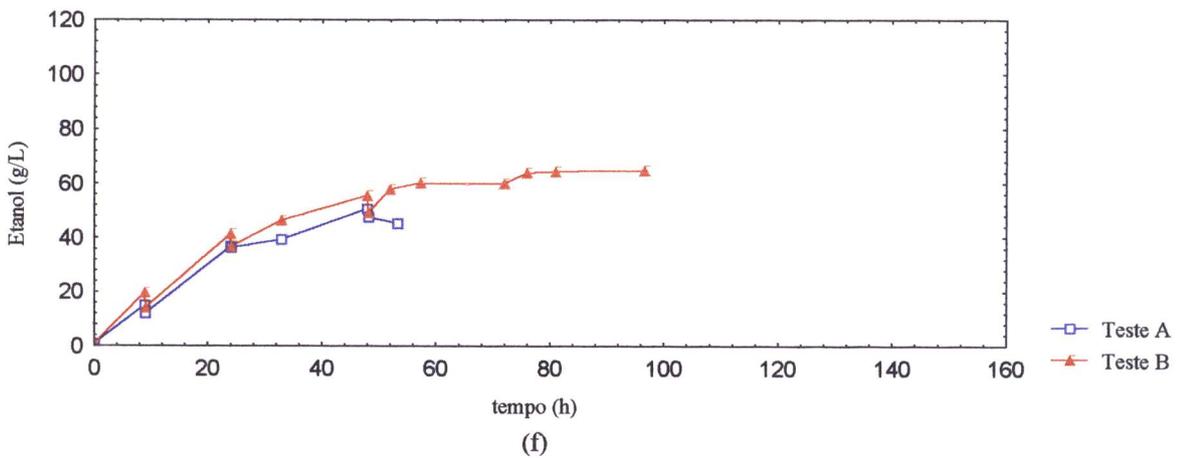
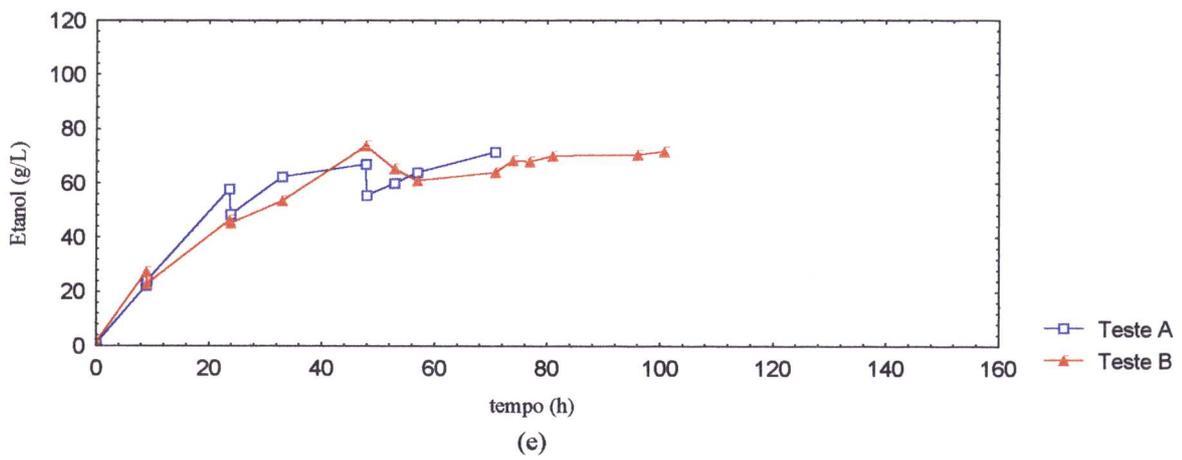
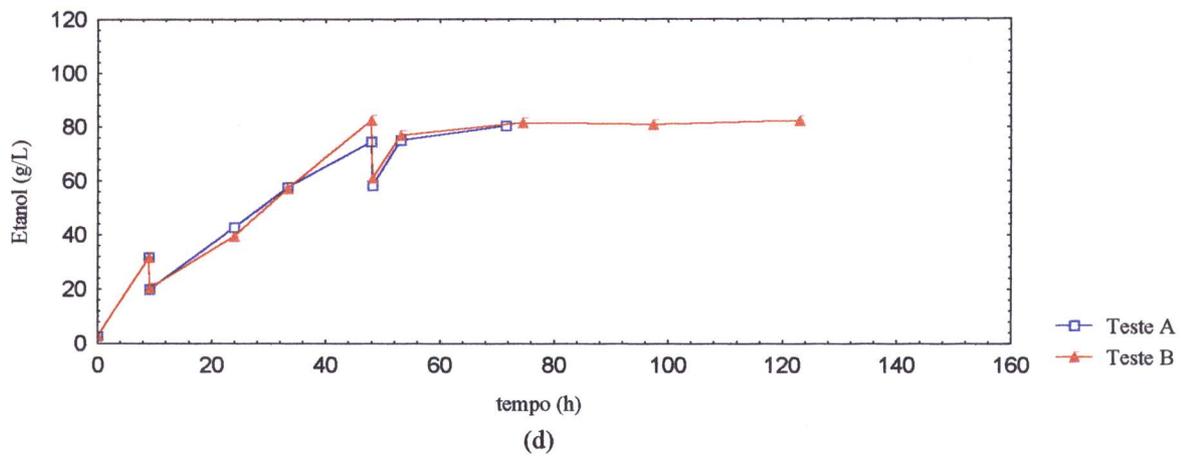


Figura B4 - Produção de etanol com o tempo para 36°C (d), 38°C (e) e 40°C (f)

**APÊNDICE C: FIGURAS QUE ILUSTRAM A DETERMINAÇÃO DOS
PARÂMETROS DE TOLERÂNCIA**

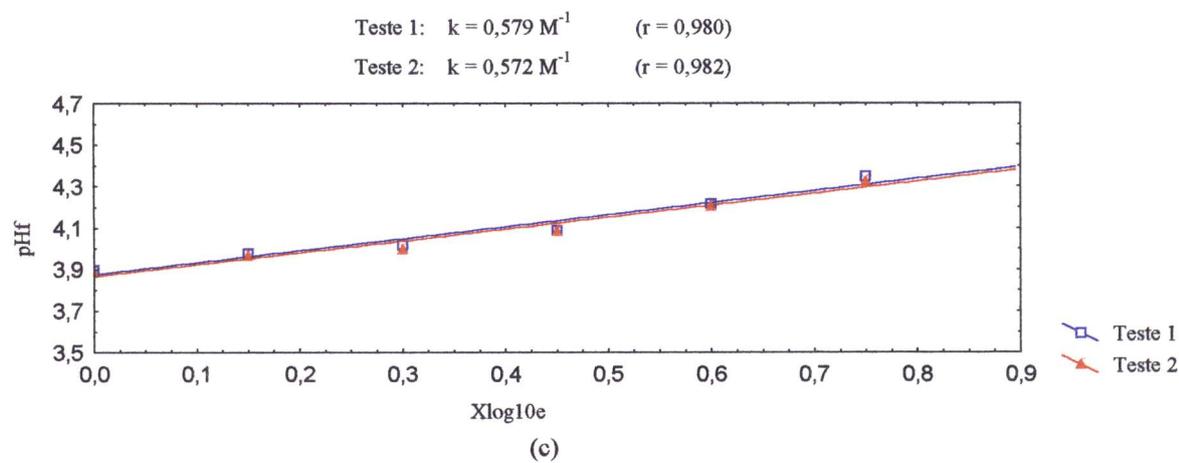
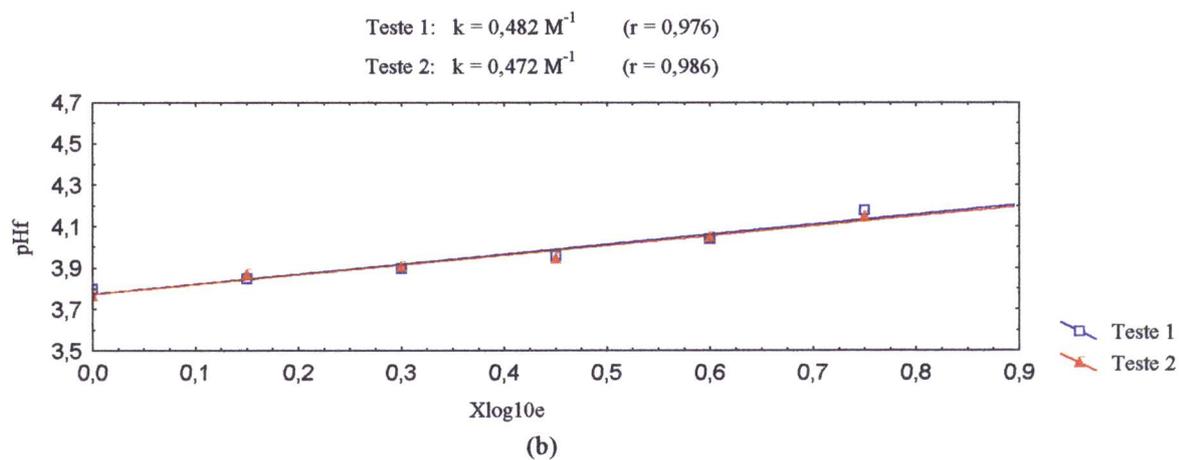
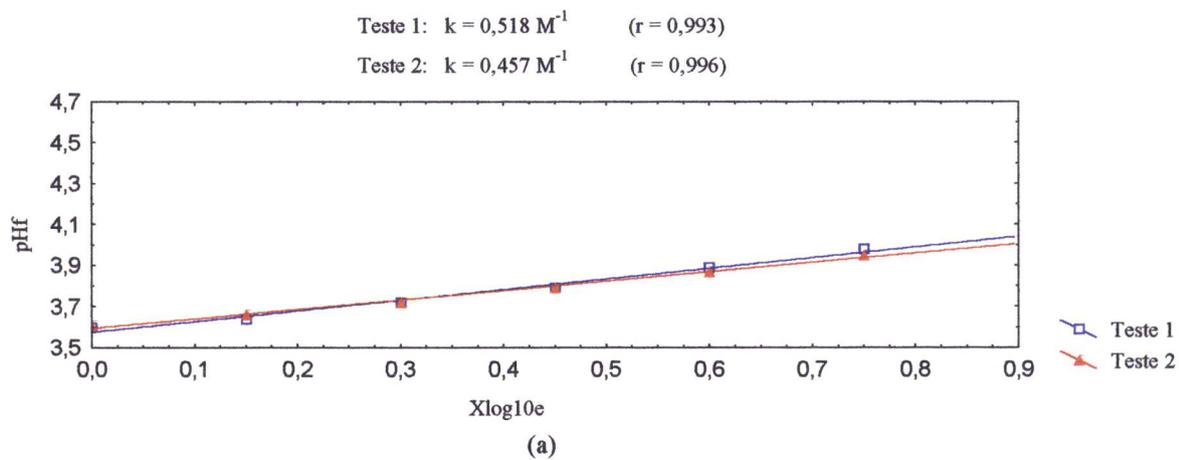


Figura C1 - Determinação da tolerância ao etanol (k) para 30°C (a), 32°C (b) e 34°C (c) para viabilidade de 98%

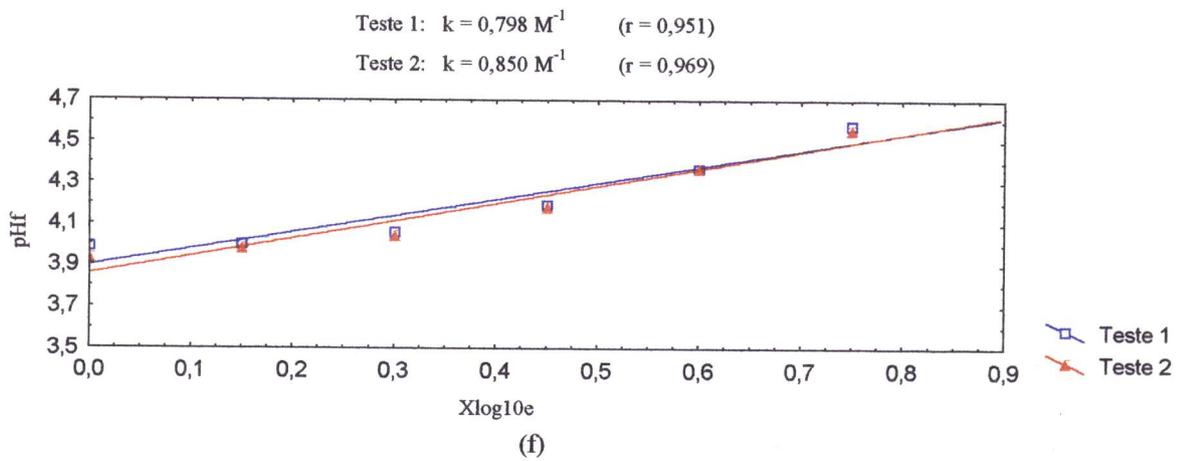
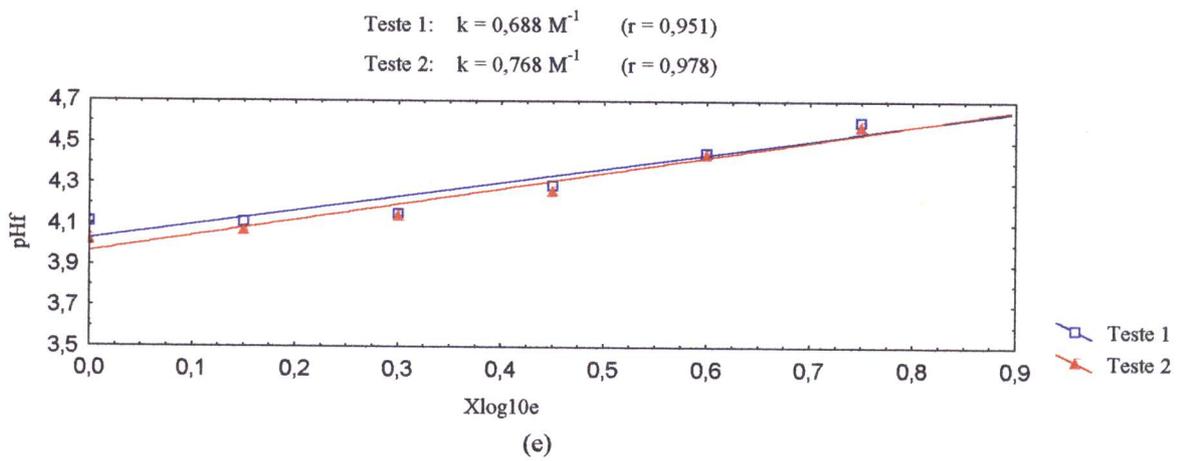
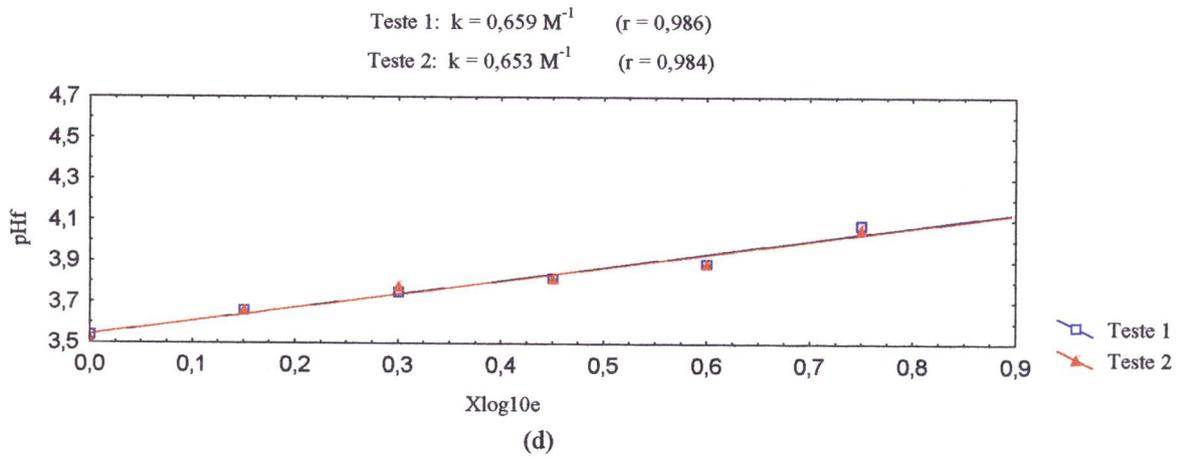
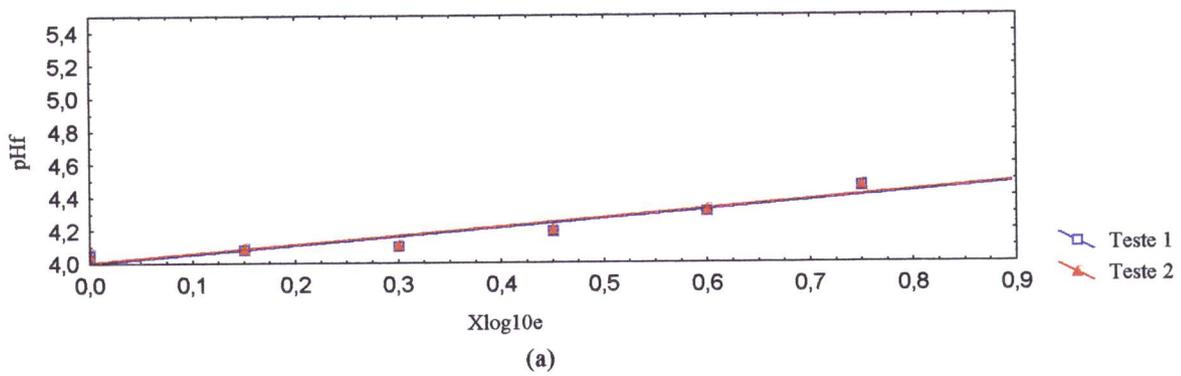


Figura C1 - Determinação da tolerância ao etanol (k) para 36°C (d), 38°C (e) e 40°C (f) para a viabilidade de 98%

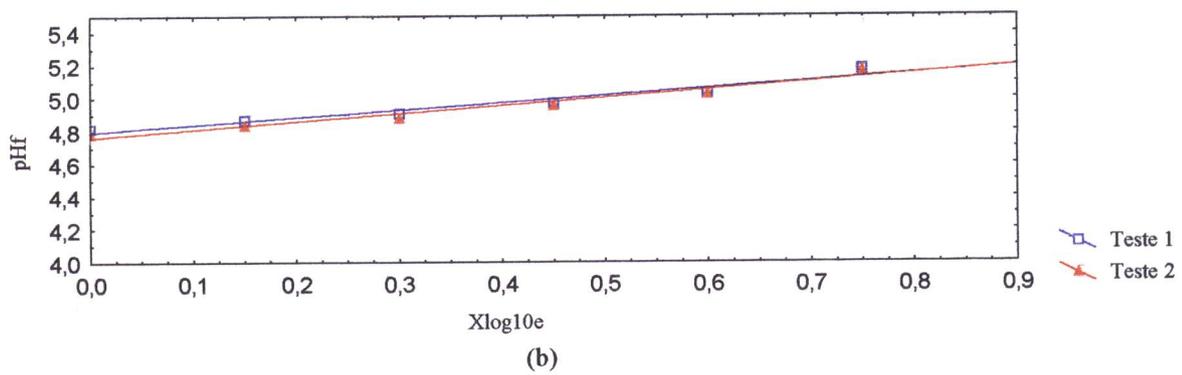
Teste 1: $k = 0,539 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,950$)

Teste 2: $k = 0,539 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,950$)



Teste 1: $k = 0,446 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,968$)

Teste 2: $k = 0,486 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,977$)



Teste 1: $k = 0,486 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,974$)

Teste 2: $k = 0,472 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,979$)

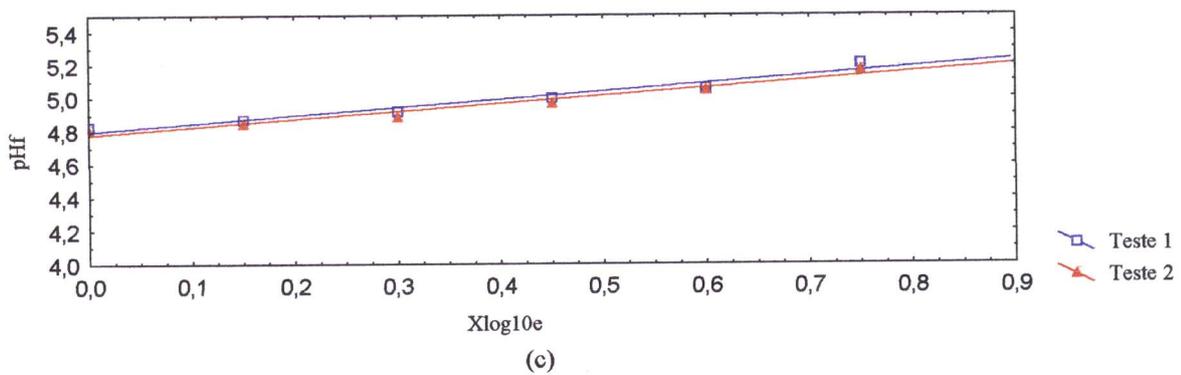
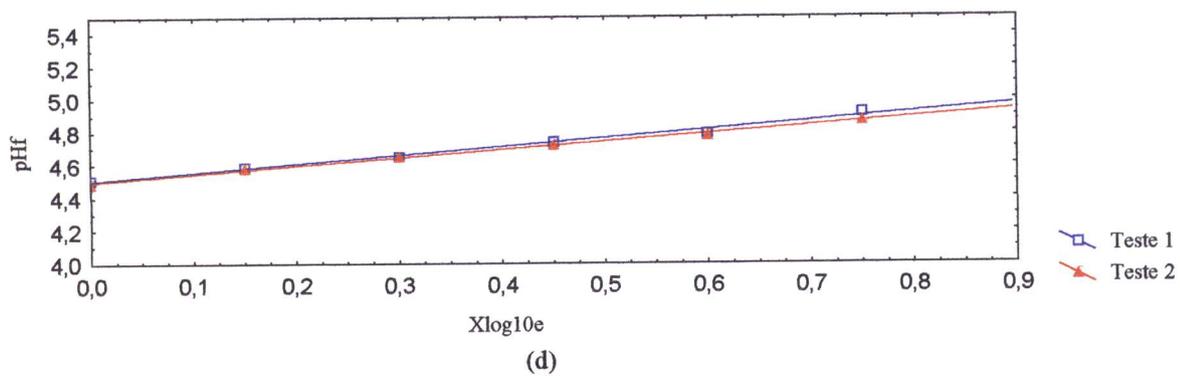


Figura C2 - Determinação da tolerância ao etanol (k) para 30°C (a), 32°C (b) e 34°C (c) para viabilidade de 50%

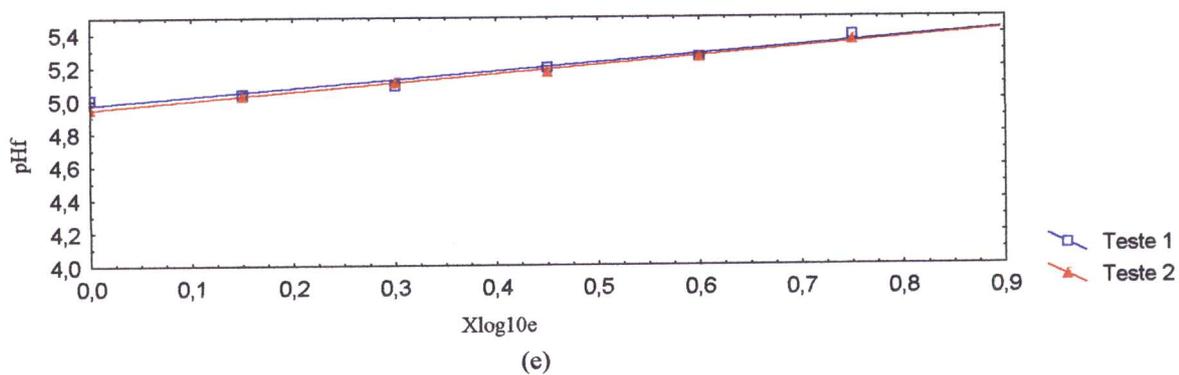
Teste 1: $k = 0,522 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,993$)

Teste 2: $k = 0,490 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,998$)



Teste 1: $k = 0,509 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,979$)

Teste 2: $k = 0,543 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,996$)



Teste 1: $k = 0,45 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,985$)

Teste 2: $k = 0,47 \text{ M}^{-1}$ ($r = 0,994$)

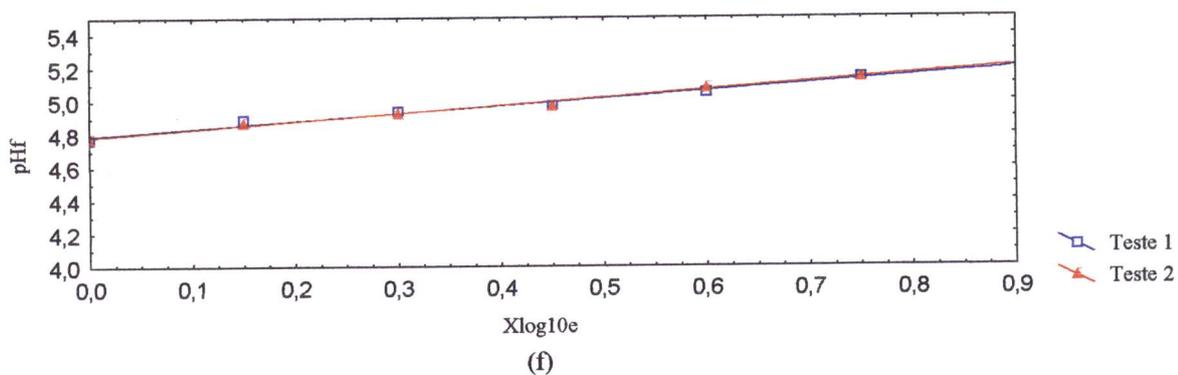


Figura C2 - Determinação da tolerância ao etanol (k) para 36°C (d), 38°C (e) e 40°C (f) para viabilidade de 50%