

ERRATA

Lista de Tabelas

Tabela IV – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação com pH inicial 5,0 (em vez de 3,50) e inóculo $4,20 \times 10^4$ células viáveis / mL (Página xi).

Revisão Bibliográfica (Página 4, segundo parágrafo)

Maclean et al., 2001 em vez de Maclean, 2001.

Material e Métodos (Página 22)

Tabela IV – pH inicial 5,0 em vez de 3,5.

Item 3.1.3.1 (Página 26)

Os meios estéreis inoculados foram posteriormente distribuídos nos frascos erlenmeyer de fermentação de 250 mL (150 mL de meio).

Item 3.1.3.2 (Página 27 primeiro parágrafo)

Os tratamentos delineados referem-se à concentração de açúcar (80, 110, 120, 140, 160, 170 e 200 g ART/L).

Açúcar residual inóculo 10^4 (Página 64, segundo parágrafo, quinta linha)

A 38°C uma elevação um pouco mais acentuada se fez presente em 160 e 200 g/L (0,213 e 2,113 g/100 mL, em vez de 2,11 g/L).

Item 4.2.3 (Página 97, segundo parágrafo, última linha)

Tabela 5, Figura 29, em vez de Figura 30.

Item 4.4 (Página 134, segundo parágrafo)

Figura 30 em vez de 37

Item 4.4.6 (Página 141, terceiro parágrafo)

A velocidade instantânea atingiu 49,85, 88,59, 44,79 e 36,17 g/L/h em vez de g/L/h/g de células.

Referências Bibliográficas (Página 158)

GAO, C.; FLEET, G.H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.65, p.405-409, 1988.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Tecnologia de Alimentos

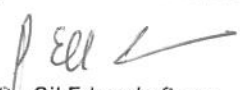
ESTUDO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EM FRASCOS
AGITADOS

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Leonel Vasco Ferreira** aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de dezembro de 2002.

Leonel Vasco Ferreira
(Engenheiro Agrônomo)

Campinas, 19 de dezembro de 2002.


Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
Presidente da Banca

Orientador: Prof. Dr. Gil Eduardo Serra

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

CAMPINAS
Estado de São Paulo – Brasil
2002

UNIDADE	BP
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	F413e
V	EX
TOMBO BCI	52381
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00179772-5

BIB ID 279800

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

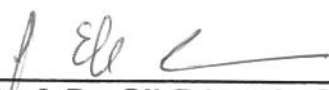
F413e Ferreira, Leonel Vasco
Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados / Leonel
Vasco Ferreira. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Gil Eduardo Serra
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

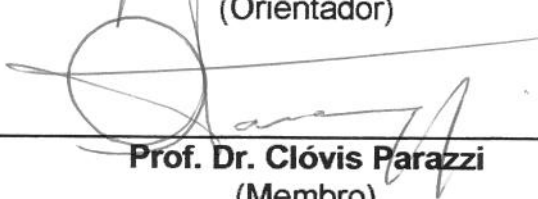
1. fermentação. 2. Etanol. 3. *Saccharomyces cerevisiae*.
I. Serra, Gil eduardo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

APROVADA EM ____/____/____



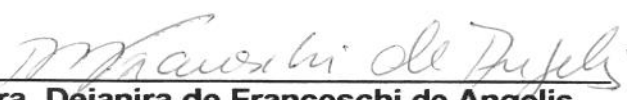
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(Orientador)



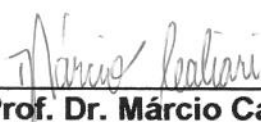
Prof. Dr. Clóvis Parazzi
(Membro)



Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim
(Membro)



Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis
(Membro)



Prof. Dr. Márcio Caliari
(Membro)

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso
(Membro)

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta
(Membro)

Dedico este trabalho em memória do meu pai Vasco Patrão Ferreira, falecido em 28 de setembro de 2001, pela lição de vida e espírito de amor ao próximo que sempre caracterizou a sua vida.

Ofereço este trabalho a minha mãe Nhima Correia a quem estou com muita saudade, pela distância que nos separa e que Deus proporcione o nosso reencontro o mais breve possível.

"Acreditar em nossa própria força é uma virtude que nos leva a vencer diversos desafios da vida cotidiana".

Leonel Vasco Ferreira

AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde concedida e disposição para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gil Eduardo Serra, pela orientação e sobretudo um amigo presente.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pelo encaminhamento para UNICAMP, disponibilidade de laboratório de Bioquímica - ESALQ-USP para análise de álcool e amizade.

Ao Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim pelo apoio concedido durante este período, encaminhamento para UNICAMP, amizade e as orientações pertinentes de vida.

Às Usinas Iracema e Costa Pinto de Açúcar e Álcool de Estado de São Paulo, pela cessão de matérias primas para execução dos experimentos.

Às técnicas de laboratório, Ana Koon e Priscila pelo serviço de apoio durante a fase experimental.

Aos secretários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Jaime e Marlene pelo apoio ao encaminhamento de Relatórios a FAPESP.

Aos amigos Rodrigo Petrus e Pedro Marinho como colegas de luta e comunhão de pensamentos.

Às alunas Elisângela Gerônimo e Carolina pelo apoio concedido e amizade.

Aos Bibliotecários Geraldo, Creusa, Claudia e Sueli, pelas orientações em referências bibliográficas.

Ao secretário de Pós-Graduação da FEA/UNICAMP, Cosme Perota, pelo apoio incansável oferecido e amizade.

À Profa. Maria Izalina pela orientação em análise estatística.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos FEA/UNICAMP, pela cessão de instalações para o desenvolvimento deste trabalho.

À FEA/UNICAMP pela oportunidade oferecido para realização deste sonho.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento do Projeto e a concessão de Bolsa de Estudos.

À todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho tornasse uma realidade, o meu muitíssimo obrigado.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XXIV
RESUMO.....	XXIX
SUMMARY.....	XXXI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. PRINCIPAIS FATORES QUE AFETAM A CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	3
2.1.1. Concentração de substrato.....	3
2.1.2. O pH e a temperatura.....	6
2.1.3. Quantidade de inóculo.....	9
2.1.4. Metabólitos.....	12
2.1.5. Cinética da fermentação alcoólica.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO.....	19
3.1.1. Fatores que afetam a fermentação em meio de glicose.....	19
3.1.2. Fermentação alcoólica em diferentes substratos.....	23
3.1.3. Cinética da liberação de CO ₂ na fermentação alcoólica em diversos substratos	26
3.1.3.1. Fatores que afetam a cinética de liberação de CO ₂	26
3.1.3.2. A cinética de liberação de CO ₂ em diferentes substratos.....	27
3.1.4. Cinética da fermentação alcoólica em substrato de glicose	27
3.2. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	29
3.2.1. Cinética da produção de gás carbônico.....	29
3.2.2. Determinação de massa celular	29
3.2.3. Determinação de etanol.....	29
3.2.4. Determinação do pH do vinho.....	30
3.2.5. Determinação do teor de cinzas condutivimétricas	30
3.2.6. Determinação da viabilidade celular.....	30
3.2.7. Determinação de glicose.....	31
3.2.8. Determinação de açúcares redutores totais (ART) e açúcares residuais (AR).....	31
3.2.9. Determinação de glicerol.....	32
3.2.10. Rendimento da fermentação e eficiência da levedura.....	32

3.2.11. Variáveis cinéticas.....	33
3.2.12. Delineamento e tratamento estatístico dos resultados.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1. FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EM MEIO DE GLICOSE.....	36
4.1.1. Fermentação alcoólica com inóculo de 10^8 células viáveis / mL.....	37
4.1.1.1. pH inicial 3,5.....	38
4.1.1.1.1. Rendimento, etanol no vinho, tempo de fermentação e viabilidade do fermento.....	38
4.1.1.1.2. Açúcar residual.....	42
4.1.1.1.3. Glicerol.....	43
4.1.1.1.4. Fator de conversão de substrato em produto (eficiência da levedura) – $Y_{p/s}$	43
4.1.1.1.5. Fator de conversão de substrato em células – $Y_{x/s}$	45
4.1.1.1.6. Velocidade média de formação de etanol (VMFE) e de consumo de substrato (VMCS).....	45
4.1.1.2. pH inicial 5,0.....	46
4.1.1.2.1. Rendimento, etanol no vinho, tempo de fermentação e viabilidade do fermento.....	46
4.1.1.2.2. Açúcar residual.....	48
4.1.1.2.3. Glicerol.....	48
4.1.1.2.4. Fator de conversão de substrato em produto (eficiência da levedura) – $Y_{p/s}$	49
4.1.1.2.5. Fator de conversão de substrato em células – $Y_{x/s}$	49
4.1.1.2.6. Velocidade média de formação de etanol (VMFE) e de Consumo de substrato (VMCS).....	49
4.1.2. Fermentação alcoólica com inóculo de 10^4 células viáveis / mL.....	62
4.1.2.1. pH inicial 3,5.....	62
4.1.2.1.1. Rendimento, etanol no vinho, tempo de fermentação e viabilidade celular.....	63
4.1.2.1.2. Açúcar residual.....	64
4.1.2.1.3. Glicerol.....	65
4.1.2.1.4. Fator de conversão de substrato em produto (eficiência da levedura) – $Y_{p/s}$	65
4.1.2.1.5. Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e velocidade média de crescimento celular.....	66
4.1.2.1.6. Velocidade média de formação de etanol e de consumo de substrato.....	66
4.1.2.2. pH inicial 5,0.....	67
4.1.2.2.1. Rendimento, etanol no vinho, tempo de fermentação e viabilidade do fermento.....	67
4.1.2.2.2. Açúcar residual.....	68
4.1.2.2.3. Glicerol.....	69
4.1.2.2.4. Fator de conversão de substrato em produto (eficiência da levedura) – $Y_{p/s}$	69
4.1.2.2.5. Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e velocidade média de crescimento celular (VMCC).....	70
4.1.2.2.6. Velocidade média de formação de etanol (VMFE) e de consumo de substrato (VMCS).....	70
4.1.3. Resumo.....	71
4.2. A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EM DIFERENTES SUBSTRATOS.....	94
4.2.1. A fermentação alcoólica em substrato de glicose.....	94
4.2.2. A fermentação alcoólica em substrato de sacarose.....	95

4.2.3. A fermentação alcoólica em substrato de xarope	96
4.2.4. A fermentação alcoólica em substrato de melação de menor pureza	97
4.2.5. A fermentação alcoólica em substrato de melação de maior pureza	98
4.3. A CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE CO₂ NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	108
4.3.1. Fatores que afetam a cinética de liberação de CO ₂ em substrato de glicose	108
4.3.2. O CO ₂ liberado e a estimativa de outros parâmetros	114
4.3.3. Cinética de liberação de CO ₂ em diferentes substratos	119
4.3.4. O CO ₂ liberado e a estimativa de outros parâmetros	123
4.3.5. Equações polinomiais representativas	126
4.4. A CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM SUBSTRATO DE GLICOSE	133
4.4.1. Rendimento, etanol no vinho, tempo de fermentação e viabilidade celular	133
4.4.2. Açúcar residual e glicerol	137
4.4.3. Fermento úmido (% p/v), fermento seco (% p/v) e matéria seca (%)	138
4.4.4. Fator de conversão de substrato em produto - $Y_{p/s}$	139
4.4.5. Velocidade de formação de etanol	140
4.4.6. Velocidade de consumo de substrato	141
4.4.7. Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), velocidade instantânea de crescimento celular e velocidade específica de crescimento celular	141
4.4.8. Resumo	142
4.4.9. Correlação entre o CO ₂ liberado, etanol produzido e consumo de substrato durante a fermentação alcoólica	149
5. CONCLUSÕES	150
5.1. FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO DE GLICOSE	150
5.2. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM DIFERENTES SUBSTRATOS	152
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
7. ANEXOS (DADOS ORIGINAIS)	165
7.1. A CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE CO ₂ NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	165
7.2. FATORES QUE AFETAM O COMPORTAMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM MEIO DE GLICOSE	165
7.2.1. Fermentação alcoólica com inóculo de 10 ⁸ células viáveis / mL	165
7.2.2. Fermentação alcoólica com inóculo de 10 ⁴ células viáveis / mL	165
7.3. A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM DIFERENTES SUBSTRATOS	178
7.3.1. A fermentação alcoólica em substrato de sacarose	178
7.3.2. A fermentação alcoólica em substrato de xarope	178
7.3.3. A fermentação alcoólica em substrato de melação de menor pureza	178

7.3.4. <i>A fermentação alcoólica em substrato de melaço de maior pureza</i>	178
7.4. CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE CO₂ EM DIFERENTES SUBSTRATOS	178
7.4.1. <i>Substrato de sacarose</i>	178
7.4.2. <i>Substrato de xarope industrial de fabricação de açúcar</i>	178
7.4.3. <i>Substrato de melaço de menor pureza, de fabricação de açúcar</i>	178
7.4.4. <i>Substrato de melaço de maior pureza, de fabricação de açúcar</i>	178
7.5. A CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM SUBSTRATO DE GLICOSE	200

LISTA DE TABELAS

Página

<i>Tabela I – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $3,72 \times 10^8$ células viáveis / mL.</i>	21
<i>Tabela II – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação, com pH inicial 5,0 e inóculo de $7,32 \times 10^8$ células viáveis / mL.</i>	21
<i>Tabela III – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $5,12 \times 10^4$ células viáveis / mL.</i>	22
<i>Tabela IV – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $4,20 \times 10^4$ células viáveis / mL.</i>	22
<i>3.1.2. Fermentação alcoólica em diferentes substratos.</i>	23
<i>Tabela V – Características das matérias primas coletadas nas usinas de açúcar.</i>	24
<i>Tabela VI – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação, nos meios de glicose, sacarose, xarope, melaço de menor pureza e melaço de maior pureza, nas condições de inóculo 10^8, pH inicial 3,50 e 38°C.</i>	25
<i>Tabela 1 – Médias e resultados estatísticos da fermentação alcoólica em substrato de glicose com inóculo de 10^8 células viáveis / mL.</i>	50
<i>Tabela 2 – Tempos de fermentação (horas) obtidos através da cinética de evolução da liberação do CO_2.</i>	52
<i>Tabela 3 – Médias de viabilidade celular e de células viáveis de levedura no final da fermentação</i>	52
<i>Tabela 4 – Médias e resultados estatísticos da fermentação alcoólica em substrato de glicose, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL.</i>	75
<i>Tabela 5 – Médias e resultados estatísticos da fermentação alcoólica em substratos diversos, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.</i>	100

<i>Tabela 6 - Médias de viabilidade celular (%) e de células viáveis de levedura no final da fermentação</i>	102
<i>Tabela 7 – Resultados de CO₂ e de etanol produzido e glicose consumida calculados estequiometricamente em função do CO₂ e determinados por via analítica (real), com inóculo alto de 10⁸ células viáveis / mL, em meio sintético de glicose.</i>	115
<i>Tabela 8 – Resultados de CO₂, etanol produzido e glicose consumida calculados estequiometricamente, e as mesmas variáveis determinadas por via analítica (real), em função da concentração de substrato, pH e temperatura, com inóculo baixo de 10⁴ células viáveis / mL, em meio sintético de glicose.</i>	117
<i>Tabela 9 – Resultados de CO₂, etanol produzido e glicose consumida calculados estequiometricamente, e as mesmas variáveis determinadas por via analítica (real), em função de diversos substratos, com inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH 3,50 e 38°C.</i>	124
<i>Tabela 10 – Médias e resultados estatísticos da fermentação alcoólica em substrato de glicose, com inóculo alto (10⁸ células viáveis / mL), pH 3,5 e 38°C.</i>	144
<i>Tabela 11 - Médias de viabilidade celular (%) e de células viáveis de levedura no final da fermentação.</i>	144
<i>Tabela A1 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) durante a fermentação alcoólica com pH inicial 3,50 e inóculo de 3,72 x 10⁸ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose....</i>	166
<i>Tabela A2 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de 3,72 x 10⁸ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.</i>	167
<i>Tabela A3 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de 3,72 x 10⁸ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.</i>	168
<i>Tabela A4 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) durante a fermentação alcoólica com pH inicial 5,0 e inóculo de 7,32 x 10⁸ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose....</i>	169

<i>Tabela A5 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 5,0 e inóculo de $7,32 \times 10^8$ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.....</i>	<i>170</i>
<i>Tabela A6 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 5,0 e inóculo de $7,32 \times 10^8$ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.....</i>	<i>171</i>
<i>Tabela A7 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) durante a fermentação alcoólica com pH inicial 3,50 e inóculo de $5,12 \times 10^4$ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose....</i>	<i>172</i>
<i>Tabela A8 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $5,12 \times 10^4$ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.....</i>	<i>173</i>
<i>Tabela A9 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $5,12 \times 10^4$ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.....</i>	<i>174</i>
<i>Tabela A10 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) durante a fermentação alcoólica com pH inicial 5,0 e inóculo de $4,20 \times 10^4$ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose....</i>	<i>175</i>
<i>Tabela A11 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 5,0 e inóculo de $4,20 \times 10^4$ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.....</i>	<i>176</i>
<i>Tabela A12 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 5,0 e inóculo de $4,20 \times 10^4$ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.....</i>	<i>177</i>
<i>Tabela A13 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de sacarose com 80g / L de ART, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>179</i>

<i>Tabela A14 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de sacarose com 120g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>179</i>
<i>Tabela A15 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de sacarose com 160g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>180</i>
<i>Tabela A16 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de sacarose com 200g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>181</i>
<i>Tabela A17 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de xarope com 80g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>182</i>
<i>Tabela A18 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de xarope com 120g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>182</i>
<i>Tabela A19 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de xarope com 160g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>183</i>
<i>Tabela A20 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de xarope com 200g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>184</i>
<i>Tabela A21 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melaço de menor pureza com 80g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>185</i>
<i>Tabela A22 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melaço de menor pureza com 120g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>186</i>

<i>Tabela A23 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melão de menor pureza com 160g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>187</i>
<i>Tabela A24 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melão de menor pureza com 200g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>188</i>
<i>Tabela A25 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melão de maior pureza com 80g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>189</i>
<i>Tabela A26 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melão de maior pureza com 120g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>189</i>
<i>Tabela A27 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melão de maior pureza com 160g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>190</i>
<i>Tabela A28 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melão de maior pureza com 200g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>191</i>
<i>Tabela A29 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final da fermentação, com o meio de sacarose, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.</i>	<i>192</i>
<i>Tabela A30 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final da fermentação, com o meio de xarope, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.</i>	<i>193</i>
<i>Tabela A31 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final da fermentação, com o meio de melão de menor pureza, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.</i>	<i>194</i>
<i>Tabela A32 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final da fermentação, com o meio de melão de maior pureza, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.....</i>	<i>195</i>
<i>Tabela A33 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final da fermentação, em meio de sacarose, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.</i>	<i>196</i>

<i>Tabela A34 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final da fermentação, em meio de xarope, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.</i>	197
<i>Tabela A35 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final da fermentação, em meio de melaço de menor pureza, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.</i>	198
<i>Tabela A36 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final da fermentação, em meio de melaço de maior pureza, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.</i>	199
<i>Tabela A37 – Resultados da cinética da liberação de CO₂ (g/100mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo inicial de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	201
<i>Tabela A38 – Resultados da cinética da liberação de CO₂ (g/100mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo inicial de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	201
<i>Tabela A39 – Resultados da cinética da liberação de CO₂ (g/100mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	202
<i>Tabela A40 – Resultados da cinética da liberação de CO₂ (g/100mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	202
<i>Tabela A41 – Resultados da cinética da formação de etanol (% v/v), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	203
<i>Tabela A42 – Resultados da cinética da formação de etanol (% v/v), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	203
<i>Tabela A43 – Resultados da cinética da formação de etanol (% v/v), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	204

<i>Tabela A44 – Resultados da cinética da formação de etanol (% v/v), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	204
<i>Tabela A45 – Resultados de rendimento da fermentação (%), em substratos com 80, 120, 160, e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	205
<i>Tabela A46 – Resultados da cinética de consumo de substrato (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	206
<i>Tabela A47 – Resultados da cinética de consumo de substrato (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	206
<i>Tabela A48 – Resultados da cinética de consumo de substrato (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	207
<i>Tabela A49 – Resultados da cinética de consumo de substrato (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	207
<i>Tabela A50 – Resultados da cinética da formação de glicerol (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	208
<i>Tabela A51 – Resultados da cinética da formação de glicerol (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	208
<i>Tabela A52 – Resultados da cinética da formação de glicerol (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	209

<i>Tabela A53 – Resultados da cinética da formação de glicerol (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	209
<i>Tabela A54 – Resultados do teor do fermento úmido (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	210
<i>Tabela A55 – Resultados do teor do fermento úmido (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	210
<i>Tabela A56 – Resultados do teor do fermento úmido (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	211
<i>Tabela A57 – Resultados do teor do fermento úmido (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	211
<i>Tabela A58 – Resultados da matéria seca do fermento (%MS), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	212
<i>Tabela A59 – Resultados da matéria seca do fermento (%MS), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	212
<i>Tabela A60 – Resultados da matéria seca do fermento (%MS), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	213
<i>Tabela A61 – Resultados da matéria seca do fermento (%MS), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	213

<i>Tabela A62 – Resultados do teor de fermento seco (g/100 mL), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>214</i>
<i>Tabela A63 – Resultados do teor de fermento seco (g/100 mL), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>214</i>
<i>Tabela A64 – Resultados do teor de fermento seco (g/100 mL), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>215</i>
<i>Tabela A65 – Resultados do teor de fermento seco (g/100 mL), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>215</i>
<i>Tabela A66 – Resultados da viabilidade celular (%), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>216</i>
<i>Tabela A67 – Resultados da viabilidade celular (%), de fermentação alcoólica em Substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>216</i>
<i>Tabela A68 – Resultados da viabilidade celular (%), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>217</i>
<i>Tabela A69 – Resultados da viabilidade celular (%), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>217</i>
<i>Tabela A70 – Resultados do n° células viáveis / mL, de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.....</i>	<i>218</i>

<i>Tabela A71 – Resultados do nº células viáveis / mL, de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	218
<i>Tabela A72 – Resultados do nº células viáveis / mL, de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	219
<i>Tabela A73 – Resultados do nº células viáveis / mL, de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	220
<i>Tabela A74 – Resultados do pH do vinho, de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C. ...</i>	221
<i>Tabela A75 – Resultados do pH do vinho, de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C. ...</i>	221
<i>Tabela A76 – Resultados do pH do vinho, de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C. ...</i>	222
<i>Tabela A77 – Resultados do pH do vinho, de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C. ...</i>	222
<i>Tabela A78 – Resultados da velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	223
<i>Tabela A79 – Resultados da velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	223
<i>Tabela A80 – Resultados da velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	224

<i>Tabela A81 – Resultados da velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	224
<i>Tabela A82 – Resultados da velocidade média de consumo de substrato (g/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	225
<i>Tabela A83 – Resultados da velocidade média de consumo de substrato (g/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	225
<i>Tabela A84 – Resultados da velocidade média de consumo de substrato (g/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	226
<i>Tabela A85 – Resultados da velocidade média de consumo de substrato (g/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	226
<i>Tabela A86 – Resultados da velocidade específica média de formação de etanol (μ_p), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	227
<i>Tabela A87 – Resultados da velocidade específica média de formação de etanol (μ_p), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	227
<i>Tabela A88 – Resultados da velocidade específica média de formação de etanol (μ_p), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	228
<i>Tabela A89 – Resultados da velocidade específica média de formação de etanol (μ_p), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	228

<i>Tabela A90 – Resultados da velocidade específica média de consumo de substrato (μ_s), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	229
<i>Tabela A91 – Resultados da velocidade específica média de consumo de substrato (μ_s), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	229
<i>Tabela A92 – Resultados da velocidade específica média de consumo de substrato (μ_s), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	230
<i>Tabela A93 – Resultados da velocidade específica média de consumo de substrato (μ_s), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	230
<i>Tabela A94 – Resultados do fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	231
<i>Tabela A95 – Resultados do fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	231
<i>Tabela A96 – Resultados do fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	232
<i>Tabela A97 – Resultados do fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	232
<i>Tabela A98 – Velocidade instantânea de formação de etanol (mL/L/h) durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.</i>	233

Tabela A99 – Velocidade instantânea de consumo de substrato (g/L/h) durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C..... 234

Tabela A100 – Velocidade específica de formação de etanol (μ_P) durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C..... 235

Tabela A101 – Velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C..... 235

LISTA DE FIGURAS

Página

<i>Figura 1 - Cinética de consumo de açúcares redutores totais e formação de etanol no mosto/vinho, durante o transcorrer da fermentação (Basso & Amorim, 1988b).....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 1 – Rendimento(%) da fermentação em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,5 e 5,0.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 2 – Etanol (% v/v) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,5 e 5,0.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 3 – Açúcar residual (% p/v) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 4 – Glicerol (% p/v) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 5 – Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 6 – Velocidade média de formação de etanol (mL / L / h) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 7 – Velocidade média de formação de etanol (mL / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 8 – Velocidade média de consumo de substrato (g / L / h) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 9 – Velocidade média de consumo de substrato (g / L / h) em função da concentração de substrato e Temperatura, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.</i>	<i>61</i>
<i>Figura 10 – Rendimento da fermentação (%) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,5.....</i>	<i>79</i>

<i>Figura 11 – Etanol (% v/v) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,5.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 12 – Etanol (% v/v) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 13 – Açúcar residual (% p/v) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,5 e 5,0.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 14 – Açúcar residual (% p/v) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 15 – Glicerol (% p/v) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 16 – Glicerol (% p/v) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 17 – Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 18 – Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 19 – Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) em função concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 20 – Velocidade média de formação de etanol (mL / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 21 – Velocidade média de formação de etanol (mL / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 22 – Velocidade média de crescimento celular (g cel / L / h) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 23 – Velocidade média de crescimento celular (g cel / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.....</i>	<i>90</i>

Figura 24 – Velocidade média de crescimento celular (g cel / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.	91
Figura 25 – Velocidade média de consumo de substrato (g / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.	92
Figura 26 – Velocidade média de consumo de substrato (g / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.	93
Figura 27 – Rendimento da fermentação (%), etanol (% v/v), açúcar residual (% p/v), glicerol (% p/v) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), em função da concentração de substrato de glicose, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.	103
Figura 28 – Rendimento da fermentação (%), etanol (% v/v), açúcar residual (% p/v), glicerol (% p/v) e fator de conversão de substrato e produto ($Y_{p/s}$) em função da concentração de substrato de sacarose, com inóculo alto de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.	104
Figura 29 – Rendimento da fermentação (%), etanol (% v/v), açúcar residual (% p/v), glicerol (% p/v), fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e velocidade média de consumo de substrato (g ART/L/h) em função da concentração de substrato de xarope, com inóculo alto de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.	105
Figura 30 – Rendimento da fermentação (%), etanol (% v/v), açúcar residual (% p/v), glicerol (% p/v), fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), velocidade média de formação de etanol (mL/L/h) e de consumo de substrato (g ART/L/h) em função da concentração de substrato de melaço final de menor pureza, com inóculo alto de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.	106
Figura 31 – Rendimento da fermentação (%), etanol (% v/v), açúcar residual (% p/v), glicerol (% p/v), fator de conversão de substrato e produto ($Y_{p/s}$), velocidade média de formação de etanol (mL / L / h) e de consumo de substrato (g ART/L / h) em função da concentração de substrato de melaço final de maior pureza, com inóculo alto de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,50 e 38°C.	107
Figura 32 – Cinética da liberação de CO ₂ (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e temperatura de 32 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 120g ART / L; S3 – 160g ART / L e S4 – 200g ART / L.	110

<i>Figura 33 – Cinética da liberação de CO₂ (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 5,0 e temperatura de 32 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 120g ART / L; S3 – 160g ART / L e S4 – 200g ART / L</i>	<i>111</i>
<i>Figura 34 – Cinética da liberação de CO₂ (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de glicose, nas condições de inóculo de 10⁴ células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e temperatura de 32 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 120g ART / L; S3 – 160g ART / L e S4 – 200g ART / L</i>	<i>112</i>
<i>Figura 35 – Cinética da liberação de CO₂ (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de glicose, nas condições de inóculo de 10⁴ células viáveis / mL, pH inicial 5,0 e temperatura de 32 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 120g ART / L; S3 – 160g ART / L e S4 – 200g ART / L</i>	<i>113</i>
<i>Figura 36 – Correlação entre CO₂ produzido na fermentação com etanol produzido e ART consumido, em função da concentração de substrato, pH e temperatura, com inóculo alto de 10⁸ células viáveis / mL, em meio sintético de glicose.....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 37 – Correlação entre CO₂ produzido na fermentação com etanol produzido e ART consumida, em função da concentração de substrato, pH e temperatura, com inóculo de 10⁴ células viáveis / mL, em meio sintético de glicose.</i>	<i>118</i>
<i>Figura 36 – Cinética da liberação de CO₂ (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de glicose (a), de sacarose (b) e de xarope (c), nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 120g ART / L; S3 – 160g ART / L e S4 – 200g ART / L</i>	<i>121</i>
<i>Figura 37 – Cinética da liberação de CO₂ (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de melaço de menor pureza (a) e melaço de maior pureza (b), nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 110g ART / L; S3 – 140g ART / L e S4 – 170g ART / L.....</i>	<i>122</i>
<i>Figura 38 – Correlação entre CO₂ produzido na fermentação com etanol produzido e ART consumida, em função da concentração de diversos substratos, com inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.....</i>	<i>125</i>
<i>Figura 39 - Cinética da liberação de CO₂ (g/100 mL vinho), etanol no vinho (% v/v), consumo de glicose (g/100 mL vinho) e fermento seco (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C.</i>	<i>145</i>

Figura 40 - Cinética da formação de glicerol (g/100 mL vinho), viabilidade celular (%), pH do vinho e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C. 146

Figura 41 - Velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), velocidade média de consumo de substrato (g/L/h), velocidade específica média de formação de etanol e velocidade específica média de consumo de substrato durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C. 147

Figura 42 - Velocidade instantânea de Formação de Etanol (mL/L/h) e de consumo de substrato (g/L/h), velocidade específica de formação de etanol e de consumo de substrato durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C. 148

Figura 43 - Correlação entre a cinética da evolução de CO_2 com a cinética da produção de etanol e consumo de glicose durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e 38°C. 149

ESTUDO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EM FRASCOS AGITADOS

Autor: Leonel Vasco Ferreira

Orientador: Dr. Gil Eduardo Serra

RESUMO

Os experimentos de fermentação alcoólica foram conduzidos com diferentes quantidades de inóculo, pH inicial do mosto e temperatura de fermentação, estudando estas variáveis sob diferentes concentrações de substrato, em substratos de glicose, sacarose, xarope industrial e mel final da produção de açúcar. A cinética de liberação de CO₂ foi determinada em paralelo, em todos os experimentos. Também se determinou parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica em substrato de glicose. As fermentações foram monitoradas com determinação de etanol, glicerol, açúcar residual, massa celular, viabilidade e contagem de leveduras, e outras variáveis; os índices de rendimento e parâmetros cinéticos também foram calculados. Os experimentos foram conduzidos em laboratório, com frascos agitados. O inóculo com 10⁸ células viáveis / mL resultou em fermentações rápidas (2 a 8 horas) enquanto que com 10⁴ células viáveis / mL as fermentações foram lentas (18 a 44 horas). Os pH iniciais de 3,5 e 5,0 mostram influir de forma diversa na fisiologia da levedura, resultando em alterações significativas no rendimento da fermentação. Foi observado que sempre que três fatores desfavoráveis se apresentam – alta concentração de substrato, pH 3,5 ou temperatura elevada (38°C) – o rendimento da fermentação é reduzido e há comprometimento da viabilidade do fermento. A determinação da cinética de liberação de gás carbônico mostrou ser um parâmetro importante que permite determinar com precisão o tempo de fermentação e estimar a produção de etanol e consumo de açúcar. Através da cinética da liberação de gás carbônico se monitora o tempo final, para fins de caracterizar a paralisação da fermentação e

sua amostragem imediata para determinação das variáveis de controle e especialmente a viabilidade celular. O tempo de fermentação e de consumo de substrato é um fator relevante na avaliação de linhagens. Com substrato de mel final, foi observado o efeito inibidor desse substrato; o melaço com pureza de 60 fermentou significativamente pior que o de pureza 69, mostrando ambos elevada inibição pelo substrato mas especialmente o de menor pureza. Em pH 3,5, com inóculo 10^8 ou 10^4 células viáveis / mL e temperatura de 38°C, a inibição pelo substrato mostrou-se forte a partir de 160g / L de glicose; em pH 5,0 esta inibição não se manifestou.

STUDY OF THE ALCOHOLIC FERMENTATION IN SHAKEN FLASKS

Author: Leonel Vasco Ferreira

Adviser: Dr. Gil Eduardo Serra

SUMMARY

Fermentation trials were performed with different levels of inoculum, initial mash pH and temperature, and using different substrate concentrations of glucose, sucrose, industrial syrup and molasses from sugarcane production. The kinetics of carbon dioxide liberation was determined in parallel in all experiments. The kinetic parameters of the alcoholic fermentation with glucose as substrate were also determined. Fermentation was monitored by determining ethanol, glycerol, residual sugars, cell mass, yeast viability and cell count and other variables. The yield and kinetic parameters were also determined. The experiments were carried out in a laboratory in shaken flasks. The inoculum of 10^8 viable cells/mL resulted in rapid fermentations (2 - 8 hours) whilst with 10^4 cells the fermentations were sluggish (18 to 44 hours). The initial pH values of 3.5 and 5.0 caused various responses in the physiology of the yeast, resulting in significant alterations in fermentation yield. It was observed that whenever three negative factors were present - high substrate concentration, pH 3.5 or high temperature (38°C) - the fermentation yield and yeast viability were reduced. The determination of the kinetics of carbon dioxide liberation was shown to be an effective way of precisely determining the fermentation time and estimating the production of ethanol and sugar consumption. By way of the kinetics of carbon dioxide liberation, the final time could be monitored in order to characterize fermentation paralyzation and carry out an immediate sampling for the determination of the control variables and especially of cell viability. Fermentation time and substrate consumption are relevant factors in the evaluation of strains. With molasses as substrate, an inhibitory effect of this substrate was observed. Using molasses with a purity of 60%, fermentation was

significantly worse than with that of 69% purity, although both showed considerable inhibition of the fermentation. At pH 3.5, with an inoculum of 10^8 or 10^4 viable cells/mL and a temperature of 38°C, substrate inhibition was shown to be significant as from 160 g/L of glucose. At pH 5.0 this inhibition was not apparent.

1. INTRODUÇÃO

Os estudos que envolvem a condução da fermentação alcoólica em laboratório não seguem protocolos padronizados em variáveis como a concentração de açúcares, quantidade de inóculo, temperatura, pH, agitação e outros. Os resultados obtidos são dependentes destas variáveis tornando difícil a sua comparação sem a padronização de algumas.

Em experimentos de laboratório verifica-se o uso de diversos substratos como caldo de cana, xarope e melaço, sem considerar de maneira apropriada que são materiais de composição altamente variável e complexa, influenciando significativamente na fermentação. A pureza dos substratos e a natureza das impurezas influem decisivamente nos resultados.

Além disso, sem o acompanhamento cinético que permita situar o desenvolvimento da fermentação, os resultados obtidos são limitados em seu significado. A cinética de consumo de açúcar pela levedura, em frascos agitados, depende da linhagem da levedura, da concentração de açúcar, da agitação e outros parâmetros ambientais tais como o pH e a temperatura. Uma boa fermentação é aquela que proporciona a obtenção de bom rendimento alcoólico e produtividade em etanol, sem no entanto causar grandes danos à sobrevivência das células da levedura. Para tanto, o conhecimento de mecanismos envolvidos é de importância fundamental para que uma boa estratégia fermentativa seja formulada para garantir bons resultados. O acompanhamento da fermentação através da evolução de CO_2 indica o ponto exato do término da fermentação bem como o seu próprio desenvolvimento. Desta forma torna-se possível detectar pontos nos quais a fermentação é paralisada ou tratamentos em que sua velocidade é afetada.

Na literatura (Nagodawithana & Steinkraus, 1976 ; Borzani et al., 1983; Silva et al., 1987; Alterthum & Canz, 1987; Basso & Amorim, 1988a,b; El Haloui et al., 1989; Rubio & Navarro, 1989; Gutierrez, 1990, 1991; Almela et al., 1991; Maurício & Salmon, 1992; Johannes et al., 1993; Maia et al., 1993; Salmon & Maurício, 1994; Andrietta et al., 1995; Cleto & Mutton, 1995, 1997; Dominguez et al., 1997; Wanderley, 1997) as condições de fermentação são relatadas dentro de amplas faixas de variação, e até mesmo sem a completa descrição das condições experimentais. A temperatura da fermentação é na maioria dos trabalhos entre 28 a 32°C, e em raros ensaios situa-se na faixa de temperatura observada na prática industrial, entre 36 a 40°C. O pH inicial na maioria dos ensaios situa-se entre 4,5-5,0 e alguns ao redor de 3,5 que é mais compatível com a prática das fermentações industriais. Com relação à quantidade de inóculo efetivo em termos de células viáveis inoculadas, grande parte dos ensaios não controla este parâmetro, e os dados situam-se entre 10^6 a 10^9 células viáveis por mL; muitos ensaios optam por determinar a massa de células úmidas no inóculo preparado.

O objetivo deste trabalho de pesquisa foi avaliar os principais fatores envolvidos na cinética da fermentação alcoólica, para definir condições experimentais propícias ao bom desempenho da fermentação. Ou seja, as condições de temperatura, pH, concentração de açúcares fermentescíveis e teor alcoólico, e quantidade de inóculo, bem como o controle e monitoramento, devem fornecer subsídios para o conhecimento da ação daqueles fatores e planejamento de ensaios em laboratório.

Alguns resultados obtidos eram relativamente previsíveis fazendo parte do conhecimento genérico e empírico da fermentação alcoólica e da ação das leveduras. Assim o que se pretende é o estudo sistemático de fatores já conhecidos, mas tratados mediante condições selecionadas dentro da realidade de fermentação no Brasil e delineados de forma a obter resultados que contribuam ao conhecimento da fermentação alcoólica.

2. REVISÃO DE LITERATURA .

2.1. Principais fatores que afetam a cinética da fermentação alcoólica

2.1.1. Concentração de substrato

O substrato utilizado para produzir álcool no Brasil é a sacarose, que após hidrólise externa é absorvida pela levedura como glicose e frutose. As concentrações normalmente utilizadas variam de 10-15% p/v de açúcar redutor total (ART), suficientes para induzir repressão catabólica da respiração, o que favorece a fermentação mesmo em aerobiose (Ratledge & Evan, 1989).

A alta concentração de substrato permite a obtenção de alto teor alcoólico, que é desejável a nível industrial pois reduz os custos da destilação, além de propiciar maior produtividade. No entanto os efeitos danosos são sentidos pela levedura, com a redução da viabilidade e crescimento. Outros prejuízos relacionam-se com o acúmulo de etanol intracelular no início da fermentação (D'Amore et al., 1988), muito embora propicie menor formação de glicerol e ácido succínico, em valores relativos ao açúcar mobilizado ou ao etanol produzido (Alves, 1994).

Leyva et al. (1999) em um elucidativo trabalho sobre o efeito da concentração de açúcar (efeito Crabtree, que é definido como a ocorrência da fermentação alcoólica em condições totalmente oxidativas) e da concentração de oxigênio (efeito Pasteur, que é definido como o estímulo ao consumo de açúcar em anaerobiose, quando comparado à aerobiose), mostram que a produção de CO₂ é dependente da concentração de oxigênio somente em condições de concentração baixa de açúcar (menores que 0,5 mM glicose ou cerca de 0,1%). Em concentrações elevadas de açúcar a produção de CO₂ independe da concentração de oxigênio, ou seja, a regulação é dominada pelo efeito Crabtree. Esses autores mostram ainda que em condições de baixo teor de açúcar, a

glicose mostrou ser dependente do teor de oxigênio, enquanto a frutose não; esta é mais rapidamente consumida que a glicose em condições de boa oxigenação o que pode ser atribuído à maior taxa de consumo da frutose através do efeito Crabtree.

Altas concentrações de glicose no meio (acima de 150 g/L) inibem enzimas, tanto nos processos fermentativos quanto nos oxidativos, inibição esta conhecida comumente como inibição pelo substrato. Moss et al. (1971) apontam que concentrações de glicose de 3 a 5 g/L são suficientes para provocar a repressão catabólica independentemente da concentração de oxigênio no meio. Endo & Inoue (1975) trabalhando com meio sintético verificaram a concentração de 10 g/L como inibitória, e que o ideal seria a metade desse valor.

Em substrato de glicose há uma considerável repressão da função respiratória durante a fase inicial, respiração / fermentação, de rápido crescimento (MacLean, 2001).

Ekunsanmi & Odunfa (1990) sugeriram que leveduras mais tolerantes ao etanol também tendem a ser mais tolerantes ao estresse osmótico. A inibição a nível do substrato pode ser contornada por adição parcelada deste, permitindo alta viabilidade celular, menor produção de glicerol, consequentemente melhor desempenho fermentativo, com células em melhores condições para o reciclo (Kenyon et al., 1986). Segundo Monk & Cowley (1984) com altas concentrações de açúcar há maior produção de ácido acético com conseqüente redução no crescimento da levedura.

Em fermentação alcoólica a produção instantânea de biomassa da levedura *S. cerevisiae* mostrou um decréscimo (0,156 para 0,026g) com o aumento da concentração de etanol (de 0 para 107 g/L), indicando uma relação definida entre a produção de biomassa e a inibição pelo produto. A inibição do substrato (glicose) foi observada quando a sua concentração está acima de 150

g/L. Uma relação similar foi também constatada entre inibição pelo substrato e a produção instantânea de biomassa. Foi verificado que a inibição pelo produto não tem quase nenhum efeito considerando que a inibição pelo substrato afeta significativamente a produção do produto, refletindo-se numa diminuição do produto produzido de 0,45 para 0,30g etanol/g substrato quando a concentração inicial de substrato aumenta de 150 para 280g/L. Estes resultados obtidos têm influência significativa na formulação do substrato, otimização e na variação de forma do fermentador e desenvolvimento de uma estratégia efetiva de controle para otimizar a produtividade de etanol (Thatipamala et al., 1992).

Raghav et al. (1989) chamam a atenção para o fato que dois pré-requisitos são importantes para produção eficiente de etanol: leveduras com alta produtividade específica de etanol e tolerância adequada ao substrato. A osmotolerância é particularmente importante quando melaços são utilizados. Citam ainda que há relativamente poucos dados sobre performance comparativa de leveduras em melaços com alto teor salino. Esses autores conduziram experimentos com melaço de cana contendo 200 g/L de glicose equivalente.

Salmon & Maurício (1994) sugerem que a atividade de absorção de açúcar é um dos fatores mais limitantes durante a fermentação de caldo de uva, e que pode haver uma possível relação entre a paralização da síntese de proteína, alteração na composição de lipídeos da membrana e a redução observada na capacidade de transporte do açúcar. A toxicidade ao etanol produzido não parece ser o fator determinante.

Maurício & Salmon (1992) observaram a diferença entre duas linhagens de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* (738-2 e K1) com relação à perda aparente da atividade de transporte de hexose. De acordo com os autores, este fenômeno seria suficiente para explicar as diferenças observadas na produção máxima de etanol que foi maior com a linhagem K1. Sugerem ainda que é necessário buscar boa integração de atividade de transporte de açúcar durante a

fermentação e a quantidade máxima de açúcar a ser consumido no decorrer da mesma (Salmon & Maurício, 1994).

À medida que os nutrientes tornam-se limitantes, a *S. cerevisiae* entra na fase estacionária de crescimento. Nessa fase, com a redução da taxa de metabolismo e da síntese protéica, e a síntese de carboidratos de reserva, as células tornam-se consideravelmente mais tolerantes a condições de estresse potencialmente letais como o calor e exposição a oxidantes (MacLean et al., 2001; Drebot et al., 1990).

As células de levedura precisam sair do ciclo celular, e entrar num estado de resistência induzida por falta de nutrientes, para que consigam manter a viabilidade em períodos longos (MacLean et al., 2001).

2.1.2. O pH e a temperatura

A concentração hidrogeniônica é um fator de extrema importância para a fermentação sobretudo no controle da contaminação bacteriana e seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos. Os principais contaminantes são bactérias formadoras do ácido láctico e seu desenvolvimento é consideravelmente reprimido a valores de pH abaixo de 5,0 (Jones et al., 1981). Foi observado pelo autor que a faixa de pH ótimo para fermentação é entre 2,8 a 3,2, onde se mantém alta produção de etanol em condições laboratoriais. Gomes (1988) observou maiores perdas de nutrientes das células, a valores de pH baixo, especialmente nitrogênio e potássio. Os valores de pH dos meios fermentativos industriais encontram-se geralmente na faixa de 4,5 a 5,0 com uma boa capacidade tamponante (Jones et al., 1981), mas algumas leveduras mantêm sua homeostase de forma quase independente dos valores de pH do meio, assim como sua capacidade tamponante (Eraso & Gancedo, 1987). Sob uma faixa de pH externo entre 3,0 e 8,0, o pH interno encontra-se entre 6,0 e

7,0 com um gradiente interno do centro para a periferia da célula, sendo mais ácido próximo a membrana (Slavik & Kotyk, 1984).

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes e influencia todos os mecanismos que regem os microrganismos (Watson, 1987). De acordo com Jones et al. (1981) a temperatura ótima para a fermentação é de 5 a 10°C acima da ótima para o crescimento; ou seja, 25 a 30°C segundo Watson (1987). Por outro lado Stupiello & Horii (1981) afirmaram que a reprodução de células pode ocorrer até temperatura da ordem de 38°C, havendo inibição da multiplicação a 40°C na presença de 8 a 9° GL de álcool. Entretanto, em baixas concentrações de álcool pode haver reprodução a temperaturas superiores a 38°C em algumas linhagens. A levedura *S. uvarum* apresentou maior resistência ao etanol a temperaturas de 5 a 10°C, porém entre 25 a 35°C o efeito inibitório do etanol foi mais pronunciado.

Leveduras que crescem a 40°C ou mais, são consideradas termotolerantes (Panchal & Tavares, 1990). No entanto sua capacidade de fermentar a essas temperaturas geralmente é reduzida. A utilização de temperaturas mais elevadas reduz o tempo de fermentação e eleva a taxa de morte celular (Ferreira, 1998), pela maior sensibilidade ao etanol por parte da levedura nessas condições (Gao & Fleet, 1988). O aumento da temperatura também induz a uma diminuição nos teores das proteínas e dos ácidos nucleicos da célula (Parada & Acevedo, 1983) com conseqüente diminuição do crescimento. Na temperatura de 40°C foi detectado por Gomes (1988) perdas de nutrientes das células, principalmente fosforo e potássio.

Quanto maior a temperatura, mais acentuada é a queda da viabilidade (Wanderley, 1997; Ferreira, 1998). Numerosos fatores exercem seus efeitos sobre o bom desenvolvimento da fermentação alcoólica em particular: a linhagem da levedura, aeração de mosto e a temperatura de fermentação. Entre 25 e 35°C a sobrevivência da levedura é melhor do que em temperatura mais elevada. O teor

final de álcool formado é no entanto mais importante do que a temperatura baixa. A aeração aumenta a taxa de fermentação pelo aumento da taxa de multiplicação da levedura e é responsável pelo acréscimo de 1 a 3% da taxa de álcool produzido. A aeração favorece a síntese por parte da levedura de “fatores de sobrevivência”, contribui também para uma fermentação alcoólica completa ou seja exaustão de açúcar do meio fermentativo. A elevação da temperatura aumenta a toxicidade do álcool sobre a levedura, limita o seu desenvolvimento e a taxa de fermentação (Colas & Cuinier, 1983).

Foi observado por Wanderley (1997) que o rendimento em etanol obtido em fermentação de batelada foi baixo e bem menor que o máximo teórico (0,5111g/g de ART), e que não é influenciado pela temperatura na faixa de 30 a 40°C, sendo igual a 0,354 g de etanol/g de ART. Verificou-se que a produção de gás carbônico ao longo da fermentação comportou-se de uma forma semelhante na faixa de 30 a 34°C, e diminuiu com o aumento da temperatura. O mesmo ocorreu com o consumo de ART e a produção de etanol ao longo da fermentação. A produção de massa seca durante a fermentação alcoólica foi maior quanto menor a temperatura.

Raghav et al. (1989) estudaram o efeito da temperatura (30 e 40°C, a pH 4,5) em fermentação de melaço com a concentração de 200g/L de açúcares redutores totais (ART) com duas linhagens de *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* y-10 e *S. uvarum* linhagem 17. Verificaram que a concentração de etanol em 24 horas foi alta a 30°C, cujos valores são 80 e 79 g/L, respectivamente; os valores correspondentes a 35°C são 75 e 78 g/L e 63 e 62 g/L a 40°C, respectivamente. Segundo os autores a sensibilidade à temperatura mostrou-se mais expressiva em condições fechadas de fermentação e em concentrações mais altas de etanol.

A temperatura ótima de operação para a máxima produção de etanol e máxima utilização de substrato em fermentação descontínua de um resíduo de licor sulfítico, “waste sulphite liquor (wsl)” e um meio sintético contendo 25g/L de

glicose com *S. cerevisiae* foi determinado por Rousseau et al., (1992). O consumo de substrato resultou em um tempo de fermentação de 13 e 45 horas (a 30°C) com o meio sintético e o de wsl, respectivamente. A concentração de etanol nos dois meios foi também máxima sob estas condições: 11,6 g/L e 9,4 g/L com o meio sintético e wsl, respectivamente. A produtividade de biomassa e de etanol aumentou com o aumento da temperatura e alcançou o valor máximo de 0,89 e 0,21 g/L/h de etanol no meio sintético e wsl, respectivamente. A produtividade da biomassa em meio sintético atingiu o valor máximo de 0,16 g/L/h e 0,02 g/L/h em meio wsl. Os agentes inibitórios no meio wsl (glicose, galactose, manose e sulfito) afetam a atividade metabólica microbiana e prolonga sobretudo o tempo de fermentação quando decresce a produtividade de biomassa e etanol.

2.1.3. Quantidade de inóculo

Durante a produção de etanol a fermentação rápida é conseguida com altas concentrações de inóculo utilizadas, e conseqüente aumento de temperatura (Panchal & Tavares, 1990). Nagodawithana & Steinkraus (1974, 1976) afirmam que baixa viabilidade celular pode ocorrer em alta concentração de células na fermentação alcoólica.

A recirculação das células da levedura permite a manutenção da alta concentração celular e maior eficiência decorrente de um menor consumo de açúcar utilizado para a formação de células (Amorim et al., 1985), que de acordo com as condições de fermentação pode desviar de 2 a 10% do açúcar total para a produção da sua biomassa (Stupiello & Horii, 1982). As altas concentrações iniciais de células ocasionam menor crescimento e permitem maiores taxas de produção de etanol (Cachot et al., 1991), enquanto que a remoção de células proporciona diminuição na eficiência fermentativa (De Martin, 1988). Vega et al. (1987) observaram que o aumento da concentração do inóculo diminui a

severidade da inibição do etanol. Os mesmos autores sugeriram que essa variável fosse incluída nos modelos cinéticos de inibição de fermentação pelo etanol.

Têm sido divulgado trabalhos a respeito da influência da quantidade do inóculo sobre a fermentação alcoólica com leveduras (Nagodawithana & Steinkraus, 1976; Strehaiano et al., 1983). Estes autores constataram em fermentações descontínuas ou em batelada, com três linhagens de *Saccharomyces*, que o rendimento em etanol permanecia constante em todos os níveis de inóculo, enquanto a velocidade específica de crescimento e o rendimento em biomassa diminuíram com o aumento de sua concentração. A partir desses resultados afirmaram que os parâmetros de produção são menos afetados pela variação do inóculo do que parâmetros de crescimento (produtividade).

Strehaiano et al. (1983) conduziram um trabalho com o objetivo de observar a influência do nível de inóculo sobre o rendimento fermentativo e proporção de crescimento. Concluíram que o nível de 2% proporciona longo tempo de fermentação, alta produção de biomassa e bom crescimento específico; com o nível de 10% houve redução do tempo de fermentação e a fase lag foi bastante reduzida; com o nível de 60% a fermentação foi rápida e não foi possível observar a fase lag; o crescimento específico foi baixo. Os mesmos autores comentam que trabalhos em fermentação alcoólica têm sido conduzidos sob diferentes condições de inoculação. Esses autores citam que estudos de cinética de crescimento da levedura são freqüentemente conduzidos sem qualquer referência à quantidade de inóculo, e diversos autores no estudo da fermentação alcoólica usaram diferentes níveis de inóculo. Acrescentaram que tais condições experimentais não padronizadas certamente podem produzir resultados diferentes. Ainda as conclusões dos pesquisadores procuram responder à questão de qual quantidade de inóculo deve ser empregada. Inóculos pequenos são considerados para estudos básicos em parâmetros cinéticos pois resultam em longos tempos de fermentação, alta produção de biomassa e boa taxa de

crescimento. A inoculação com 10% (v/v), a partir de uma suspensão de células (inóculo preparado) com 10^6 células / mL, é classificada pelos autores como de uso clássico em indústrias de fermentação. Essa quantidade de inóculo também permite estudos cinéticos (lag fase é minimizada) e tem a vantagem de reduzir o tempo de fermentação.

Em fermentações (30°C) com *S. cerevisiae*, com 7×10^8 células / mL, em meio de solução de mel com 25° Brix, Nagodawithana & Steinkraus (1974) obtiveram fermentados com 12% (v/v) de etanol em 2,5 a 3 horas, ou seja, fermentações rápidas; a taxa de mortalidade foi elevada, e apenas 2,1% sobreviveram ao final de 3 horas sob condições anaeróbias. A oxigenação provocou um aumento progressivo na sobrevivência das células. Os autores definem "fermentação rápida" como sendo aquela em que o teor de etanol atinge 12% (v/v) em 6 horas ou menos. Esta fermentação é consequência, primeiro, do uso de concentração de células de 3×10^9 células / mL. Em elevada concentração de açúcar (25 °Brix, mel de abelha), Nagodawithana & Steinkraus (1974) mostraram que a 30°C houve diminuição na viabilidade celular ao longo das 5 horas em que a fermentação ocorreu. Dentre temperaturas de 15 a 30°C, as concentrações menores de células causaram retardamento da produção de etanol, apresentando menores velocidades máximas durante a fermentação (7 horas). Os pesquisadores ao estudar em diversas condições de concentração de substrato, quantidade de inóculo e temperatura de fermentação, fazem importantes comentários para o delineamento de experimentos. Se o tempo de fermentação não é questão primordial, as condições de fermentação podem ser selecionadas de modo a manter a população de levedura estável ou com crescimento.

Durante a fermentação em batelada a levedura *S. cerevisiae* mostra, ao longo da fase de crescimento, taxas elevadas de glicólise e conseqüentemente de produção de etanol. Durante a fase estacionária as taxas decrescem gradualmente levando ocasionalmente a fermentações muito lentas e incompletas

("sluggish fermentation" ou "stuch fermentation") em meios contendo altos teores iniciais de açúcar (Salmon & Maurício, 1994). Os autores conduziram estudos de cinética de fermentação em meio com 285 g / L de glicose, 10 g / L de extrato de levedura, 20 g / L de bacto-peptona, tamponizado a pH 3,5 com tampão 30 mM de ácido cítrico / citrato; a concentração inicial de células foi de 10^6 células / mL.

2.1.4. Metabólitos

Segundo Toda et al. (1987) a inibição de crescimento pela concentração de etanol é de 45g/L para *Kluyveromyces fragilis* e 125g/L para *Saccharomyces cerevisiae* UQM66Y. As concentrações de etanol que inibem completamente a fermentação variam entre 93-235g/L. Em alguns relatos, ela é quase a mesma ou um pouco maior da que inibe o crescimento. Segundo Salgueiro et al. (1988) o etanol estimula a morte térmica e inibição do sistema de transporte da D-xilose, além de provocar autólise celular, nas concentrações acima de 10 e 16% v/v, respectivamente.

O efeito inibitório do etanol produzido em *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação é complexo e é o principal fator para resultar em fermentação incompleta e conseqüentemente de baixo rendimento fermentativo. Portanto, o melhor conhecimento do efeito de etanol sobre a levedura pode ser interessante para melhorar a fermentação (Galeote et al. 2001). O etanol retarda o crescimento da levedura, reduz sua viabilidade e habilidade fermentativa. O etanol também modifica a fluidez da membrana plasmática (D' Amore et al. 1988), estimula a atividade da membrana plasmática H⁺-ATPase (Monteiro & Sa-Correia, 1998) e inibe o transporte de glicose (Salmon et al. 1993). Teores de etanol entre 4 e 6% (v/v) induzem a formação da proteína de choque térmico em meio de cultura com levedura a 24°C e inóculo de 10^6 células / mL. Entretanto, pouca informação está disponível para condições fermentativas industriais, as quais são caracterizadas por alta concentração inicial de açúcar (150-260 g/L), e por

consequente alta concentração final de etanol (11-15% v/v), baixo pH (2,9-3,6) e baixa disponibilidade de nitrogênio. A principal característica desse tipo de fermentação é a maior produção de etanol na fase estacionária das células. Durante a fase estacionária a fermentação decresce até a completa exaustão de açúcar. O impacto de etanol no decréscimo da fermentação não está ainda precisamente esclarecido (Galeote et al., 2001).

A levedura *S. cerevisiae* produz grandes quantidades de glicerol como um regulador osmótico durante estresse hiper-osmótico e como fonte de redox em baixa disponibilidade de oxigênio. O metabolismo do glicerol é de fundamental importância no metabolismo da levedura, especialmente em meios com baixo potencial osmótico. Sob condições anaeróbicas o glicerol é formado para reoxidar o NADH formado em reações de anabolismo e na síntese de ácidos orgânicos. Sob condições aeróbicas o glicerol pode também ser formado, mas normalmente em teores mais baixos; exceção ocorre em baixo potencial osmótico, quando o glicerol age como regulador osmótico e quantidades substanciais podem ser formadas (Costenoble et al., 2000).

A produção de glicerol sob condições fermentativas pode ser eliminada pela presença de baixas concentrações de oxigênio (condições microaeróbicas). Estudos de modelagem matemática indicam que nesse caso a oxidação do excesso de NADH ocorre via cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. A redução da formação de glicerol neste sistema teria grande impacto na produção de etanol combustível, minimizando a formação de subprodutos. Dependendo das condições de fermentação, cerca de 4 a 10 % da fonte de carbono podem ser convertidos para glicerol (Costenoble et al., 2000).

Jones & Greenfield (1986) demonstraram que o etanol formado tem maior efeito na redução da atividade de água no substrato de fermentação do que os açúcares. Os resultados experimentais com três linhagens de levedura mostraram

que a inibição do etanol ocorre tanto reduzindo a atividade de água como em consequência de sua própria toxicidade à célula de levedura.

2.1.5. Cinética da fermentação alcoólica

Sablayrolles & Barre (1993a) utilizaram a determinação do gás carbônico por pesagem em intervalos de tempo, para monitorar e calcular dados cinéticos da fermentação. A validade desta metodologia para monitorar a fermentação foi demonstrada por El Haloui et al. (1989). Demonstraram que em fermentações sob diversas condições isotérmicas essa relação varia com as diferentes temperaturas estudadas (16 a 30°C). Comparando as duas condições de temperatura (isotérmicas e anisotérmicas) na duração da fermentação os autores verificaram que a fermentação é acelerada em certos momentos sob condições anisotérmicas. Segundo eles este fenômeno parece ser influenciado severamente por outros fatores, particularmente pela assimilação de nitrogênio contido no mosto. Com alguns mostos é possível obter a mesma duração da fermentação em condições anisotérmicas com uma temperatura inicial bem mais baixa (22°C em vez de 30°C). Entretanto, esta ativação algumas vezes apresenta consequências negativas, como a elevada mortalidade celular no final da fermentação (Sablayrolles & Barre, 1993a).

Bryan & Silman (1991) utilizando levedura seca comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) como inóculo, mostraram que foi requerida uma lag fase de apenas 15 minutos para que a levedura seca iniciasse o crescimento e produção de etanol. Esses mesmos autores relataram que a concentração de etanol pode ser estimada com precisão através da perda de massa durante a fermentação, com pré-saturação do meio com CO₂ antes do manuseio.

A fermentação alcoólica é um processo complexo que envolve diferentes mecanismos físicos, químicos, bioquímicos e microbiológicos. Os principais

fatores como a temperatura, pH, etanol, açúcar, nutrientes, oxigênio e inibidores, estão bastante identificados e seu efeito parcialmente descrito. A modelagem precisa da cinética é impossível devido aos inúmeros parâmetros envolvidos, ao lado da variabilidade da composição dos mostos naturais. A predição da cinética é de grande utilidade para a avaliação do tempo de fermentação e para a prevenção de fermentações longas ("stuck fermentations"). No futuro isto pode ser possível usando um modelo empírico baseado em observações cinéticas (Sablayrolles & Barre, 1993b).

Na Figura I podem ser observadas variações nos teores de etanol e açúcares redutores totais no mosto/vinho, no decorrer da fermentação com 10% de fermento inicial (*Saccharomyces cerevisiae*). Nota-se que em quatro horas de fermentação a concentração de açúcar aproximou-se de zero, quando foi atingida praticamente a máxima concentração de etanol na suspensão.

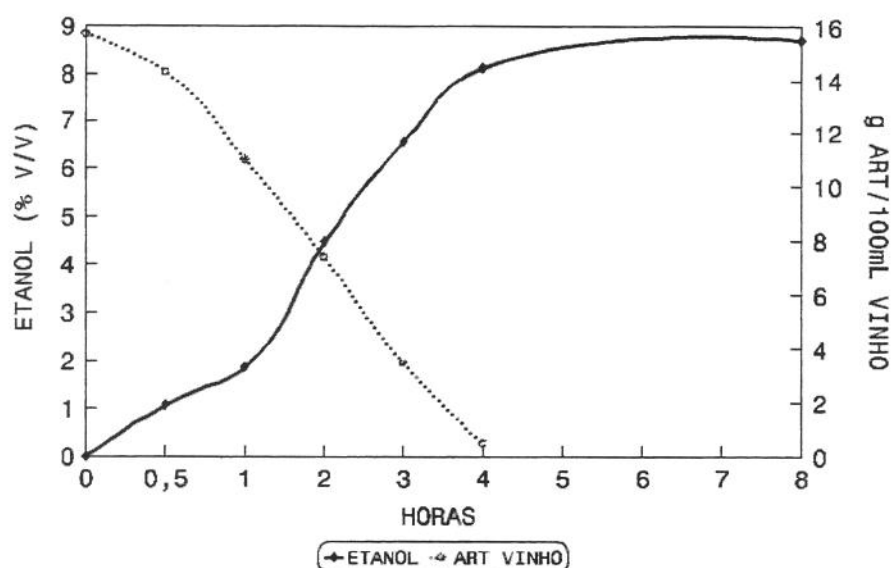


Figura I - Cinética de consumo de açúcares redutores totais e formação de etanol no mosto/vinho, durante o transcorrer da fermentação (Basso & Amorim, 1988b).

Caro et al. (1991) em estudo sobre o desenvolvimento de um modelo cinético para a fermentação alcoólica de mosto de uva em batelada, na faixa de pH 3,0-3,6, observaram a inibição do crescimento da levedura pelo substrato, e em segundo plano a inibição competitiva dos açúcares do substrato. Finalmente, a inibição pelo produto e a redução da viabilidade da levedura foram observados e atribuídos ao etanol. Esses autores observaram que em fermentadores de laboratório, com inóculo de $1,8 \times 10^6$ e substrato com 214 g ART/litro, a produção de CO_2 e etanol não correspondem a um simples cálculo estequiométrico. Atribuem a diferença ao gás carbônico produzido pela atividade respiratória da levedura. Sob condições microaerofílicas a demanda específica em oxigênio para a respiração da *S. cerevisiae* é de 8 mmol $\text{O}_2/\text{h/g}$ de biomassa, em condições operacionais industriais; este valor mostrou-se consistente com os resultados obtidos em fermentador piloto. O crescimento da levedura *S. cerevisiae* consome 10g substrato/g biomassa, e 0,01g substrato/h/g biomassa. Esses valores significam um consumo de substrato para manutenção abaixo de 10% do total de substrato consumido. Os autores afirmam ser possível o uso do modelo cinético obtido com os dados de laboratório para uma escala de processo industrial, com condições operacionais similares empregadas em cada escala. Esses autores concluem que a respiração pode explicar até 50% das perdas totais na eficiência da levedura (geralmente, entre 5 a 20g de etanol / litro), enquanto a evaporação do etanol não é maior que 10% das perdas totais; outros processos, como a síntese de componentes celulares e produtos secundários do metabolismo, são ainda apontados como mecanismos importantes.

Bely et al. (1990) explicam que a taxa de produção de CO_2 é obtida por acompanhamento polinomial e que as numerosas medidas da evolução do CO_2 e a precisão da pesagem (0,1 ou 0,01 g) permitem obter a taxa de produção de CO_2 com boa precisão. Esses autores propõem que a curva de produção de CO_2 possa ter diversas aplicações úteis e significativas. O valor máximo desta taxa fornece uma informação preliminar sobre a fermentabilidade do mosto. A curva de CO_2 pode ser usada para predição da cinética, especialmente em fermentações

lentas; as curvas não permitem a predição de fermentação lenta, mas podem ser usadas ao final da fermentação para detectar o risco de paralisação prematura. El Haloui et al. (1989) também se preocuparam com um método para predição da cinética da fermentação em linha ("on-line"), de modo que se possa prevenir a paralisação prematura da fermentação, e a sua finalização para estimar o tempo total da mesma.

Bazua & Wilke (1977) encontraram valor de produção específica de etanol de 1,098 g/g/h para 60 g/L de glicose com *Saccharomyces cerevisiae* ATCC4126. Aiba et al. (1969) chegaram a um valor máximo de 1,0 g/g/h com linhagem *S. cerevisiae* com deficiência respiratória. No referido trabalho a máxima concentração específica de etanol produzido é de 0,58 g/g/h em cultivo em batelada com alta concentração de levedura e um valor de 0,75 g/g/h com o reciclo contínuo de células. A eficiência da fermentação foi também relativamente alta em fermentação contínua (84-86%) e o máximo de produtividade de 36 g/L/h em meio com 20% de glicose. Dados de Cysewski & Wilke (1977) mostraram valores de 29 g/L/h e 40 g/L/h, respectivamente, em meio com 10 e 33,4% de glicose.

Rosaris et al. (1979) em estudo da cinética da fermentação alcoólica com alta concentração de levedura, da ordem de $3,0 \times 10^9$ células viáveis / mL ($3,6 \pm 2 \times 10^{10}$ células/g), com a concentração de glicose de 200 g/L, observaram que nas primeiras 3 horas o decréscimo de açúcares redutores totais (ART) foi aproximadamente constante e que a razão de utilização é de $0,40 \pm 0,03$ g de etanol/g de ART utilizado que quando comparado com o valor estequiométrico de 0,511 g/g, corresponde a 78,3% de conversão de glicose em etanol. A produção específica de etanol foi estimada como $1,62 \pm 0,2 \times 10^{-11}$ g de etanol/célula viável ou 0,58 g/g/h.

Com concentração de glicose superior a 150 g/L há decréscimo de crescimento celular proporcional ao aumento da concentração. Concentração de

glicose acima de 400 g/L, aumenta acentuadamente a fase lag, o crescimento começa após 95 horas sob concentração de glicose de 600 g/L (Toda et al., 1987).

Há efeito sinérgico entre as concentrações de etanol e glicose. Sobre o crescimento da levedura não foi verificada inibição com a concentração de 10g de glicose/L, e o crescimento específico da levedura foi quase constante para concentração de etanol menor que 12 g/L. Acima desse valor, o crescimento específico decresceu linearmente com o incremento da concentração de etanol. A concentração na qual o crescimento é inibido completamente, foi estimado em 95g de etanol/L. Quando a concentração de glicose existente foi incrementada (100 e 200 g/L) o crescimento foi severamente inibido por concentrações menores de etanol. A inibição total da fermentação foi observada com 195 g/L de etanol (Toda et al., 1987).

Sabluyrolles & Barre (1993b) verificaram que o nitrogênio assimilável é um parâmetro muito importante na cinética da fermentação e o limite de deficiência é cerca de 140 a 150 mg N/litro. Assim, a produção instantânea de CO₂ pode ser influenciada não somente pela temperatura mas também pelo elevado teor de nitrogênio em mostos.

Rubio & Navarro (1989) em estudo do efeito de agitação sobre as variáveis cinéticas da fermentação alcoólica com *S. cerevisiae*, em meio contendo melaço com 15% de açúcares redutores totais, verificaram que as taxas de produção de etanol, produtividade específica, taxas de utilização de substrato e de crescimento, estiveram significativamente relacionadas com a taxa de agitação. Este resultado seria explicado por aumento de transferência de massa, o que permitiria maior absorção de substrato e rápida eliminação do produto pela levedura. Detectaram nesse processo valores de produtividade volumétrica e taxas de crescimento de 33 e 83%, respectivamente, acima dos valores obtidos sem agitação, quando esta foi de 200 rpm. O crescimento celular é aumentado pela agitação e resulta numa rápida formação de etanol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ensaio de fermentação

Os ensaios foram conduzidos com quatro repetições para cada tratamento.

3.1.1. Fatores que afetam a fermentação em meio de glicose

Os experimentos foram conduzidos em frascos agitados contendo substratos de concentração definida. Em meio de glicose foram estudados os efeitos de diversos fatores, cada um numa faixa de variação: a) quantidade de inóculo: de 10^8 células viáveis / mL, que é o limite a partir do qual praticamente não ocorre multiplicação celular, além de ser observado, no início e decorrer das fermentações industriais em batelada; de 10^4 células viáveis / mL, sendo adotado como o tratamento comparativo, com possibilidade de crescimento celular; b) pH inicial: de 3,5 que ocorre no início das fermentações industriais, e de 5,0 que é o pH próximo do ideal para crescimento e utilizado em grande parte dos experimentos de laboratório; c) temperatura de fermentação: 32°C como favorável à levedura, e a de 38°C observada durante a fermentação na maioria das destilarias brasileiras; d) concentrações de substrato: 80, 120, 160 e 200g ART / L que incluem experimentos normalmente realizados em laboratório e nas condições industriais.

Em resumo, os tratamentos utilizados foram:

a) Quantidade de inóculo de levedura:

10^8 a 10^9 células viáveis / mL

10^4 a 10^5 células viáveis / mL

b) Concentração de substrato: 80, 120, 160 e 200 g ART / L

c) pH: 3,5 e 5,0

d) Temperatura: 32 e 38°C

Para instalação desse experimento foi preparado, em um frasco erlenmeyer, 1,5L de meio para cada concentração de substrato. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C com pressão de 1 atmosfera por 20 minutos. O pH dos meios foi corrigido com H_2SO_4 0,1N e NaOH 0,1N. Estes foram inoculados com o fermento seco na quantidade adequada (37,5g por frasco ou 2,5g / 100mL de meio) para atingir a concentração de células viáveis desejada; este foi o procedimento para os tratamentos com inóculo de 10^8 células viáveis / mL. Para os tratamentos com inóculo de 10^4 células viáveis / mL foi preparada uma suspensão padrão, a partir de inóculo de fermento seco da mesma forma como foi preconizado para inóculo 10^8 . Com esta suspensão foi feita diluição de 1:10000 para obter inóculo de 10^4 (150 μ L / 1,5L). A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Y904 do fermento seco produzido pela Mauri do Brasil Ltda; este fermento apresentou entre 88 a 90% de viabilidade celular.

Os meios estéreis inoculados foram posteriormente distribuídos nos frascos erlenmeyer de fermentação de 250mL (150mL de meio), colocados em um "shaker" de temperatura controlada e sob agitação a 150 rpm. As análises realizadas nos meios preparados e inoculados foram: ART, teor de fermento úmido, matéria seca, contagem de leveduras e viabilidade celular; e nos frascos ao final da fermentação foram: etanol, glicerol, açúcar residual, teor de fermento úmido, contagem de leveduras e viabilidade celular.

A composição do meio de fermentação em minerais e fonte nitrogenada protéica é a seguinte (g/100mL): KH_2PO_4 (0,50); NH_4Cl (0,15); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,10); KCl (0,10) e extrato de levedura (0,60).

As características dos meios preparados e inoculados no tempo inicial, para cada um dos tratamentos são mostrados nas Tabelas a seguir.

Tabela I – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $3,72 \times 10^8$ células viáveis / mL.

Tratamentos	Fermento			Glicose Inicial Real
	Úmido	Seco	Matéria Seca	
g ART / L	(g/100mL)		(%)	(g/100mL)
80	9,00	2,46	27,34	7,98
120	8,10	2,25	27,81	12,06
160	8,30	2,46	29,60	16,14
200	8,00	2,36	29,46	20,30

Tabela II – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação, com pH inicial 5,0 e inóculo de $7,32 \times 10^8$ células viáveis / mL.

Tratamentos	Fermento			Glicose Inicial Real
	Úmido	Seco	Matéria Seca	
g ART / L	(g/100mL)		(%)	(g/100mL)
80	9,60	2,35	24,51	7,99
120	8,00	2,02	25,27	12,22
160	9,60	2,46	25,63	16,18
200	8,10	2,10	25,93	20,29

Tabela III – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $5,12 \times 10^4$ células viáveis / mL.

Tratamentos	Glicose Inicial Real
g ART / L	(g/100mL)
80	8,05
120	11,99
160	16,08
200	20,10

Tabela IV – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $4,20 \times 10^4$ células viáveis / mL.

Tratamentos	Glicose Inicial Real
g ART / L	(g/100mL)
80	8,00
120	12,32
160	16,12
200	20,57

3.1.2. Fermentação alcoólica em diferentes substratos

Neste ensaio foram feitos experimentos com diferentes substratos empregados em fermentação alcoólica (glicose, sacarose, xarope, melaço de menor pureza e melaço de maior pureza), com acompanhamento da cinética de liberação de CO_2 . Os tratamentos incluem a concentração de açúcar (80, 110, 120, 140, 160, 170 e 200g ART / L), em substratos inoculados com 10^8 células viáveis / mL, pH 3,50 e temperatura de fermentação de 38°C.

Para instalação deste experimento foi preparado, em um frasco erlenmeyer, 1,5L de meio para cada tipo de matéria prima utilizada e concentração de substrato em açúcar. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C com pressão de 1 atmosfera por 20 minutos. O pH dos meios foi corrigido com H_2SO_4 0,1N e NaOH 0,1N. Estes foram inoculados com o fermento seco na quantidade adequada (37,5g por frasco ou 2,5g / 100mL de meio) para atingir a concentração de células viáveis desejada (10^8 células viáveis / mL). A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Y904 do fermento seco produzido pela Mauri do Brasil Ltda.

Os meios estéreis inoculados foram posteriormente distribuídos nos frascos erlenmeyer de fermentação de 250mL (150mL de meio), colocados em um “shaker” de temperatura controlada e sob agitação a 150 rpm. As análises realizadas nos meios preparados e inoculados foram: ART, teor de fermento úmido, matéria seca, contagem de leveduras e viabilidade celular; e nos frascos no final da fermentação foram: etanol, glicerol, açúcar residual, teor de fermento úmido, contagem de leveduras e viabilidade celular.

Em meios de glicose e de sacarose foram acrescentados sais minerais e fonte nitrogenada protéica nas concentrações seguintes (g/100mL): KH_2PO_4 (0,50); NH_4Cl (0,15); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,10); KCl (0,10) e extrato de levedura (0,60). O

xarope e os melaços foram coletados diretamente na linha de produção de usinas de açúcar do Estado de São Paulo.

O xarope e os melaços utilizados foram analisados e sua composição está apresentada na Tabela V a seguir.

Tabela V - Características das matérias primas coletadas nas usinas de açúcar

Matéria Prima	Cinzas	Brix	AR	ART	Sacarose	Pureza	
						ART	Sacarose
	(ppm)	(% p/p)	(% p/p)	(% p/p)	(% p/p)	(%)	
Xarope	22,30	63,93	7,84	59,32	49,03	93	77
Melaço de Menor Pureza	101,00	84,70	10,69	63,64	50,43	75	60
Melaço de Maior Pureza	67,90	82,20	7,89	67,31	56,59	82	69

A Tabela VI mostra as características dos meios inoculados no tempo inicial de fermentação.

Tabela VI – Composição do mosto no tempo inicial de fermentação, nos meios de glicose, sacarose, xarope, melaço de menor pureza e melaço de maior pureza, nas condições de inóculo 10^8 , pH inicial 3,50 e 38°C.

Tratamentos	Fermento			ART no Mosto	Viabilidade Celular	Células Viáveis
	Úmido	Seco	Matéria Seca			
g ART / L	(g/100mL)		(%)	(g/100mL)	(%)	(cel/mL)
Glicose						
80	7,09	1,94	27,40	8,05	83	$5,15 \times 10^8$
120	7,10	2,06	28,95	12,00	83	$5,64 \times 10^8$
160	7,85	2,16	27,53	16,03	85	$5,35 \times 10^8$
200	7,29	2,16	29,70	19,96	79	$4,96 \times 10^8$
Sacarose						
80	7,10	1,97	27,78	7,71	87	$3,84 \times 10^8$
120	6,95	1,99	28,66	11,20	87	$3,16 \times 10^8$
160	6,90	2,05	29,77	15,67	85	$3,36 \times 10^8$
200	6,73	2,08	30,89	19,65	87	$4,20 \times 10^8$
Xarope						
80	7,43	2,03	27,31	7,35	85	$3,28 \times 10^8$
120	6,28	1,85	29,42	11,48	79	$3,20 \times 10^8$
160	6,38	1,95	30,56	15,56	85	$5,64 \times 10^8$
200	6,20	1,92	30,97	19,65	78	$3,48 \times 10^8$
Melaço de Menor Pureza						
80	6,88	2,06	30,01	7,65	84	$3,72 \times 10^8$
110	7,08	2,22	31,42	11,86	86	$3,84 \times 10^8$
140	7,53	2,43	32,28	13,83	83	$5,80 \times 10^8$
170	7,60	2,74	36,00	18,67	83	$3,56 \times 10^8$
Melaço de Maior Pureza						
80	5,83	1,90	32,58	7,12	89	$4,24 \times 10^8$
110	6,00	1,92	32,05	11,48	88	$5,96 \times 10^8$
140	6,68	2,08	31,08	14,36	83	$3,64 \times 10^8$
170	7,33	2,26	30,85	17,78	83	$5,08 \times 10^8$

3.1.3. Cinética da liberação de CO₂ na fermentação alcoólica em diversos substratos

3.1.3.1. Fatores que afetam a cinética de liberação de CO₂

Os tratamentos delineados referem-se à concentração de açúcar (80, 120, 160 e 200g ART / L, em substrato de glicose inoculado com 10⁸ células viáveis / mL, pH 3,5 e temperatura de fermentação de 38°C. Para instalação desse experimento foram preparados 1,5L de meio para cada concentração de substrato, e colocados em um frasco Erlenmeyer de 2L. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C com pressão de 1 atmosfera por 20 minutos. O pH dos meios foi corrigido com H₂SO₄ 0,1N e NaOH 0,1N. Estes foram inoculados com o fermento seco na quantidade adequada (37,5g por frasco ou 2,5g / 100mL de meio) para atingir a concentração de células viáveis desejada. O ensaio foi conduzido mantendo os frascos erlenmeyer sob agitação a 150 rpm em um “shaker” a 38°C.

No decorrer da fermentação foram feitas pesagens horárias dos frascos em fermentação para determinar o desprendimento de gás carbônico. A pesagem foi interrompida quando se obteve peso constante entre dois tempos sucessivos, caracterizando o término da fermentação, pelo esgotamento de açúcar ou pela inibição da levedura. Foram calculadas as variáveis cinéticas de fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e em células ($Y_{x/s}$); e velocidade média de formação de etanol (VMFE), de crescimento celular (VMCC) e de consumo de substrato (VMCS).

Com base nos resultados obtidos de CO₂ liberado, foram calculados o etanol formado e o açúcar consumido e foi verificado o desvio desses valores em relação aos resultados analíticos reais.

3.1.3.2. A cinética de liberação de CO₂ em diferentes substratos

Os tratamentos delineados referem-se à concentração de açúcar (80, 120, 160 e 200g ART / L, em substrato de glicose inoculado com 10⁸ células viáveis / mL, pH 3,5 e temperatura de fermentação de 38°C. Para instalação desse experimento foram preparados 1,5L de meio para cada concentração de substrato, e colocados em um frasco Erlenmeyer de 2L. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C com pressão de 1 atmosfera por 20 minutos. O pH dos meios foi corrigido com H₂SO₄ 0,1N e NaOH 0,1N. Estes foram inoculados com o fermento seco na quantidade adequada (37,5g por frasco ou 2,5g / 100mL de meio) para atingir a concentração de células viáveis desejada. O ensaio foi conduzido mantendo os frascos erlenmeyer sob agitação a 150 rpm em um "shaker" a 38°C.

No decorrer da fermentação foram feitas pesagens horárias dos frascos em fermentação para determinar o desprendimento de gás carbônico.

Foram calculadas as variáveis cinéticas $Y_{p/s}$ e $Y_{x/s}$; VMFE, VMCC e VMCS.

Com base nos resultados obtidos de CO₂ liberado, foram calculados o etanol formado e o açúcar consumido e foi verificado o desvio desses valores em relação aos resultados analíticos reais.

3.1.4. Cinética da fermentação alcoólica em substrato de glicose

Os tratamentos delineados referem-se a concentrações de açúcar de 80, 120, 160 e 200g glicose / L, inoculados com 10⁸ células viáveis / mL, pH 3,5 e temperatura de fermentação de 38°C. Para instalação desse experimento foram preparados 1,5L de meio para cada concentração de substrato, e colocados em um frasco Erlenmeyer de 2L. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C

com pressão de 1 atmosfera por 20 minutos. O pH dos meios foi corrigido com H_2SO_4 0,1N e NaOH 0,1N. Estes foram inoculados com o fermento seco na quantidade adequada (37,5g por frasco ou 2,5g / 100mL de meio) para atingir a concentração de células viáveis desejada. O ensaio foi conduzido mantendo os frascos erlenmeyer sob agitação a 150 rpm em um “shaker” a 38°C.

Neste ensaio com substrato de glicose foi realizado acompanhamento horário da cinética de liberação de CO_2 , formação de etanol e glicerol, consumo de substrato, variação de pH do vinho, teor do fermento úmido, matéria seca, viabilidade celular e número células viáveis / mL. Foram também calculadas as variáveis cinéticas e outras: $Y_{p/s}$ e $Y_{x/s}$; VMFE, VMCC e VMCS; velocidade média específica de formação de etanol (VMEFE), de crescimento celular (VMECC) e de consumo de substrato (VMECS); velocidade instantânea de formação de etanol (VIFE), de crescimento celular (VICC) e de consumo de substrato (VICS); velocidade específica de formação de etanol (VEFE), de crescimento celular (VECC) e de consumo de substrato (VECS).

Com base nos resultados obtidos de CO_2 liberado, foram calculados o etanol formado e o açúcar consumido e feita a comparação dos valores obtidos em relação aos resultados analíticos reais.

3.2. Determinações analíticas

3.2.1. Cinética da produção de gás carbônico

O CO₂ foi medido através de pesagens dos frascos de fermentação em intervalos de tempo de uma hora. A diferença de peso corresponde à massa de CO₂ desprendido, com precisão de $\pm 0,01\text{g}$.

3.2.2. Determinação de massa celular

Foi tomado 20 mL do vinho bruto, e transferido para o tubo da centrífuga com o peso já conhecido. A seguir foi feita a centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi separado para determinação do pH. O tubo com o precipitado de células foi pesado para obtenção do peso úmido. O fermento úmido foi transferido para Placa de Petri de boa resistência térmica, de peso conhecido, onde foi feita a secagem em estufa a 105-110°C até a obtenção de peso constante. Com o peso do fermento úmido e seco, calculou-se respectivamente o teor do fermento e a percentagem de matéria seca.

3.2.3. Determinação de etanol

O etanol foi determinado com a destilação de 25mL do vinho no microdestilador Kjeldhal adaptado para destilação de voláteis. Com o destilado obtido foi feita a leitura do grau alcoólico no densímetro digital Anton-Paar DMA-48 (Amorim et al., 1982).

3.2.4. Determinação do pH do vinho

O pH foi determinado no sobrenadante livre de células de levedura (item 3.2.2.), em medidor digital de pH.

3.2.5. Determinação do teor de cinzas condutivimétricas

Metodologia descrita por De Whalley (1975). Condutivímetro aferido com solução padrão de 1,412mV/cm a 25°C. Foi pipetado 5mL da amostra em balão volumétrica de 100mL e o volume completado com água deionizada. A porcentagem de cinzas é calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ cinzas} = 0,0018 \times \text{Condutividade específica } (\mu\text{mhos})$$

3.2.6. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada com a utilização de eritrosina para colorir as células mortas de levedura, segundo Bonneu et al. (1991). A contagem foi efetuada ao microscópio ótico através da câmara de Neubauer. A técnica consiste em se misturar em proporções iguais a suspensão da levedura (amostra) devidamente diluída, com a solução corante. As células viáveis não ficam coloridas enquanto as células inviáveis ou inativas fisiologicamente (mortas) apresentam-se coloridas de rosa intenso. Foram contadas no mínimo 500 células por câmara.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \text{n}^\circ \text{ células vivas} / \text{n}^\circ \text{ total de células (vivas e mortas)} \times 100;$$

$$\text{N}^\circ \text{ células viáveis / mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células viáveis} \times 1/0,00025}{\text{n}^\circ \text{ total de retículos contados}} \times \text{diluição} \times 10^3$$

3.2.7. Determinação de glicose

A glicose foi determinada pelo método enzimático (glicose oxidase e peroxidase) associado a um sistema revelador de fenol-4-aminofenazona, produzindo um composto colorido, com leitura em espectrofotômetro a 505 nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (490-530 nm). A reação é linear até 4,5 g / L de glicose (Trinder, 1969; Henry et al., 1974). A reação que envolve a glicose é a seguinte:

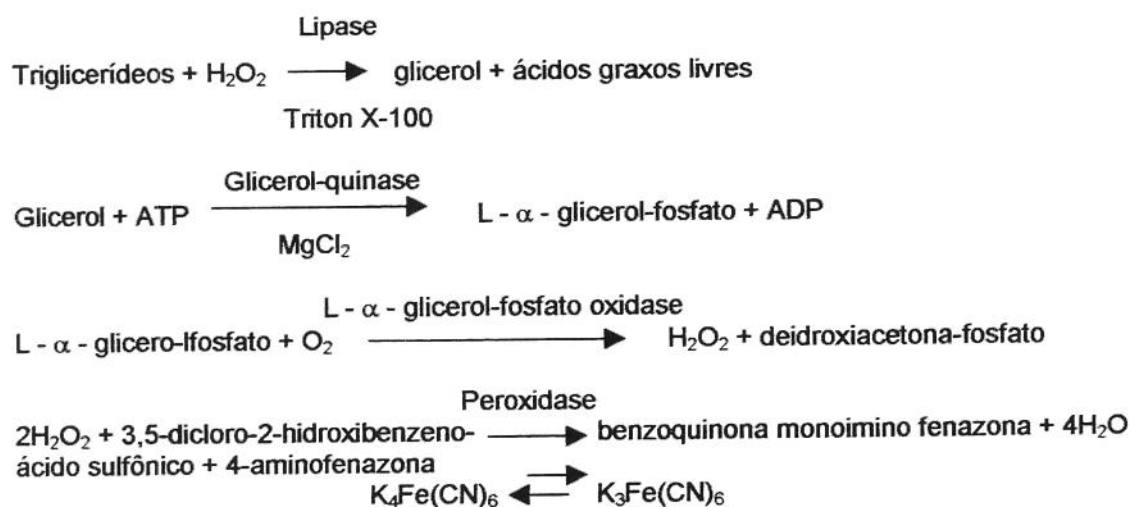


3.2.8. Determinação de açúcares redutores totais (ART) e açúcares residuais (AR)

Para determinação de ART a amostra foi submetida a uma hidrólise ácida, quando necessário. Os açúcares redutores foram quantificados pelos métodos de Lane e Eynon ou pelo método de Somogyi e Nelson, de acordo com a quantidade de açúcar presente no meio. Nas concentrações de açúcar menores que 0,5% empregou-se o método de Somogyi e Nelson mediante a reação colorimétrica. Nas concentrações iguais ou maiores que 0,5% de açúcar foi empregado o método Lane e Eynon que consiste na redução do Cu^{++} em Cu^+ , pelos açúcares redutores através de técnica de titulometria (Zago et al., 1996). Os açúcares residuais foram determinados da mesma forma como foi preconizado para ART, porém sem a reação de hidrólise da sacarose.

3.2.9. Determinação de glicerol

O glicerol foi determinado pelo método enzimático (lipase, GK, GPO, POD, ATP, 4AF e 3,5 - HDCBS). A amostra colorida com 4-aminofenazona foi lida no espectrofotômetro a 505 nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (490-530 nm). A reação é linear até 9 g / L de glicerol (Fossati & Prencipe, 1982; McGowan et al., 1983). Os triglicerídeos são determinados segundo o seguinte esquema:



3.2.10. Rendimento da fermentação e eficiência da levedura

O rendimento da fermentação (%) foi calculado a partir do etanol produzido em relação ao teor de ART presente no substrato. A eficiência da levedura (%) foi calculada a partir do etanol produzido em relação ao teor de ART consumido. Ambos com base na estequiometria da reação de fermentação (1g ART: 0,5111g ou 0,6475mL de etanol a 20°C).

3.2.11. Variáveis cinéticas

As variáveis cinéticas foram calculadas como segue (Copersucar, 1987):

Velocidade média ou produtividade – é a velocidade média com que ocorre a transformação em um dado intervalo de tempo (Δt).

Velocidade média de crescimento

$$r_x = X / \Delta t = (x_f - x_0) / (t_f - t_0) \text{ g/L/h}$$

Velocidade média de consumo de substrato

$$r_s = \Delta S / \Delta t = (s_0 - s_f) / t_f - t_0 \text{ g/L/h}$$

Velocidade média da formação de produto

$$r_p = \Delta P / \Delta t = (p_f - p_0) / (t_f - t_0) \text{ mL/L/h}$$

As velocidades instantâneas em vários momentos da fermentação:

Velocidade instantânea de crescimento

$$r_x = dX / dt \text{ (g/L/h)}$$

Velocidade instantânea de consumo de substrato

$$r_s = dS / dt \text{ (g/L/h)}$$

Velocidade instantânea de formação de produto

$$r_p = dP / dt \text{ (mL/L/h)}$$

As velocidades instantâneas da formação de produto (etanol) e de consumo de substrato foram calculadas através das equações ajustadas aos dados originais. A velocidade é obtida derivando a equação.

Velocidade específica de crescimento (μ_x), definida como relação entre a velocidade de crescimento r_x observada em um instante t e a concentração X de microrganismos observada no mesmo instante.

$$\mu_x = r_x / X$$

Velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), definida como a relação entre a velocidade de consumo de substrato r_s observada em um instante t e a concentração de microrganismos observada no mesmo instante.

$$\mu_s = r_s / X$$

Velocidade específica de formação de produto (μ_p), definida como relação entre a velocidade de formação de produto r_p observada em um instante t e a concentração de microrganismos observada no mesmo instante.

$$\mu_p = r_p / X$$

Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), definido pela relação entre a variação da concentração celular observada em um intervalo Δt e a correspondente variação da concentração de substrato verificada no mesmo intervalo.

$$Y_{x/s} = - \Delta X / \Delta S$$

Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), definido pela relação entre a variação da concentração do produto observada em um intervalo Δt e a correspondente variação da concentração de substrato verificada no mesmo intervalo.

$$Y_{p/s} = - \Delta P / \Delta S$$

Foi utilizado o teor de fermento seco para o cálculo de parâmetros cinéticos pertinentes.

3.2.12. Delineamento e tratamento estatístico dos resultados

Os resultados foram submetidos a análises e tratamentos estatísticos (Gomes, 1987). Foi aplicada a análise de variância e variância da regressão com o teste F, a comparação de médias pelo teste Tukey e ajuste de equações de regressão com os respectivos coeficientes de correlação (r).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fatores que afetam a fermentação alcoólica em meio de glicose

Os fatores estudados foram a quantidade de inóculo, a concentração de substrato, a temperatura de fermentação e o pH inicial. De acordo com os experimentos realizados e a observação geral dos seus resultados, o rendimento da fermentação, o etanol no vinho, a cinética de liberação de CO₂ (tempo de fermentação) e a população de células viáveis de levedura ao final da fermentação, constituem-se nas variáveis básicas e determinantes a serem discutidas em maiores detalhes.

O rendimento da fermentação deve ser elevado, todavia somente é interessante se concomitante com teores também elevados de etanol no vinho, isto é, rendimentos elevados obtidos em substratos com baixa concentração em açúcar não representam o objetivo do ponto de vista industrial das destilarias de álcool; não interessa a baixa produtividade nas instalações de fermentação, além do que, por exemplo, será destilado um vinho com baixo teor alcoólico (D' Amore et al., 1988). Por outro lado, a cinética da liberação de CO₂ permite determinar o tempo da fermentação (para experimentos em laboratório determina o controle do final da fermentação sem necessidade de amostragens intermitentes) (Sablayrolles & Barre, 1993b). Finalmente deve ser satisfeita a condição de ter-se um fermento, ao final da fermentação, em condições adequadas de viabilidade celular, de forma que possa ser reaproveitado em processos que reciclam o fermento.

Para a adequada execução do experimento e garantia de resultados apropriados, o acompanhamento da fermentação foi conduzido com a cinética de liberação do CO₂ por gravimetria. Deste modo se obteve a curva de liberação do CO₂ e também o monitoramento do andamento da fermentação de modo a selecionar o momento correto do término da fermentação, e assim ter os dados

obtidos segundo um referencial de tempo que é o término da fermentação, quer pelo esgotamento do substrato quer pela paralisação por inibição da levedura. Este procedimento é particularmente importante para quantificação das variáveis estudadas e, principalmente, na determinação da viabilidade celular.

É necessário lembrar que as condições de processo das fermentações industriais para produção de etanol, como praticadas no Brasil, operam com concentração de substrato (mostos de caldo de cana misturados ou não com melaço) ao redor de 200 g/L de açúcares totais; o etanol no vinho próximo a 10%, em volume, e o pH inicial próximo a 3,5. No início da fermentação em batelada o fermento representa cerca de 30% do volume da dorna de fermentação, geralmente com pH entre 2,8 a 3,5. A temperatura em geral se mantém ao redor de 38°C, uma vez que a fermentação permanece a maior parte do tempo em fase de fermentação intensa, com grande liberação de calor, e a água disponível para resfriamento é de 30-33°C; a população inicial, em células viáveis de leveduras, está ao redor de 10^8 células/mL, que se mantém durante a fermentação.

Por outro lado, os fabricantes de aguardente, principalmente aqueles de pequeno porte e artesanais, operam em condições de concentração de substrato mais próximas a 120-160 g/L de glicose, etanol no vinho de cerca de 6,0-7,5%, pH inicial ao redor de 5,0 e concentração de células viáveis de levedura ao redor de 10^6 células/mL ou menores.

4.1.1. Fermentação alcoólica com inóculo de 10^8 células viáveis / mL

Os resultados das variáveis determinadas foram submetidos a análise estatística, com aplicação da análise da variância (teste F) da regressão, em relação aos níveis de concentração do substrato. As médias e a sua comparação pelo teste de Tukey (para variâncias estatisticamente significativas) estão apresentadas na Tabela 1, adotando para a análise de variância o nível de

significância mínimo de 1%, e para a comparação das médias pelo teste Tukey o nível de 5%. As regressões estatisticamente significativas e o coeficiente de regressão encontram-se nas tabelas de comparação de médias e suas equações estão apresentadas nas Figuras 1 a 9; somente coeficientes de regressão acima de 0,80 foram considerados significantes para discussão. Na Tabela 2 encontram-se as médias dos tempos de fermentação e na Tabela 3 os resultados de contagem de células viáveis de levedura e a viabilidade celular do fermento.

4.1.1.1. pH inicial 3,5

4.1.1.1.1. Rendimento, etanol no vinho, tempo de fermentação e viabilidade do fermento

Os resultados são mostrados nas Tabelas 1 a 3 e Figuras 1 a 9. Todas as variáveis mostram a influência da concentração de substrato segundo equações de primeiro ou segundo grau, com elevados valores de coeficiente de correlação (r). Na concentração de 200 g/L de glicose se chegou a teores médios de 10,16% de etanol no vinho e observa-se que nessa concentração inicia-se a inibição pelo etanol de forma mais visível, com o rendimento chegando a apenas 77,25%. Os resultados de efeito da temperatura de fermentação são mostrados apenas quando esse fator é estatisticamente significativo.

Em 120 e 160 g/L de glicose, os rendimentos foram estatisticamente iguais, com médias de 83,50 e 83,75% e com teores de etanol no vinho de 6,5 e 8,7%, respectivamente. Na concentração de 80 g/L o rendimento foi o mais elevado, de 86,13%, com etanol no vinho de 4,5%. Este resultado mostra que na realidade, a inibição da levedura já tem seu primeiro patamar a partir desta concentração, conforme se nota pela queda no rendimento para as concentrações de substrato de 120 e 160 g/L. Thatipamala et al. (1992) observaram a inibição quando a concentração de glicose foi acima de 150 g/L. Toda et al. (1987)

afirmaram que concentrações de etanol entre 93 a 235 g/L inibem completamente a fermentação.

A Figura 1 mostra a variação do rendimento da fermentação em diferentes níveis de substrato com pH 3,5 e 5,0, podendo ser observada a diferença de comportamento entre os mesmos. Enquanto no pH 3,5 a tendência do rendimento é de queda com o aumento da concentração de substrato, no pH 5,0 houve redução seguida de aumento a partir de 160 g/L de glicose. Com o pH inicial favorável (5,0) a levedura suporta melhor o efeito desfavorável do etanol o que leva a uma fermentação completa do açúcar do meio, ou seja, sem açúcar residual (Figura 3). Este comportamento resulta em aumento do rendimento mesmo em presença de altas concentrações de substrato (200 g/L).

A eficiência da levedura foi menor nas concentrações de substrato intermediárias (120 e 160 g / L de glicose), como pode ser visto na Figura 5. Os pH iniciais de 3,5 e 5,0 se comportaram de forma similar quanto à variação da eficiência da fermentação com os níveis de substrato.

O fator $Y_{p/s}$ apresenta médias de 0,4417, 0,4260 , 0,4277 e 0,4421 g etanol/g glicose consumida, que equivalem a eficiência da levedura de 86,42, 83,3, 83,7 e 86,5%, respectivamente nas concentrações de 80, 120, 160 e 200 g/L. O mesmo efeito de redução da eficiência da levedura, nas concentrações de 120 e 160 g/L, ocorreu também em pH 5,0, onde o fator $Y_{p/s}$ apresenta médias de 0,4311, 0,4074, 0,4113 e 0,4287 g etanol/g glicose consumida, que equivalem à eficiências de 84,4, 79,7, 80,8 e 83,9%, respectivamente nas concentrações de 80, 120, 160 e 200 g/L.

Em resumo, ocorreu um aumento na eficiência da levedura, em pH 3,5 (em relação ao pH 5,0), de 2,0, 3,6, 2,9 e 2,6 unidades absolutas, respectivamente, em 80, 120, 160 e 200 g/L. Jones et al. (1981) constatou o pH ótimo para fermentação na faixa de 2,8 a 3,2, onde se mantém alta produção de

etanol em condições laboratoriais, pois, em pH abaixo de 5,0 os principais contaminantes da fermentação como bactérias formadoras do ácido láctico são severamente reprimidas. Por outro lado, em ambos pH, ocorreu redução na eficiência da levedura, em 120 e 160 g/L, expressa em relação a 200 g/L, equivalente a 3,2 e 2,8 em pH 3,5, e equivalente a 4,2 e 3,1 unidades absolutas em pH 5,0, respectivamente. A inibição mais severa foi em 120 g/L. É interessante observar que em pH 3,5 a produção de glicerol foi cerca de 6 vezes maior.

Este resultado, observando em conjunto os dados em pH 3,5 e 5,0, aponta no sentido que a concentração de açúcar causa inibição da levedura a partir de 80 g/L de glicose, sendo mantida até 160 g/L; os teores de etanol no vinho até a concentração de 160 g/L atingiram cerca de 8,7% e não causaram inibição a ponto de diminuir drasticamente ou paralisar a fermentação, ou ainda de ocorrer açúcar residual em quantidade expressiva no vinho. O contrário ocorreu quando se associou o pH 3,5 a concentração de 200 g/L, onde a inibição atribuída ao etanol foi marcante, paralisando a fermentação quando o teor de etanol no vinho atingiu cerca de 10,1%, restando ainda cerca de 2,1% de açúcar residual no vinho.

As concentrações elevadas de inóculo, 10^8 células/mL, conduziram a fermentações rápidas, de 2 a 8 horas (Tabela 2), em geral com duração proporcional à concentração do substrato, revelando o início de forte inibição, para a concentração de 200 g/L, em 8 horas de fermentação, com teor de etanol no vinho de 10,16%. Em pH 3,5 houve a tendência geral da fermentação se estender por 1 ou 2 horas. A liberação de CO_2 em 38°C mostrou, nas diversas concentrações de substrato, ser sempre maior na primeira e segunda hora de fermentação, em relação a 32°C; a tendência foi de igualarem da terceira hora em diante.

Em 80 g/L de glicose o tempo foi de 3 horas nas temperaturas de 32 e 38°C e a fermentação caracterizou-se por ser vigorosa, com um pico em 2 horas, com ligeira tendência de ser mais rápida a 38°C. Em 120 g/L foi de 5 horas, a 32 e

38°C, vigorosa e com pico em 3 horas para 32°C e em 2 horas para 38°C, que mostrou pequena tendência de ser mais rápida. A utilização de temperaturas mais elevadas reduz o tempo de fermentação e eleva a taxa de morte celular (Ferreira, 1998), pela maior sensibilidade ao etanol por parte da levedura nessas condições. Em 160 g/L, o tempo de fermentação prolongou-se até 8 horas e já mostrou sinais de inibição da levedura a 32 e 38°C, tendo atingido um teor médio de 8,75% de etanol no vinho; o pico máximo ocorreu a 2 e 3 horas do início da fermentação. Em 200 g/L o tempo de fermentação foi de 8 horas para 32 e 38°C, com pico de produção de CO₂ a 2 e 3 horas do início e com uma evolução que mostra uma expressiva inibição da levedura, mais visível a partir de 5 horas; atingiu 10,16% de etanol no vinho. Os tempos de fermentação foram determinados com base nos resultados da cinética da formação de CO₂.

A viabilidade celular da levedura mostra que para todas as concentrações de substrato, a temperatura de 38°C reduziu a viabilidade entre 61 a 86% em relação a 32°C. O aumento da temperatura induz a uma queda nos teores das proteínas e dos ácidos nucleicos da célula (Parada & Acevedo, 1983). Em temperaturas entre 25 e 35°C a sobrevivência da levedura é melhor do que em temperatura mais elevada (Colas & Cuinier, 1983). Em 80 g/L e 32°C foi detectada a maior viabilidade (70%), valor este expressivamente maior que nos demais tratamentos; em 38°C foi de 56% (Tabela 3). Na concentração de 80 g/L foram mantidas as mais altas viabilidades, tanto em pH 3,5 como 5,0. Na temperatura de 32°C, a viabilidade em pH 3,5 foi sempre menor que a pH 5,0, indicando o efeito adverso do pH 3,5 quando a temperatura era mais favorável ao crescimento. A viabilidade obtida nos quatro ensaios permite observar que: a) o pH inicial 3,5 e a temperatura de 38°C são adversos; concentrações de substrato acima de 80 g/L também manifestam efeito adverso; b) em pH 3,5 e com inóculo inicial 10⁸ (fermentações rápidas, de até 8 horas), foi mantida uma viabilidade que variou entre 24 a 70%, dependendo das condições do meio de fermentação; neste mesmo pH, mas com inóculo 10⁴, a viabilidade foi nula em praticamente todos os tratamentos, mostrando também o efeito adverso do pH 3,5; c) em pH 3,5 e com

inóculo inicial 10^8 , em concentração de 200 g/L de glicose, a viabilidade foi menos afetada (50 e 43%, a 32 e 38°C, respectivamente), o que é atribuído à manutenção de açúcar residual (ao redor de 2,1%) nesse tratamento. Neste caso, mesmo sob teores elevados de etanol no vinho, ao redor de 10,2%, obteve-se maior taxa de sobrevivência das células de levedura. Os resultados de número de células viáveis, pode-se dizer, apresentou comportamento ou tendência similar àquela da viabilidade.

4.1.1.1.2. Açúcar residual

A análise da variância mostrou haver efeito estatístico apenas para a concentração de substrato ($p < 0,001$) e sem significância para temperatura e interação desses dois tratamentos.

As médias mostram que na concentração de 200 g/L ocorreu um expressivo aumento no teor de açúcar residual. O nível de açúcar residual era extremamente baixo (0,005 a 0,009 % de glicose) até a concentração de 160 g/L, elevou-se para 2,16 % a 200 g/L, mostrando o início de uma forte inibição pelo álcool. Esse valor elevado de açúcar residual é compatível com a redução no rendimento nesse tratamento. A Figura 3 mostra a elevação do açúcar residual segundo uma equação de 2º grau, com $r = 0,97$.

4.1.1.1.3. Glicerol

A análise da variância mostrou haver efeito estatístico significativo apenas para o tratamento concentração de substrato ($p < 0,001$); não houve significância para temperatura e para a interação desses dois tratamentos.

O teor de glicerol no vinho aumenta gradativamente de 0,55 a 1,02% (p/v), de modo proporcional ao aumento da concentração do substrato. Dependendo das condições de fermentação, cerca de 4 a 10% da fonte de carbono podem ser convertidas para glicerol (Costenoble et al., 2000). Observou-se um aumento praticamente linear ($r = 0,991$). A síntese de glicerol em pH 3,5 foi cerca de 6 vezes maior do que em pH 5,0. Assim como o etanol, a produção de glicerol é diretamente proporcional à concentração de substrato como mostra a Figura 4. Em condições de pH inicial favorável (5,0) há menor produção de glicerol em comparação ao pH 3,5. Durante a fermentação alcoólica a levedura produz glicerol para manter seu equilíbrio redox. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* produz grandes quantidades de glicerol como um regulador osmótico durante estresse hiper-osmótico e como fonte de redox em baixa disponibilidade de oxigênio (Costenoble et al., 2000).

4.1.1.1.4. Fator de conversão de substrato em produto (eficiência da levedura) – $Y_{p/s}$

O fator $Y_{p/s}$ mostrou médias similares para as temperaturas de 32 e 38°C, com valores de cerca de 0,4417 em 80 g/L de glicose, 0,4260 em 120 g/L, 0,4277 em 160 g/L, e de 0,4421 em 200 g/L (Tabela 1). Os resultados também mostram que a 120 e 160 g/L, o fator $Y_{p/s}$ foi menor que nas demais concentrações de substrato; o mesmo ocorreu em pH 5,0.

Os resultados médios de $Y_{p/s}$ em inóculo 10^8 , em pH 3,5 são maiores que em pH 5,0, da mesma forma que ocorreu para o rendimento da fermentação. Contudo, foram menores que em inóculo 10^4 em pH 3,5 (Tabela 4). Este resultado é aparentemente contraditório, uma vez que em inóculo de 10^8 não foi detectado crescimento da massa celular, ao contrário do ocorrido em inóculo 10^4 , ou seja, naquele inóculo não teria havido consumo de açúcar para a formação de novas células de levedura. Todavia, o que se observou a partir desses dados, que se pode questionar, é que a metodologia usual determina a massa celular de levedura presente na fermentação e não o crescimento celular propriamente dito, isto é, a multiplicação celular que ocorre. Assim, é possível ter uma massa constante ou praticamente constante, mas haver multiplicação das células e, conseqüentemente, consumo de açúcar para esse fim. Isso explica a eficiência da levedura ser menor uma vez que há o consumo total do açúcar do substrato, mas com menos etanol formado devido ao desvio de açúcar para a formação de material celular das novas células de levedura. Todavia, é possível que quando as condições do meio forem adversas, podem favorecer a lise ou ruptura celular com liberação de açúcares no meio de fermentação, ou dificultar a multiplicação das células, alterando assim o fator $Y_{p/s}$. As fermentações longas e em condições adversas de pH e temperatura, podem favorecer a mobilização dos carboidratos de reserva da levedura, trealose e glicogênio, para manutenção de sua viabilidade celular. Ao serem mobilizados incrementam a quantidade de álcool produzido e seu esgotamento causa a redução drástica da viabilidade celular, podendo chegar a zero (Ferreira, 1998). Os resultados obtidos permitem apenas a suposição de modelos que podem explicá-los, mas certamente a sua confirmação irá depender de experimentos nesse sentido.

4.1.1.1.5. Fator de conversão de substrato em células – $Y_{x/s}$

O fator $Y_{x/s}$ não foi calculado, pois não houve crescimento da massa celular da levedura, devido ao inóculo ter sido elevado, da ordem de 10^8 células viáveis por mL de mosto.

4.1.1.1.6. Velocidade média de formação de etanol (VMFE) e de consumo de substrato (VMCS)

A velocidade média de formação de etanol (mL/L/h) mostra valores decrescentes à medida que o tempo de fermentação aumenta, em função da concentração de substrato. Somente a partir de uma concentração fixa e tempo de fermentação se mantendo constante é que há interesse prático em condições que permitam obter ganhos na VMFE. O tempo médio de fermentação do substrato de 80 a 200 g/L foi, respectivamente, de 3, 5, 8 e 8 horas. As VMFE apresentaram médias de 14,88, 13,01, 10,93 e 12,70 mL/L/h, respectivamente, nas concentrações de 80 a 200 g/L.

A velocidade média de consumo de substrato apresentou médias de 26,58, 24,11, 20,16 e 22,68 g/L/h. As mesmas considerações do parágrafo anterior aplicam-se aqui.

As velocidades médias de formação de etanol e de consumo de substrato apresentaram a tendência de queda com o aumento da concentração de substrato. A produtividade de etanol e consumo de substrato são afetadas principalmente pela concentração de substrato, não havendo interferência dos efeitos de temperatura e pH inicial (Figuras 6 a 9).

4.1.1.2. pH inicial 5,0

4.1.1.2.1. Rendimento, etanol no vinho, tempo de fermentação e viabilidade do fermento

O que se observa nos resultados é que a fisiologia da levedura e o metabolismo definido pelos ciclos bioquímicos que se envolvem com a fermentação alcoólica, fornecem respostas diferentes a pH 5,0 em relação a pH 3,5.

O fator $Y_{p/s}$ apresenta médias de 0,4311, 0,4074, 0,4113 e 0,4287 g etanol/g glicose consumida, que equivalem a eficiências de 84,3, 79,7, 80,8 e 83,9%, respectivamente nas concentrações de 80, 120, 160 e 200 g/L. O mesmo efeito de redução da eficiência da levedura, nas concentrações de 120 e 160 g/L, ocorreu também em pH 3,5.

Em resumo, pode-se dizer que em 80 g/L o rendimento foi de 84,13% , e nos tratamentos de 120 e 160 g/L de glicose, o rendimento da fermentação foi de 81,13% para ambas as concentrações. Quanto ao fato do rendimento ter sido maior a 200 g/L (85,13%), pode ser notado que nessa concentração de substrato o teor de glicerol não teve um aumento proporcional à formação de etanol, em relação aos demais tratamentos. O fator $Y_{p/s}$ mostra que em 120 e 160 g/L a eficiência da levedura, em etanol formado por unidade de glicose consumida, foi menor; em 80 e 200 g/L foi de 0,4316 e 0,4287 g etanol/g glicose consumida, o que equivale a eficiências de 84,3 e 83,9%, respectivamente; em 120 e 160 g/L foi de 0,4075 e 0,4128 , ou 79,7 e 80,8% de eficiência da levedura, respectivamente. Essa diferença média de aproximadamente 4% na eficiência da levedura, menor em 120 e 160 g/L, em relação a 80 e 200 g/L, é responsável por uma diferença média de aproximadamente 3,0 unidades absolutas no rendimento, justificando aquela queda no rendimento.

Os resultados para as concentrações de substrato de 80, 120 e 160 g/L permitem observar que o etanol no vinho em cada um deles é similar tanto para pH 5,0 como pH 3,5; contudo, nessas concentrações, o rendimento a pH 5,0 é menor, sem que o açúcar residual seja afetado expressivamente, quando se compara os dois pH; até mesmo o glicerol é cerca de 6 vezes menor a pH 5,0, não justificando o menor rendimento.

Os tempos de fermentação, determinados com base nos resultados da cinética da formação de CO₂ (Tabela 2) foram de 2 horas (80 g/L), 5 e 4 horas (120 g/L, com 32 e 38°C, respectivamente), 6 e 5 horas (160 g/L, com 32 e 38°C, respectivamente), e 8 horas (200 g/L).

A viabilidade % das células de levedura permaneceu elevada em 80 g/L, com valores de 82 e 87%, respectivamente a 32 e 38°C. Nas concentrações de 120 a 160 g/L permaneceram entre 63 a 67%, para 32°C; e caíram para 26 a 42%, para 38°C. Em 200 g/L os valores foram de 64% e 41% a 32 e 38°C, respectivamente. Estes resultados mostram que em condições de concentração de substrato favorável ou não inibitória mesmo com temperatura desfavorável (38°C) a levedura consegue manter a sua viabilidade até o final da fermentação. O outro fato é que com 80 g/L as fermentações terminaram em curto intervalo de tempo, de 2 a 3 horas (Tabela 2), o que leva as células a ficarem menos tempo expostas a alta temperatura. Em fermentações em pH 5,0, como estas, nota-se a menor perda da viabilidade e manutenção do número de células viáveis, o que é atribuído ao pH 5,0 manter a levedura em condições fisiológicas melhores.

4.1.1.2.2. Açúcar residual

A análise da variância mostra significância estatística apenas para o efeito do tratamento de concentração do substrato ($p < 0,001$) e sem significância para temperatura e para a interação desses dois tratamentos.

Os resultados (Figura 3) mostram que o açúcar residual aumenta diretamente com o aumento da concentração do substrato. Contudo os valores do açúcar residual são da ordem de 0,0074 a 0,012 g/L (Tabela 1) e assim há pouco interesse prático em sua discussão. O resultado que chama a atenção é que praticamente todo o açúcar foi consumido, até mesmo no tratamento 200 g/L, que em pH 3,5 apresentou açúcar residual de 2,16% no tempo final em que a fermentação foi considerada paralisada.

4.1.1.2.3. Glicerol

A análise da variância mostrou haver efeito estatístico significativo apenas para o tratamento concentração de substrato ($p < 0,001$); não houve significância para temperatura e interação desses dois tratamentos.

Os resultados de glicerol no vinho mostram que seus níveis foram expressivamente menores a pH 5,0, em relação a pH 3,5; essa redução é da ordem de 5 a 6,3 vezes. Também se observa que enquanto em pH 3,5 o teor de glicerol aumenta continuamente desde 80 até 200 g/L de glicose, a pH 5,0 o teor de glicerol em 160 e 200 g/L apresentou médias estatisticamente iguais.

4.1.1.2.4. Fator de conversão de substrato em produto (eficiência da levedura) – $Y_{p/s}$

O fator $Y_{p/s}$ mostrou médias similares para as temperaturas de 32 e 38°C, com valores médios de 0,4311 em 80 g/L de glicose, 0,4074 em 120 g/L, 0,4113 em 160 g/L, e de 0,4287 em 200 g/L. A menor eficiência de conversão do substrato consumido em etanol, em 120 e 160 g/L, sugere o consumo de glicose para outros fins nesses tratamentos e é compatível com os menores rendimentos observados nos mesmos.

4.1.1.2.5. Fator de conversão de substrato em células – $Y_{x/s}$

A variável $Y_{x/s}$ não pode ser determinada uma vez que praticamente não houve crescimento celular.

4.1.1.2.6. Velocidade média de formação de etanol (VMFE) e de Consumo de substrato (VMCS)

A velocidade média de formação de etanol apresentou médias de 21,80, 14,17, 15,45 e 13,77 mL/L/h, respectivamente nas concentrações de 80 a 200 g/L; esses valores são um pouco maiores que aqueles em pH 3,5, devido às fermentações com maior rendimento e mais rápidas em alguns tratamentos. Os valores de VMFE foram decrescentes, em função do tempo de fermentação ter sido crescente nas concentrações de substrato de 80 a 200 g/L, mostrando que enquanto não há inibição a VMFE é inversamente proporcional à concentração do substrato. As médias de VMCS foram de 39,91, 27,47, 29,64 e 25,35 g/L/h, acompanhando os resultados de VMFE.

Tabela 1 – Médias e resultados estatísticos da fermentação alcoólica em substrato de glicose com inóculo de 10^8 células viáveis / mL.

	Substrato (g glicose / L)				Regressão	
	80	120	160	200	Média	r
pH	Rendimento da Fermentação (%)					
3,5	86,13 a	83,50 b	83,75 b	77,25 c	82,66	0,945 ***
5,0	84,13 a	81,13 b	81,13 b	85,13 a	82,88	0,998 ***
Média	85,13	82,32	82,44	81,19		
pH	Etanol no Vinho (%v/v)					
3,5	4,46 d	6,51 c	8,74 b	10,16 a	7,47	0,996 ***
5,0	4,36 d	6,30 c	8,43 b	11,02 a	7,53	0,998 ***
Média	4,41	6,41	8,59	10,59		
pH	Açúcar Residual (% p/v)					
3,5	0,005 b	0,007 b	0,009 b	2,156 a	0,545	0,966 ***
5,0	0,007 d	0,009 c	0,011 b	0,012 b	0,010	0,986 ***
Média	0,006	0,008	0,010	1,084		
pH	Glicerol (% p/v)					
3,5	0,546 d	0,728 c	0,835 b	1,015 a	0,781	0,995 ***
5,0	0,107 c	0,125 b	0,150 a	0,160 a	0,135	0,986 ***
Média	0,327	0,426	0,493	0,587		
pH	$Y_{p/s}$					
3,5	0,4417 a	0,4260 b	0,4277 b	0,4421 a	0,4344	0,998 ***
5,0	0,4311 a	0,4074 b	0,4113 b	0,4287 a	0,4196	0,989 ***
Média	0,4364	0,4167	0,4195	0,4354		
	$Y_{x/s}$					
	Sem crescimento					

*** - Significativo a 0,1%;

** - Significativo a 1%;

* - Significativo a 5%

Letras minúsculas – comparação horizontal;

Letras maiúsculas – comparação vertical

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

Tabela 1 – Continuação.

	Substrato (g glicose / L)				Regressão	
	80	120	160	200	Média	r
pH	Velocidade Média de Formação de Etanol (mL / L / h)					
3,5	14,88 a	13,01 b	10,93 d	12,70 c	12,88	0,946 ***
5,0	21,80 a	14,17 c	15,45 b	13,77 d	16,30	0,912 ***
Média	18,34	13,59	13,19	13,23		
(°C)	Velocidade Média de Formação de Etanol (mL / L / h) - pH 5,0					
32	21,78 aA	12,68 cB	14,03 bB	13,73 bA	15,55 B	0,928 ***
38	21,83 aA	15,66 cA	16,86 bA	13,81 dA	17,04 A	0,899 ***
Média	21,80 a	14,17 c	15,45 b	13,74 d		
	Velocidade Média de Crescimento Celular (g / L / h) Sem crescimento					
pH	Velocidade Média de Consumo de Substrato (g / L / h)					
3,5	26,58 a	24,11 b	20,16 d	22,68 c	23,38	0,925 ***
5,0	39,91 a	27,47 c	29,64 b	25,35 d	30,59	0,907 ***
Média	33,25	25,79	24,90	24,01		
(°C)	Velocidade Média de Consumo de Substrato (g / L / h) - pH 5,0					
32	39,91 aA	24,42 dB	26,95 bB	25,35 cA	29,16 B	0,919 ***
38	39,92 aA	30,53 cA	32,34 bA	25,35 dA	32,03 A	0,904 ***
Média	39,91 a	27,47 c	29,64 b	25,35 d		

*** - Significativo a 0,1%;

** - Significativo a 1%;

* - Significativo a 5%

Letras minúsculas – comparação horizontal;

Letras maiúsculas – comparação vertical

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

Tabela 2 – Tempos de fermentação (horas) obtidos através da cinética de evolução da liberação do CO₂

glicose g/L / t°C	10 ⁸ cel/mL - pH 3,5		10 ⁸ cel/mL - pH 5,0		10 ⁴ cel/mL - pH 3,5		10 ⁴ cel/mL - pH 5,0	
	t ₁	t ₂	t ₁	t ₂	t ₁	t ₂	t ₁	t ₂
80 / 32°	3	-	2	-	20	-	18	-
80 / 38°	3	-	2	-	20	-	19	-
120 / 32°	5	-	5	-	25	-	22	-
120 / 38°	5	-	4	-	24	-	24	-
160 / 32°	-	8	6	-	-	31	-	28
160 / 38°	-	8	5	-	-	33	-	30
200 / 32°	-	8	-	8	-	41	-	38
200 / 38°	-	8	-	8	-	41	-	44

t₁ – Tempo da fermentação (final de liberação de CO₂);

t₂ – Tempo limite da fermentação (final da fermentação, devido à reduzida velocidade de liberação de CO₂);

Tabela 3 – Médias de viabilidade celular e de células viáveis de levedura no final da fermentação

Tratamentos	10 ⁸ / pH 3,5		10 ⁸ / pH 5,0		10 ⁴ / pH 3,5		10 ⁴ / pH 5,0	
	Viab.	Células Viáveis	Viab.	Células Viáveis	Viab.	Células Viáveis	Viab.	Células Viáveis
glicose g/L / t°C	(%)	(cel/mL)	(%)	(cel/mL)	(%)	(cel/mL)	(%)	(cel/mL)
80 / 32°	70	3,6 x 10 ⁸	82	5,8 x 10 ⁸	0	0	89	4,2 x 10 ⁸
80 / 38°	56	3,2 x 10 ⁸	87	5,5 x 10 ⁸	0	0	78	2,8 x 10 ⁸
120 / 32°	46	2,6 x 10 ⁸	63	3,9 x 10 ⁸	0	0	98	4,6 x 10 ⁸
120 / 38°	28	1,5 x 10 ⁸	26	2,1 x 10 ⁸	0	0	81	2,8 x 10 ⁸
160 / 32°	36	2,0 x 10 ⁸	67	6,1 x 10 ⁸	0	0	89	4,7 x 10 ⁸
160 / 38°	24	1,3 x 10 ⁸	42	2,9 x 10 ⁸	4,73	2,8 x 10 ⁷	23	1,1 x 10 ⁸
200 / 32°	50	2,6 x 10 ⁸	64	4,8 x 10 ⁸	0	0	54	3,2 x 10 ⁸
200 / 38°	43	1,8 x 10 ⁸	41	3,4 x 10 ⁸	0	0	7	4,8 x 10 ⁶

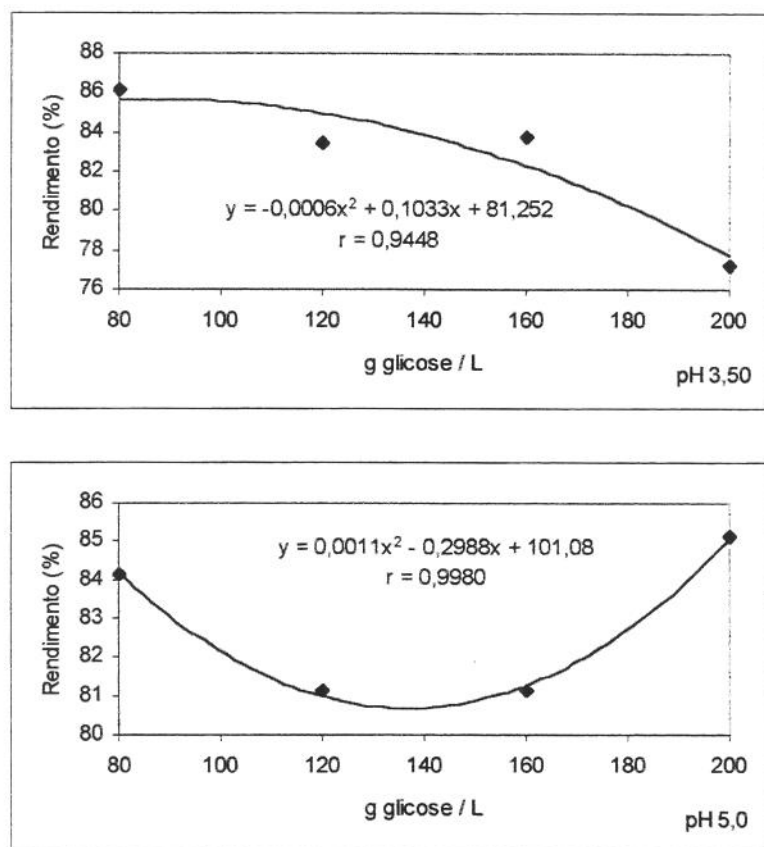


Figura 1 – Rendimento(%) da fermentação em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,5 e 5,0.

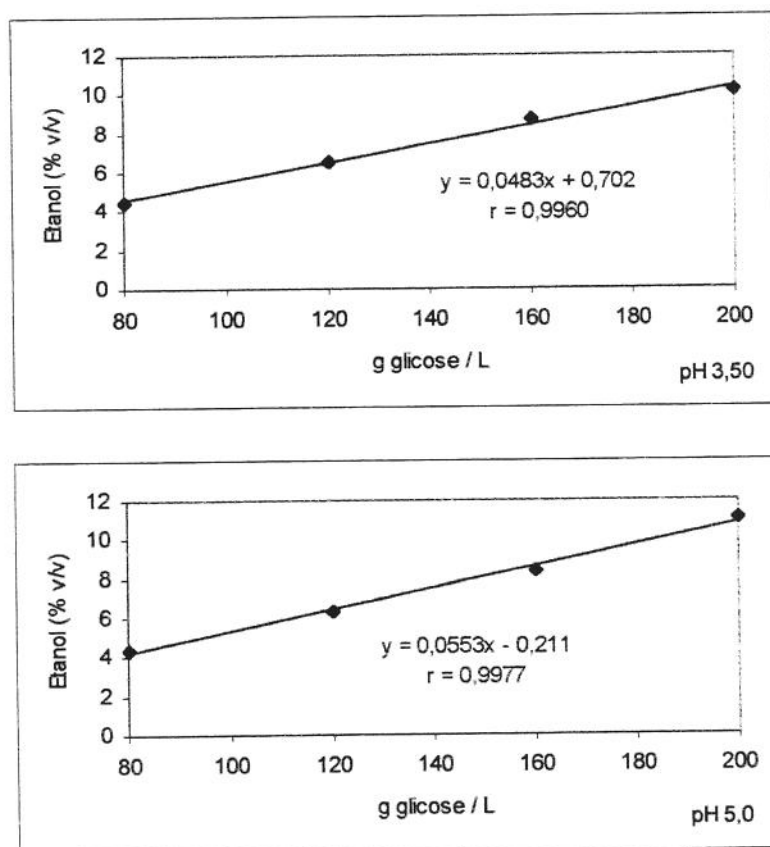


Figura 2 – Etanol (% v/v) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,5 e 5,0.

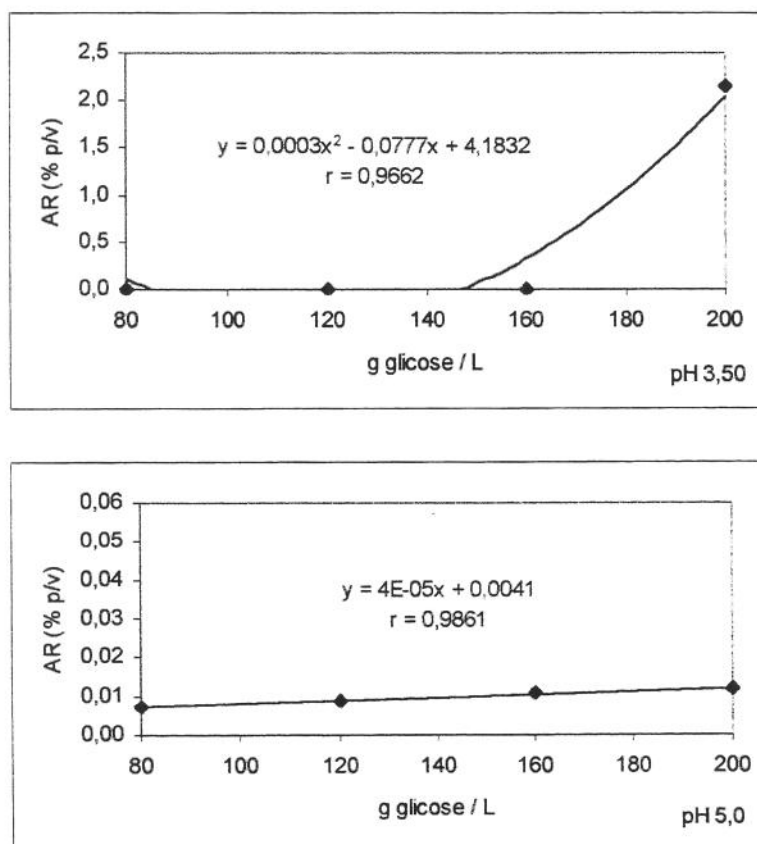


Figura 3 – Açúcar residual (% p/v) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.

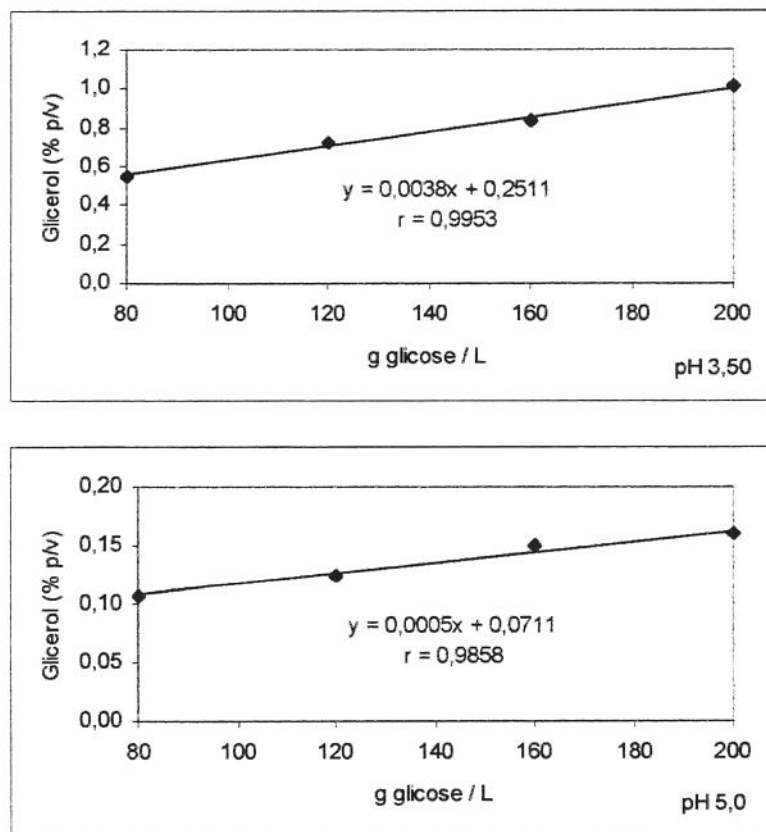


Figura 4 – Glicerol (% p/v) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.

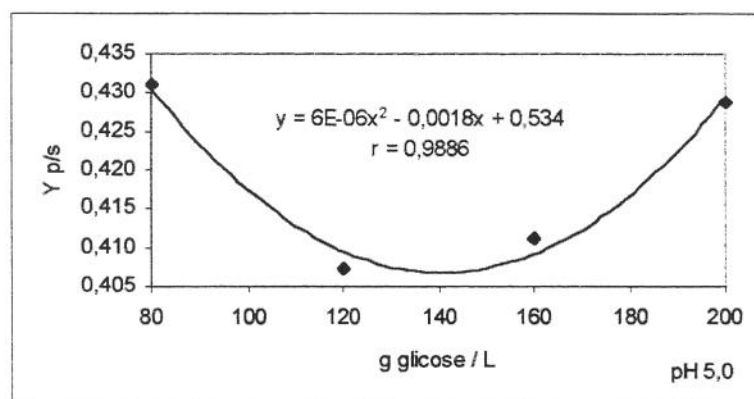
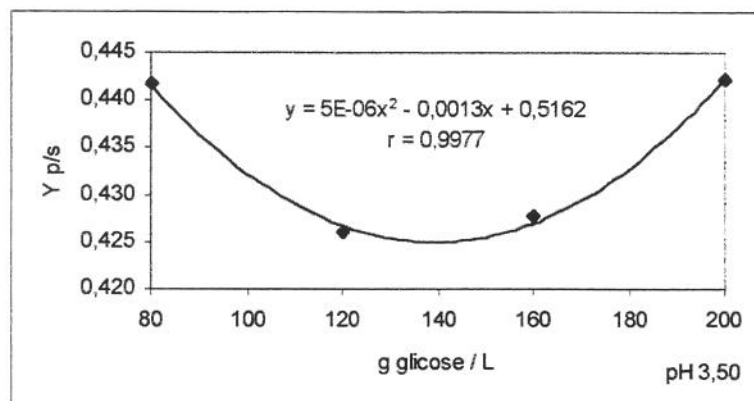


Figura 5 – Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.

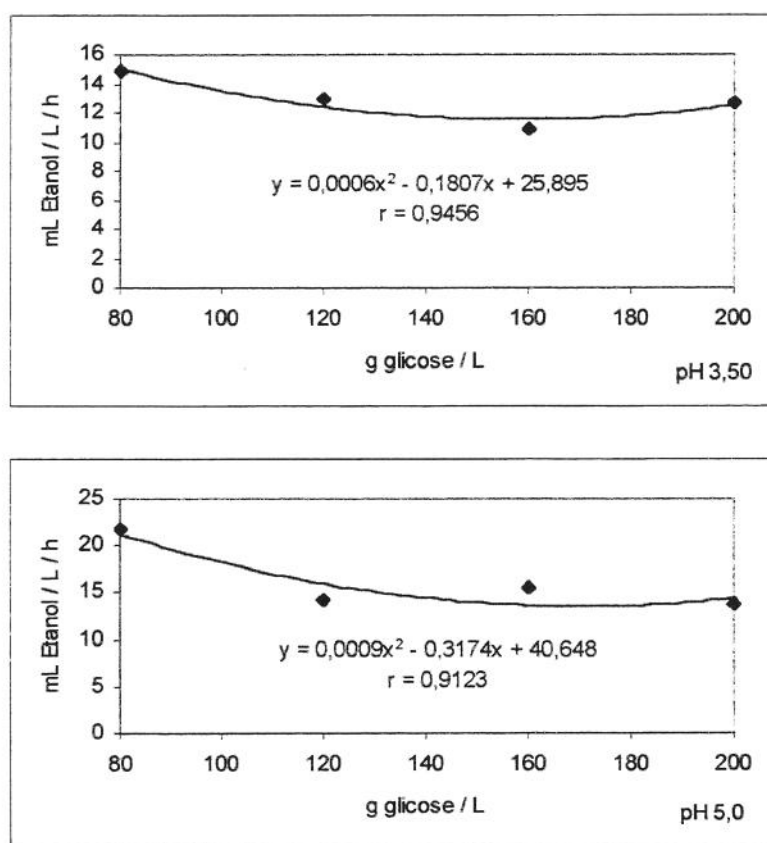


Figura 6 – Velocidade média de formação de etanol (mL / L / h) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.

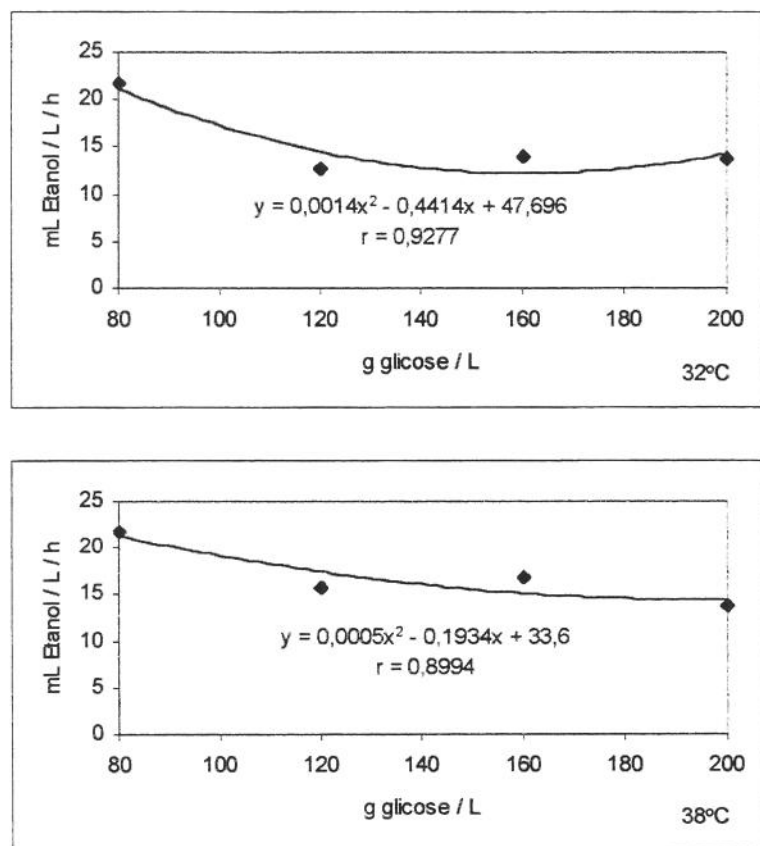


Figura 7 – Velocidade média de formação de etanol (mL / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.

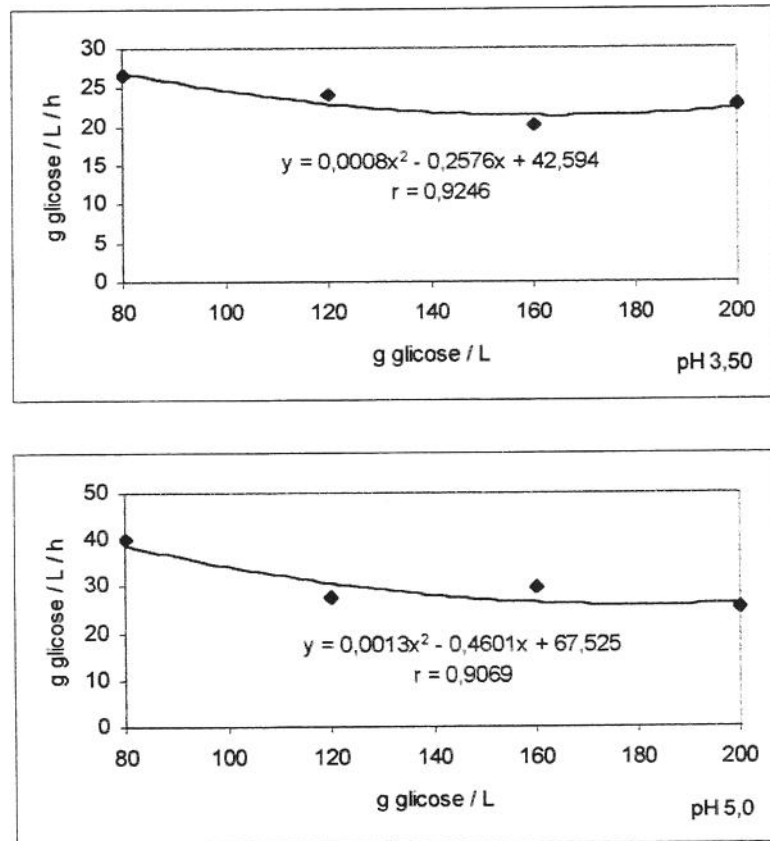


Figura 8 – Velocidade média de consumo de substrato (g / L / h) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.

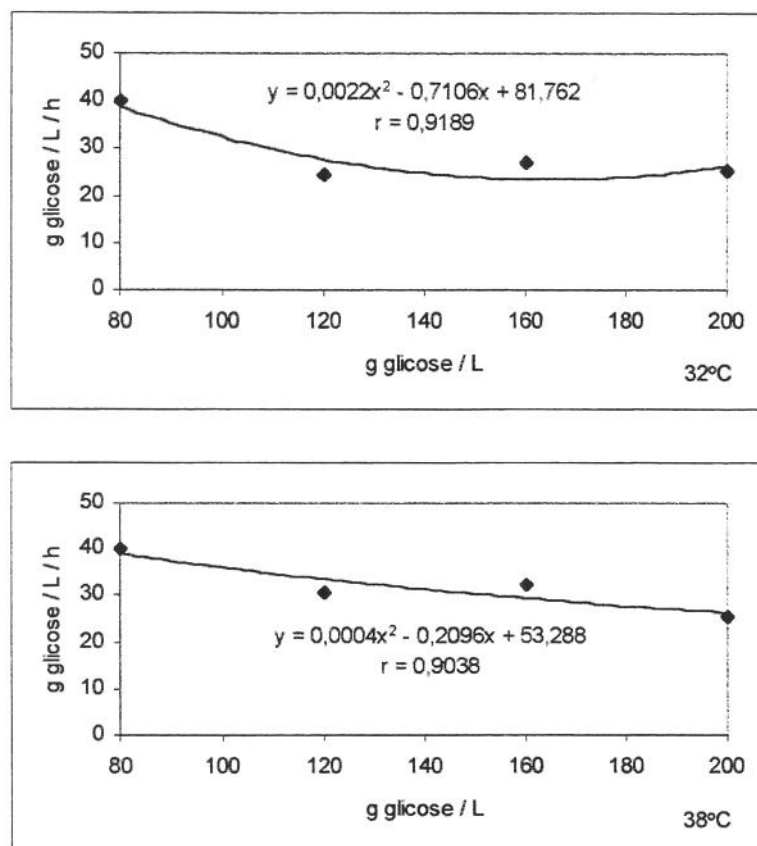


Figura 9 – Velocidade média de consumo de substrato (g / L / h) em função da concentração de substrato e Temperatura, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.

4.1.2. Fermentação alcoólica com inóculo de 10^4 células viáveis / mL

Os resultados das variáveis determinadas foram submetidos a análise estatística, com aplicação da análise da variância e variância da regressão (teste F), em relação aos níveis de concentração do substrato. As médias e a sua comparação pelo teste de Tukey (para variâncias estatisticamente significativas) estão apresentadas na Tabela 4, adotando para a análise de variância o nível de significância de 1%, e para a comparação das médias pelo teste Tukey o nível de 5%. As regressões estatisticamente significativas e o coeficiente de regressão encontram-se na Tabela 4 e nas Figuras 10 a 26; Somente coeficientes de regressão acima de 0,80 foram considerados significantes para discussão. Na Tabela 2 encontram-se as médias dos tempos de fermentação e na Tabela 3 as médias de contagem de células viáveis de levedura e viabilidade celular do fermento.

4.1.2.1. pH inicial 3,5

O principal efeito do inóculo 10^4 , em relação a 10^8 , foi o de causar fermentações bastante lentas e assim estender a sua duração por tempos de 18 até 44 horas. Inóculos bastante pequenos são interessantes para estudos básicos em parâmetros cinéticos, pois resultam em longos tempos de fermentação, alta produção de biomassa e boa taxa de crescimento (Strehaiano et al., 1983). Em relação ao efeito sobre as variáveis determinadas, destaca-se o efeito em pH 3,5 que mostrou resultados também bastante diversos daquele em inóculo 10^8 , podendo-se citar um expressivo aumento no rendimento da fermentação.

4.1.2.1.1. Rendimento, etanol no vinho, tempo de fermentação e viabilidade celular

A análise da variância para rendimento e etanol no vinho mostrou haver significância estatística para o efeito da concentração do substrato ($p < 0,001$), temperatura ($p < 0,001$) e para a interação desses tratamentos ($p < 0,001$).

Os rendimentos no tratamento com inóculo 10^4 em pH 3,5 foram expressivamente superiores aos de 10^8 (Tabela 1); em pH 5,0 foram similares. As temperaturas provocaram um efeito de interação com os substratos. Na temperatura de 32°C os rendimentos se mantiveram entre 88 a 89%, sendo estatisticamente iguais para as concentrações de 80 a 200 g/L, com o etanol no vinho atingindo 11,45% a 200 g/L de glicose. Na temperatura de 38°C a forte inibição pelo etanol se manifestou (observada também a 10^8 cel/mL a 32 e 38°C), constatada pela queda no rendimento de 88,50 para 77,50%; é interessante observar que um rendimento similar de 77,25% também foi observado em pH 3,5 com inóculo de 10^8 a 32 e 38°C. Também o etanol no vinho mostra o que já havia sido observado, confirmando um teor de 10,1% como limite para condução de uma fermentação para evitar a inibição pelo etanol formado, nestas condições. O efeito inibitório de etanol produzido em *S. cerevisiae* durante a fermentação é complexo e é o principal fator para uma fermentação incompleta e consequentemente de baixo rendimento fermentativo (Galeote et al., 2001). Concentração elevada de etanol retarda o crescimento da levedura, reduz sua viabilidade e sua habilidade fermentativa. A ação maléfica de etanol é atribuída em parte a redução da atividade de água no substrato de fermentação bem como sua própria toxicidade à célula de levedura (Jones & Greenfield, 1986).

No tratamento de 200 g/L de glicose e 38°C o teor de etanol no vinho foi de 10,1%, podendo-se observar uma atenuação na sua progressão a partir das concentrações de glicose menores. A análise da variável açúcar residual mostra um expressivo aumento que justifica a redução no rendimento.

Os tempos de fermentação , determinados com base nos resultados da cinética de formação de CO₂ (Tabela 2), foram de 20 horas (80 g/L), 25 e 24 horas (120 g/L, respectivamente com 32 e 38°C), 31 e 33 horas (160 g/L, respectivamente com 32 e 38°C), e 41 horas (200 g/L).

A viabilidade % das células de levedura caíram a zero ou próximo desse valor, em todos os tratamentos, o mesmo ocorrendo com o número de células viáveis (Tabela 3), o que é atribuído à exposição da levedura a um baixo pH (3,5), durante um longo período de duração das fermentações.

4.1.2.1.2. Açúcar residual

A análise da variância mostrou efeito estatisticamente significativo para concentração do substrato ($p < 0,001$), temperatura ($p < 0,001$) e interação entre esses tratamentos ($p < 0,001$).

A 32°C o açúcar residual mostrou uma elevação pequena e gradual, diretamente proporcional à concentração do substrato, todavia como se trata de valores extremamente baixos, os mesmos deixam de apresentar interesse e indicam que todos os substratos foram esgotados ao final da fermentação. A 38°C uma elevação um pouco mais acentuada se fez presente em 160 e 200 g/L (2,13 e 2,11 g/L, respectivamente). Deste modo o açúcar residual explica em grande parte o destino do açúcar não transformado em etanol. A média para açúcar residual a 38°C foi, assim, bastante superior àquela de 32°C, confirmando a expressiva queda do rendimento neste tratamento a 38°C. Em 200 g/L o fator $Y_{p/s}$ mostrou que a eficiência média da levedura, de 87,5%, foi similar à dos demais substratos, indicando que a glicose consumida foi transformada em etanol na mesma proporção para todas as concentrações.

4.1.2.1.3. Glicerol

A análise da variância mostrou haver significância estatística para os tratamentos de concentração de substrato ($p < 0,001$), temperatura ($p < 0,001$) e interação dos mesmos ($p < 0,001$).

Os valores de glicerol aumentaram gradativamente à medida que também aumentou a concentração do substrato. A 32°C aumentaram de 0,26 para 0,82%, mostrando a tendência de serem um pouco mais elevados que a 38°C, que aumentaram de 0,25 a 0,69%. A produção de glicerol sob condições fermentativas pode ser eliminada pela presença de baixas concentrações de oxigênio, ou seja, condições microaeróbicas. A redução da formação de glicerol neste sistema favoreceria a produção de etanol e minimizaria a formação de subprodutos. De acordo com as condições de fermentação cerca de 4 a 10% da fonte de carbono pode ser convertido para formação de glicerol (Costenoble et al., 2000).

O glicerol, assim como o etanol, aumenta com a concentração de substrato e sua variação segue uma correlação linear e quadrática como pode ser visto na Figura 15 e 16.

4.1.2.1.4. Fator de conversão de substrato em produto (eficiência da levedura) – $Y_{p/s}$

As médias e tendências são apresentadas na Tabela 4 e Figura 17. O fator $Y_{p/s}$ mostrou médias similares para as temperaturas de 32 e 38°C, com valores de 0,4541 em 80 g/L de glicose; 0,4591 em 120 g/L; 0,4539 em 160 g/L e de 0,4474 em 200 g/L. Correspondem a valores de eficiência da levedura de 87,5 a 89,8%. Esses resultados foram mais elevados que aqueles em pH 5,0. Observa-se que a eficiência da levedura foi expressivamente maior que em inóculo 10^8 ,

indicando que em inóculo 10^4 houve menor consumo de açúcar para outros fins, justificando os maiores rendimentos observados.

4.1.2.1.5. Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e velocidade média de crescimento celular

As médias e tendências são apresentadas na Tabela 4 e Figura 18. Os valores médios de $Y_{x/s}$ foram de 0,0522 (80 g/L), 0,0415 (120 g/L), 0,0325 (160 g/L) e 0,0291 (200 g/L), com uma nítida tendência de diminuir com o aumento da concentração do substrato, ou seja, mostrando melhores condições de crescimento em concentrações mais baixas de glicose. A temperatura de 32°C mostrou valores de $Y_{x/s}$ maiores apenas em 80 e 120 g/L, e a partir de 160 g/L os valores foram similares para 32 e 38°C.

A velocidade média de crescimento celular foi decrescente com o aumento da concentração de substrato, seguindo a tendência do fator $Y_{x/s}$, com médias de 0,210, 0,203, 0,162 e 0,135 g/L/h, respectivamente, nas concentrações de 80 a 200 g/L de glicose. Tais valores indicam sua proporcionalidade com o tempo de fermentação (Tabela 2), sugerindo uma massa celular uniforme.

4.1.2.1.6. Velocidade média de formação de etanol e de consumo de substrato

A velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), Tabela 4 e Figura 20, mostrou que não há proporcionalidade entre o etanol formado (ou a concentração de substrato) e a duração da fermentação (Tabela 4). O tempo médio de fermentação do substrato de 80 a 200 g/L foi, respectivamente, de 20 , 24,5 , 32 e 41 horas. Esses resultados indicam a existência de uma fase inicial prolongada para início da multiplicação celular e de uma fase de fermentação mais vigorosa.

As VMFE apresentaram médias de 2,32, 2,85, 2,87 e 2,65 mL/L/h, respectivamente, nas concentrações de 80 a 200 g/L.

A velocidade média de consumo de substrato (Tabela 4 e Figura 25) apresentou médias de 4,02, 4,90, 5,00 e 4,63 g/L/h. As mesmas considerações do parágrafo anterior aplicam-se aqui.

4.1.2.2. pH inicial 5,0

4.1.2.2.1. Rendimento, etanol no vinho, tempo de fermentação e viabilidade do fermento

A análise da variância, para rendimento e etanol no vinho, mostrou haver efeito para concentração de substrato ($p < 0,001$) e temperatura ($p < 0,001$), sem efeito de interação.

Os rendimentos a pH inicial 5,0 não seguiram a tendência verificada em pH 3,5, foram em média 0,68 unidades absolutas menores em relação ao inóculo 10^8 cel/mL. Ou seja, no pH 5,0 praticamente não houve diferença de rendimento entre inóculo 10^4 e 10^8 cel/mL. A manutenção de viabilidade elevada de células de levedura no final de fermentação sugere não ter havido a mobilização de seus carboidratos de reserva para produzir etanol, como pode ter acontecido com pH 3,5 (Ferreira, 1998) que apresentou teores alcoólicos mais elevados mas com viabilidade comprometida (Tabela 3 e 4). O rendimento médio foi de 82,2% e a 38°C foi cerca de 1 unidade absoluta maior que a 32°C.

Os tempos de fermentação (Tabela 2) foram de 18 e 19 horas (80 g/L, respectivamente a 32 e 38°C), 22 e 24 horas (120 g/L, respectivamente a 32 e 38°C), 28 e 30 horas (160 g/L, respectivamente a 32 e 38°C), e 38 e 44 horas (200

g/L, respectivamente a 32 e 38°C). Os tempos foram determinados com base nos resultados da cinética de formação de gás carbônico.

A viabilidade % das células de levedura, sob condições mais favoráveis de pH (5,0) e em meio com elevação mais lenta do teor de etanol, mostrou ser bastante susceptível à temperatura, mantendo-se maior em 32°C e caindo mais drasticamente a 38°C, em concentrações mais elevadas de glicose (160 e 200 g/L). Até 160 g/L a viabilidade manteve-se elevada, ao redor de 90%, em 32°C. O número de células viáveis manteve-se elevado ao final das fermentações, devido às boas condições fisiológicas da levedura nesse pH, começando a cair a partir de 160 g/L e na temperatura de 38°C. Nota-se com efeito que com a presença de pelo menos um fator favorável ajuda a tenuous o efeito negativo de demais fatores desfavoráveis associados.

4.1.2.2.2. Açúcar residual

A análise da variância mostrou efeito estatisticamente significativo apenas os tratamentos de concentração do substrato ($p < 0,001$), e sem significância para temperatura e para a interação desses dois tratamentos. O coeficiente de variação do experimento foi de 5,5%. O teor de açúcar residual foi extremamente pequeno, indicando o esgotamento do substrato em todos os tratamentos de concentração de substrato.

4.1.2.2.3. Glicerol

A análise da variância mostrou haver significância estatística para os tratamentos de concentração de substrato ($p < 0,001$), temperatura ($p < 0,001$) e interação dos mesmos ($p < 0,01$).

Os teores de glicerol no vinho, em pH 5,0, mostram ser similares àqueles em pH 3,5, com comportamento também similar em sua tendência de ser maiores a 32°C e aumentar proporcionalmente com o aumento da concentração do substrato.

4.1.2.2.4. Fator de conversão de substrato em produto (eficiência da levedura) – $Y_{p/s}$

A análise da variância mostrou haver significância estatística para os tratamentos de concentração de substrato ($p < 0,001$) e temperatura ($p < 0,001$), não havendo efeito de interação entre os dois tratamentos. O coeficiente de variação do ensaio foi de 0,4%. O fator $Y_{p/s}$ mostrou médias de 0,4227 em 80 g/L de glicose, 0,4137 em 120 g/L, 0,4270 em 160 g/L, e de 0,4199 em 200 g/L; a eficiência média da levedura foi de 82,7, 80,9, 83,5 e 82,2%, respectivamente. As médias para 38°C foram ligeiramente superiores que as de 32°C. Esses valores mostram-se compatíveis com aqueles de rendimento.

4.1.2.2.5. Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e velocidade média de crescimento celular (VMCC)

A análise da variância mostrou significância para concentração de substrato, temperatura e interação de ambos. Os valores médios (Tabela 4) de $Y_{x/s}$ foram de 0,0852 (80 g/L), 0,0650 (120 g/L), 0,0503 (160 g/L) e 0,0354 (200 g/L), com uma nítida queda em função do aumento da concentração do substrato. As médias da velocidade média de crescimento celular (g/L/h) foram de 0,371 (80 g/L), 0,350 (120 g/L), 0,283 (160 g/L) e 0,180 (200 g/L), igualmente diminuindo à medida que aumenta a concentração do substrato. As mesmas considerações feitas para estas variáveis, em pH 3,5, são aplicáveis aqui. Os resultados em pH 3,5 foram expressivamente menores que aqueles em pH 5,0, o que mostra uma menor massa celular em pH 3,5, portanto, menor consumo de açúcar destinado a novas células de levedura, e assim, maior $Y_{p/s}$ ou eficiência da levedura em produzir etanol a partir do açúcar consumido. Estas considerações são compatíveis com o maior rendimento em pH 3,5 (Tabela 4) e os resultados das demais variáveis citadas.

4.1.2.2.6. Velocidade média de formação de etanol (VMFE) e de consumo de substrato (VMCS)

A velocidade média de formação de etanol apresentou médias de 2,32, 2,81, 3,01 e 2,68 mL/L/h, respectivamente nas concentrações de 80 a 200 g/L; esses valores são bastante similares àqueles de pH 3,5, inclusive com as mesmas tendências. As médias da velocidade média de consumo de substrato (Tabela 4) foram de 4,33, 5,37, 5,56 e 5,04 g/L/h, acompanhando os resultados de VMFE. As considerações feitas na discussão em pH 3,5 são aplicadas aqui.

4.1.3. Resumo

Observou-se que a interação do pH baixo (3,5), com outros dois fatores adversos dentro dos três tratamentos restantes, conduziu a uma redução expressiva do rendimento. Fermentações em pH 5,0 não expressaram esta sensibilidade a tais fatores para inibição da fermentação. Portanto, em pH inicial 3,5 a conjugação com pelo menos outros dois fatores adversos para a adaptação da levedura com elevado inóculo inicial (10^8 cel/mL), alta concentração do substrato (200 g/L) ou alta temperatura (38°C), resultou numa interação com severa inibição pelo etanol presente no vinho. O fato do inóculo inicial elevado ter resultado em rendimento menor foi surpreendente e pode ser explicado pela baixa multiplicação celular com maior sobra de açúcar para a transformação em etanol. Todavia, pode-se entender que sob as condições adversas de pH inicial 3,5 e de temperatura de 38°C, a viabilidade foi bastante afetada e a levedura acabou respondendo a esta situação com a multiplicação, de forma que a contagem de células viáveis foi mantida aproximadamente estável; a baixa viabilidade determinada ao final da fermentação não significa necessariamente um decréscimo no número de células viáveis, mas representa a proporção entre o número de células viáveis em relação ao de células totais. Os resultados obtidos são indicativos deste modelo, uma vez que a baixa viabilidade, acompanhada de certa estabilidade no número de células viáveis indica o aumento do número de células totais. Deste modo é que se coloca o enquadramento de inóculo inicial 10^8 como um fator adverso, ou seja, indiretamente, em certos casos, a expressiva multiplicação acarretou um consumo de açúcar que reduziu a eficiência da levedura. Nas mesmas condições adversas de pH inicial e temperatura, mas com baixo inóculo inicial (10^4), devido ao longo tempo de fermentação a viabilidade acabou por cair a zero, assim como o número de células viáveis detectadas pela metodologia empregada.

Os resultados permitem observar que a inibição mais expressiva da fermentação ocorreu em elevada concentração de substrato e portanto altos

teores de etanol no vinho. Examinando os resultados pode-se detectar que em tratamentos com no mínimo três fatores adversos, o rendimento atingiu um patamar mínimo de cerca de 77,00%, como ocorreu em inóculo 10^8 , pH 3,5, concentração 200 g/L e temperaturas de 32 e 38°C, e ainda em inóculo 10^4 , pH 3,5, concentração 200 g/L e temperatura 38°C. Nas condições deste último ensaio, mas com temperatura 32°C, o maior tempo de fermentação e maior multiplicação celular foi suficiente para permitir que a levedura se adaptasse a 200 g/L de glicose; o mesmo não ocorreu para a fermentação a 38°C que teve rendimento bastante reduzido.

Quanto ao teor de etanol no vinho o valor máximo obtido foi para a concentração de 200 g/L de glicose, sob pH 3,5, temperatura de 32°C e inóculo de 10^4 , que atingiu 11,45%, com rendimento de 88,00%, sem ser afetado com a inibição pelo etanol. Como se vê, foi satisfeita a condição primordial de elevada concentração do substrato, mas sob condições não adversas de temperatura e de inóculo inicial, embora sob pH 3,5. Nos casos em que houve inibição pelo etanol devido aos fatores prejudiciais apontados, o teor de etanol no vinho situou-se entre 10,1 a 10,2%. Ou seja, teor abaixo de 10,1% de etanol no vinho deveria ser a concentração máxima a ser planejada para evitar a inibição pelo etanol quando se fermenta à temperatura de 38°C, pH inicial de 3,5, e inóculo inicial de 10^8 ou 10^4 cel/mL. As fermentações industriais ocorrem dentro dessas condições adversas, ou condições próximas a cada uma delas; como por exemplo o pH que numa fermentação industrial se inicia num nível inicial ao redor de 3,5, conforme as condições da cana-de-açúcar e do processo industrial. O teor máximo de etanol no vinho que se observa em destilarias de álcool, no Brasil, é de cerca de no máximo 10,0%.

O efeito combinado de baixo pH inicial (3,5) e inóculo pequeno (10^4) e alta concentração de substrato (200 g/L de glicose), contribuiu para obtenção de fermentações incompletas, resultado do não esgotamento do açúcar presente no meio fermentativo e, como consequência houve diminuição do rendimento (Figura

10 e 13). Em pH inicial 5,0 com açúcar residual praticamente nulo, houve a tendência de aumento do rendimento com elevação do nível de substrato, como mostra a Figura 13.

A levedura mesmo diante do pH inicial desfavorável (3,5) à sua fisiologia, mas estando em condições de temperatura de fermentação favorável (32°C), fermentou completamente o açúcar disponível no meio. Os valores de açúcar residual apesar de praticamente nulos (como no caso do pH 5,0, Figura 13), mostraram que a sua tendência é de elevação com o aumento do nível de substrato. A associação entre o pH inicial 3,5, temperatura de fermentação de 38°C e concentração de substrato de 200 g/L, condição desfavorável à levedura, fez com o que açúcar do meio fermentativo não fosse esgotado. O açúcar residual atingiu cerca de 2%, por conseguinte, o rendimento da fermentação diminuiu em mais ou menos 10% (Figura 10 e 14).

A Figura 17 mostra a variação da eficiência da levedura com os níveis de substrato. O efeito combinado entre alta concentração de açúcar e pH inicial 3,5 contribuiu para a sua redução.

O fator de conversão de substrato em células diminuiu com o aumento da concentração de substrato independentemente de pH e temperatura de fermentação (Figura 18 e 19).

A velocidade média de formação de etanol apresentou pouca variação em relação aos níveis de substrato como pode ser constatado na Figura 20 e 21.

A velocidade média de crescimento celular diminuiu gradativamente com aumento da concentração de substrato (Figura 22 a 24)

A velocidade média de consumo de substrato sofreu poucas oscilações com a variação de nível de substrato, assim como de etanol, como ilustra a Figura 25 e 26.

Em estudos onde o objetivo é verificar efeitos positivos ou negativos de determinados tratamentos sobre a fermentação alcoólica, as condições em 200 g/L permitem uma avaliação mais adequada. Nestas condições qualquer efeito inibitório de um tratamento terá maior chance de ser detectado, uma vez que a levedura está trabalhando em condições próximas de inibição por outros fatores, e portanto próximas do ponto de estresse. Em 160 g/L ou menos, a levedura não submetida à inibição pelo álcool pode ter resposta não detectável para outras variáveis inibitórias analisadas. Ou seja, nas condições em 200 g/L a levedura deve "amplificar" sua resposta; além de que as condições gerais a que está submetida refletem o ambiente de fermentação industrial, se este também for o objetivo. Nos tratamentos favoráveis ao desenvolvimento da levedura, principalmente como baixo teor em açúcar e conseqüente baixo teor em etanol no vinho, a levedura poderá não expressar o efeito adverso de algum outro fator em estudo.

Tabela 4 – Médias e resultados estatísticos da fermentação alcoólica em substrato de glicose, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL.

	Substrato (g glicose / L)				Regressão	
	80	120	160	200	Média	r
(°C)	Rendimento da Fermentação (%) - pH 3,5					
32	88,50 aA	89,00 aA	88,00 aA	88,00 aA	88,38 A	0,990 ***
38	88,50 aA	90,50 aA	89,00 aA	77,50 bB	86,38 B	
Média	88,50 a	89,75 a	88,50 a	82,75 b		
(°C)	Rendimento da Fermentação (%) - pH 5,0					
32	82,00	80,25	83,00	81,75	81,75 B	
38	83,25	81,00	84,00	82,25	82,63 A	
Média	82,63 b	80,63 d	83,50 a	82,00 c		
(°C)	Etanol no Vinho (% v/v) - pH 3,5					
32	4,63 d	6,92 c	9,15 b	11,45 a	8,04 A	1 ***
38	4,63 d	7,03 c	9,22 b	10,09 a	7,74 B	0,998 ***
Média	4,63 d	6,97 c	9,19 b	10,77 a		
(°C)	Etanol no Vinho (% v/v) - pH 5,0					
32	4,25	6,41	8,67	10,90	7,56B	1 ***
38	4,32	6,50	8,77	10,98	7,64A	1 ***
Média	4,28 d	6,46 c	8,72 b	10,94 a		
pH	Açúcar Residual (% p/v)					
3,5	0,002 c	0,002 c	0,108 b	1,059 a	0,293	0,983 ***
5,0	0,003 c	0,005 b	0,006 a	0,007 a	0,005	0,988 ***
Média	0,002	0,003	0,057	0,533		
(°C)	Açúcar Residual (% p/v) - pH 3,5					
32	0,001 aA	0,002 aA	0,002 aB	0,005 aB	0,003 B	0,983 ***
38	0,002 cA	0,002 cA	0,213 bA	2,113 aA	0,583 A	
Média	0,002 c	0,002 c	0,108 b	1,059 a		

Tabela 4 – Continuação.

	Substrato (g glicose / L)				Regressão	
	80	120	160	200	Média	r
(°C)	Glicerol (% p/v) - pH 3,5					
32	0,258 dA	0,447 cA	0,634 bA	0,825 aA	0,541 A	1 ***
38	0,249 dA	0,375 cB	0,530 bB	0,686 aB	0,460 B	0,999 ***
Média	0,253 d	0,411 c	0,582 b	0,755 a		
(°C)	Glicerol (% p/v) - pH 5,0					
32	0,347 dA	0,519 cA	0,631 bA	0,806 aA	0,575 A	0,997 ***
38	0,309 dB	0,448 cB	0,597 bB	0,822 aA	0,544 B	0,999 ***
Média	0,328 d	0,483 c	0,614 b	0,814 a		
pH	$Y_{p/s}$					
3,5	0,4541ab	0,4591 a	0,4539 ab	0,4474 b	0,4536	0,971 *
5,0	0,42270 b	0,4137 d	0,4270 a	0,4199 c	0,4208	< 0,80 ***
Média	0,4384	0,4364	0,4405	0,4337		
(°C)	$Y_{p/s}$ - pH 5,0					
32	0,4195	0,4108	0,4244	0,4184	0,4183B	< 0,80 ***
38	0,4259	0,4166	0,4296	0,4215	0,4234A	< 0,80 ***
Média	0,4227 b	0,4137 d	0,4270 a	0,4199 c		
pH	$Y_{x/s}$					
3,5	0,0522 a	0,0415 b	0,0325 c	0,0291 c	0,0388	0,999 ***
5,0	0,0852 a	0,0650 b	0,0503 c	0,0354 d	0,0590	0,997 ***
Média	0,0687	0,0532	0,0414	0,0323		
(°C)	$Y_{x/s}$ - pH 5,0					
32	0,0885 aA	0,0696 bA	0,0593 cA	0,0407 dA	0,0645 A	0,994 ***
38	0,0819 aB	0,0603 bB	0,0414 cB	0,0300 dB	0,0534 B	1 ***
Média	0,0852 a	0,0650 b	0,0503 c	0,0354 d		

Tabela 4 – Continuação.

	Substrato (g glicose / L)				Regressão	
	80	120	160	200	Média	r
(°C)	Velocidade Média de Formação de Etanol (mL / L / h) - pH 3,5					
32	2,32 cA	2,77 bB	2,95 aA	2,84 bA	2,72 A	1 ***
38	2,32 dA	2,93 aA	2,79 bB	2,46 cB	2,62 B	0,969 ***
Média	2,32 c	2,85 a	2,87 a	2,65 b		
(°C)	Velocidade Média de Formação de Etanol (mL / L / h) - pH 5,0					
32	2,36 dA	2,91 bA	3,09 aA	2,87 cA	2,81 A	1 ***
38	2,27 dB	2,71 bB	2,92 aB	2,50 cB	2,60 B	0,981 ***
Média	2,32 d	2,81 b	3,01 a	2,68 c		
pH	Velocidade Média de Crescimento Celular (g / L / h)					
3,5	0,210 a	0,203 a	0,162 b	0,135 c	0,177	0,985 *
5,0	0,369 a	0,350 b	0,282 c	0,180 d	0,295	1 ***
Média	0,289	0,276	0,222	0,158		
(°C)	Velocidade Média de Crescimento Celular (g / L / h) - pH 3,5					
32	0,219	0,208	0,166	0,141	0,184 A	
38	0,201	0,198	0,158	0,128	0,171 B	
Média	0,210 a	0,203 a	0,162 b	0,135 c		
(°C)	Velocidade Média de Crescimento Celular (g / L / h) - pH 5,0					
32	0,393 aA	0,390 aA	0,341 bA	0,220 cA	0,336 A	0,999 ***
38	0,345 aB	0,309 bB	0,223 cB	0,140 dB	0,254 B	0,997 **
Média	0,369 a	0,350 b	0,282 c	0,180 d		

Tabela 4 – Continuação

	Substrato (g glicose / L)				Regressão	
	80	120	160	200	Média	r
(°C)	Velocidade Média de Consumo de Substrato (g / L / h) - pH 3,5					
32	4,02 dA	4,80 cB	5,19 aA	4,90 bA	4,73 A	0,997 ***
38	4,02 dA	5,00 aA	4,81 bB	4,36 cB	4,55 B	0,964 ***
Média	4,02 d	4,90 b	5,00 a	4,63 c		
(°C)	Velocidade Média de Consumo de Substrato (g / L / h) - pH 5,0					
	80	120	160	200		
32	4,44 dA	5,60 bA	5,76 aA	5,41 cA	5,30 A	0,994 ***
38	4,21 dB	5,13 bB	5,37 aB	4,67 cB	4,85 B	0,998 ***
Média	4,33 d	5,37 b	5,57 a	5,04 c		

*** - Significativo a 0,1%;

** - Significativo a 1%;

* - Significativo a 5%

Letras minúsculas – comparação horizontal;

Letras maiúsculas – comparação vertical

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

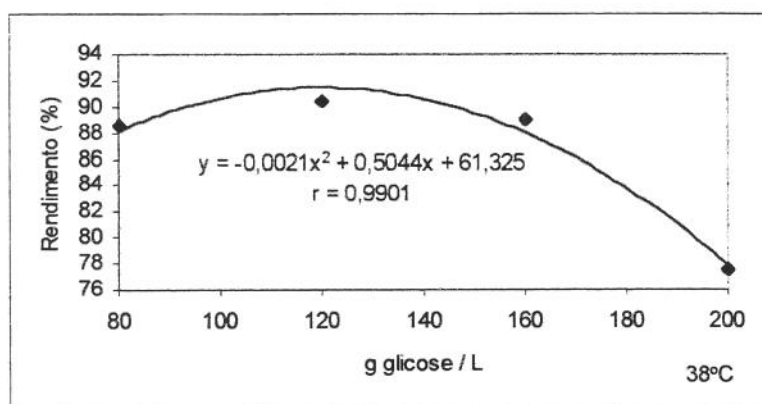


Figura 10 – Rendimento da fermentação (%) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,5.

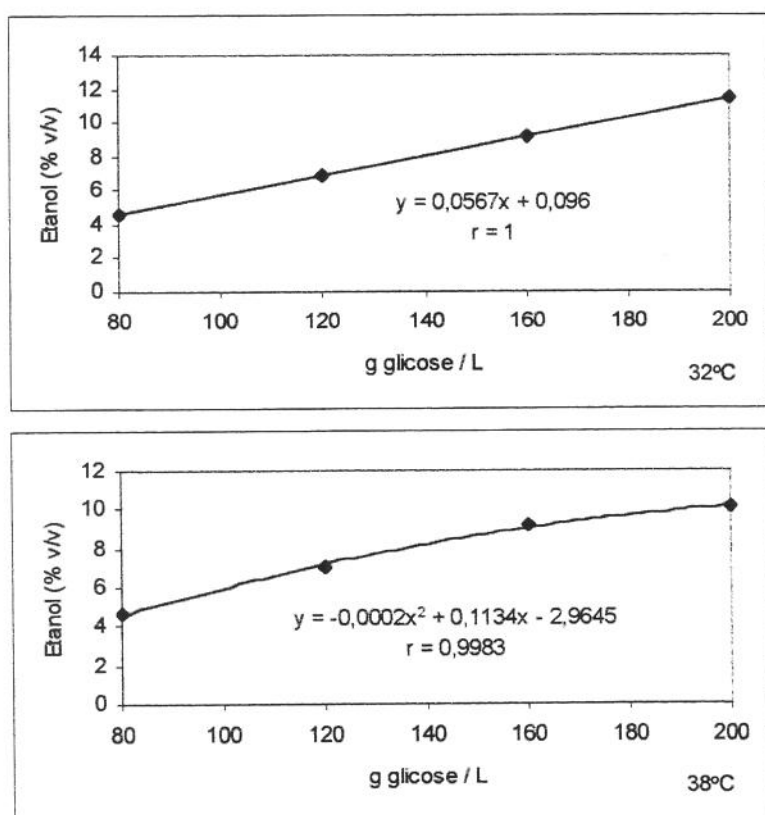


Figura 11 – Etanol (% v/v) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,5.

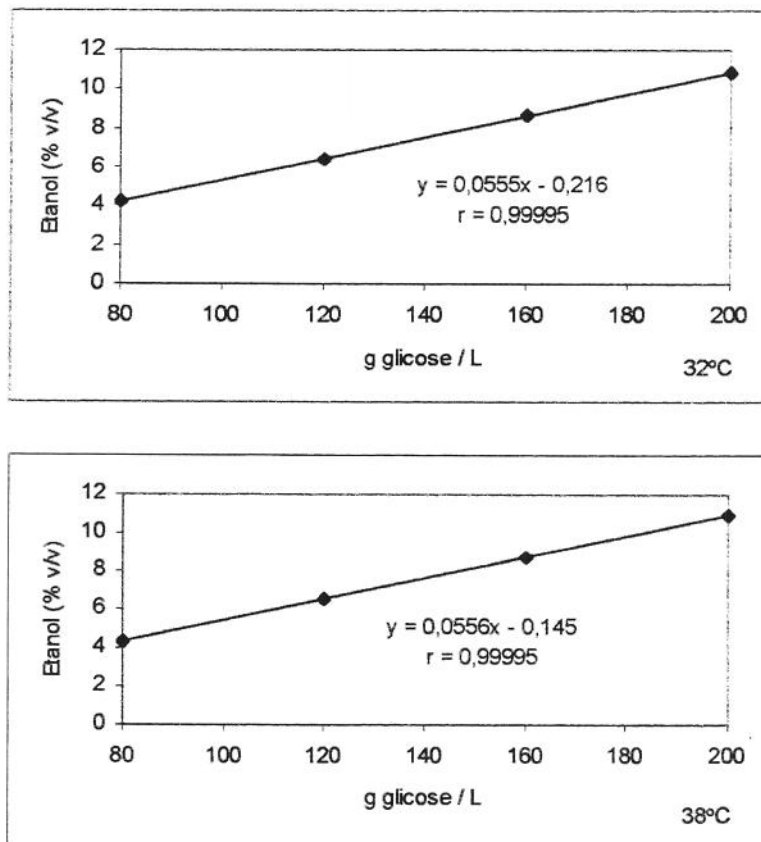


Figura 12 – Etanol (% v/v) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.

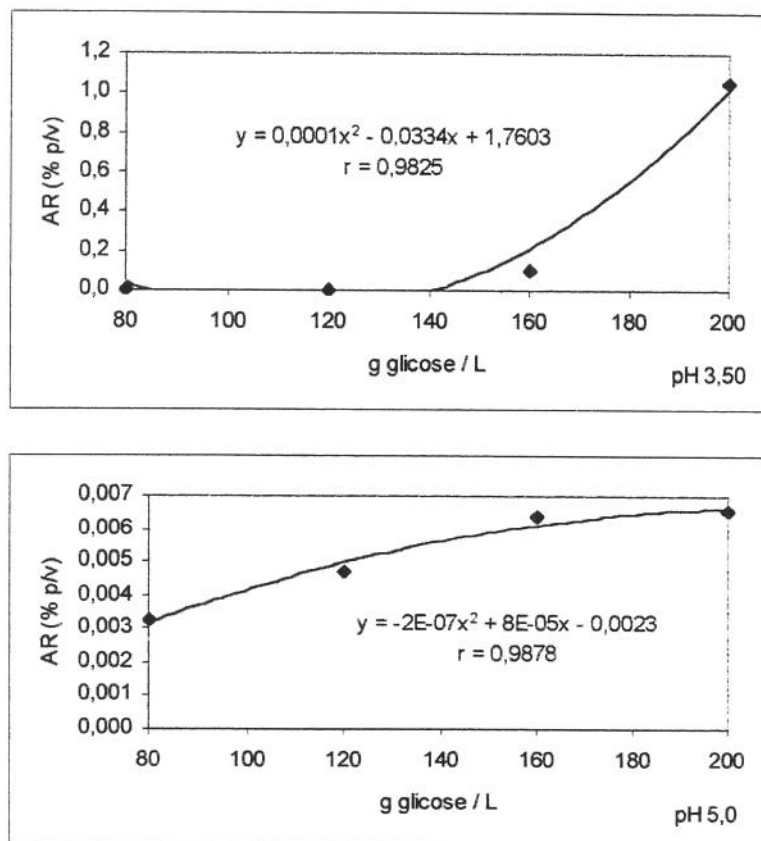


Figura 13 – Açúcar residual (% p/v) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,5 e 5,0.

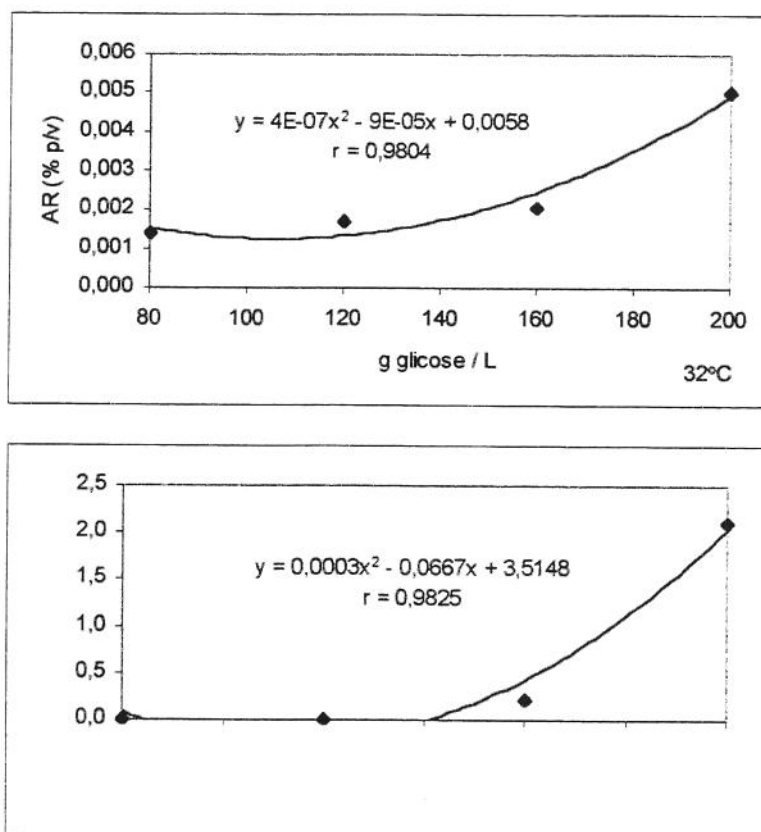


Figura 14 – Açúcar residual (% p/v) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.

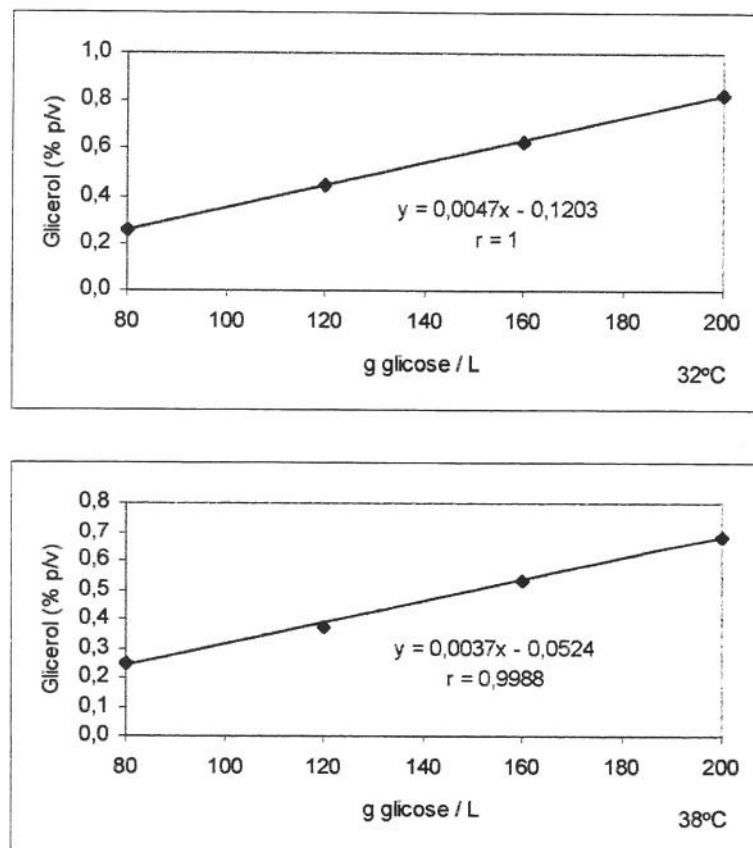


Figura 15 – Glicerol (% p/v) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.

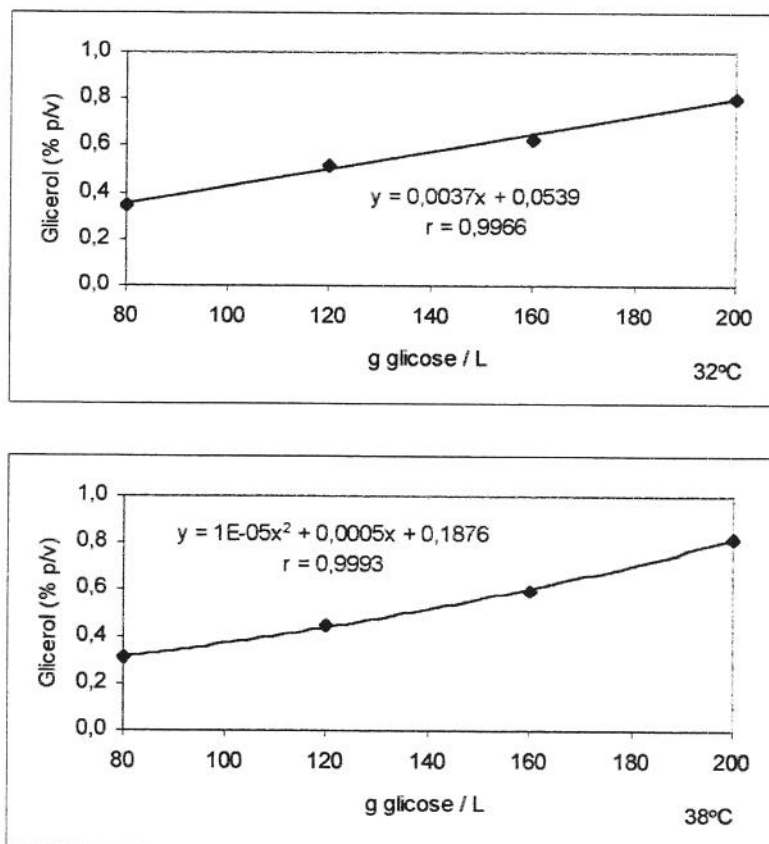


Figura 16 – Glicerol (% p/v) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.

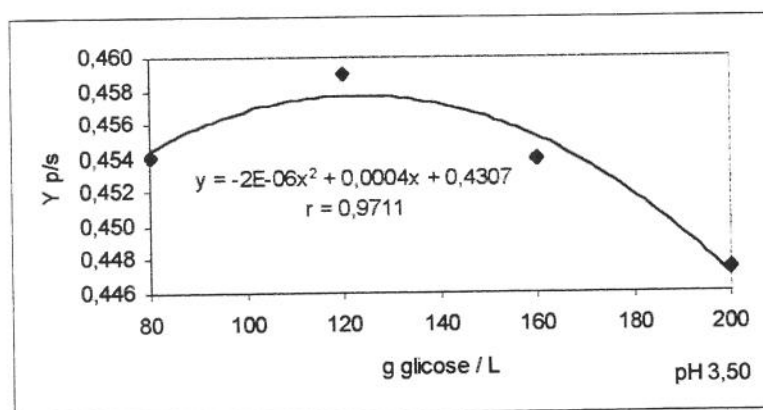


Figura 17 – Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.

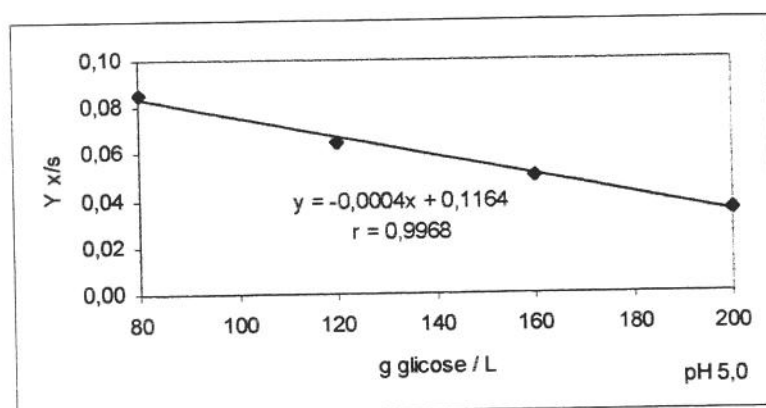
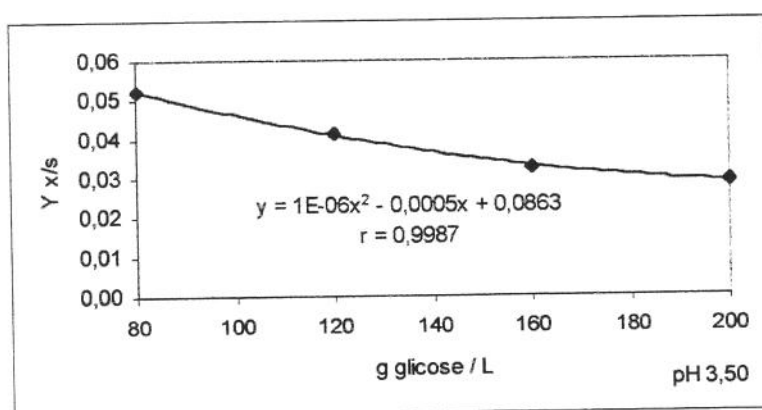


Figura 18 – Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.

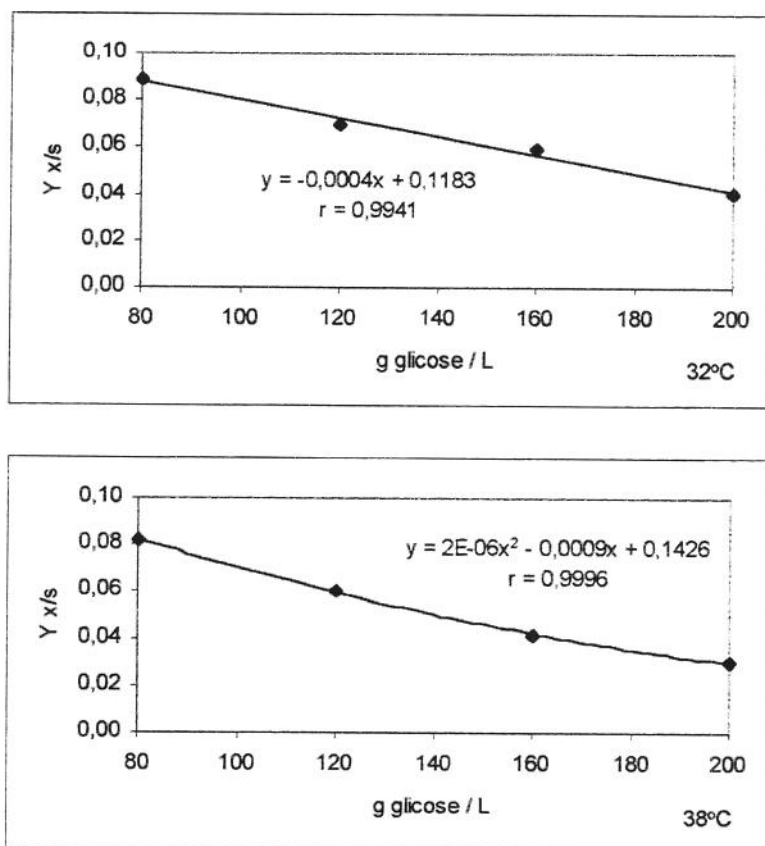


Figura 19 – Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) em função concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.

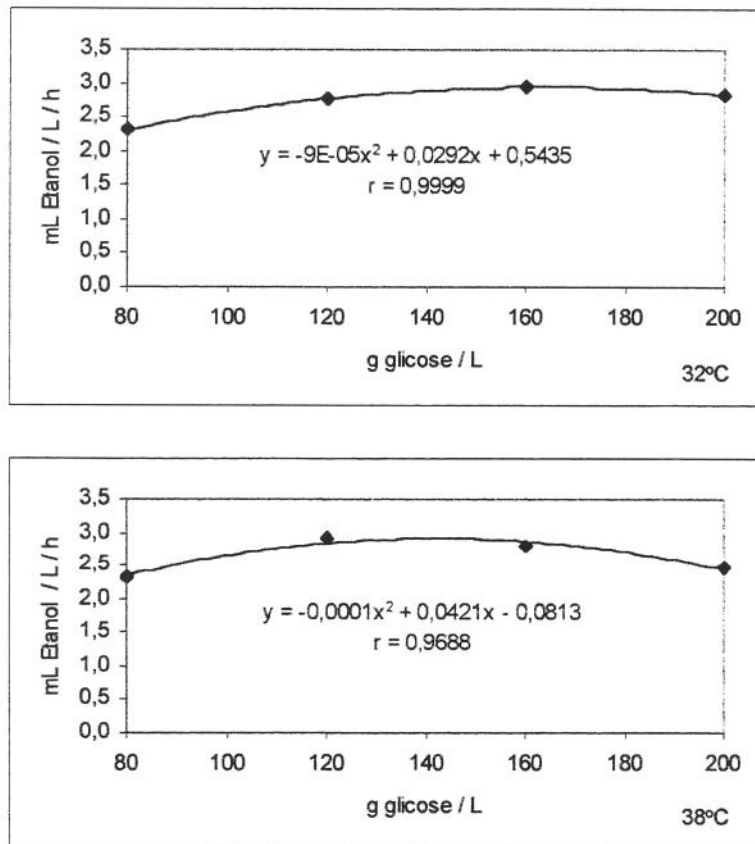


Figura 20 – Velocidade média de formação de etanol (mL / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.

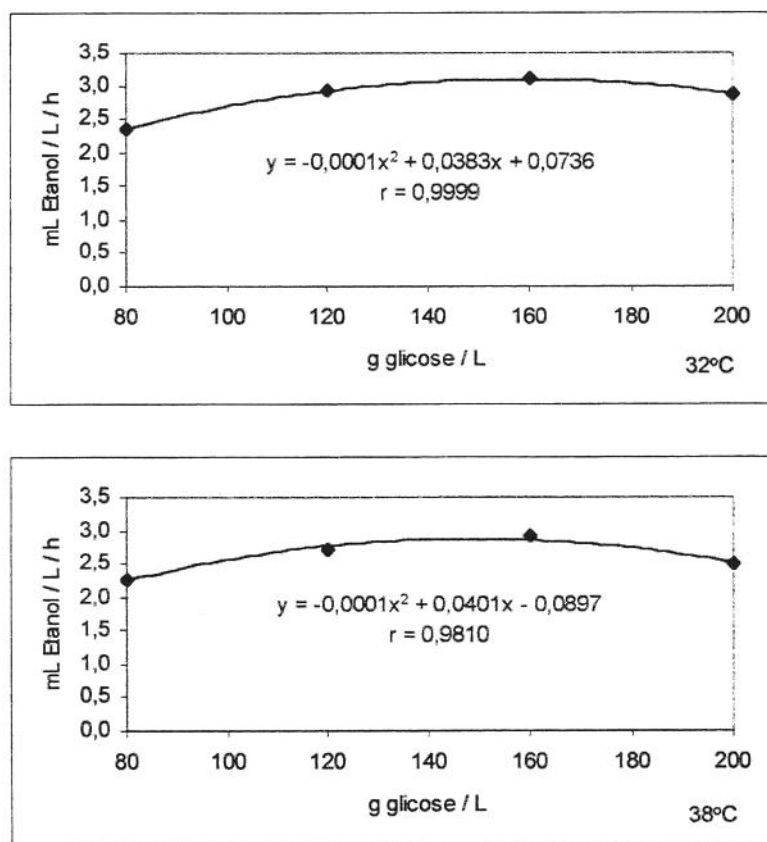


Figura 21 – Velocidade média de formação de etanol (mL / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.

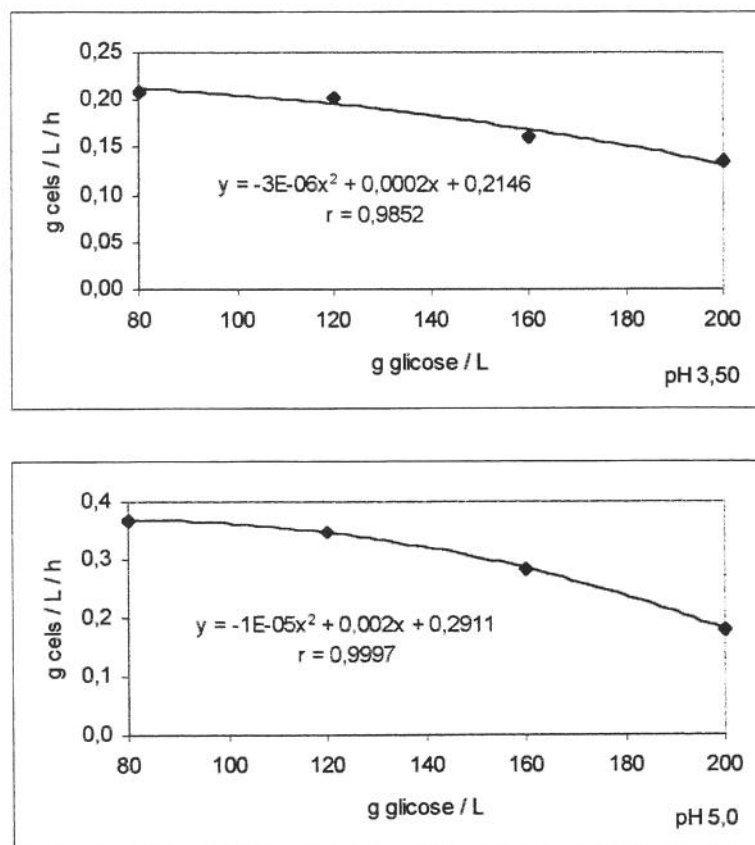


Figura 22 – Velocidade média de crescimento celular (g cel / L / h) em função da concentração de substrato, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50 e 5,0.

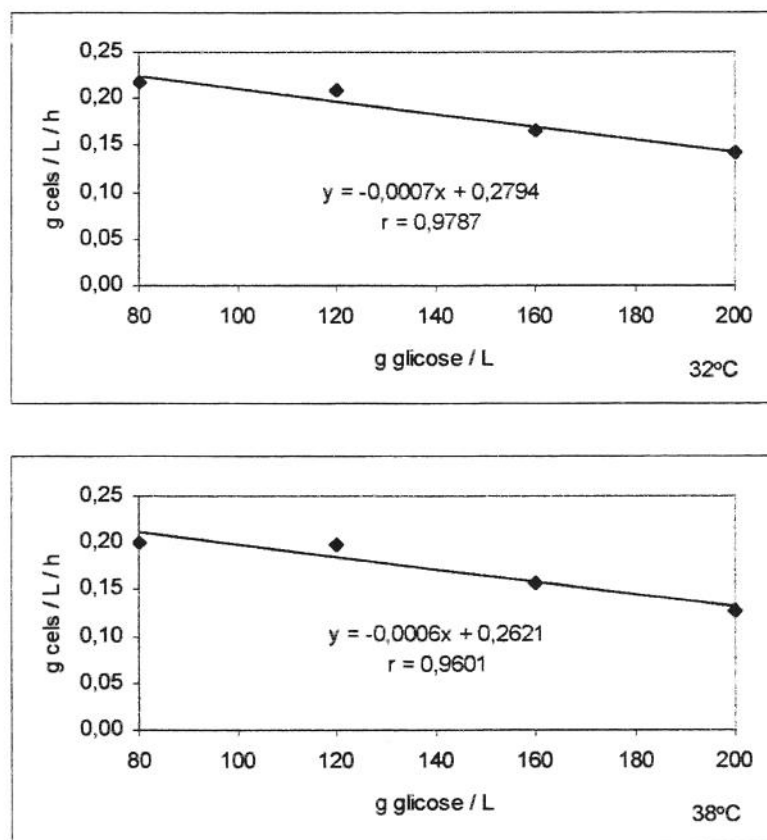


Figura 23 – Velocidade média de crescimento celular (g cel / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.

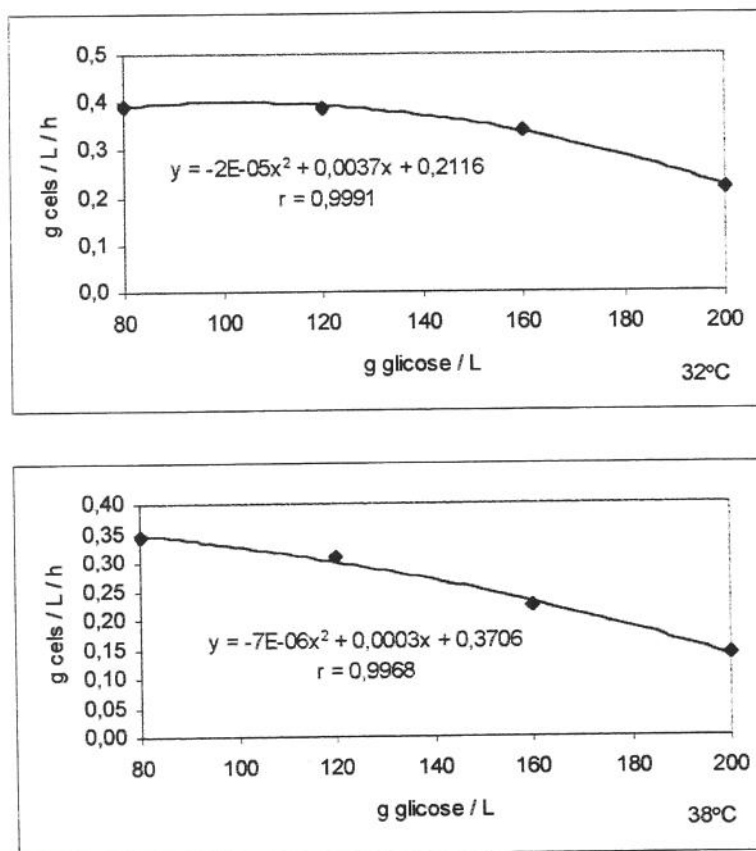


Figura 24 – Velocidade média de crescimento celular (g cel / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.

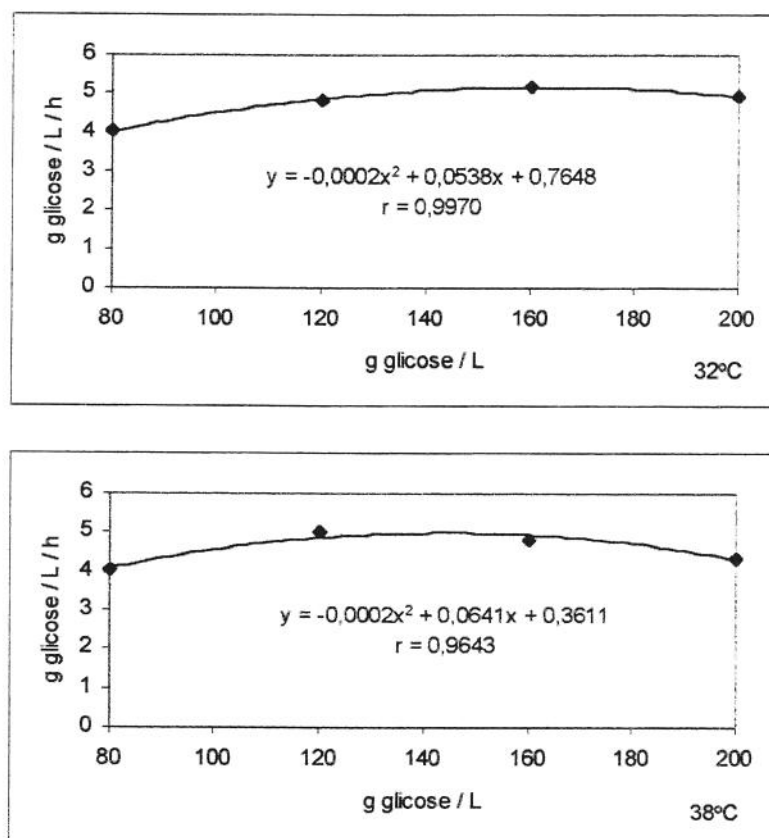


Figura 25 – Velocidade média de consumo de substrato (g / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 3,50.

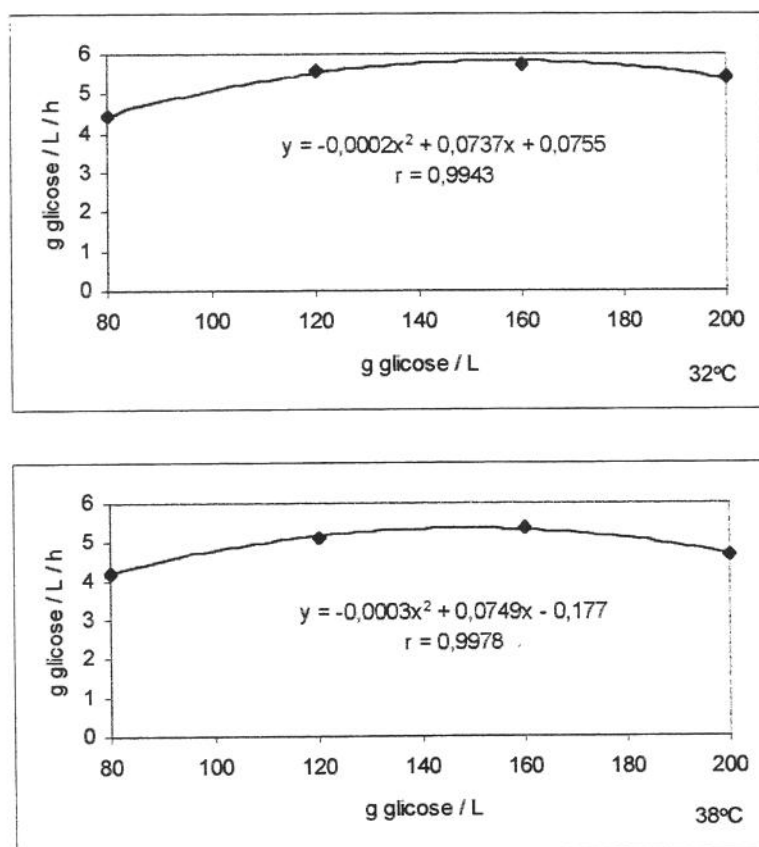


Figura 26 – Velocidade média de consumo de substrato (g / L / h) em função da concentração de substrato e temperatura, com inóculo de 10^4 células viáveis / mL e pH inicial 5,0.

4.2. A fermentação alcoólica em diferentes substratos

O experimento com as diversas matérias primas empregadas na fermentação alcoólica foi delineado para condução com inóculo 10^8 células viáveis / mL em quatro níveis de concentração de substrato (80, 120, 160 e 200 g/L de ART), pH inicial 3,5 e temperatura de fermentação 38°C. Estas variáveis foram selecionadas para este experimento com base nos resultados do experimento anterior, e por representarem as condições mais próximas daquelas observadas nas fermentações industriais nas destilarias brasileiras. O experimento foi conduzido em um delineamento de cinco ensaios individuais, cada um correspondente a uma matéria prima com quatro repetições para cada tratamento.

4.2.1. A fermentação alcoólica em substrato de glicose

O rendimento da fermentação é similar nas concentrações de substrato de 80 a 160 g ART / L, sendo de 81% em média. Com a concentração de 200 g/L houve redução de aproximadamente 12 unidades absolutas no rendimento, ocasionada pela fermentação incompleta provocada pela ação conjunta da alta concentração de substrato, de temperatura alta (38°C) e pH baixo (Tabela 5, Figura 27). Este resultado também ocorreu quando do estudo do comportamento dos fatores na fermentação alcoólica. A existência de açúcar residual (2,15% p/v) e a alta produção de glicerol (1,09% p/v) favoreceram a redução de rendimento alcoólico.

Como não houve crescimento celular apresentam-se nulos os valores do fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e a velocidade média de crescimento celular (VMCC), como se vê na Tabela 5, isto se deve por iniciar o processo com inóculo grande (10^8 células viáveis / mL).

A velocidade média de formação de etanol (VMFE) e de consumo de substrato (VMCS) apresentaram médias de 13,75 , 15,20 , 12,06 e 12,93 mL / L / h de etanol e 26,55, 29,98, 22,89 e 24,44 g / L / h de ART, respectivamente para as concentrações de 80, 120, 160 e 200 g/L. Os tempos de fermentação foram 3, 4, 7 e 7 horas, respectivamente (Tabela 5).

4.2.2. A fermentação alcoólica em substrato de sacarose

A fermentação com substrato de sacarose se caracterizou com a obtenção de rendimento alto e similar em todas as concentrações de substrato (80 a 200 g/L). O valor máximo obtido foi de 89%, com a concentração de 120 g/L. Os valores de açúcar residual e glicerol não foram muito diferentes, embora apresentem uma ligeira tendência de aumentar à medida que se caminha da menor para maior concentração de substrato. Percebe-se que a causa principal da diferença de rendimento é a produção de glicerol e não a existência de açúcar residual (Tabela 5). A levedura fermentou totalmente o açúcar disponível mesmo em presença de fatores indesejáveis como alta concentração de açúcar, de produto, pH inicial baixo (3,5) e temperatura alta (38°C).

A fermentação em substrato de sacarose mostrou que a inibição em 200 g/L ocorre em menor grau com sacarose e o etanol % vinho atingiu o mais elevado valor, de 11,05%.

A eficiência da fermentação apresentou valores de 84, 84, 80 e 79%, respectivamente para as concentrações de substrato de 80, 120, 160 e 200 g/L de ART. Estes valores justificam o fato de produção de glicerol ser neste caso o maior responsável pela diferença de rendimento alcoólico entre as concentrações de substrato (Tabela 5, Figura 28).

A velocidade média de formação de etanol e de consumo de substrato foram 14,67 , 16,13 , 12,68 e 12,28 mL / L / h de etanol e 25,40 , 27,73 , 22,20 e 21,72 g / L / h de ART, respectivamente para as concentrações de substrato de 80, 120, 160 e 200 g ART / L. Os tempos de fermentação foram 3, 4, 7 e 9 horas respectivamente (Tabela 5).

4.2.3. A fermentação alcoólica em substrato de xarope

O rendimento da fermentação em substrato de xarope, assim como em meio de sacarose, foi influenciado pela produção de glicerol; em xarope também se nota o crescimento da massa celular da levedura. O glicerol formado aumenta com o aumento da concentração de substrato, ao mesmo tempo em que o rendimento alcoólico decresce na mesma proporção. Dos substratos estudados o xarope foi o único que apresentou crescimento celular da levedura apesar do inóculo ser grande. Provavelmente a sua composição em nutrientes seja o fator preponderante que determine tal comportamento mesmo em situação de equilíbrio populacional. Nestas circunstâncias, o tempo da fermentação foi reduzido em uma hora nas concentrações de 160 e 200 g/L de ART quando comparado com o substrato de glicose (Tabela 5, Figura 29). As condições nutricionais adequadas favorecem o crescimento e conseqüentemente resulta em maior velocidade fermentativa, o que reduz o tempo da fermentação (Strehaiano et al., 1983). O rendimento máximo obtido foi de 88% em concentração de substrato de 80 g/L, coincidindo com menor produção de glicerol, quando observado em relação a outras concentrações. Em condições adversas a levedura produz mais glicerol para manter a sua viabilidade celular (Costenoble et al., 2000). O rendimento mostrou, como para substrato de sacarose, uma inibição crescente pelo substrato (Tabela 5).

A eficiência da levedura foi de 90, 85, 85 e 82%, respectivamente para a concentração de substrato de 80, 120, 160 e 200 g ART / L. A velocidade média

de formação de etanol (VMFE), de crescimento celular (VMCC) e de consumo de substrato (VMCS) foi de 14,03 , 15,64 , 14,07 ; 17,09 mL / L / h de etanol e 0,913, 1,182, 0,083 e 0,234 g / L / h de células e 23,99 , 28,25 , 25,59 e 32,10 g / L / h de ART, respectivamente (Tabela 5, Figura 30).

4.2.4. A fermentação alcoólica em substrato de melaço de menor pureza

O fator determinante na fermentação de melaço é sua pureza , ou seja, a concentração de açúcar e não-açúcares. A somatória do efeito desses dois fatores inibe quase completamente a fermentação.

Com a concentração de 80 g/L de ART não houve inibição da fermentação e o rendimento alcançou 86%. Em concentrações crescentes de açúcar o rendimento diminuiu drasticamente até o valor de 7%, em concentração de substrato de 170 g/L (Tabela 5, Figura 30). Nesta, o etanol produzido foi 0,84% v/v e o açúcar residual 16,28% p/v, ou seja somente 1,3 g de açúcar foi transformado em etanol durante 14 horas. Praticamente não houve a fermentação. Este resultado mostra a importância das características de substrato a ser usado na condução de experimentos em laboratório. Dependendo de sua pureza e concentração de açúcar, o melaço pode ser inviável para conduzir os experimentos laboratoriais. Em baixa concentração de substrato a levedura suporta melhor as condições adversas do meio, mantendo o número elevado de células viáveis durante a fermentação, como mostra a Tabela 6.

A eficiência da levedura foi de 84, 84, 80 e 79%, respectivamente para as concentrações de substrato de 80, 110, 140 e 170 g/L. Curiosamente estas eficiências foram exatamente iguais aos encontradas com substrato de sacarose nas concentrações de 80, 120, 160 e 200 g/L, respectivamente. As velocidades médias de formação de etanol e de consumo de substrato foram de 10,58 , 13,67 , 2,54 e 0,60 mL / L / h de etanol, e 18,50, 27,70, 7,09 e 1,71 g / L / h de ART,

respectivamente. Os tempos de fermentação foram 4, 3, 10 e 14 horas, respectivamente (Tabela 5).

4.2.5. A fermentação alcoólica em substrato de melaço de maior pureza

Com o melaço de maior pureza em relação ao melaço anterior o rendimento da fermentação foi melhor, embora ainda baixo, atingindo apenas 55% em 170 g/L de ART (Tabela 5, Figura 31). O melaço como subproduto da fabricação de açúcar contém impurezas que com interação com outros fatores indesejáveis, tais como, baixo pH inicial (3,5), temperatura elevada (38°C) e alta concentração de substrato, contribuem para inibir a fermentação e como consequência obtêm-se rendimentos baixos. A presença das impurezas do melaço agrega uma sobrecarga em sólidos solúveis que eleva a pressão osmótica do meio. Apesar da característica homeostática da célula da levedura, conforme a quantidade e qualidade dos sais minerais presentes no melaço, torna-se difícil a manutenção do seu equilíbrio hidrostático. A fermentação de melaço é particularmente importante nas destilarias anexas, porque além de dar uso a esse resíduo da fabricação de açúcar, contribui para o aumento do rendimento global da usina e a sua mistura com o caldo de cana destinado a fermentação aumenta sua concentração em açúcares fermentescíveis, garantindo a obtenção de teores alcoólicos no vinho adequados a um bom rendimento de destilação e economia de energia.

A quantidade de glicerol produzido foi similar àquela com a utilização de substrato de glicose, situando-se na faixa de 1% p/v, nas concentrações de 160 e 200 g/L de glicose (Tabela 5).

A eficiência da levedura apresentou valores de 88, 79, 82 e 88%, respectivamente para as concentrações de substrato de 80, 110, 140 e 170 g / L. A velocidade média de formação de etanol e de consumo de substrato foi de

13,25, 14,36, 14,44 e 15,61 mL / L / h de etanol, e 23,18, 28,13, 27,25 e 27,48 g / L / h de ART, respectivamente. Os tempos de fermentação foram 3, 4, 5 e 4 horas, respectivamente, (Tabela 5).

As quantidades de etanol a partir de 5,75% v/v intensificou a ação negativa das impurezas do melaço sobre a viabilidade da levedura. Este fato é bem evidenciado na Tabela 5 e 6. Pode ser observado que teores de etanol no vinho de 0,84 a 4,23% (v/v) com melaço de menor pureza a levedura ainda manteve no final da fermentação uma viabilidade entre 23 a 55% de acordo com a concentração de substrato. Com o melaço de maior pureza na presença de teor de etanol entre 5,75 e 7,22 % (v/v) fizeram com que a viabilidade fosse reduzida a 4% (Tabela 5 e 6).

Tabela 5 – Médias e resultados estatísticos da fermentação alcoólica em substratos diversos, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.

	Substrato (g ART / L)				Regressão
	80	120	160	200	r
Glicose					
Rendimento (%)	80,70 a	80,98 a	81,40 a	72,83 b	0,958 ***
Etanol (% v/v)	4,21 d	6,29 c	8,45 b	9,41 a	0,998 ***
A R res (% p/v)	0,006 b	0,006 b	0,005 b	2,15 a	0,966 ***
Glicerol (% p/v)	0,569 d	0,782 c	0,934 b	1,085 a	0,996 ***
$Y_{p/s}$	0,4127 a	0,4141 a	0,4162 a	0,4170 a	ns
$Y_{x/s}$	-	-	-	-	-
VMFE (mL / L / h)	13,75 b	15,20 a	12,06 c	12,93 c	< 0,80 ***
VMCC (g / L / h)	-	-	-	-	-
VMCS (g / L / h)	26,55 b	29,98 a	22,89 d	24,44 c	< 0,80 ***
Tempo (h)	3	4	7	7	-
Sacarose					
Rendimento (%)	88,00 b	89,00 a	87,00 c	86,75 c	0,8003 ***
Etanol (% v/v)	4,40 d	6,45 c	8,84 b	11,05 a	1,000 ***
A R res (% p/v)	0,086 d	0,102 c	0,111 b	0,128 a	0,993 ***
Glicerol (% p/v)	0,821 d	1,069 c	1,228 b	1,461 a	0,997 ***
$Y_{p/s}$	0,4306 a	0,4316 a	0,4098 b	0,4050 b	ns
$Y_{x/s}$	-	-	-	-	-
VMFE (mL / L / h)	14,67 b	16,13 a	12,68 c	12,28 c	< 0,80 ***
VMCC (g / L / h)	-	-	-	-	-
VMCS (g / L / h)	25,40 b	27,73 a	22,20 c	21,72 c	< 0,80 ***
Tempo (h)	3	4	7	9	-
Xarope					
Rendimento (%)	88,25 a	84,25 b	84,00 b	80,62 c	0,957 ***
Etanol (% v/v)	4,21 d	6,26 c	8,44 b	10,26 a	0,999 ***
A R res (% p/v)	0,152 b	0,180 b	0,208 b	0,390 a	0,983 ***
Glicerol (% p/v)	0,835 d	1,127 c	1,328 b	1,527 a	0,995 ***
$Y_{p/s}$	0,4617 a	0,4369 b	0,4339 b	0,4203 c	0,970 *
$Y_{x/s}$	0,0381 a	0,0418 a	0,0032 c	0,0073 b	< 0,80 ***
VMFE (mL / L / h)	14,03 c	15,64 b	14,07 c	17,09 a	< 0,80 ***
VMCC (g / L / h)	0,913 b	1,182 a	0,083 d	0,234 c	< 0,80 ***
VMCS (g / L / h)	23,99 d	28,25 b	25,59 c	32,10 a	< 0,80 ***
Tempo (h)	3	4	6	6	-

Tabela 5 – Continuação.

	Substrato (g ART / L)				Regressão
	80	110	140	170	r
Melaço Final de Menor Pureza					
Rendimento (%)	85,50 a	53,50 b	28,25 c	7,00 d	0,996 ***
Etanol (% v/v)	4,23 a	4,10 b	2,54 c	0,84 d	0,994 ***
A R res (% p/v)	0,255 d	3,551 c	6,744 b	16,280 a	0,993 ***
Glicerol (% p/v)	0,625 a	0,457 b	0,315 c	0,137 d	0,999 ***
$Y_{p/s}$	0,4306 a	0,4316 a	0,4098 b	0,4050 b	ns
$Y_{x/s}$	-	-	-	-	-
VMFE (mL / L / h)	10,58 b	13,67 a	2,54 c	0,60 d	0,876 ***
VMCC (g / L / h)	-	-	-	-	-
VMCS (g / L / h)	18,50 b	27,70 a	7,09 c	1,71 d	0,866 ***
Tempo (h)	4	3	10	14	-
Melaço Final de Maior Pureza					
Rendimento (%)	86,00 a	77,50 b	77,75 b	54,50 c	0,952 ***
Etanol (% v/v)	3,98 d	5,75 c	7,22 a	6,25 b	0,979 ***
A R res (% p/v)	0,166 c	0,228 c	0,733 b	6,788 a	0,979 ***
Glicerol (% p/v)	0,639 c	0,832 b	1,015 a	1,013 a	0,992 ***
$Y_{p/s}$	0,4512 a	0,4030 c	0,4182 b	0,4485 a	0,964 ***
$Y_{x/s}$	-	-	-	-	-
VMFE (mL / L / h)	13,25 c	14,36 b	14,44 b	15,61 a	0,958 ***
VMCC (g / L / h)	-	-	-	-	-
VMCS (g / L / h)	23,18 c	28,13 a	27,25 b	27,48 b	0,918 ***
Tempo (h)	3	4	5	4	-

*** - Significativo a 0,1%;

** - Significativo a 1%;

* - Significativo a 5%

Letras minúsculas – comparação horizontal;

Letras maiúsculas – comparação vertical

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

Tabela 6 - Médias de viabilidade celular (%) e de células viáveis de levedura no final da fermentação

Tratamentos	Glicose		Sacarose		Xarope	
	Viabilidade	Células Viáveis	Viabilidade	Células Viáveis	Viabilidade	Células Viáveis
g ART / L	(%)	(cel/mL)	(%)	(cel/mL)	(%)	(cel/mL)
80	48	3,55 x 10 ⁸	54	4,11 x 10 ⁸	78	4,42 x 10 ⁸
120	29	1,98 x 10 ⁸	48	3,00 x 10 ⁸	65	3,60 x 10 ⁸
160	1,18	1,50 x 10 ⁷	36	2,92 x 10 ⁸	23	1,43 x 10 ⁸
200	11	7,50 x 10 ⁷	39	3,24 x 10 ⁸	13	1,09 x 10 ⁸
	Melaço de Menor Pureza		Melaço de Maior Pureza			
	Viabilidade	Células Viáveis	Viabilidade	Células Viáveis		
	(%)	(cel/mL)	(%)	(cel/mL)		
80	41	2,48 x 10 ⁸	13	7,80 x 10 ⁷		
110	55	3,33 x 10 ⁸	4	1,99 x 10 ⁷		
140	42	2,77 x 10 ⁸	4	2,10 x 10 ⁷		
170	23	1,62 x 10 ⁸	9	5,90 x 10 ⁷		

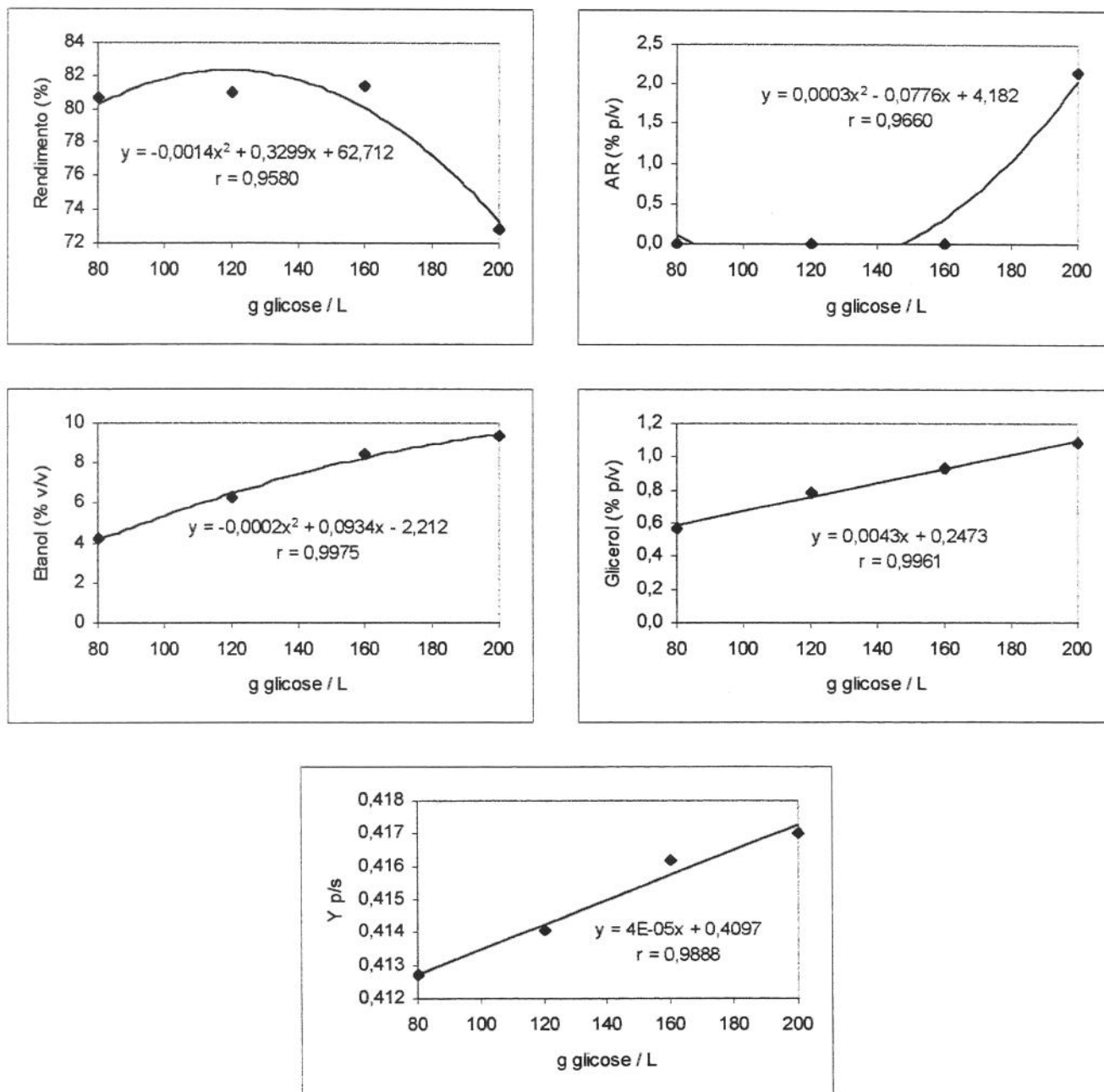


Figura 27 – Rendimento da fermentação (%), etanol (% v/v), açúcar residual (% p/v), glicerol (% p/v) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), em função da concentração de substrato de glicose, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.

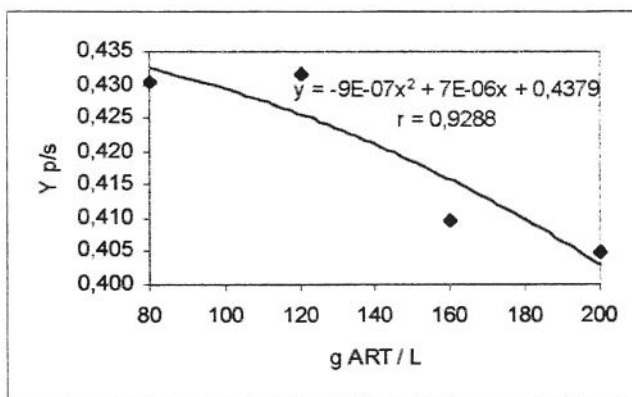
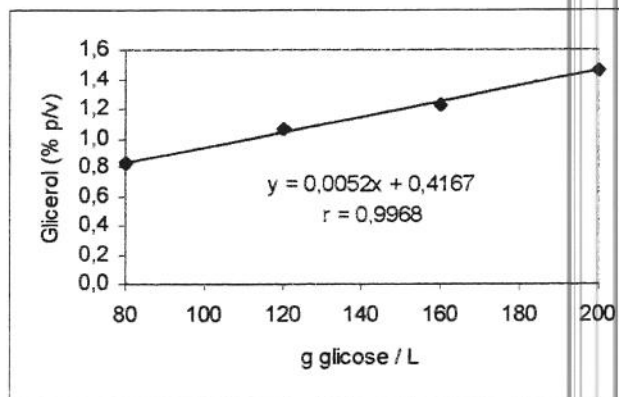
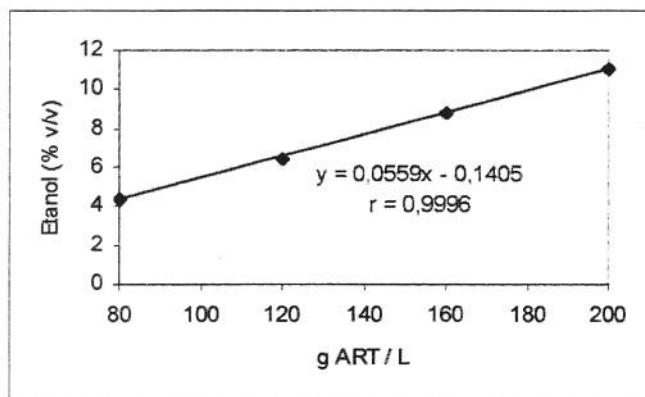
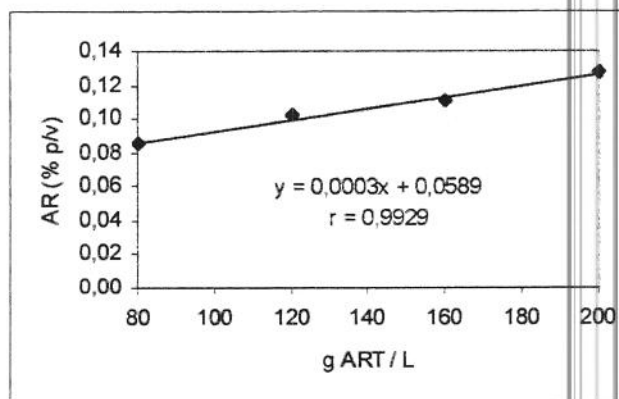
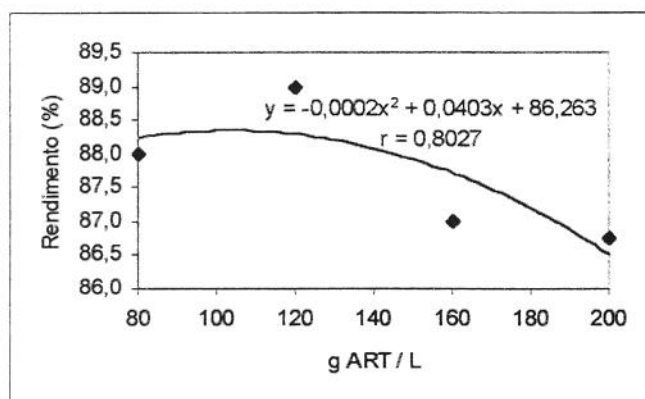


Figura 28 – Rendimento da fermentação (%), etanol (% v/v), açúcar residual (% p/v), glicerol (% p/v) e fator de conversão de substrato e produto ($Y_{p/s}$) em função da concentração de substrato de sacarose, com inóculo alto de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.

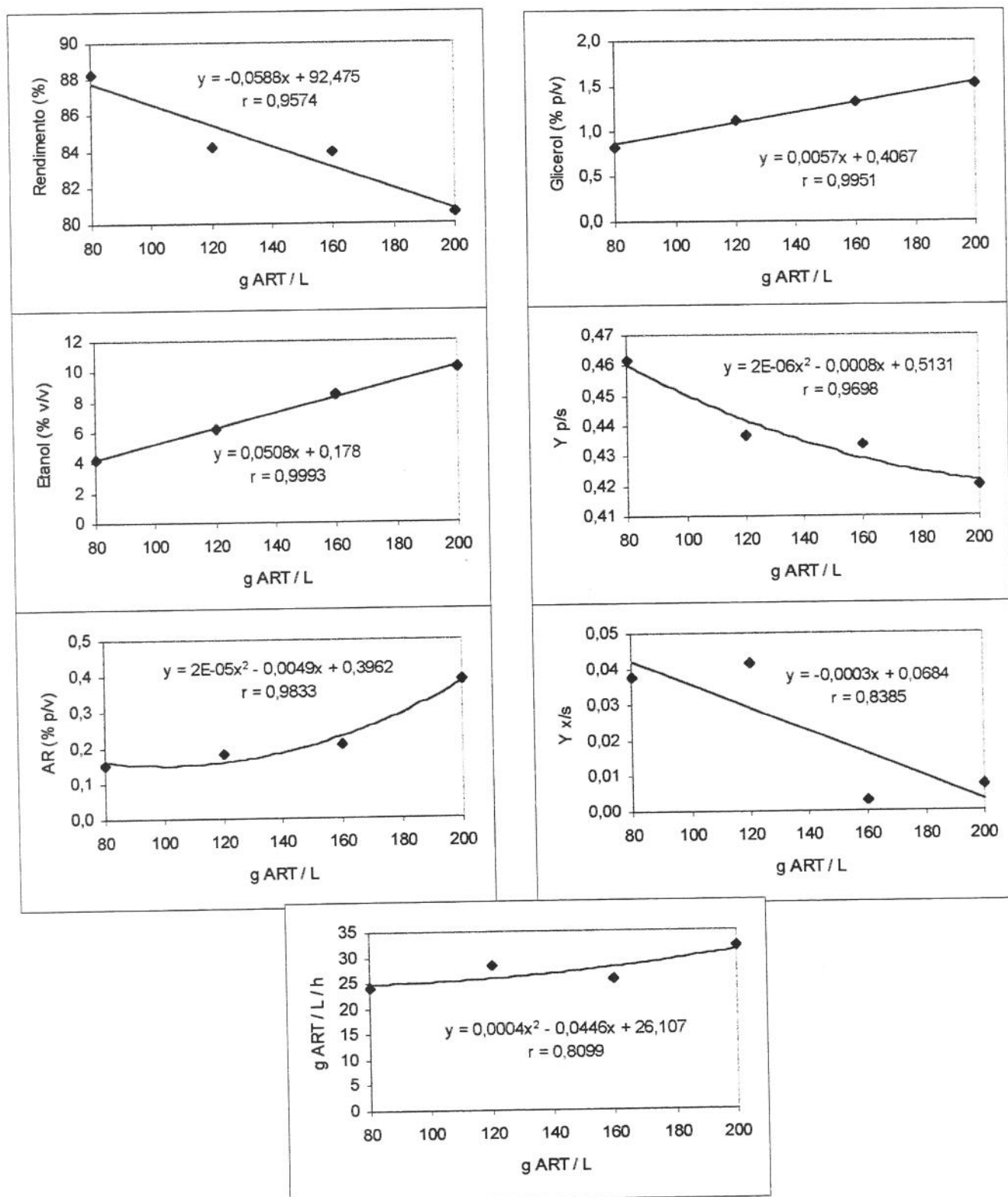


Figura 29 – Rendimento da fermentação (%), etanol (% v/v), açúcar residual (% p/v), glicerol (% p/v), fator de conversão de substrato em produto (Y_{ps}), fator de conversão de substrato em células (Y_{xs}) e velocidade média de consumo de substrato (g ART/L/h) em função da concentração de substrato de xarope, com inóculo alto de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C .

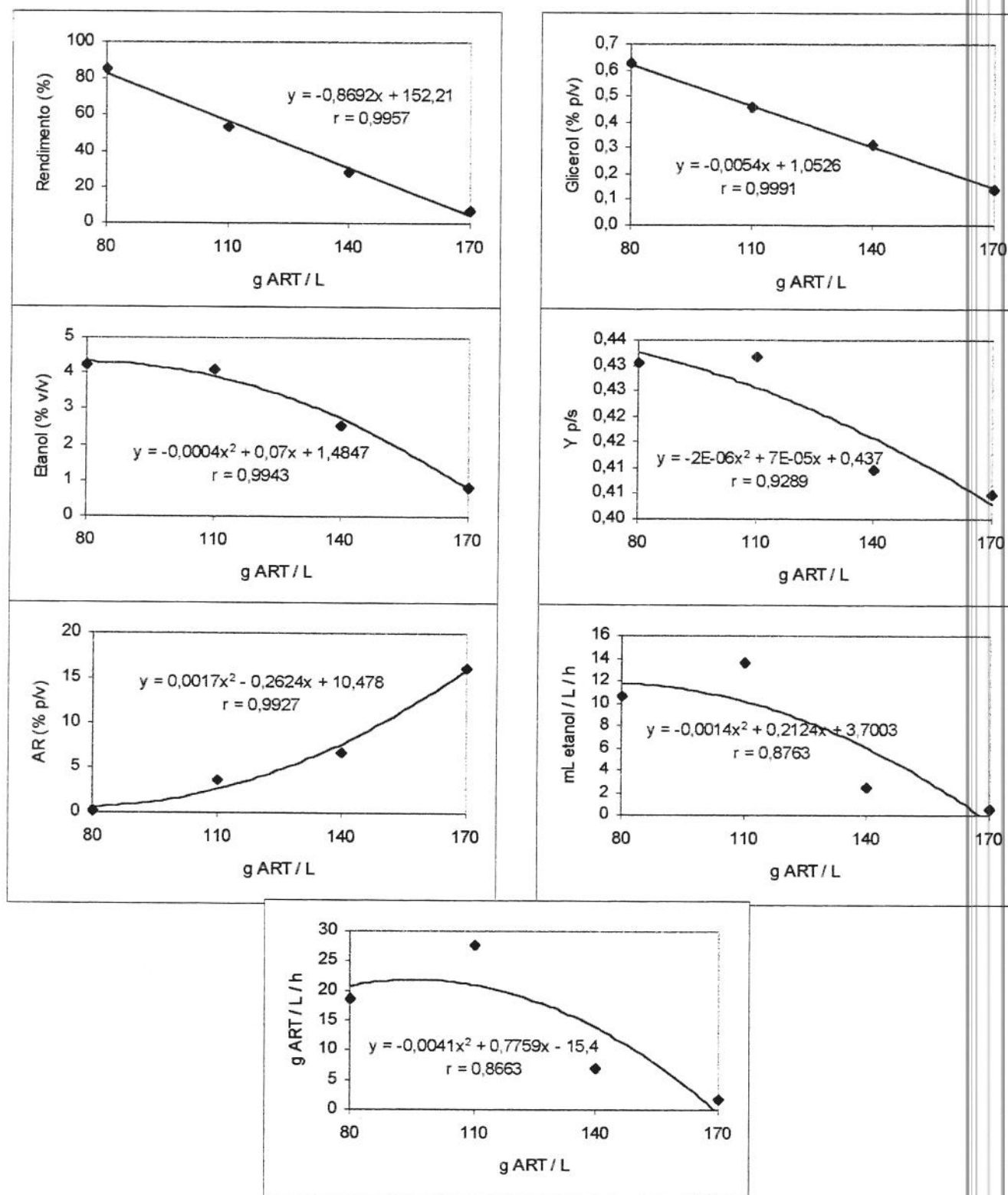


Figura 30 – Rendimento da fermentação (%), etanol (% v/v), açúcar residual (% p/v), glicerol (% p/v), fator de conversão de substrato em produto (Y_{ps}), velocidade média de formação de etanol (mL/L/h) e de consumo de substrato (g ART/L/h) em função da concentração de substrato de melaço final de menor pureza, com inóculo alto de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.

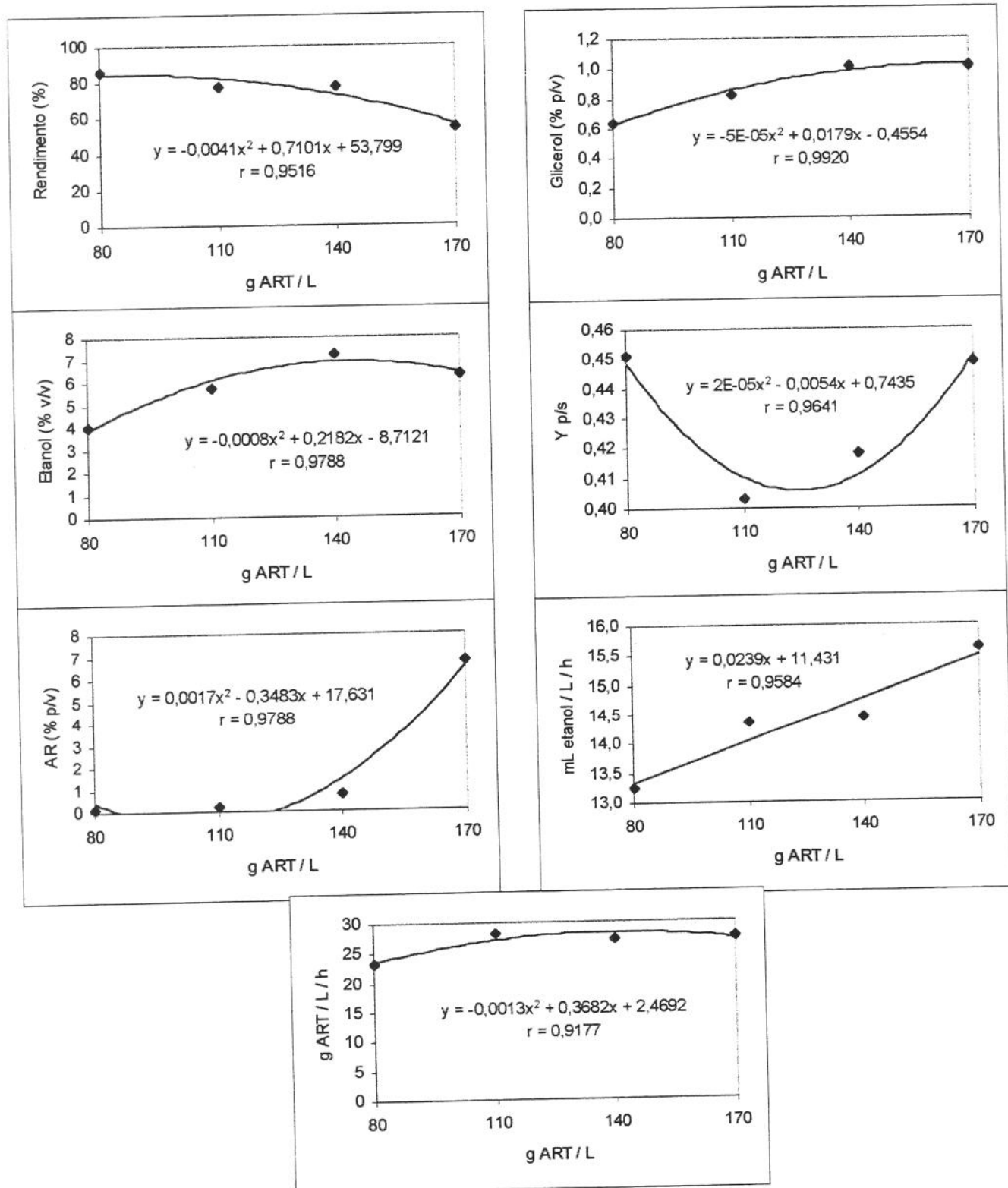


Figura 31 – Rendimento da fermentação (%), etanol (% v/v), açúcar residual (% p/v), glicerol (% p/v), fator de conversão de substrato e produto (Y_{ps}), velocidade média de formação de etanol (mL / L / h) e de consumo de substrato (g ART/L / h) em função da concentração de substrato de melação final de maior pureza, com inóculo alto de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,50 e 38°C.

4.3. A cinética de liberação de CO₂ na fermentação alcoólica

4.3.1. Fatores que afetam a cinética de liberação de CO₂ em substrato de glicose

Os fatores estudados foram a quantidade de inóculo, pH inicial, a concentração de substrato e a temperatura de fermentação.

Os resultados obtidos para CO₂ (% p/v), determinados em intervalos de uma hora, são apresentados nas Figuras 32 a 35. A partir desses resultados foram estabelecidos os tempos de fermentação (Tabela 2). A quantidade de inóculo é fundamental no desenvolvimento da fermentação. Inóculo grande (10⁸ células viáveis / mL) resultou em fermentações que se completaram entre 3 a 8 horas, para concentrações de substrato de 80 a 200g / L de glicose. Inóculo pequeno (10⁴ células viáveis / mL) resultou em fermentações lentas que se estenderam de 20 a 44 horas. A predição da cinética é de grande utilidade para avaliação do tempo de fermentação e para prevenção de fermentações longas (Sablayrolles & Barre, 1993b).

Com inóculo grande os tempos de fermentação foram praticamente iguais para as temperaturas de 32 e 38°C. Com inóculo pequeno houve ligeira tendência de aumento de tempo para a temperatura de 38°C.

Nas fermentações com pH 5,0 a tendência foi de fermentações mais rápidas que a pH 3,5.

Para inóculo grande, nas concentrações de 80, 120, 160 e 200 g/L de glicose, a quantidade média acumulada de CO₂ liberado (Tabela 7) foi de cerca de 3,72, 5,46, 7,34 e 8,20 g CO₂ / 100 mL de mosto, respectivamente, para pH 3,5. Para pH 5,0 os resultados foram similares. Para o pH e temperatura estudados, os coeficientes de correlação entre a concentração de substrato e o CO₂ liberado

foram praticamente igual a 1. Para inóculo pequeno, do mesmo modo, o coeficiente de correlação entre a concentração de substrato e o CO₂ liberado foi também elevado (próximo à uma unidade), mostrando a resposta linear da medição da liberação de CO₂ com a concentração de substrato. Nas Figuras 36 a 38 vê-se que há elevado coeficiente de correlação, com valores de r próximos à unidade, entre as quantidades de CO₂ liberado com etanol formado e ART consumido. Este resultado demonstra que a determinação de CO₂ liberado pode ser usado para estimar o etanol produzido e a glicose consumida, assim como outros dados cinéticos da fermentação como afirmaram Bely et al. (1990); Bryan & Silman (1991) e Sablayrolles & Barre (1993a).

Os valores de etanol reais são menores que aqueles estimados estequiometricamente, devido ao consumo de açúcar para crescimento e atividades celulares.

Sob inóculo grande não houve lag fase. Sob inóculo pequeno a lag fase foi de 14 horas, permitindo observar que em substratos com 80 g ART / L a fase exponencial durou apenas cerca de 4 a 5 horas, tempo similar a inóculo grande. Todavia, sob concentrações de açúcar mais elevadas a fase exponencial se inicia com velocidade similar (pH 3,5) ou pouco mais atenuada (pH 5,0), especialmente em 38°C, apresentando-se bastante lenta em sua fase final e não mostrando uma inflexão nítida que marcaria o início da fase estacionária (Figura 32 e 33). Assim, tem-se fermentações prolongadas ou demoradas que atingem até cerca de 40 ou 49 horas para que se consuma o açúcar em substratos com 160 e 200 g ART / L, respectivamente (Figura 34 e 35). Esta situação torna o emprego de inóculo baixo (10⁴ células viáveis / mL) mais oneroso no que se refere ao tempo requerido e, por conseguinte, menos econômico em comparação ao uso de inóculo grande (10⁸), onde já se tem o equilíbrio populacional logo no início do processo fermentativo, o que contribui consideravelmente para a redução do tempo da fermentação (Tabela 2).

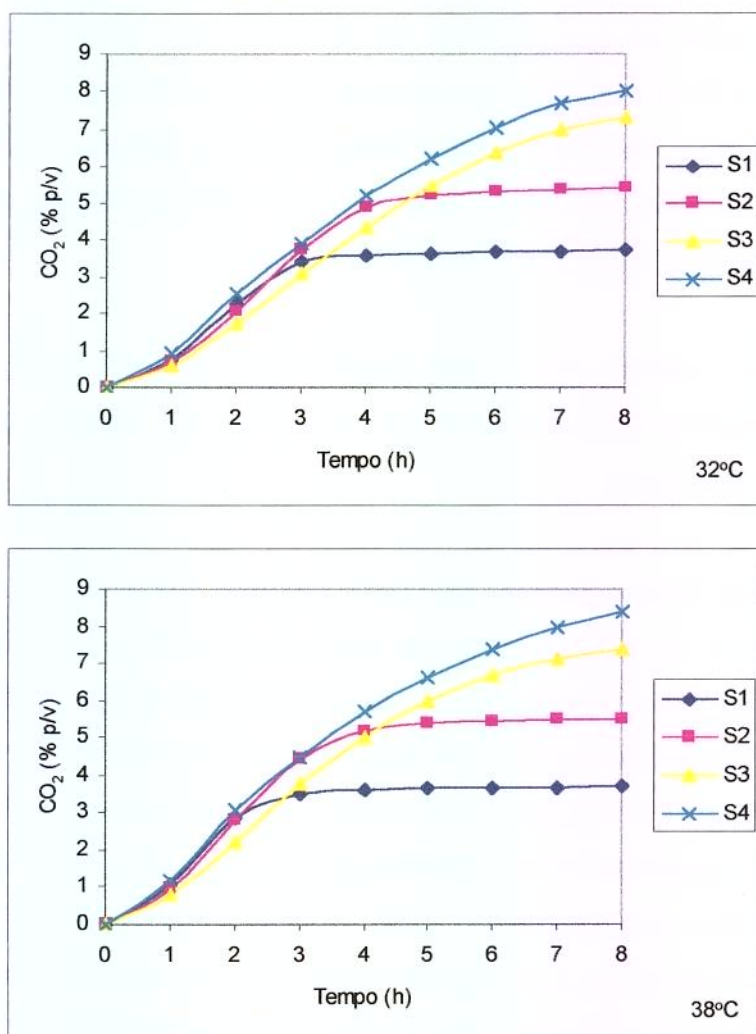


Figura 32 – Cinética da liberação de CO_2 (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e temperatura de 32 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 120g ART / L; S3 – 160g ART / L e S4 – 200g ART / L.

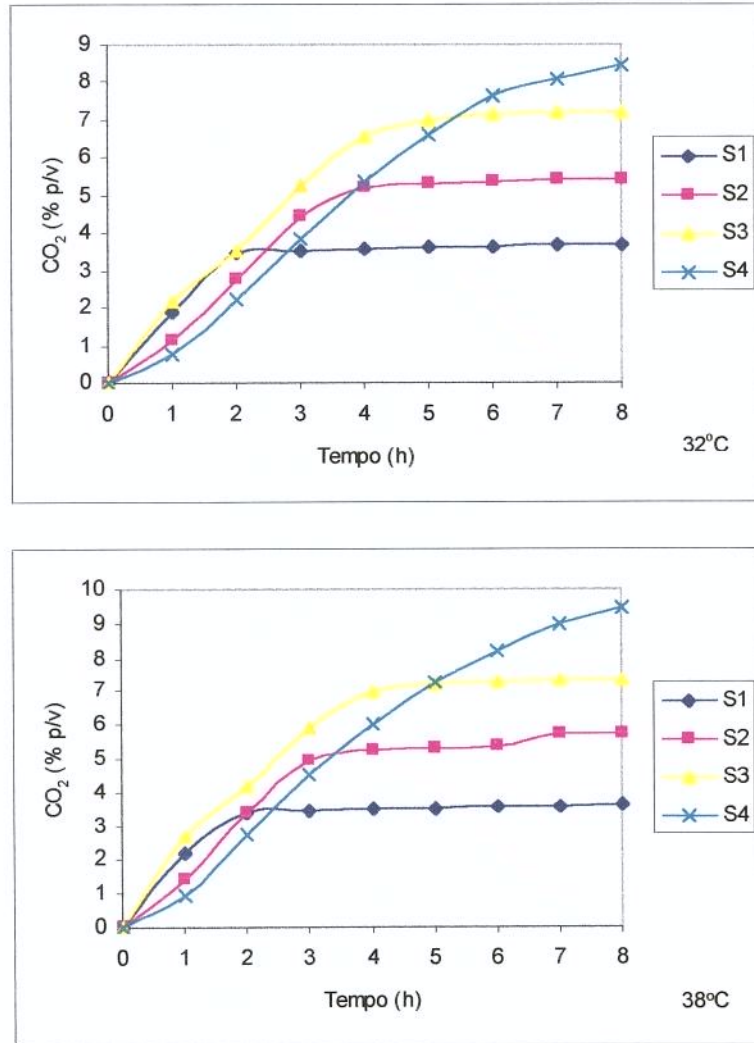


Figura 33 – Cinética da liberação de CO₂ (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 5,0 e temperatura de 32 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 120g ART / L; S3 – 160g ART / L e S4 – 200g ART / L.

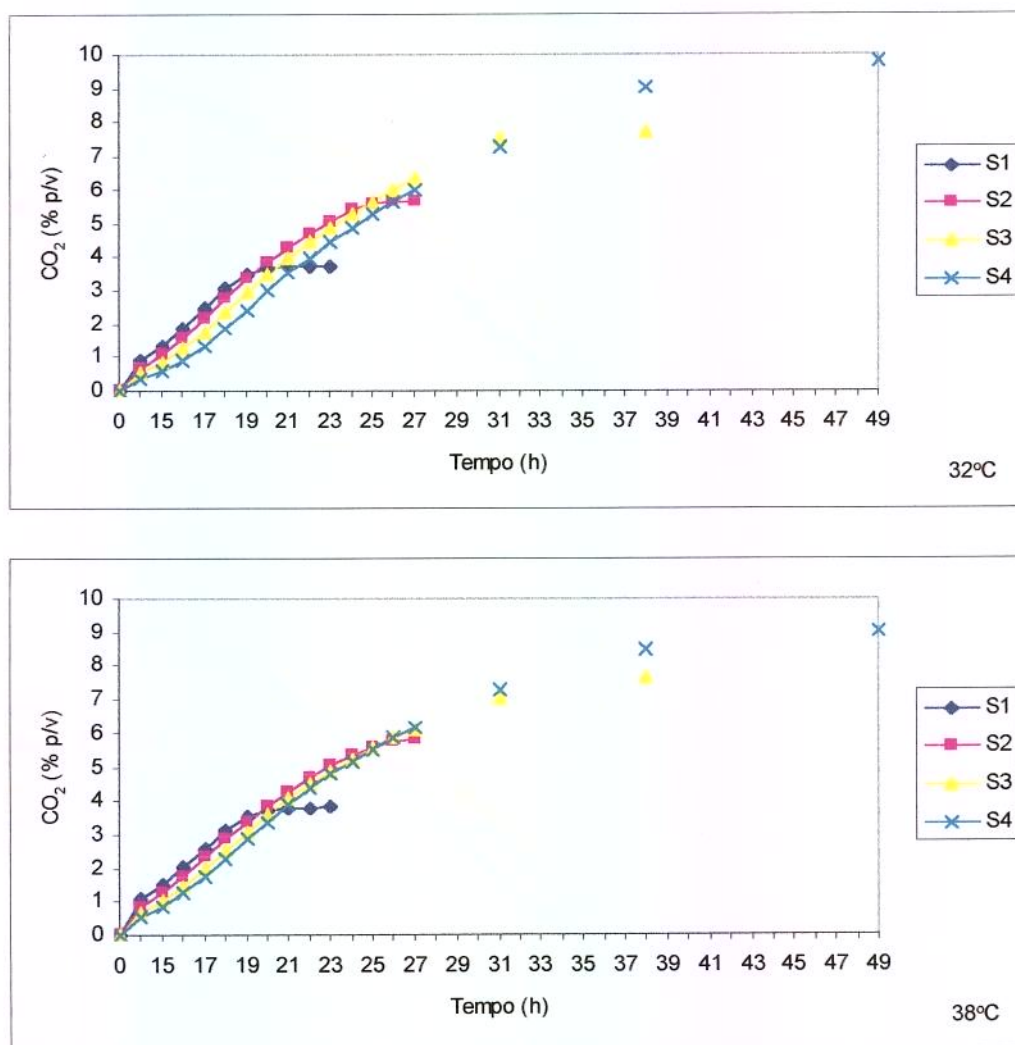


Figura 34 – Cinética da liberação de CO_2 (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de glicose, nas condições de inóculo de 10^4 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e temperatura de 32 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 120g ART / L; S3 – 160g ART / L e S4 – 200g ART / L.

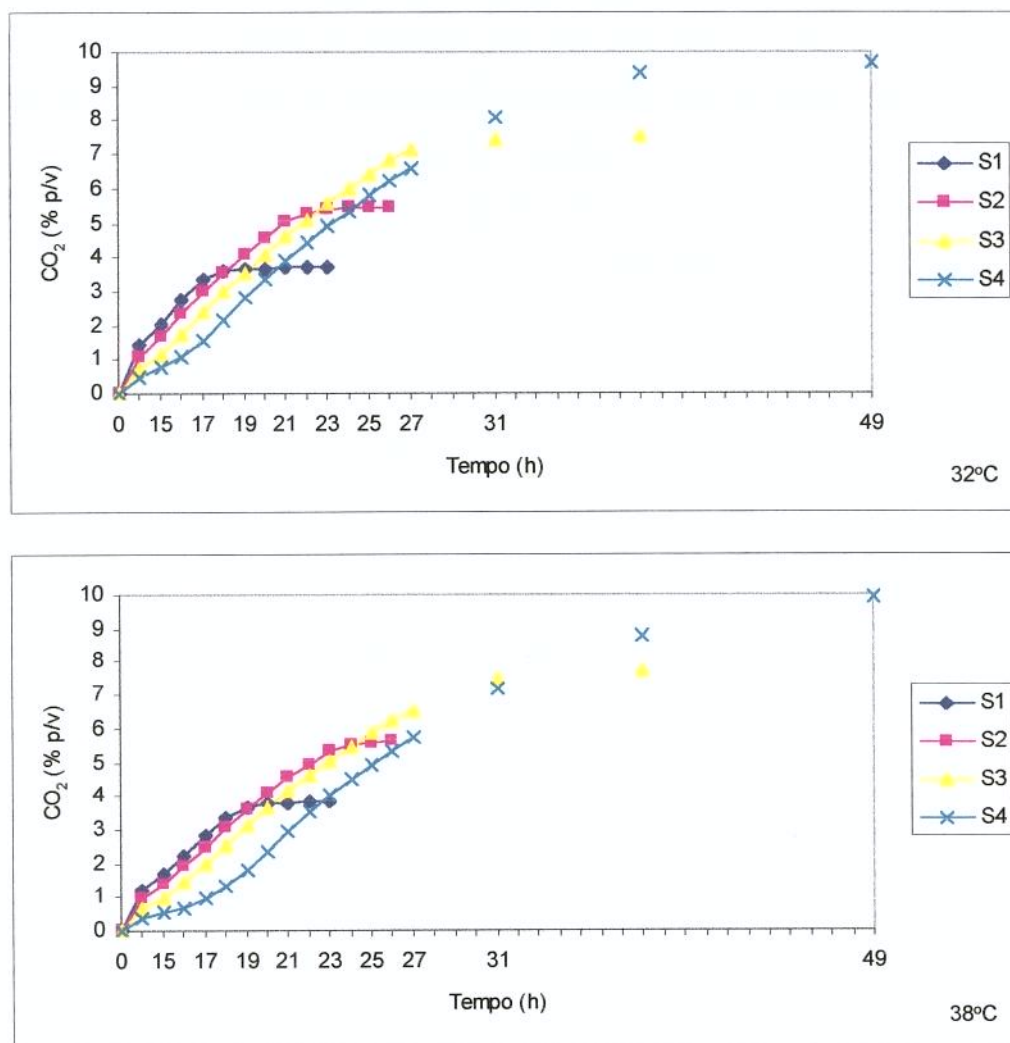


Figura 35 – Cinética da liberação de CO₂ (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de glicose, nas condições de inóculo de 10⁴ células viáveis / mL, pH inicial 5,0 e temperatura de 32 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 120g ART / L; S3 – 160g ART / L e S4 – 200g ART / L.

4.3.2. O CO₂ liberado e a estimativa de outros parâmetros

O CO₂ produzido na fermentação pode ser usado para estimar o etanol produzido e ART consumido, conforme mostram as Tabelas 7, 8 e 9 e Figuras 36, 37 e 38. As equações obtidas mostram coeficiente de correlação próximo a unidade. O etanol calculado via CO₂ liberado apresenta-se um pouco maior que o etanol real determinado devido a existência de outras vias consideradas desvio da fermentação, como a de produção de glicerol e de ácidos orgânicos. Ao contrário, o açúcar calculado via CO₂ é ligeiramente menor do real, pelas razões consideradas anteriormente.

Tabela 7 – Resultados de CO₂, e de etanol produzido e glicose consumida calculados estequiometricamente em função do CO₂ e determinados por via analítica (real), com inóculo alto de 10⁶ células viáveis / mL, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	CO ₂	Etanol	Etanol	ART	ART
	(real)	(real)	(calculado)	consumido (real)	consumido (calculada)
glicose g/L / t°C	% p/v	% v/v		% p/v	
pH 3,5					
80 / 32°	3,71	4,49	4,91	7,97	7,59
80 / 38°	3,72	4,44	4,93	7,97	7,61
120 / 32°	5,41	6,53	7,17	12,05	11,07
120 / 38°	5,50	6,48	7,28	12,05	11,25
160 / 32°	7,32	8,75	9,69	16,13	14,97
160 / 38°	7,36	8,73	9,75	16,13	15,05
200 / 32°	8,03	10,13	10,63	20,24	16,42
200 / 38°	8,43	10,19	11,16	20,27	17,24
pH 5,0					
80 / 32°	3,69	4,36	4,89	7,98	7,55
80 / 38°	3,61	4,37	4,78	7,98	7,38
120 / 32°	5,44	6,34	7,20	12,21	11,13
120 / 38°	5,74	6,27	7,60	12,21	11,74
160 / 32°	7,21	8,42	9,55	16,17	14,75
160 / 38°	7,33	8,43	9,71	16,17	14,99
200 / 32°	8,46	10,98	11,20	20,28	17,30
200 / 38°	9,44	11,05	12,50	20,28	19,31

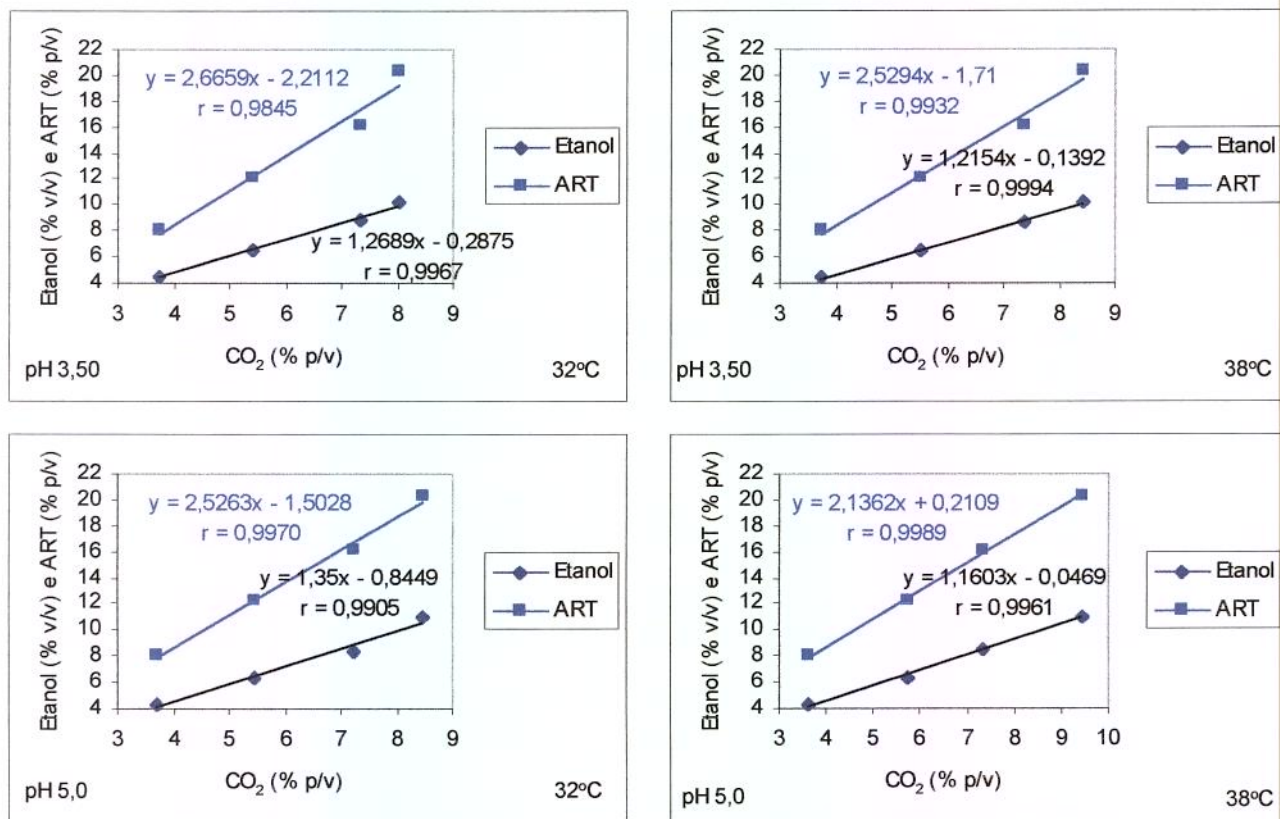


Figura 36 – Correlação entre CO₂ produzido na fermentação com etanol produzido e ART consumido, em função da concentração de substrato, pH e temperatura, com inóculo alto de 10⁸ células viáveis / mL, em meio sintético de glicose.

Tabela 8 – Resultados de CO₂, etanol produzido e glicose consumida calculados estequiometricamente, e as mesmas variáveis determinadas por via analítica (real), em função da concentração de substrato, pH e temperatura, com inóculo baixo de 10⁴ células viáveis / mL, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	CO ₂	Etanol	Etanol	ART	ART
	(real)	(real)	(calculado)	consumida (real)	consumida (calculada)
glicose g/L / t°C	g/100 mL	% v/v		g/100 mL	
pH 3,5					
80 / 32°	3,73	4,63	4,94	8,05	7,63
80 / 38°	3,82	4,63	5,06	8,05	7,81
120 / 32°	5,64	6,92	7,47	11,99	11,54
120 / 38°	5,83	7,03	7,72	11,99	11,92
160 / 32°	7,71	9,15	10,21	16,08	15,77
160 / 38°	7,68	9,22	10,17	15,87	15,71
200 / 32°	9,82	11,45	13,01	20,09	20,09
200 / 38°	9,05	10,09	11,99	17,88	18,51
pH 5,0					
80 / 32°	3,72	4,25	4,92	8,00	7,61
80 / 38°	3,85	4,32	5,09	8,00	7,87
120 / 32°	5,47	6,41	7,24	12,32	11,19
120 / 38°	5,64	6,50	7,46	12,32	11,54
160 / 32°	7,53	8,67	9,97	16,11	15,40
160 / 38°	7,71	8,77	10,21	16,11	15,77
200 / 32°	9,68	10,90	12,82	20,56	19,80
200 / 38°	9,93	10,98	13,14	20,56	20,31

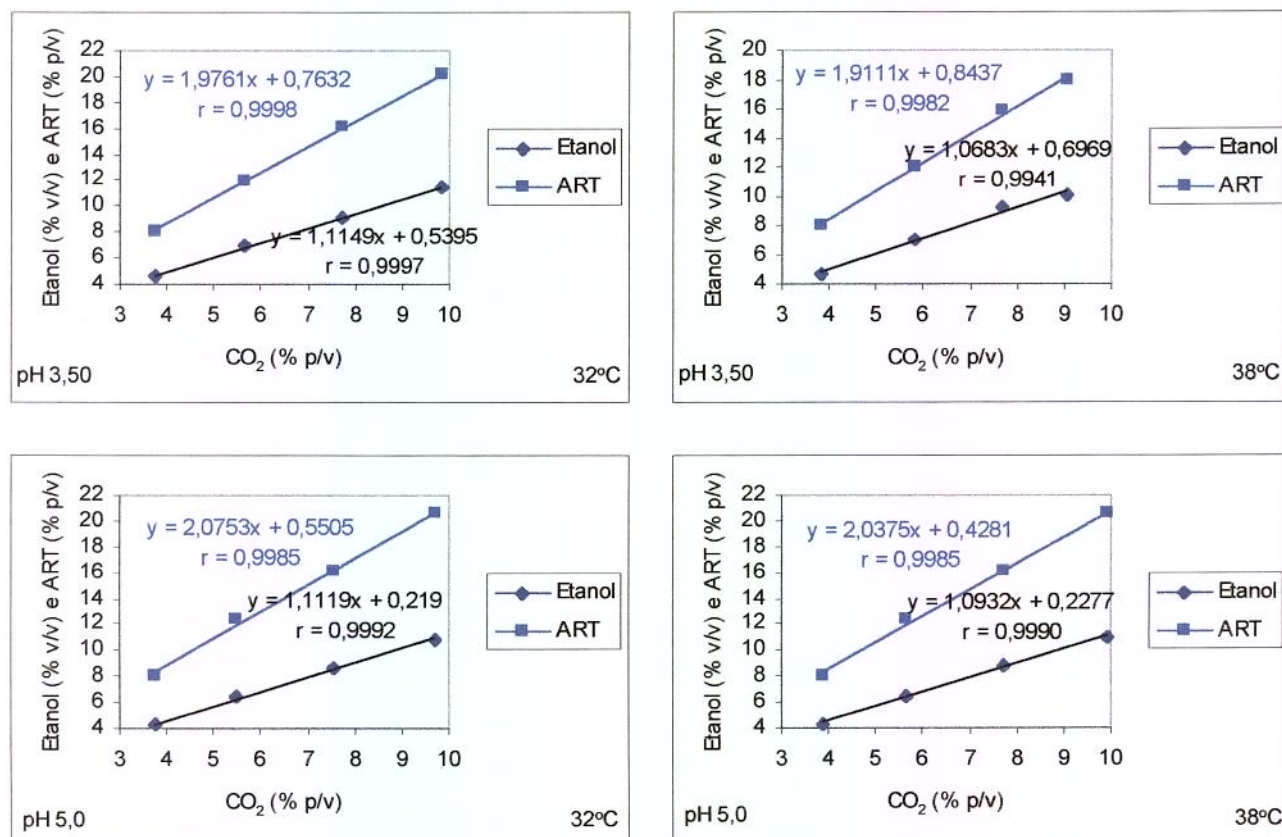


Figura 37 – Correlação entre CO₂ produzido na fermentação com etanol produzido e ART consumida, em função da concentração de substrato, pH e temperatura, com inóculo de 10⁴ células viáveis / mL, em meio sintético de glicose.

4.3.3. Cinética de liberação de CO₂ em diferentes substratos

O experimento com as diversas matérias-primas empregadas na fermentação alcoólica foi delineado para condução em quatro níveis de concentração de substrato (80, 120, 140, 160, 170 e 200 g/L de ART), com inóculo 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e temperatura de fermentação 38°C. Estas variáveis foram selecionadas para este experimento com base nos resultados do experimento de fatores que afetam a fermentação em meio de glicose, e por representarem as condições mais próximas daquelas observadas nas fermentações industriais nas destilarias brasileiras. O Experimento foi conduzido em um delineamento de cinco ensaios individuais, cada um correspondente a uma matéria prima com quatro níveis de concentração de substrato e quatro repetições para cada tratamento.

A determinação do CO₂ liberado mostrou em todos os substratos uma elevada correlação com o etanol produzido. Isso ocorreu tanto para substrato de elevada pureza (glicose, sacarose e xarope) como para os méis finais.

A correlação do gás carbônico com o ART consumido também mostrou uma elevada correlação para todos os substratos, com exceção do mel final.

Em substrato de mel final, de menor e maior pureza, foi bastante visível o efeito inibidor dos componentes não-açúcares e associados ao teor de ART. Na concentração de 140 g ART por litro a inibição da levedura foi bastante significativa. Para mel final de menor pureza a inibição da fermentação em 140 g/L de ART é bastante visível sendo muito pronunciada em 170 g/L. Em mel final de maior pureza a fermentação com 80 g ART / L não mostrou inibição de levedura, que ocorreu de forma expressiva, em 140 g/L. Deste modo a fermentação em substrato de melaço não é recomendada para estudo de tratamentos em simulação a uma fermentação nas condições gerais em que é normalmente

conduzida em uma destilaria onde o caldo de cana é o principal componente de mosto.

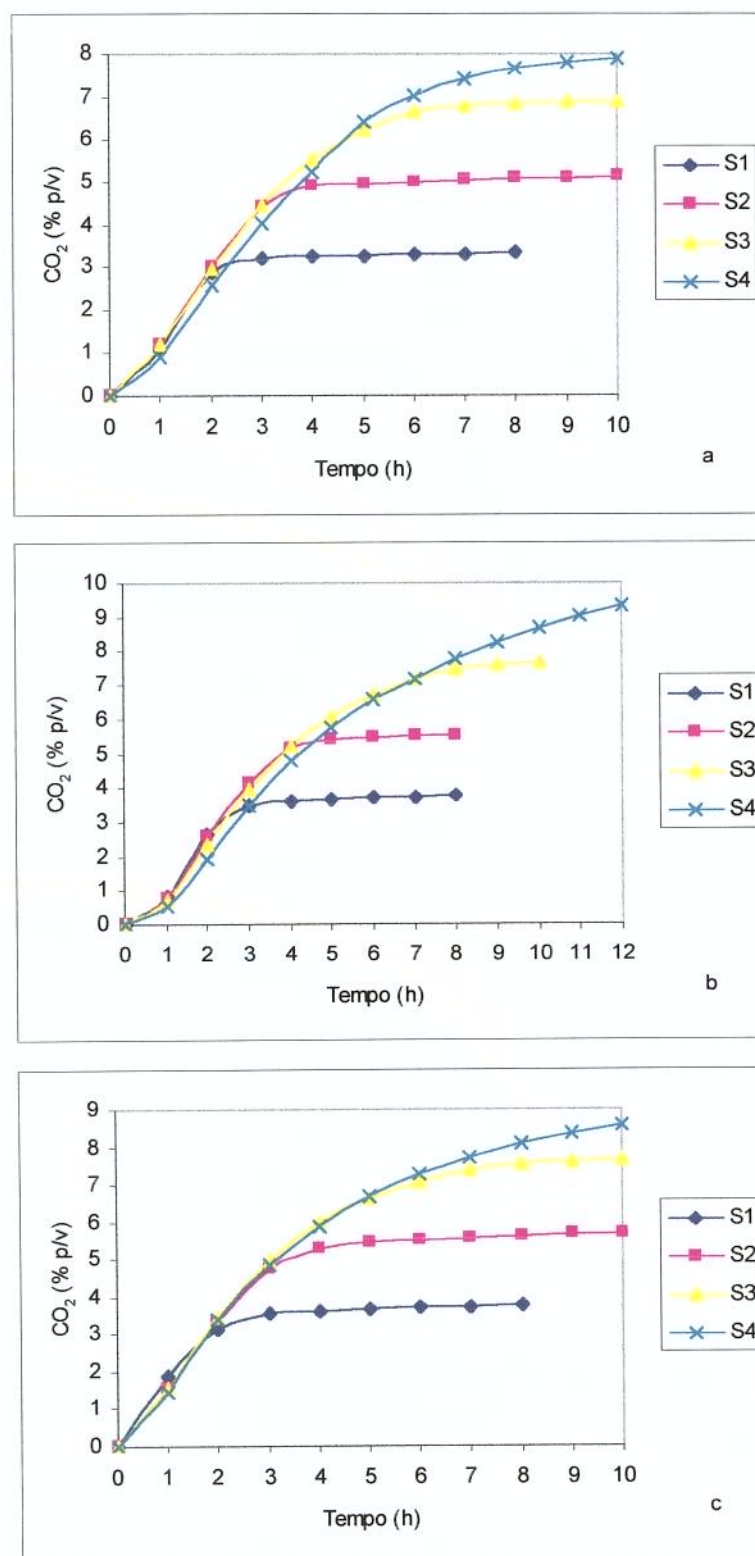


Figura 36 – Cinética da liberação de CO₂ (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de glicose (a), de sacarose (b) e de xarope (c), nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C. S1 – 80g ART / L; S2 – 120g ART / L; S3 – 160g ART / L e S4 – 200g ART / L.

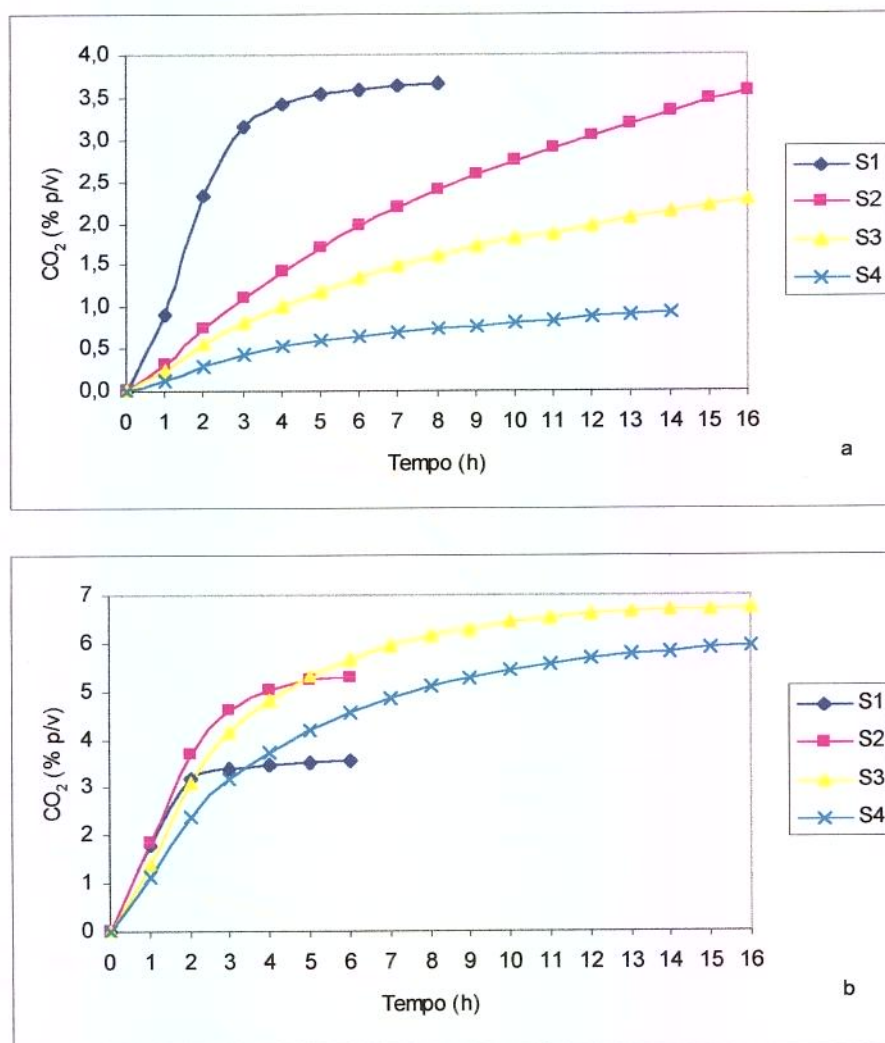


Figura 37 – Cinética da liberação de CO_2 (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato de melaço de menor pureza (a) e melaço de maior pureza (b), nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C . S1 – 80g ART / L; S2 – 110g ART / L; S3 – 140g ART / L e S4 – 170g ART / L.

4.3.4. O CO₂ liberado e a estimativa de outros parâmetros

De modo geral os valores calculados e reais apresentaram-se próximos. Os resultados variaram de acordo com o substrato usado e sua concentração em ART. Em substrato de glicose a diferença de etanol está entre 0,23 a 1,06 e de ART entre 1,19 a 1,88 entre diferentes concentrações de substrato estudados. Em substrato de sacarose a diferença de etanol situou-se entre 0,56 a 1,31 e de ART entre 0,05 a 0,48. A de xarope, a diferença entre etanol variou de 0,78 a 1,71 e de ART entre 0,27 a 1,75. Em substrato de melaço final de menor pureza a diferença de etanol situou-se entre 0,26 a 0,63 e de ART entre 0,09 a 2,43. A de melaço final de pureza maior, a diferença entre etanol variou de 0,73 a 1,72 e de ART entre 0,17 a 1,2 (Tabela 9). A produção de outros compostos durante a fermentação que não sejam etanol, como glicerol e ácidos orgânicos, constitui a causa principal das diferenças existentes conforme foi abordado anteriormente.

Tabela 9 – Resultados de CO₂, etanol produzido e glicose consumida calculados estequiometricamente, e as mesmas variáveis determinadas por via analítica (real), em função de diversos substratos, com inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH 3,50 e 38°C.

Tratamentos	CO ₂ (real)	Etanol (real)	Etanol (calculado)	ART Consumida (real)	ART Consumida (calculada)
g ART / L	g/100 mL	% v/v		g/100 mL	
Substrato de glicose					
80	3,35	4,21	4,44	8,04	6,85
120	5,11	6,29	6,76	11,99	10,44
160	6,92	8,45	9,16	16,03	14,15
200	7,91	9,41	10,47	17,81	16,18
Substrato de sacarose					
80	3,75	4,40	4,96	7,62	7,67
120	5,54	6,45	7,33	11,09	11,32
160	7,66	8,84	10,15	15,54	15,67
200	9,33	11,05	12,35	19,55	19,07
Substrato de xarope					
80	3,77	4,21	4,99	7,20	7,71
120	5,66	6,26	7,49	11,30	11,57
160	7,67	8,44	10,15	15,35	15,68
200	8,56	10,26	11,34	19,26	17,51
Substrato de melaço final de menor pureza					
80	3,66	4,23	4,85	7,40	7,49
110	3,57	4,10	4,73	8,31	7,30
140	2,28	2,54	2,28	7,09	4,66
170	0,94	0,84	1,25	2,39	1,92
Substrato de melaço final de maior pureza					
80	3,56	3,98	4,71	6,95	7,28
110	5,29	5,75	7,01	11,25	10,82
140	6,75	7,22	8,94	13,63	13,80
170	5,96	6,25	7,89	10,99	12,19

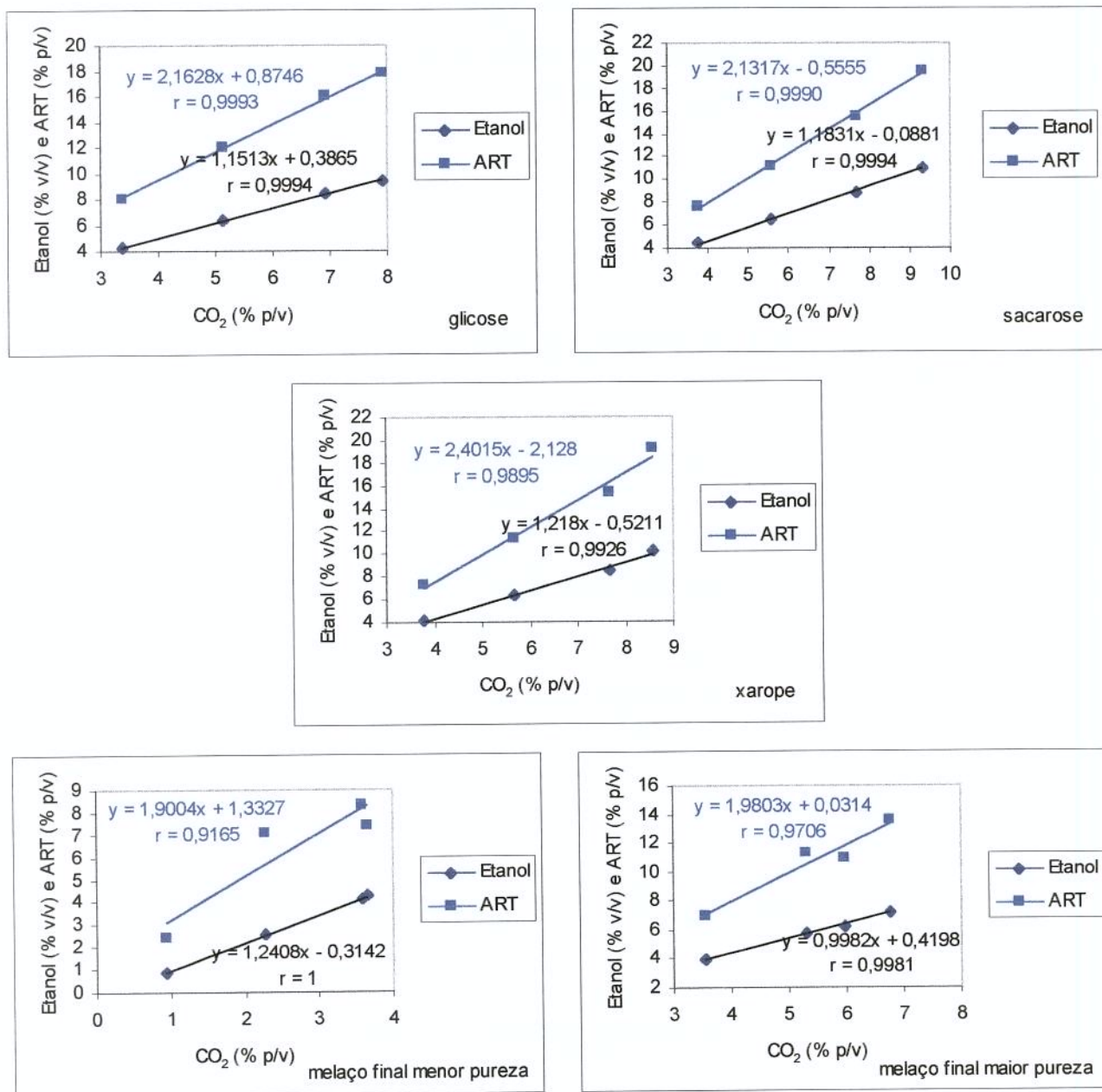


Figura 38 – Correlação entre CO₂ produzido na fermentação com etanol produzido e ART consumida, em função da concentração de diversos substratos, com inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH 3,5 e 38°C.

4.3.5. Equações polinomiais representativas

As equações representam as curvas da cinética de evolução de gás carbônico durante a fermentação alcoólica (item 4.3). Através das quais podem ser calculadas as velocidades instantâneas.

Figura 32, 32°C

S1

$$y = 0,0004x^6 - 0,0136x^5 + 0,1632x^4 - 0,9161x^3 + 2,2172x^2 - 0,7057x + 0,0047$$
$$r = 0,9993$$

S2

$$y = -0,0007x^6 + 0,0147x^5 - 0,1085x^4 + 0,245x^3 + 0,2126x^2 + 0,3009x + 0,0024$$
$$r = 0,9999$$

S3

$$y = 4E-05x^6 - 0,0013x^5 + 0,0192x^4 - 0,1553x^3 + 0,6493x^2 + 0,0533x + 0,0007$$
$$r = 1$$

S4

$$y = 0,0002x^6 - 0,0066x^5 + 0,0737x^4 - 0,4145x^3 + 1,1206x^2 + 0,1726x - 0,0018$$
$$r = 1$$

Figura 32, 38°C

S1

$$y = 0,0012x^6 - 0,0318x^5 + 0,3227x^4 - 1,5282x^3 + 3,0979x^2 - 0,7867x - 0,0029$$
$$r = 0,9997$$

S2

$$y = -6E-05x^6 - 0,0011x^5 + 0,0484x^4 - 0,4609x^3 + 1,5165x^2 - 0,1467x + 0,0031$$
$$r = 0,9999$$

S3

$$y = 6E-05x^6 - 0,002x^5 + 0,031x^4 - 0,2451x^3 + 0,8867x^2 + 0,109x + 0,0004$$
$$r = 1$$

S4

$$y = 0,0004x^6 - 0,0113x^5 + 0,1221x^4 - 0,6413x^3 + 1,543x^2 + 0,1746x - 0,0027$$
$$r = 0,99995$$

Figura 33, 32°C

S1

$$y = 0,0011x^6 - 0,028x^5 + 0,2597x^4 - 1,0564x^3 + 1,4735x^2 + 1,2966x - 0,0073$$

$$r = 0,9983$$

S2

$$y = -0,0004x^6 + 0,0077x^5 - 0,036x^4 - 0,0746x^3 + 0,6756x^2 + 0,5521x + 0,005$$

$$r = 0,9997$$

S3

$$y = -0,0014x^6 + 0,036x^5 - 0,3345x^4 + 1,4144x^3 - 2,7917x^2 + 3,8501x + 0,0029$$

$$r = 0,9999$$

S4

$$y = 0,0003x^6 - 0,0065x^5 + 0,0638x^4 - 0,345x^3 + 1,0428x^2 - 0,007x + 0,0016$$

$$r = 1$$

Figura 33, 38°C

S1

$$y = 0,0006x^6 - 0,0137x^5 + 0,115x^4 - 0,3602x^3 - 0,1023x^2 + 2,5926x - 0,0044$$

$$r = 0,9993$$

S2

$$y = -9E-05x^6 - 0,0019x^5 + 0,0684x^4 - 0,5708x^3 + 1,585x^2 + 0,3265x + 0,0046$$

$$r = 0,9996$$

S3

$$y = -0,0014x^6 + 0,0346x^5 - 0,3173x^4 + 1,3415x^3 - 2,8124x^2 + 4,4128x + 0,0053$$

$$r = 0,9997$$

S4

$$y = 1E-05x^6 - 0,0017x^5 + 0,0353x^4 - 0,3005x^3 + 1,0858x^2 + 0,1369x + 0,0008$$

$$r = 1$$

Figura 34, 32°C

S1

$$y = -0,0001x^6 + 0,0053x^5 - 0,081x^4 + 0,603x^3 - 2,2518x^2 + 4,48x - 2,754$$
$$r = 0,99995$$

S2

$$y = -7E-06x^6 + 0,0004x^5 - 0,0067x^4 + 0,0604x^3 - 0,2587x^2 + 1,014x - 0,786$$
$$r = 0,9997$$

S3

$$y = -4E-07x^6 + 2E-05x^5 - 0,0003x^4 - 0,0007x^3 + 0,0465x^2 + 0,2184x - 0,2144$$
$$r = 0,9998$$

S4

$$y = 7E-08x^6 - 9E-06x^5 + 0,0005x^4 - 0,011x^3 + 0,1252x^2 - 0,1429x + 0,1104$$
$$r = 0,9998$$

Figura 34, 38°C

S1

$$y = -0,0001x^6 + 0,0048x^5 - 0,0764x^4 + 0,5899x^3 - 2,325x^2 + 4,9141x - 3,1034$$
$$r = 0,9999$$

S2

$$y = -1E-05x^6 + 0,0006x^5 - 0,0122x^4 + 0,118x^3 - 0,576x^2 + 1,8394x - 1,3517$$
$$r = 0,9999$$

S3

$$y = -8E-07x^6 + 6E-05x^5 - 0,0014x^4 + 0,0146x^3 - 0,0667x^2 + 0,613x - 0,5146$$
$$r = 0,9998$$

S4

$$y = 9E-08x^6 - 1E-05x^5 + 0,0005x^4 - 0,01x^3 + 0,1005x^2 + 0,0756x - 0,0936$$
$$r = 0,9998$$

Figura 35, 32°C

S1

$$y = -0,0002x^6 + 0,0055x^5 - 0,0787x^4 + 0,5535x^3 - 2,0958x^2 + 4,7831x - 3,1574$$

$$r = 0,9994$$

S2

$$y = -6E-06x^6 + 0,0004x^5 - 0,0087x^4 + 0,0949x^3 - 0,5256x^2 + 2,0338x - 1,5838$$

$$r = 0,9998$$

S3

$$y = 7E-07x^6 - 5E-05x^5 + 0,0012x^4 - 0,0142x^3 + 0,0822x^2 + 0,3848x - 0,4019$$

$$r = 0,9998$$

S4

$$y = 1E-07x^6 - 2E-05x^5 + 0,0006x^4 - 0,0132x^3 + 0,135x^2 - 0,0948x + 0,0583$$

$$r = 0,9998$$

Figura 35, 38°C

S1

$$y = -0,0002x^6 + 0,0066x^5 - 0,1002x^4 + 0,7476x^3 - 2,8622x^2 + 5,8518x - 3,6427$$

$$r = 0,99995$$

S2

$$y = -1E-05x^6 + 0,0007x^5 - 0,0148x^4 + 0,1428x^3 - 0,7013x^2 + 2,1679x - 1,5802$$

$$r = 0,9998$$

S3

$$y = -5E-07x^6 + 3E-05x^5 - 0,0008x^4 + 0,0082x^3 - 0,0255x^2 + 0,4939x - 0,4126$$

$$r = 0,9997$$

S4

$$y = -2E-07x^6 + 2E-05x^5 - 0,0005x^4 + 0,0053x^3 + 0,0086x^2 + 0,0822x + 0,0021$$

$$r = 0,9996$$

Figura 36 (a)

S1

$$y = 0,0014x^6 - 0,036x^5 + 0,3538x^4 - 1,6041x^3 + 3,0574x^2 - 0,6116x - 0,0061$$
$$r = 0,9987$$

S2

$$y = 0,0003x^6 - 0,0094x^5 + 0,1233x^4 - 0,7472x^3 + 1,8746x^2 - 0,0767x + 0,0017$$
$$r = 0,9998$$

S3

$$y = 8E-05x^6 - 0,0031x^5 + 0,0456x^4 - 0,3229x^3 + 0,9539x^2 + 0,5367x - 0,0063$$
$$r = 0,99995$$

S4

$$y = 4E-05x^6 - 0,0015x^5 + 0,0241x^4 - 0,1964x^3 + 0,7075x^2 + 0,4609x - 0,0116$$
$$r = 0,9998$$

Figura 36 (b)

S1

$$y = 0,0011x^6 - 0,0302x^5 + 0,3156x^4 - 1,5518x^3 + 3,3422x^2 - 1,2442x - 0,0012$$
$$R^2 = 0,9999$$

S2

$$y = -1E-04x^6 + 6E-05x^5 + 0,0349x^4 - 0,4002x^3 + 1,464x^2 - 0,3219x + 0,0001$$
$$r = 0,99995$$

S3

$$y = 0,0001x^6 - 0,0047x^5 + 0,0656x^4 - 0,4532x^3 + 1,4399x^2 - 0,349x - 0,0013$$
$$r = 1$$

S4

$$y = 4E-05x^6 - 0,0019x^5 + 0,0337x^4 - 0,2816x^3 + 1,0718x^2 - 0,2937x - 0,0015$$
$$r = 1$$

Figura 36 (c)

S1

$$y = 0,0005x^6 - 0,0124x^5 + 0,1161x^4 - 0,4578x^3 + 0,4163x^2 + 1,8108x - 0,0017$$
$$r = 0,9999$$

S2

$$y = 0,0002x^6 - 0,0064x^5 + 0,0857x^4 - 0,5219x^3 + 1,2239x^2 + 0,7514x + 0,0026$$
$$r = 0,99995$$

S3

$$y = 0,0001x^6 - 0,0041x^5 + 0,0531x^4 - 0,3282x^3 + 0,7928x^2 + 1,0871x - 0,0023$$
$$r = 1$$

S4

$$y = 0,0001x^6 - 0,0047x^5 + 0,061x^4 - 0,376x^3 + 0,9449x^2 + 0,8657x - 0,0059$$
$$r = 0,99995$$

Figura 37 (a)

S1

$$y = 0,0005x^6 - 0,0141x^5 + 0,1546x^4 - 0,7965x^3 + 1,7477x^2 - 0,1732x + 0,0001$$
$$r = 1$$

S2

$$y = 1E-06x^6 - 7E-05x^5 + 0,0015x^4 - 0,0139x^3 + 0,0463x^2 + 0,3189x - 0,0085$$
$$r = 0,99995$$

S3

$$y = 1E-06x^6 - 6E-05x^5 + 0,0013x^4 - 0,0109x^3 + 0,0285x^2 + 0,2514x - 0,0104$$
$$r = 0,9998$$

S4

$$y = 2E-06x^6 - 9E-05x^5 + 0,0016x^4 - 0,0131x^3 + 0,0356x^2 + 0,1151x - 0,0032$$
$$r = 0,9998$$

Figura 37 (b)

S1

$$y = 0,005x^6 - 0,0986x^5 + 0,7334x^4 - 2,515x^3 + 3,5168x^2 + 0,1765x - 2E-08$$

$$r = 1$$

S2

$$y = 0,002x^6 - 0,0416x^5 + 0,3434x^4 - 1,3506x^3 + 2,2143x^2 + 0,6658x - 3E-08$$

$$r = 1$$

S3

$$y = 7E-06x^6 - 0,0004x^5 + 0,0062x^4 - 0,0402x^3 - 0,0386x^2 + 1,7131x - 0,0596$$

$$r = 0,9994$$

S4

$$y = 3E-06x^6 - 0,0001x^5 + 0,0021x^4 - 0,009x^3 - 0,0991x^2 + 1,385x - 0,0327$$

$$r = 0,9997$$

4.4. A cinética da fermentação alcoólica em substrato de glicose

O experimento de cinética da fermentação alcoólica foi delineado com inóculo 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5, quatro níveis de concentração de substrato (80, 120, 160 e 200 g/L de glicose) e temperatura de fermentação 38°C. Estas variáveis foram selecionadas para este experimento de acordo com os resultados do experimento anterior e por representarem as condições mais próximas daquelas observadas nas fermentações industriais nas destilarias brasileiras. O experimento foi conduzido em um delineamento de quatro ensaios individuais, cada um correspondente a um nível de concentração de substrato, com quatro repetições para cada tratamento.

O resultado das variáveis determinadas está apresentado nas figuras e nas tabelas de forma a facilitar a discussão.

4.4.1. Rendimento, etanol no vinho, tempo de fermentação e viabilidade celular

O rendimento da fermentação (Tabela 10) mostrou médias bastante próximas para as concentrações de 80, 120 e 160 g/L de glicose, respectivamente de 80,70, 80,98 e 81,40%. Confirmando os resultados do experimento anterior, em 200 g/L o rendimento foi expressivamente menor, com uma média de 72,83%. A diferença de 8,20 unidades absolutas entre o rendimento em 200 g/L e a média dos demais, foi próxima àquela de 7,21 unidades absolutas observada no experimento anterior sobre o estudo dos fatores que afetam o comportamento da fermentação alcoólica em meio de glicose.

O tempo de fermentação (final) foi 3, 4, 7 e 7 horas (Tabela 10), nas concentrações de 80, 120, 160 e 200 g/L de glicose, respectivamente. Os tempos foram definidos com base nos resultados da cinética de liberação de gás

carbônico, formação de etanol e consumo de substrato (Figura 39). As fermentações, em 160 e 200 g/L, foram 1 hora mais rápidas que as do experimento anterior. Esses tempos foram utilizados no cálculo das velocidades médias ou produtividade. Em fermentações industriais, que operam com concentração de açúcares totais próximas a 200 g/L e também próximas às outras condições de fermentação experimentais, é comum observar tempo de fermentação de 8 horas.

O etanol no vinho (Figura 39 e Tabela A41 a 44) mostrou valores médios, nos respectivos tempos de fermentação, de 4,13% (80 g/L), 6,08% (120 g/L), 8,44% (160 g/L) e 9,05% (200 g/L). Os resultados mostram que, em relação ao experimento anterior, apenas em 200 g/L se pôde notar o início de inibição quando o etanol no vinho atingiu aproximadamente 9,1%. Todavia, há que se considerar que os teores de etanol no vinho foram menores neste experimento, devido aos rendimentos também menores (entre 2 a 5 unidades absolutas, aproximadamente); este experimento permite verificar que a inibição inicia-se com teores menores que 10,1% verificados no experimento anterior. Na Figura 39 também se observa que a partir do tempo tomado como término da fermentação e até mais 3 horas de fermentação, o etanol no vinho aumentou 0,11, 0,185, 0,01, 0,36 unidades absolutas, respectivamente em 80, 120, 160 e 200 g/L de glicose; com relação ao maior aumento em 200 g/L deve ser lembrado que o tempo de 7 horas foi aquele considerado de paralisação da fermentação e não de esgotamento de substrato.

Em menores concentrações de substrato 80 e 120 g ART / L com inóculo de 10^8 células viáveis / mL a fermentação terminou entre 2 e 4 horas, com exceção ao substrato de melaço de menor pureza. Neste substrato nas concentrações acima de 80 g ART / L o tempo excedeu esse intervalo por causa de uma forte inibição, principalmente em 140 e 170 g ART / L. Este comportamento deve ter sido a combinação entre a inibição a nível de substrato e as impurezas existentes no mosto de melaço (Tabela 5, Figura 37).

Em fermentações com inóculo de 10^4 células viáveis / mL, a fermentação estende-se a tempos extremamente longos, que operacionalmente inviabiliza o processo pela morosidade conduzida neste caso específico.

As equações polinomiais das curvas representativas da evolução de CO_2 com o tempo de acordo com a concentração de substrato, mostram uma correlação elevada entre as duas variáveis em todos os fatores avaliados.

O consumo de substrato está diretamente proporcional à liberação de gás carbônico e a produção de etanol no decorrer da fermentação. Ou seja, existe um paralelismo entre o CO_2 e etanol produzido em decorrência ao consumo de substrato durante a fermentação alcoólica. A Figura 39 mostra os picos de formação de CO_2 e etanol coincidindo com o esgotamento de substrato.

A viabilidade celular (Figura 40 e Tabela A66 a 69) mostrou-se decrescente, com indícios de estabilizar-se ao final do tempo de fermentação, tendência esta observada até 160 g/L de glicose. Em 200 g/L essa tendência mostrou-se retardada em cerca de 2 horas. A viabilidade inicial variou entre 79 a 85%, e desceu para 59% (queda de 29%) ao tempo de 3 horas, em 80 g/L; a 54% (queda de 35%) em 4 horas, em 120 g/L; a 15% (queda de 82%) em 7 horas, em 160 g/L; e a 31% (queda de 61%) em 7 horas, em 200 g/L. A partir de 5 e 6 horas de fermentação, os substratos com 80 e 120 g/L, respectivamente, mostraram tendência de reduzir a taxa de mortalidade que foi similar para todos os substratos até esses tempos. Os substratos com 160 e 200 g/L continuaram a mostrar praticamente a mesma tendência de queda intensa da viabilidade, após aqueles tempos, o que resultou em valores de 1 e 11%, respectivamente. É necessário lembrar que devido à elevada população inicial de células de levedura, o número de células viáveis por mL, nos substratos de 80 a 200 g/L e nos respectivos tempos de fermentação de cada um deles, foi de $4,60 \times 10^8$, $3,3 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$ e $1,9 \times 10^8$ (Tabela A70 a 73); em 160 g/L além da ação do etanol formado em proporção relativamente elevada, ocorreu o esgotamento do açúcar do substrato,

o que pode ter provocado maior dano à levedura. Assim, a fermentação em curso não foi afetada, mas aquela queda expressiva na viabilidade certamente comprometerá o fermento para reutilização em outra fermentação. As viabilidades foram mais elevadas no experimento de fatores que afetam a fermentação alcoólica em meio de glicose, principalmente para 160 e 200 g/L de glicose, o que pode ser atribuído à menor aeração no experimento da cinética da fermentação em substrato de glicose, onde o volume de mosto a fermentar era de 1,5 L contra 150 mL do anterior (Tabela 3 e 11).

Em todas concentrações de substrato a viabilidade celular caiu no decorrer da fermentação até os níveis insignificantes, podendo chegar até o valor nulo no final da fermentação em substrato com 200 g ART por litro. Possivelmente o efeito da temperatura elevada (38°C) associado ao efeito de etanol produzido, contribuam para o decréscimo considerável de seus valores (Figura 40).

O controle do pH do meio (Figura 40) em fermentação mostrou o rápido aumento do mesmo, ficando perto de 3,7 a 3,8 nas duas primeiras horas, e com a tendência de elevar-se pouco, mas continuamente, permanecendo entre 3,8 a 3,9 até o final das fermentações. A célula de levedura tem a capacidade de equilibrar o pH do meio com o do seu meio interno através do sistema de troca iônica controlado pela sua membrana celular e sempre bem próximo ao seu pH fisiológico que é em torno de 4,5 (Jones et al., 1981; Gomes, 1988). O aumento do pH também pode ser devido à morte de células, com deslocamento de citoplasma para o meio e elevando seu poder tampão.

4.4.2. Açúcar residual e glicerol

O teor de açúcar residual (% p/v), Tabela 10 e Figura 39 no vinho praticamente esgotou-se em 80, 120 e 160 g/L, com valores iguais ou inferiores a 0,1%, nos tempos de fermentação, confirmando o término por esgotamento de substrato, com valores próximos a 0,006%. Em 200 g/L, a partir de 7 horas, o decréscimo horário foi expressivamente menor, confirmando a lentidão da fermentação e a inibição da levedura, provocando o término da fermentação quando ainda havia 2,15% de glicose residual.

O teor de glicerol (% p/v), Tabela 10 e Figura 40, no vinho, nos tempos de fermentação, foi de 0,56% em 80 g/L, 0,74% em 120 g/L, 0,92% em 160 g/L, e 1,06% em 200 g/L. Em todos os tratamentos o teor de glicerol foi crescente nas primeiras horas de fermentação e praticamente estabilizando-se após atingir os valores citados, o que ocorreu, respectivamente, após 2, 3, 4 e 4 horas. Não foi possível observar um comportamento similar com outras variáveis para as diversas concentrações de substrato; a observação das figuras mostra uma tendência de dependência com o açúcar residual, e mais especificamente com a velocidade instantânea de consumo de glicose, parecendo que o crescimento do glicerol ocorreu até velocidades mínimas de cerca de 32 g/L/h, ou com a velocidade específica de formação de etanol, com a elevação do glicerol ocorrendo até velocidades mínimas de cerca de 0,6 (Figura 42).

A produção de glicerol segue uma curva exponencial do início até o final da fermentação assim como CO₂ e etanol. Os seus valores aumentam com o aumento da concentração de substrato (Figura 40), havendo portanto uma relação molar definida entre a variação de suas concentrações.

4.4.3. Fermento úmido (% p/v), fermento seco (% p/v) e matéria seca (%)

O teor de fermento úmido % (Tabela A54 a 57) foi similar para as diversas concentrações de substrato, com média de 6,44% em 80 g/L, 6,65% em 120 g/L, 6,49% em 160 g/L, e 6,39% em 200 g/L. Esse teor manteve-se ao longo das fermentações, mais ou menos constante. Portanto, não houve crescimento da massa celular.

A matéria seca % (Tabela A58 a 61) do fermento também foi similar para as diversas concentrações de substrato, com média de 32,01% em 80 g/L, 32,23% em 120 g/L, 33,33% em 160 g/L, e 34,56% em 200 g/L. A MS% no tempo zero sempre apresentou valor, entre 3 a 7 unidades absolutas, menor que as respectivas médias. Os valores de MS% mostraram a tendência de se apresentar um pouco mais elevados nas primeiras horas de fermentação. É possível que o teor de matéria seca dos substratos tenham interferido elevando ligeiramente a MS% do fermento, principalmente nas maiores concentrações de glicose e nas primeiras horas de fermentação quando os mesmos ainda eram mais altos; a MS% dos fermentos, nas últimas horas de fermentação, foram bastante similares.

O teor de fermento seco % (Figura 39 e Tabela A62 a 65) acompanhou a tendência geral dos dados de MS%, com média de 2,060%, 2,142%, 2,151% e 2,200%, nas concentrações de 80, 120, 160 e 200 g/L de glicose, respectivamente.

4.4.4. Fator de conversão de substrato em produto - $Y_{p/s}$

O $Y_{p/s}$ quando expresso em percentagem como etanol produzido na fermentação em relação ao etanol teórico obtido da glicose consumida, vem a ser a eficiência da levedura, ou seja, significa a quantidade de açúcar consumido que foi transformado em álcool. Uma eficiência de 100% da levedura equivale estequiometricamente à produção de 0,5111 g de etanol por grama de glicose.

Os resultados (Tabela 10 e Figura 40) revelam que em amostragens a partir da 6ª hora de fermentação, todas as concentrações de substrato apresentaram $Y_{p/s}$ bastante similares, variando entre 0,4121 a 0,4181, ou seja, com eficiência da levedura entre 80,63 a 81,80%. Este resultado mostra que a eficiência da levedura em transformar a glicose em etanol atinge valores similares, independentemente da concentração do substrato, na faixa de 80 a 200 g/L de glicose.

Nos períodos iniciais da fermentação é que se nota maior variação e efeito da concentração da glicose. Em 80 g/L foi de 0,4452 no tempo de 1 hora; em 120 g/L foi de 0,3628 e 0,3894 nos tempos 1 e 2, respectivamente; em 160 g/L foi de 0,3819 e 0,3884 nos tempos 1 e 2, respectivamente; em 200 g/L foi de 0,4089 e 0,4299 nos tempos de 1 e 2, respectivamente.

O fator de conversão substrato em produto teve seu valor máximo de 0,445g de etanol/g de glicose consumida na concentração de 80g/L de glicose. Nas demais concentrações de substrato o comportamento foi praticamente similar e gira em torno de 0,41g de etanol/g de glicose. A variação notável deste parâmetro cinético aconteceu somente na primeira hora de fermentação, nos tempos seguintes, praticamente os valores não variaram até o final da fermentação, o que indica pouca ação da variação da concentração de substrato sobre o comportamento da eficiência fermentativa por parte da levedura (Tabela 10 e Figura 40).

4.4.5. Velocidade de formação de etanol

A velocidade média de formação de etanol (Figura 41; Tabela 10 e A78 a 81) atingiu 20,08 a 21,73 mL/L/h nas duas primeiras horas de fermentação em 80 a 160 g/L de glicose, indicando inibição pelo substrato em 200 g/L ao cair para 18,05 e 19,28 nos tempos 1 e 2, respectivamente. A média geral foi de 18,04, 19,09, 17,45 e 16,64 mL/L/h, respectivamente em 80, 120, 160 e 200 g/L de glicose.

A velocidade específica média (Figura 41 e Tabela A86 a 89), na concentração de 200 g/L também mostra menores valores iniciais do que os demais substratos com menor teor de glicose; em 200 g/L foi de 0,6587 g/L/h/g de células enquanto nos demais variou entre 0,7512 a 0,7886, confirmando a inibição da levedura pela pressão osmótica do substrato.

A velocidade específica (μp) (Figura 42 e Tabela A100) atingiu picos máximos de 0,834, 0,827, 0,727 e 0,659 mL/L/h/g de células, respectivamente, nas concentrações de 80 a 200 g/L.

A velocidade instantânea de formação de etanol (VIFE) (Figura 42 e Tabela A98) atingiu picos máximos de 24,25, 24,71, 21,85 e 19,64 mL/L/h, respectivamente, nas concentrações de 80 a 200 g/L. Em 160 e 200 g/L a VIFE subiu já na primeira hora de fermentação a valores próximos ao patamar máximo, enquanto em 80 e 120 g/L somente após uma hora de fermentação.

4.4.6. Velocidade de consumo de substrato

A velocidade média de consumo de substrato (Figura 41; Tabela 10 e A82 a 85), mostrou comportamento e tendência similares à velocidade média de formação de etanol e atingiu valores máximos de 39,38 , 44,70 , 43,90 e 35,43 g/L/h, respectivamente nas concentrações de 80 a 200 g/L. As médias considerando o tempo de fermentação foram, respectivamente, de 26,55, 29,98, 22,89 e 24,44 g/L/h.

A velocidade média específica (Figura 41 e Tabela A90 a 93) atingiu 1,74, 2,07, 2,06 e 1,50 g/L/h/g de células, respectivamente, nas concentrações de 80 a 200 g/L.

A velocidade instantânea (Figura 42 e Tabela A99) atingiu 49,85, 48,59 , 44,79 e 36,17 g/L/h/g de células, respectivamente, nas concentrações de 80 a 200 g/L.

A velocidade específica (μ_s) (Figura 42 e Tabela A101) atingiu 2,173, 2,060, 2,023 e 1,538 g/L/h/g de células, respectivamente, nas concentrações de 80 a 200 g/L.

4.4.7. Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), velocidade instantânea de crescimento celular e velocidade específica de crescimento celular

Essas variáveis não foram calculadas devido a não ter havido crescimento da massa celular, nos tratamentos com inóculo inicial 10^8 .

4.4.8. Resumo

A velocidade instantânea é um parâmetro importante para o acompanhamento do desenvolvimento da fermentação alcoólica. Permite a constatação de pontos máximos e mínimos durante a evolução do processo fermentativo, o que vem a facilitar as previsões e a tomada de decisão quer seja antes do início da fermentação como no decorrer da mesma. A Figura 42 mostra as velocidades instantâneas e específicas de formação de etanol e consumo de substrato. Podem ser observadas a variação da velocidade e a diferença entre as concentrações de substrato. Em todas concentrações de substrato tanto a velocidade instantânea de formação de etanol quanto a de consumo de substrato atingiram valores máximos em 2 horas de fermentação, cujos valores são 24,25, 24,71, 21,85, 19,64 mL/L/h de etanol e 49,85, 48,59, 43,99 e 36,17 g/L/h de glicose, respectivamente para as concentrações de substrato de 80, 120, 160 e 200 g/L de glicose (Figura 42). O mesmo aconteceu com as velocidades específicas, 0,834, 0,827, 0,727, 0,659 g etanol/g células e 2,17, 2,06, 1,85 e 1,54 g glicose/g células, respectivamente para 80, 120, 160 e 200 g/L de substrato. As velocidades instantâneas e específicas mostram ser afetadas pela concentração de substrato, seus valores decrescem com o aumento da concentração de açúcar, o que justifica também o aumento crescente do tempo de fermentação proporcional a sua concentração, obviamente.

Em meio sintético de glicose em todos os tratamentos houve a correlação elevada entre o CO₂ produzido com etanol produzido e ART consumida. A correlação entre CO₂ e etanol mostra-se maior quando comparado com CO₂ e ART. Este comportamento deve-se à existência de outras vias consideradas desvios de fermentação, como da produção de glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores. A produção destes compostos causa a redução no rendimento da fermentação alcoólica. Ao estimar o etanol e ART através do CO₂ produzido, a margem de erro é bem pequena por ter o coeficiente de correlação quase igual a unidade, como mostra a Figura 43.

Na Figura 41 observa-se que todas as velocidades médias de formação de etanol e consumo de substrato, e específicas, obtiveram seu pico máximo praticamente na primeira hora de fermentação seguida de queda gradual e sucessiva até o final da fermentação, o que implica em uma fermentação mais intensiva logo na primeira hora, quando se inicia a batelada com inóculo grande (10^8 células viáveis / mL) em condições de pH 3,5 e 38°C. Esta tendência foi constatada em todos níveis de substrato estudados. A produtividade máxima de etanol foi de 20,30, 21,73, 21,25 e 19,28 mL/L/h, respectivamente para as concentrações de substrato de 80, 120, 160 e 200 g/L de glicose. As correspondentes produtividades de consumo de substrato foram 39,39, 44,70, 43,90 e 35,43, respectivamente. O efeito da concentração de substrato parece não interferir na produtividade da formação de etanol nestas condições. As velocidades específicas máximas de formação de etanol foram 0,772, 0,751, 0,789 e 0,659 g etanol / g de células , respectivamente para 80, 120, 160 e 200 g/L de glicose. As correspondentes velocidades médias específicas máximas de consumo de substrato foram 1,738, 2,07, 2,065 e 1,613 g glicose / g de células.

Tabela 10 – Médias e resultados estatísticos da fermentação alcoólica em substrato de glicose, com inóculo alto (10^8 células viáveis / mL), pH 3,5 e 38°C.

	Substrato (g glicose / L)				Regressão
	80	120	160	200	r
Rendimento (%)	80,70 a	80,98 a	81,40 a	72,83 b	0,958 ***
Etanol (% v/v)	4,21 d	6,29 c	8,45 b	9,41 a	0,998 ***
A R res (% p/v)	0,006 b	0,006 b	0,005 b	2,15 a	0,966 ***
Glicerol (% p/v)	0,569 d	0,782 c	0,934 b	1,085 a	0,996 ***
$Y_{p/s}$	0,4127 a	0,4141 a	0,4162 a	0,4170 a	ns
$Y_{x/s}$	-	-	-	-	-
VMFE (mL / L / h)	13,75 b	15,20 a	12,06 c	12,93 c	< 0,80 ***
VMCC (g / L / h)	-	-	-	-	-
VMCS (g / L / h)	26,55 b	29,98 a	22,89 d	24,44 c	< 0,80 ***
Tempo (h)	3	4	7	7	-

Tabela 11 - Médias de viabilidade celular (%) e de células viáveis de levedura no final da fermentação.

Tratamentos	Viabilidade	Células Viáveis
g glicose / L	(%)	(cel/mL)
80	48	$3,55 \times 10^8$
120	29	$1,98 \times 10^8$
160	1,18	$1,50 \times 10^7$
200	11	$7,50 \times 10^7$

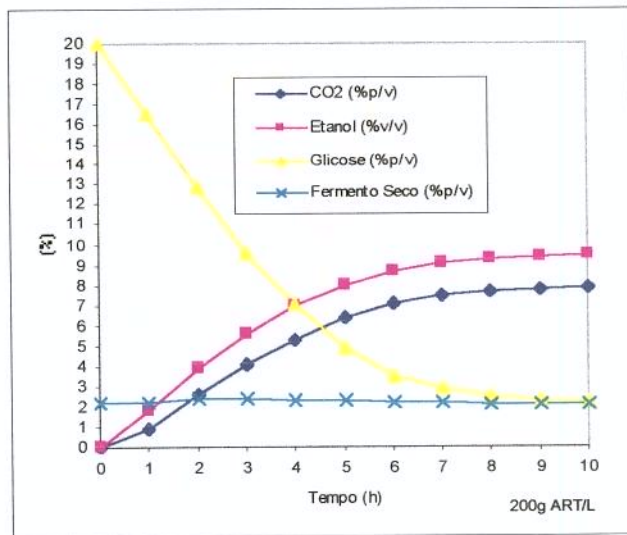
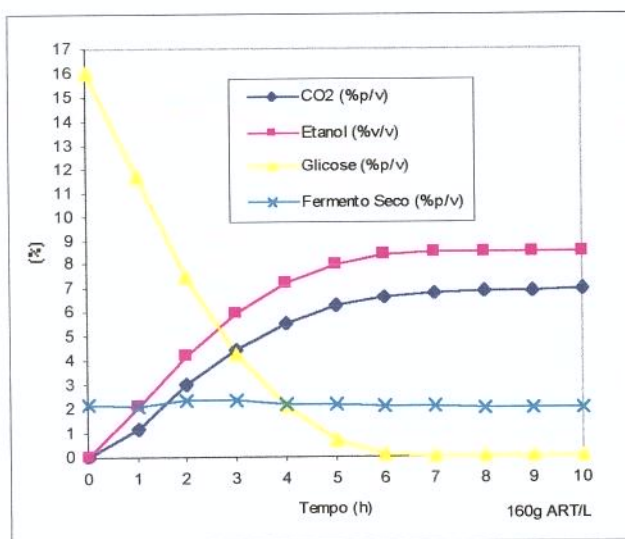
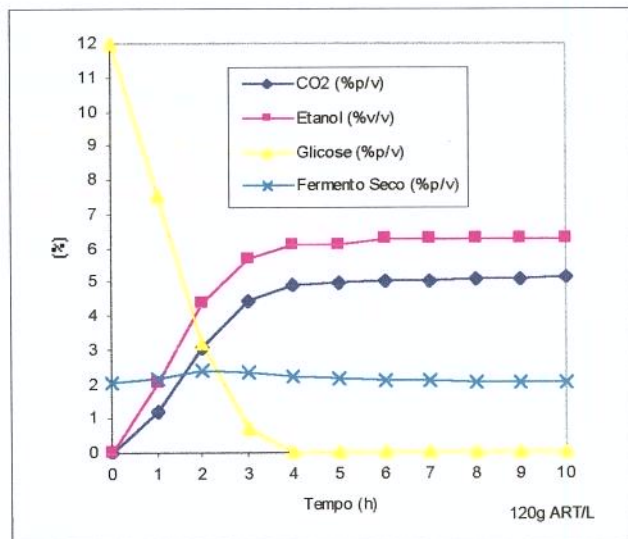
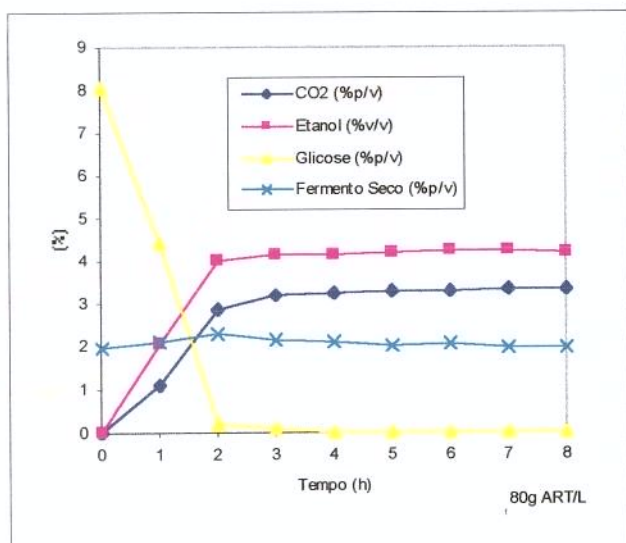


Figura 39 - Cinética da liberação de CO₂ (g/100 mL vinho), etanol no vinho (% v/v), consumo de glicose (g/100 mL vinho) e fermento seco (g/100 mL vinho), de fermentação alcoólica em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C.

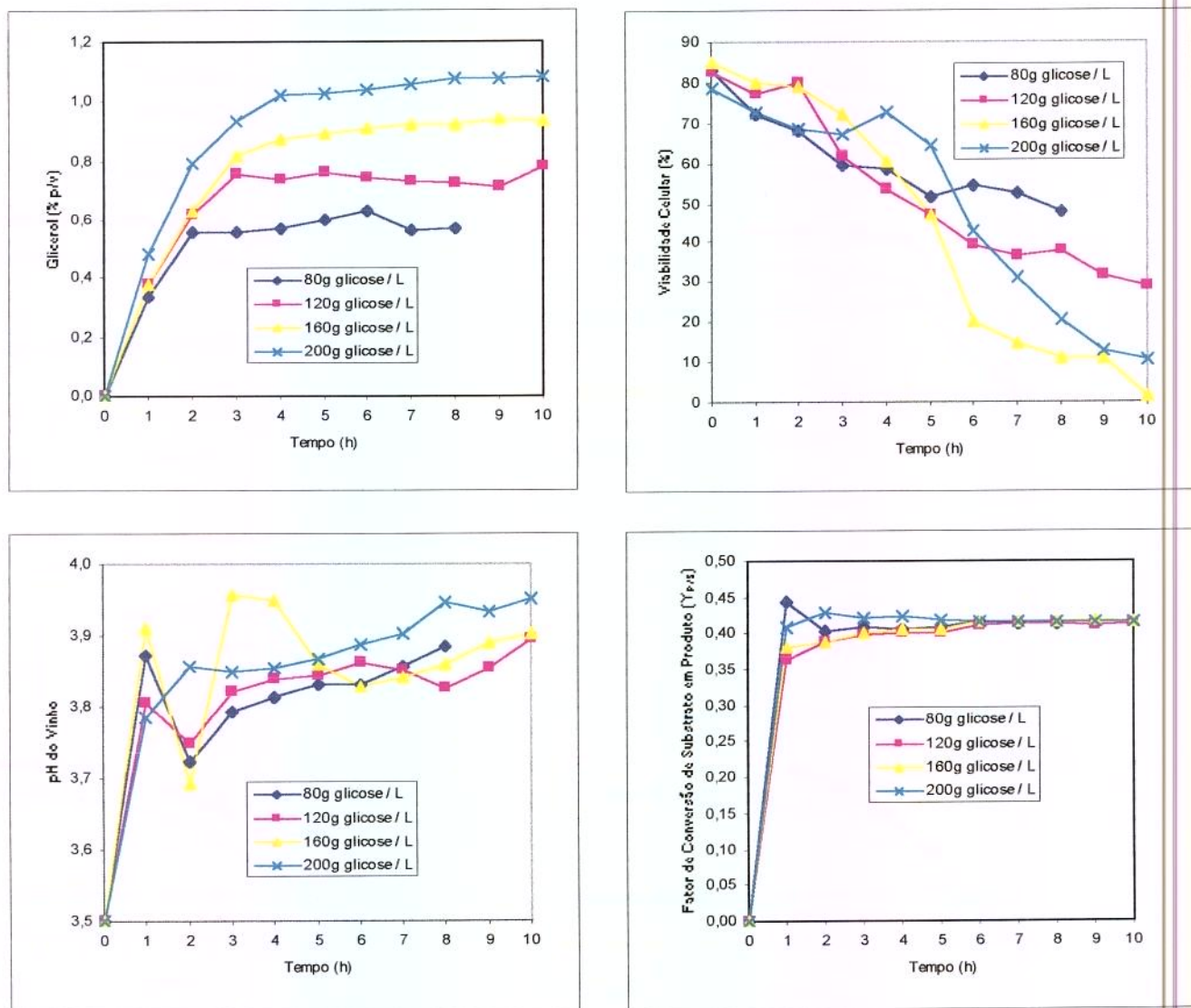


Figura 40 - Cinética da formação de glicerol (g/100 mL vinho), viabilidade celular (%), pH do vinho e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C.

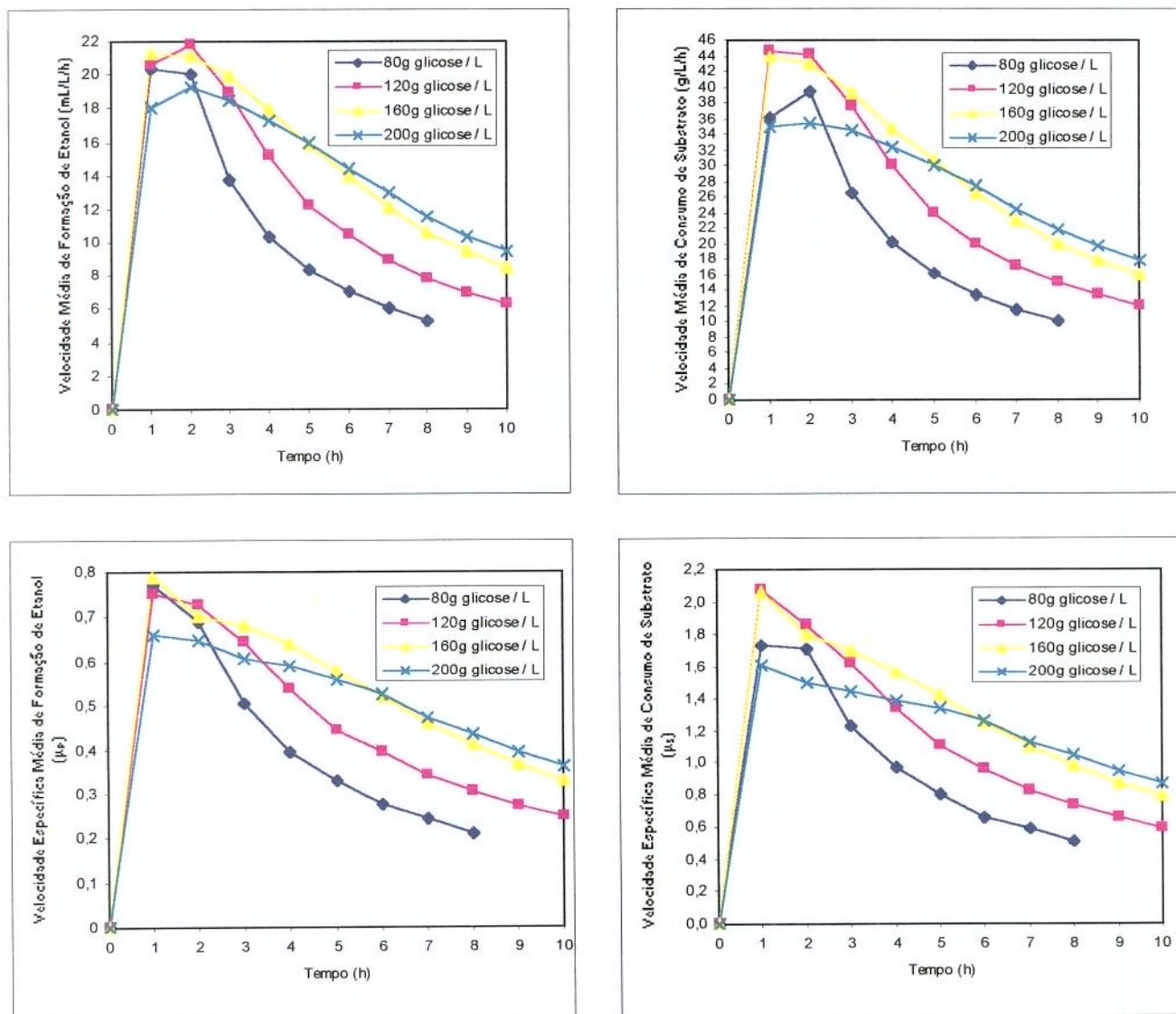


Figura 41 - Velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), velocidade média de consumo de substrato (g/L/h), velocidade específica média de formação de etanol e velocidade específica média de consumo de substrato durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C .

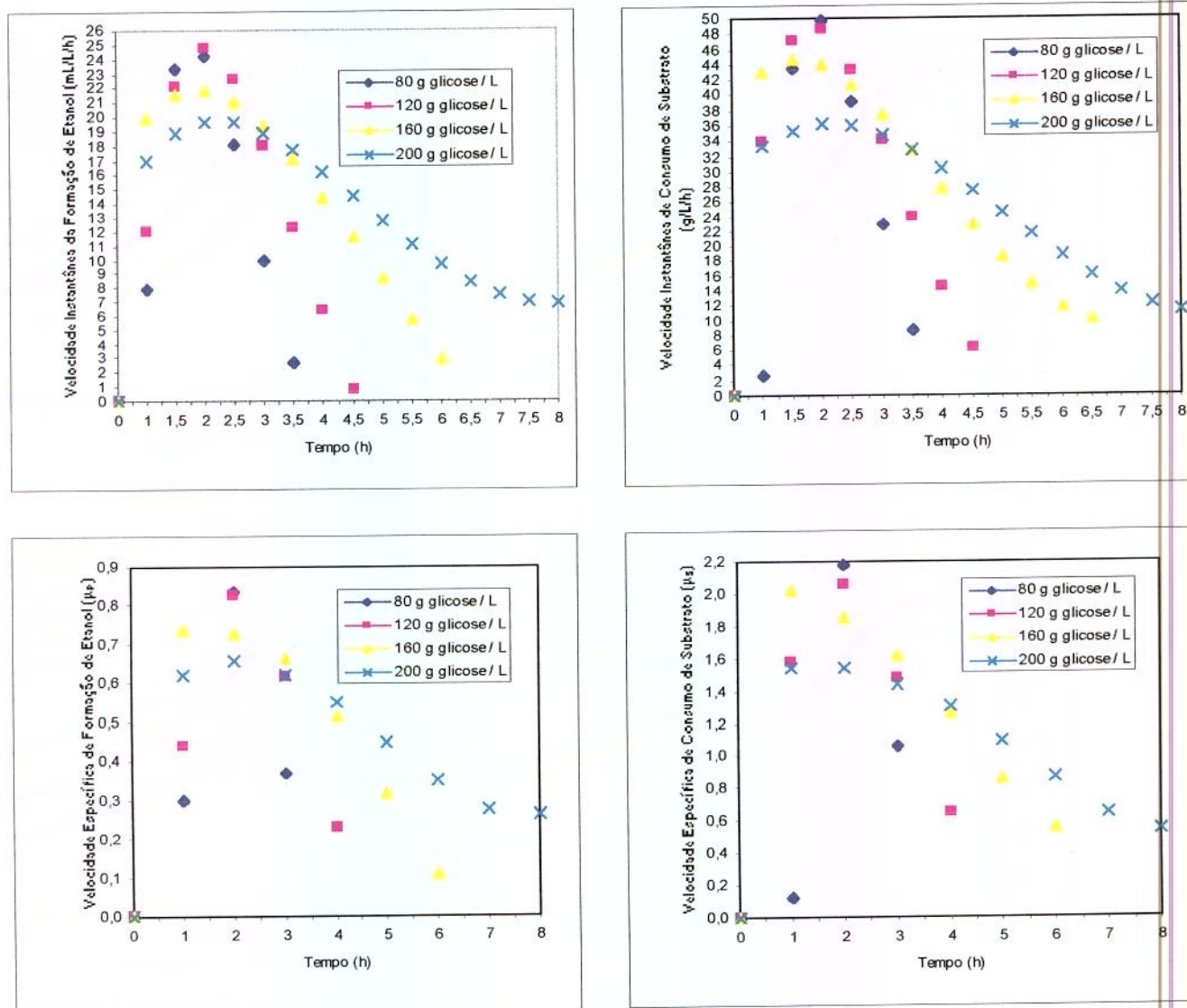


Figura 42 – Velocidade instantânea de Formação de Etanol (mL/L/h) e de consumo de substrato (g/L/h), velocidade específica de formação de etanol e de consumo de substrato durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,5 e 38°C.

4.4.9. Correlação entre o CO₂ liberado, etanol produzido e consumo de substrato durante a fermentação alcoólica

Existe uma correlação elevada entre CO₂ liberado durante a fermentação com etanol produzido e glicose consumida em todas as concentrações de substrato como mostra a Figura 43. A constatação da correlação entre valores obtidos das variáveis durante a fermentação, confirma a veracidade das estimativas de cálculo efetuadas com gás carbônico no capítulo anterior, itens 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4.

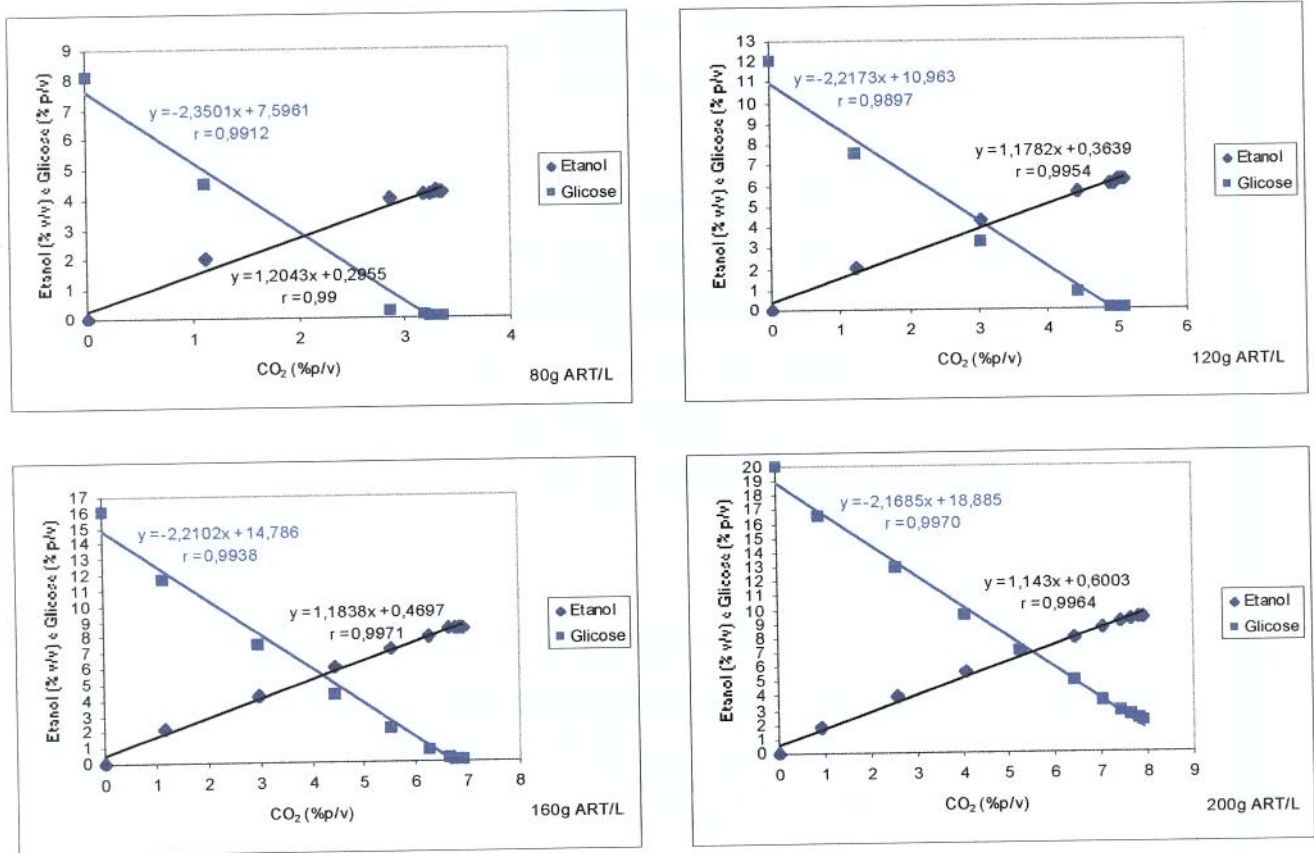


Figura 43 – Correlação entre a cinética da evolução de CO₂ com a cinética da produção de etanol e consumo de glicose durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e 38°C.

5. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões puderam ser obtidas:

5.1. Fermentação em substrato de glicose

- Dentre os fatores estudados em condições de inóculo 10^8 células viáveis / mL, o pH inicial do substrato mostrou influência no metabolismo da levedura. Em pH 3,5 a eficiência ($Y_{p/s}$) da levedura e o rendimento foram maiores que em pH 5,0, na fermentação, embora com produção de glicerol cerca de 5 a 6 vezes superior. Com o inóculo de 10^4 células viáveis / mL a eficiência da levedura e o rendimento também foram mais elevados em pH 3,5, enquanto que a produção de glicerol foi alterada em função do pH.
- A temperatura de 38°C, sob inóculo 10^8 cel / mL, nas concentrações de substrato de 120 e 160 g glicose / L, em pH 3,5 e 5,0 a velocidade média de formação de etanol (e a velocidade de consumo de substrato) foi maior que a 32°C. Nas concentrações de 80 e 200 g glicose / L as velocidades foram similares. Ao contrário, no inóculo 10^4 cel / mL e sob pH 5,0 e 32°C as velocidades médias de formação de etanol e de crescimento celular foram maiores.
- Em pH 5,0 o consumo de substrato ocorreu de tal forma que no vinho, praticamente não havia açúcar residual. Em pH 3,5 o teor de açúcar residual começou a crescer em 160 g glicose / L e chegou ao redor de 2%, quando empregou-se 200 g/L sob temperatura de fermentação de 38°C.
- Sob inóculo de 10^8 cel / mL e em pH 3,5, o rendimento da fermentação foi menor que sob inóculo de 10^4 cel / mL, com reduções absolutos de 2,4, 6,25 e 4,75% nas concentrações de 80, 120 e 160 g / L, respectivamente. Em 200 g / L essa redução chegou a 10,75%, mostrando forte inibição da fermentação.

Em pH 5,0 o rendimento não mostrou essa redução em função da concentração de substrato.

- Sob inóculo de 10^8 cel / mL, a ocorrência de dois fatores adversos (concentração de substrato de 200 g / L e pH 3,5) foi suficiente para causar uma diminuição de 7,9 pontos percentuais absolutos no rendimento da fermentação em relação a pH 5,0. Com inóculo de 10^4 cel / mL o rendimento foi reduzido em 10,5 pontos percentuais, porém mediante a conjugação de três fatores adversos: substrato de 200 g / L, pH 3,5 e temperatura de 38°C. O crescimento celular que se registrou com inóculo de 10^4 cel / mL é atribuído o efeito diferencial entre esses dois tratamentos, causando menor efeito negativo em pH 3,5.
- Inóculos de 10^4 cel / mL conduzem a fermentações de 20 a 44 horas, sob concentrações de substrato de 80 a 200 g glicose / L. Ao contrário inóculos de 10^8 cel / mL fermentam em 3 a 8 horas.
- Sob condições de inóculo com 10^8 cel / mL a viabilidade celular da levedura diminui a 38°C, ainda que o número de células viáveis se mantenha em 10^8 células viáveis / mL. Sob inóculo de 10^4 cel / mL e pH 3,5 a viabilidade atingiu zero. Em pH 5,0 a viabilidade manteve-se elevada, nas concentrações de 80, 120 e 160 g glicose / L, porém diminuiu drasticamente com 200 g / L e 38°C.

5.2. Fermentação alcoólica em diferentes substratos

- Em substrato de sacarose – sacarose pura e xarope industrial não ocorreu, tal como em glicose, a drástica inibição em 200 g ART / L, pH 3,5 e 38°C, sob inóculo de 10^8 cel / mL. A inibição em substrato de sacarose pode ter comportamento diferente daquele de glicose, pela influência da reação de inversão.
- Em substrato de xarope industrial o rendimento da fermentação foi sendo reduzido com o aumento da concentração em ART e também em relação ao substrato com sacarose pura, o que é atribuído à presença de nutrientes naturais da cana no xarope favorecendo crescimento celular.
- O açúcar residual nas fermentações com substrato de sacarose – sacarose pura e xarope industrial – mostrou teores mais elevados que em substrato de glicose, todavia a maior eficiência da levedura naqueles substratos resultou em rendimentos bem mais elevados que em glicose.
- O substrato de xarope industrial propiciou maior crescimento celular, nos substratos mais diluídos, de 80 e 120 g ART / L.
- Em substratos de mel final a fermentação foi inibida cerca de 10% em 110 e 140 g ART / L em mel final de pureza 69; em 170 g ART / L é severamente inibida (cerca de 37%). Em mel final de pureza 60 a inibição foi maior, atingindo 36, 67 e 92% nos substratos com 110, 140 e 170 g ART / L, em relação ao de 80 g ART / L. Assim, o uso de mel final como substrato em experimentos deve ser criteriosamente e adequado aos objetivos.
- Em substrato de glicose, sacarose pura, xarope industrial, mel final de pureza 69 e 60, o CO₂ liberado pode ser utilizado para a estimativa quantitativa dos teores de etanol produzido e ART consumido, por meio de equação de

regressão linear que deve ser determinada para as condições de composição e matérias primas dos mostos preparados. Para substrato de glicose, com inóculo de 10^4 cel / mL também pode ser quantificado pelo CO_2 liberado.

- A cinética de liberação de CO_2 (horária) mostra-se uma ferramenta adequada para determinar o final da fermentação, seja por esgotamento de substrato ou pela inibição da levedura, obtendo-se assim o tempo de fermentação importante para diferenciação de linhagens de levedura e de tratamentos experimentais, quanto à sua produtividade.
- Em substrato de glicose a cinética horária de liberação de CO_2 , produção de etanol, consumo de substrato e de crescimento celular, apresentaram equações com correlações bastante elevadas. As correlações existentes permitem fazer estimativas de qualquer uma das variáveis na unidade de tempo com pouca margem de erro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.10, p.845-864, 1969.
- ALMELA, L.; LÁZARO, I.; LÓPEZ ROCA, J.M. Influencia de las levaduras sobre el contenido de ácidos fenólicos de los vinos. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.31, n.3, p.393-399, 1991.
- ALTERTHUM, F.; CANZ, M.R. de M. Aumento de rendimento de fermentação alcoólica pela adição de óleo de soja. **Revista de Microbiologia**, v.18, n.1, p.52-57, 1987.
- ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. Piracicaba, 1994. 251p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. Fermentação descontínua: otimização do processo Melle-Boinot. In: Semana da fermentação alcoólica "Jaime Rocha de Almeida", Piracicaba, Anais ESALQ/STAB. v.4, p. 144-221, 1985.
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. **Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p.
- ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M.I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando-se parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB. Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v.13, n.4, p.22-25, 1995.

- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Influência de fonte de carbono nos teores de glicogênio e trealose durante a fermentação. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n.7, p.63-69, 1988a.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Mobilização e armazenamento dos carboidratos de reserva durante a fermentação alcoólica. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n.8, p.44-47, 1988b.
- BAZUA, C.D.; WILKE, C.R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v.7, p.105-118, 1977.
- BELY, M.; SABLAYROLLES, J.M.; BARRE, P. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. **American Journal Enology and Viticulture**, v.41, n.4, 1990.
- BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. Direct selection of yeast mutants with reduced viability on plates by erythrosine staining. **Analytical Biochemistry**, v. 193, p.225-230, 1991.
- BORZANI, W.; QUEIROZ, M.F.V.; VAIRO, M.L.R. Uma relação empírica entre o tempo necessário para se completar a fermentação alcoólica do mosto de melaço e as concentrações iniciais de açúcares e de levedura. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, p.38-39, 1983.
- BRYAN, W.L.; SILMAN, R.W. Viability and initial kinetic parameters for dry inocula in batch fermentations. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 13, 1991.

- CACHOT, T.; MÜLLER, M.; PONS, M. N. Kinetics of volatile metabolites during alcoholic fermentation of can molasses by *Saccharomyces cerevisiae* **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.450-454, 1991.
- CARO, I.; PÉREZ, L.; CANTERO, D. Development of a kinetic model for the alcoholic fermentation of must. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 742-748, 1991.
- CLETO, F.V.G.; MUTTON, M.J.R. Influência de dois tipos de leveduras, do tratamento ácido e de adição de fubá de milho sobre o desenvolvimento do processo fermentativo e qualidade final do destilado. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.13, n.3, p.28-30, 1995.
- CLETO, F.V.G.; MUTTON, M.J.R. Rendimento e qualidade de aguardente de cana produzida utilizando o fermento tratado com ácido sulfúrico e fubá de milho. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.16, n.2, p.38-40, 1997.
- COLAS, S.; CUINIER, M. Optimisation de la fermentation alcoolique. Application (vinification, cinetique des fermentations, influence des levures, de la temperature). **Vignes-et-Vins**, n. 322, p.24-28, 1983.
- COPERSUCAR, **Cinética de processos fermentativos**. Piracicaba, 1987. 434p.
- COSTENOBLE, R.; VALADI, H.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C. E FRANZÉN, C.J. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.16, p.1483-1495, 2000.
- CYSEWSKI, G.R.; WILKE, C.R. Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. **Biotechnology and Bioengineering**, v.19, p.1125-1143, 1977.

- D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, n.1, p.110-114, 1988.
- DE MARTIN, V. F. Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por leveduras. Piracicaba, 1988. 190p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DE WHALLEY, H.C.S. **Métodos ICUMSA de análisis de azúcar**. Compañia Editorial Continental, 1975.
- DOMINGUEZ, V.E.L.; NELSON, D.L.; MAIA, A.B.R.A. Influência do fubá e do farelo de arroz sobre a formação de produtos secundários da fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.15, n.4, p.28-31, 1997.
- DREBOT, M.A.; BARNES, C.A.; SINGER, R.A.; JOHNSTON, G.C. Genetic assessment of stationary phase for cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Bacteriological**, v.172, p.3584-3589, 1990.
- EKUNSANMI, T.I.; ODUNFA, S.A. Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activities of some yeasts strain isolated from steep water of fermentating cassava tubers. **Journal of Applied Bacteriology**, v.67, p.672-675, 1990.
- EL HALOUI, N.E.; CORRIEU, G.; CLERAN, Y.; CHERUY, A. Method for on-line prediction of kinetics of alcoholic fermentation in wine marking. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.68, n.2, p.131-135, 1989.
- ENDO, I.; INOUE, I. A fundamental research of fed batch fermentation. **Topical Biochemistry and Engineering**, v.2, n.1, p.583-588, 1975.
- ERASO, P.; GANCEDO, C. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. **FEBS Letters**, v.224, p.187-192, 1987.

- FERREIRA, L.V. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, 1998. 125 p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with the enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v.28, n.10, p.2077-2080, 1982.
- GALEOTE, G. A.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; SABLAYROLLES, J. M. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 677-681, 2001.
- GOMES, E. Efeito de tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. Piracicaba, 1988. 206p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 12ed. Piracicaba: Nobel, 1987. 467p.
- GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v.47, n.2, p.597-608, 1990.
- GUTIERREZ, L.E. Aumento da produção de etanol a partir de melaço de cana-de-açúcar pela adição de benzoato. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v.48, p.1-21, 1991.
- HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J. Principles and techniques. 2^a ed. Harper and Row Publishers. **Clinical Chemistry**, p.1288, 1974.

- JOHANNES, P.; VAN, D; RUNOL, A.; A.W.; JACK, T.P. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.63, p. 343-352, 1993.
- JONES, R.P.; GREENFIELD, P.F. Role of water activity in ethanol fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, p.29-40, 1986.
- JONES, R.P.; DAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcool fermentation by yeast: The effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, v.16, p.42-49, 1981.
- KENYON, C.P.; PRIOR, B.A.; HENDRIK,J.J.V. Water relations of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: glycerol production under solute stress. **Enzyme and Microbiology and Technology**, v.8, p.461-464, 1986.
- LEYVA, J.S.; MANRIQUE, M.; PRATS, L.; LOUREIRO-DIAS, M.C.; PEINADO, J.M. Regulation of fermentative CO₂ production by the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.270-275, 1999.
- MACLEAN, M.; HARRIS, N.; PIPER, P.W. Chronological lifespan of stationary yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms. **Yeast**, v.18, p.499-509, 2001.
- MAIA, A.B.R.A.; GERMANO, A.; GLERIAN, C. R.; AUHAREK, E.; ALVES, J.G.L.F.; ASSIS, N.R.; VÂNIA, L.S.P. Ação do fubá e farinha de soja sobre a evolução da fermentação em *Saccharomyces cerevisiae*. **STAB. Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v.11, n.5, p.22-27, 1993.

- MAURICIO, J. C.; SALMON, J.M. Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, v.14, n.7, p. 577-582, 1992.
- MCGOWAN, M.W.; ARTISS, J.D.; STRANDBERGH, D.R.; ZAK, B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides **Clinical Chemistry**, v.29, n.3, p.538-542, 1983.
- MONK, P.R.; COWLEY, P.J. Effect of nicotinic acid and sugar concentration of grape juice and temperature on accumulation of acetic acid during yeast fermentation. **Journal of Fermentation Technology**, v.62, n.6, p.515-521, 1984.
- MONTEIRO, G.G.A.; SÁ-CORREIA, I. In vivo activation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by ethanol: effect on the kinetic parameters and involvement of the carboxyl-terminus regulatory domain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1370, p.310-316, 1998.
- MOSS, F. J.; KICKARD, P.H.D.; BUSH, F.E. The response by microorganisms to steady-state growth controlled concentrations of oxygen and glucose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.13, p.63-75, 1971.
- NAGODAWITHANA, T.W.; STEINKRAUS, K.H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. **Applied Microbiology**, v.28, p.383-391, 1974.

- 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 Environmental Microbiology**, v.31, p.158-162, 1976.
- PANCHAL, C. J.; TAVARES, F.C.A. Yeast strain selection for fuel ethanol production. In: PANCHAL, C. J. ed **Yeast Strain Selection**, Marcel Dekker, 1990 cap. 8, p.225-243.
- PARADA, G.; ACEVEDO, F. On the relation of temperature and RNA content to the specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering** v.25, 2785-2788, 1983.
- RAGHAV, R.; SIVARAMAN, H.; GORHALE, D.V.; SEETARAMA RAO, B. Ethanolic fermentation of cane molasses by a highly flocculent yeast. **Biotechnology Letters**, v.11, n. 10, p. 739-744, 1989.
- RATLEDGE, C.; EVANS, C.T. Lipids and their metabolism. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. 2. ed. **The yeast**, Academic Press, v.3, cap.10, p.367-455, 1989.
- ROSARIS, E.J.; LEE, K.J.; ROGERS, P.L. Kinetics of alcohol fermentation at high yeast levels. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.1477-1482, 1979.
- ROUSSEAU, S.; ROULEAU, D.; YERUSHALMI, L.; MAYER, R.C. Effect of temperature of fermentation kinetics of waste sulphite liquor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Chemistry Biotechnology**, v.53, p.285-291, 1992.

- RUBIO, M.C.; NAVARRO, A.R. Effect of agitation on the kinetic variables of alcoholic fermentation in batch culture. **International Sugar Journal**, v.91, n.1089, p. 171-174, 1989.
- SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Kinetics of alcoholic fermentation under anisothermal enological conditions. I. influence of the temperature evolution on the instantaneous rate of fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, n. 2, p. 127-133, 1993a.
- SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Kinetics of alcoholic fermentation under anisothermal enological conditions. II. Prediction from the kinetics under isothermal conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, n. 2, p. 134-138, 1993b.
- SALGUEIRO, S.P.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.4, p.903-909, 1988.
- SALMON, J.M.; VINCENT, O.; MAURICIO, J.C.; BELY, M.; BARRE, P. Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.44, p.56-64, 1993.
- SALMON, J.M.; MAURICIO, J.C. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, v.16, n.1, p.89-94, 1994.

- SILVA, R.S.F.; BORSATO, D.; OLIVEIRA, C.L.F.; PALADINO, P.V. Otimização da fermentação alcoólica em meio sintético usando o método super-simples modificado. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.30, n.3, p.507-514, 1987.
- SLAVIK, J.; KOTYK, A. Intracellular pH distribution and transmembrane pH profile of yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.766, p.679-84, 1984.
- STREHAIANO, P.; MOTA, M; GOMA, G. Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, v.5, n.2, p. 135-140, 1983.
- STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v.4, n.17, p.43-46, 1981.
- STUPIELLO, J.P.; HORII, J. Fundo de dorna da fermentação: um fator de eficiência industrial. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.1, n.1, p.34-36, 1982.
- THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G.A. Effects of high product and substrate inhibitions on de kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p.289-297, 1992.
- TODA, K.; ASAKURA, T.; OTHAKE, H. Inhibitory effect of ethanol on ethanol fermentation. **Journal General Applied Microbiology**, v.33, p.421-428, 1987.
- TRINDER, R. **Annals Clinical Biochemistry**, v.6, n.24, 1969.
- VEGA, J.L.; NAVARRO, A. R.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. Effects of inoculum size on ethanol inhibition modeling and other fermentation parameters. **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, n.5, p.633-638, 1987.

- WANDERLEY, M. T. Estudo da termo-tolerância e parâmetros cinéticos da *Saccharomyces cerevisiae*. Campinas, 1997. 111p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- WATSON, K. Temperature relations. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. 2.ed. **The yeasts** Academic Press, 1987, v.2, cap.3, p.41-71.
- ZAGO, E.A.; SILVA, L.F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: ESALQ/FERMENTEC, 1996. 194P.

7. ANEXOS (DADOS ORIGINAIS)

7.1. A cinética de liberação de CO₂ na fermentação alcoólica

7.2. Fatores que afetam o comportamento da fermentação alcoólica em meio de glicose

7.2.1. Fermentação alcoólica com inóculo de 10^8 células viáveis / mL

7.2.2. Fermentação alcoólica com inóculo de 10^4 células viáveis / mL

Tabela A1 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) durante a fermentação alcoólica com pH inicial 3,50 e inóculo de 3,72 x 10⁸ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
	g CO ₂ /100mL							
S1T1	0,760	1,450	1,210	0,150	0,050	0,030	0,020	0,030
	0,790	1,500	1,150	0,130	0,050	0,030	0,020	0,030
	0,780	1,490	1,190	0,140	0,060	0,030	0,030	0,030
	0,790	1,470	1,170	0,130	0,060	0,030	0,020	0,030
	0,780	1,478	1,180	0,138	0,055	0,030	0,023	0,030
	1,030	1,780	0,700	0,070	0,050	0,030	0,020	0,030
	1,050	1,810	0,650	0,100	0,040	0,030	0,030	0,030
S1T2	1,030	1,790	0,690	0,080	0,050	0,020	0,020	0,020
	1,110	1,810	0,590	0,080	0,040	0,020	0,020	0,030
	1,055	1,798	0,658	0,083	0,045	0,025	0,023	0,028
	0,610	1,280	1,630	1,160	0,350	0,150	0,060	0,030
S2T1	0,710	1,470	1,690	1,110	0,290	0,080	0,050	0,030
	0,670	1,390	1,700	1,130	0,380	0,090	0,050	0,030
	0,730	1,450	1,710	1,110	0,320	0,090	0,030	0,040
	0,680	1,398	1,683	1,128	0,335	0,103	0,048	0,033
	0,990	1,870	1,660	0,730	0,180	0,070	0,030	0,020
	0,910	1,730	1,670	0,830	0,230	0,060	0,040	0,030
	0,940	1,730	1,630	0,800	0,210	0,070	0,040	0,030
S2T2	1,070	1,870	1,630	0,660	0,160	0,060	0,030	0,030
	0,978	1,800	1,648	0,755	0,195	0,065	0,035	0,028
	0,590	1,160	1,360	1,260	1,120	0,890	0,610	0,320
	0,560	1,150	1,370	1,290	1,130	0,920	0,610	0,280
S3T1	0,560	1,120	1,360	1,260	1,130	0,910	0,620	0,340
	0,570	1,160	1,350	1,280	1,130	0,930	0,620	0,310
	0,570	1,148	1,360	1,273	1,128	0,913	0,615	0,313
	0,830	1,490	1,530	1,220	0,940	0,640	0,430	0,230
	0,720	1,410	1,530	1,280	1,040	0,680	0,430	0,250
	0,780	1,420	1,560	1,270	1,010	0,680	0,460	0,270
	0,800	1,470	1,510	1,250	0,960	0,670	0,420	0,260
S3T2	0,783	1,448	1,533	1,255	0,988	0,668	0,435	0,253
	0,890	1,560	1,390	1,280	1,040	0,830	0,650	0,380
	0,930	1,600	1,390	1,290	1,030	0,820	0,630	0,330
	0,960	1,610	1,400	1,290	1,010	0,840	0,610	0,330
	0,950	1,590	1,400	1,270	1,020	0,830	0,620	0,340
	0,933	1,590	1,395	1,283	1,025	0,830	0,628	0,345
	1,200	1,890	1,410	1,230	0,930	0,770	0,620	0,480
S4T1	1,130	1,870	1,450	1,230	0,940	0,710	0,590	0,440
	1,130	1,850	1,440	1,210	0,910	0,710	0,590	0,450
	1,210	1,910	1,430	1,210	0,930	0,730	0,630	0,470
	1,168	1,880	1,433	1,220	0,928	0,730	0,608	0,460
S4T2								

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

Tabela A2 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $3,72 \times 10^8$ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	pH do Vinho	Fermento			Etanol	Rendimento	Açúcar	Glicerol	Viabilidade	Células				
		Úmido	Seco	Matéria							da	Residual	Celular	Viáveis
Seca			Fermentação											
		(g/100mL)	(%)	(%v/v)	(%)		(g/100mL)	(%)	(cel/mL)					
S1T1	3,18	9,50	2,25	23,64	4,50	87	0,00510	0,55	69	2,76 x 10 ⁸				
	3,20	9,70	2,30	23,73	4,50	87	0,00510	0,54						
	3,18	9,90	2,28	23,08	4,50	87	0,00490	0,57						
	Média	3,18	9,80	2,30	23,43	4,44	86	0,00530	0,55	71	4,40 x 10 ⁸			
		3,19	9,73	2,28	23,47	4,49	87	0,00510	0,55	70	3,58 x 10 ⁸			
		3,29	9,00	2,20	24,40	4,52	87	0,00530	0,53	53	2,68 x 10 ⁸			
		3,27	9,50	2,31	24,33	4,42	85	0,00530	0,50					
S1T2	3,27	9,20	2,23	24,29	4,42	85	0,00490	0,56						
	Média	3,27	9,30	2,25	24,14	4,40	85	0,00560	0,57	58	3,68 x 10 ⁸			
		3,28	9,25	2,25	24,29	4,44	86	0,00528	0,54	56	3,18 x 10 ⁸			
		3,08	8,30	2,25	27,06	6,48	83	0,00680	0,69	38	1,80 x 10 ⁸			
		3,00	9,20	2,43	26,45	6,54	84	0,00680	0,71					
		3,09	9,00	2,41	26,82	6,58	84	0,00690	0,78					
		3,09	9,20	2,45	26,67	6,52	84	0,00690	0,75	53	3,36 x 10 ⁸			
S2T1	Média	3,07	8,93	2,39	26,75	6,53	84	0,00685	0,73	46	2,58 x 10 ⁸			
		3,27	8,70	2,37	27,29	6,48	83	0,00760	0,71	22	1,48 x 10 ⁸			
		3,23	8,70	2,36	27,13	6,48	83	0,00790	0,72					
		3,26	8,70	2,34	26,91	6,52	84	0,00800	0,72					
	S2T2	3,26	9,00	2,40	26,71	6,44	83	0,00830	0,74	34	1,58 x 10 ⁸			
	Média	3,26	8,78	2,37	27,01	6,48	83	0,00795	0,73	28	1,53 x 10 ⁸			
		3,14	9,00	2,61	28,99	8,74	84	0,00850	0,86	33	1,80 x 10 ⁸			
S2T2		3,17	9,00	2,58	28,65	8,76	84	0,00880	0,85					
		3,15	9,00	2,59	28,75	8,74	84	0,00880	0,79					
	S3T1	3,16	8,90	2,55	28,66	8,76	84	0,00910	0,88	39	2,12 x 10 ⁸			
	Média	3,16	8,98	2,58	28,76	8,75	84	0,00880	0,85	36	1,96 x 10 ⁸			
		3,46	7,90	2,31	29,30	8,78	84	0,00980	0,81	24	1,60 x 10 ⁸			
		3,37	8,30	2,41	29,07	8,72	83	0,01000	0,84					
		3,38	8,20	2,39	29,20	8,68	83	0,00960	0,80					
S3T2		3,42	8,10	2,36	29,16	8,74	84	0,00970	0,85	24	1,08 x 10 ⁸			
	Média	3,41	8,13	2,37	29,18	8,73	84	0,00978	0,83	24	1,34 x 10 ⁸			
		3,06	9,40	2,75	29,22	10,08	77	2,07990	0,99	47	1,84 x 10 ⁸			
		3,06	9,60	2,82	29,37	10,12	77	2,61420	1,02					
		3,02	9,70	2,85	29,40	10,14	77	2,03040	1,05					
	S4T1	3,02	9,40	2,79	29,64	10,16	77	1,74100	1,09	52	3,36 x 10 ⁸			
	Média	3,04	9,53	2,80	29,41	10,13	77	2,11640	1,04	50	2,60 x 10 ⁸			
S4T1		3,29	8,70	2,61	29,97	10,26	78	2,09320	0,97	42	1,24 x 10 ⁸			
		3,27	9,10	2,70	29,64	10,18	77	1,84940	1,01					
		3,28	9,00	2,69	29,93	10,20	78	3,05000	1,02					
	S4T2	3,28	8,80	2,64	29,98	10,12	77	1,79160	0,97	44	2,32 x 10 ⁸			
	Média	3,28	8,90	2,66	29,88	10,19	78	2,19610	0,99	43	1,78 x 10 ⁸			

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

Tabela A3 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $3,72 \times 10^8$ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	Fator de Conversão de Substrato em Produto ($Y_{P/S}$)	Velocidade Média de Formação de Etanol (mL/L/h)	Velocidade Média de Consumo de Substrato (g/L/h)
S1T1 Média	0,44538	15,000	26,583
	0,44538	15,000	26,583
	0,44537	15,000	26,584
	0,43945	14,800	26,582
	0,44439	14,967	26,583
	0,44737	15,067	26,582
	0,43747	14,733	26,582
	0,43745	14,733	26,584
S1T2 Média	0,43551	14,667	26,581
	0,43945	14,800	26,582
	0,42434	12,960	24,106
	0,42827	13,080	24,106
S2T1 Média	0,43089	13,160	24,106
	0,42696	13,040	24,106
	0,42762	13,060	24,106
	0,42437	12,960	24,105
S2T2 Média	0,42438	12,960	24,104
	0,42700	13,040	24,104
	0,42177	12,880	24,103
	0,42438	12,960	24,104
S3T1 Média	0,42764	10,925	20,164
	0,42863	10,950	20,164
	0,42765	10,925	20,164
	0,42863	10,950	20,164
S3T2 Média	0,42814	10,938	20,164
	0,42963	10,975	20,163
	0,42670	10,900	20,163
	0,42473	10,850	20,163
S4T1 Média	0,42767	10,925	20,163
	0,42718	10,913	20,163
	0,43667	12,600	22,775
	0,45165	12,650	22,107
S4T2 Média	0,43808	12,675	22,837
	0,43210	12,700	23,199
	0,43972	12,663	22,730
	0,44479	12,825	22,759
S4T2 Média	0,43549	12,725	23,063
	0,46672	12,750	21,563
	0,43157	12,650	23,136
	0,44427	12,738	22,630

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

Tabela A4 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) durante a fermentação alcoólica com pH inicial 5,0 e inóculo de 7,32 x 10⁸ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
g CO ₂ /100mL								
S1T1	1,840	1,653	0,067	0,040	0,033	0,027	0,027	0,020
	1,907	1,650	0,060	0,060	0,027	0,020	0,027	0,027
	1,927	1,533	0,067	0,053	0,033	0,020	0,033	0,020
	1,900	1,473	0,067	0,040	0,027	0,033	0,020	0,020
	1,894	1,577	0,065	0,048	0,030	0,025	0,027	0,022
Média	2,187	1,213	0,060	0,047	0,033	0,027	0,027	0,027
S1T2	2,187	1,200	0,060	0,040	0,047	0,027	0,020	0,020
	2,200	1,187	0,060	0,033	0,033	0,033	0,020	0,020
	2,227	1,187	0,060	0,033	0,027	0,027	0,027	0,027
	2,200	1,197	0,060	0,038	0,035	0,029	0,024	0,024
	1,160	1,627	1,653	0,740	0,153	0,053	0,040	0,033
Média	1,180	1,647	1,680	0,680	0,113	0,053	0,040	0,033
S2T1	1,147	1,607	1,687	0,733	0,133	0,047	0,040	0,033
	1,153	1,613	1,667	0,753	0,127	0,053	0,040	0,033
	1,160	1,624	1,672	0,727	0,132	0,052	0,040	0,033
	1,467	1,940	1,567	0,287	0,067	0,047	0,040	0,040
	1,420	1,920	1,640	0,287	0,080	0,033	0,033	0,033
S2T2	1,427	1,940	1,600	0,293	0,087	0,040	0,033	0,040
	1,453	1,940	1,547	0,253	0,067	0,033	0,033	0,033
	1,442	1,935	1,589	0,280	0,075	0,038	0,035	0,037
	2,027	1,253	1,667	1,367	0,440	0,130	0,060	0,013
	2,293	1,380	1,733	1,347	0,440	0,120	0,053	0,013
S3T1	2,213	1,347	1,720	1,347	0,440	0,120	0,053	0,013
	2,233	1,347	1,720	1,347	0,420	0,113	0,047	0,013
	2,192	1,332	1,710	1,352	0,435	0,121	0,053	0,013
	2,827	1,487	1,733	1,060	0,207	0,080	0,047	0,033
	2,600	1,513	1,713	1,127	0,227	0,080	0,040	0,033
S3T2	2,627	1,487	1,700	1,073	0,180	0,080	0,033	0,027
	2,720	1,473	1,693	1,060	0,200	0,087	0,040	0,033
	2,694	1,490	1,710	1,080	0,204	0,082	0,040	0,032
	0,733	1,453	1,640	1,553	1,240	1,020	0,493	0,340
	0,747	1,427	1,633	1,507	1,253	0,980	0,453	0,393
S4T1	0,767	1,453	1,640	1,500	1,280	1,007	0,473	0,360
	0,787	1,467	1,653	1,487	1,273	1,013	0,467	0,347
	0,759	1,450	1,642	1,512	1,262	1,005	0,472	0,360
	0,907	1,740	1,840	1,520	1,193	0,967	0,780	0,453
	0,933	1,720	1,847	1,493	1,227	0,993	0,787	0,473
S4T2	1,000	1,767	1,813	1,487	1,187	0,980	0,753	0,440
	1,007	1,767	1,827	1,460	1,220	0,973	0,767	0,447
Média	0,962	1,749	1,832	1,490	1,207	0,978	0,772	0,453

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

Tabela A5 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 5,0 e inóculo de $7,32 \times 10^8$ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	pH do Vinho	Fermento			Etanol	Rendimento	Açúcar	Glicerol	Viabilidade	Células				
		Matéria									da	Residual	Celular	Viáveis
		Úmido	Seco	Seca										
S1T1 Média	3,62	11,20	2,49	22,27	4,30	83	0,00759	0,1185	84	5,72 x 10 ⁸				
	3,69	11,30	2,49	22,00	4,44	86	0,00731	0,1057						
	3,66	11,40	2,49	21,87	4,32	83	0,00732	0,1062						
	3,65	11,30	2,49	22,00	4,36	84	0,00737	0,0967	80	5,92 x 10 ⁸				
	3,66	11,30	2,49	22,04	4,36	84	0,00740	0,1068	82	5,82 x 10 ⁸				
	3,77	11,20	2,47	22,08	4,34	84	0,00729	0,1049	89	5,08 x 10 ⁸				
	3,79	11,40	2,50	21,90	4,42	85	0,00685	0,0964						
S1T2 Média	3,77	11,20	2,47	22,06	4,38	85	0,00699	0,1042						
	3,78	11,20	2,49	22,23	4,32	83	0,00695	0,1228	85	5,88 x 10 ⁸				
	3,78	11,25	2,48	22,07	4,37	84	0,00702	0,1071	87	5,48 x 10 ⁸				
	3,52	10,50	2,58	24,56	6,36	82	0,00883	0,1288	63	3,44 x 10 ⁸				
S2T1 Média	3,53	10,50	2,54	24,22	6,42	83	0,00823	0,1183						
	3,55	10,60	2,56	24,11	6,30	81	0,00857	0,1205						
	3,52	10,80	2,58	23,92	6,28	81	0,00891	0,1049	62	4,28 x 10 ⁸				
	3,53	10,60	2,57	24,20	6,34	82	0,00864	0,1181	63	3,86 x 10 ⁸				
	3,92	8,40	2,18	25,96	6,28	81	0,00918	0,1249	27	1,92 x 10 ⁸				
	3,90	8,60	2,22	25,80	6,24	80	0,00857	0,1248						
	3,91	8,50	2,21	26,03	6,22	80	0,00900	0,1222						
S2T2 Média	3,92	8,60	2,25	26,12	6,32	81	0,00989	0,1520	24	2,24 x 10 ⁸				
	3,91	8,53	2,22	25,98	6,27	81	0,00916	0,1310	26	2,08 x 10 ⁸				
	3,44	9,80	2,65	27,04	8,28	80	0,01061	0,1583	63	4,48 x 10 ⁸				
	3,48	10,70	2,90	27,06	8,48	82	0,01082	0,1466						
S3T1 Média	3,50	10,80	2,92	27,05	8,48	82	0,01144	0,1588						
	3,41	11,00	3,29	29,94	8,44	81	0,01085	0,1446	70	7,76 x 10 ⁸				
	3,46	10,58	2,94	27,77	8,42	81	0,01093	0,1521	67	6,12 x 10 ⁸				
	3,83	8,80	2,42	27,47	8,44	81	0,01187	0,1520	41	3,08 x 10 ⁸				
S3T2 Média	3,78	9,00	2,52	27,98	8,44	81	0,01107	0,1547						
	3,83	8,80	2,45	27,85	8,40	81	0,01059	0,1391						
	3,80	8,80	2,45	27,83	8,44	81	0,01107	0,1489	43	2,76 x 10 ⁸				
	3,81	8,85	2,46	27,78	8,43	81	0,01115	0,1487	42	2,92 x 10 ⁸				
	3,51	10,10	2,94	29,09	10,90	84	0,01175	0,1670	69	6,04 x 10 ⁸				
	3,48	10,20	2,95	28,95	11,04	85	0,01193	0,1610						
	3,48	10,00	2,91	29,12	10,96	85	0,01229	0,1650						
S4T1 Média	3,49	10,20	2,97	29,14	11,02	85	0,01171	0,1586	59	3,56 x 10 ⁸				
	3,49	10,13	2,95	29,08	10,98	85	0,01192	0,1629	64	4,8 x 10 ⁸				
	3,80	8,90	2,45	27,56	11,14	86	0,01156	0,1583	38	3,12 x 10 ⁸				
	3,79	8,50	2,40	28,25	10,98	85	0,01147	0,1595						
S4T2 Média	3,77	8,80	2,46	27,99	11,10	86	0,01206	0,1562						
	3,77	8,90	2,48	27,85	10,98	85	0,01188	0,1507	44	3,64 x 10 ⁸				
	3,78	8,78	2,45	27,91	11,05	86	0,01174	0,1562	41	3,38 x 10 ⁸				

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

Tabela A6 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 5,0 e inóculo de $7,32 \times 10^6$ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	Fator de Conversão Substrato em Produto (Y_{PS})	Velocidade Média de Formação de Etanol (mL/L/h)	Velocidade Média de Consumo de Substrato (g/L/h)
S1T1	0,42518	21,500	39,912
	0,43901	22,200	39,913
	0,42715	21,600	39,913
	0,43110	21,800	39,913
	0,43111	21,800	39,913
	0,42912	21,700	39,914
	0,43701	22,100	39,916
S1T2	0,43306	21,900	39,915
	0,42713	21,600	39,915
	0,43207	21,850	39,915
	0,41109	12,720	24,422
	0,41495	12,840	24,424
	0,40721	12,600	24,423
	0,40593	12,560	24,422
S2T1	0,40980	12,680	24,423
	0,40594	15,700	30,527
	0,40333	15,600	30,529
	0,40205	15,550	30,528
	0,40854	15,800	30,525
	0,40529	15,675	30,527
	0,40418	13,800	26,949
S2T2	0,41395	14,133	26,949
	0,41397	14,133	26,948
	0,41200	14,067	26,949
	0,41103	14,033	26,948
	0,41203	16,880	32,336
	0,41201	16,880	32,338
	0,41004	16,800	32,339
S3T1	0,41201	16,880	32,338
	0,41152	16,860	32,338
	0,42427	13,625	25,348
	0,42972	13,800	25,348
	0,42661	13,700	25,347
	0,42894	13,775	25,348
	0,42738	13,725	25,348
S3T2	0,43360	13,925	25,348
	0,42737	13,725	25,348
	0,43206	13,875	25,347
	0,42738	13,725	25,348
	0,43010	13,813	25,348
	0,43010	13,813	25,348
	0,43010	13,813	25,348

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C

Tabela A7 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) durante a fermentação alcoólica com pH inicial 3,50 e inóculo de 5,12 x 10⁶ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h	19 h	20 h	21 h	22 h	23 h	24 h	25 h	26 h	27 h	31 h	38 h	49 h
g CO ₂ /100mL																	
S1T1	0,900	0,390	0,570	0,620	0,550	0,430	0,130	0,050	0,030	0,020							
	0,920	0,430	0,550	0,630	0,580	0,430	0,120	0,050	0,020	0,020							
	0,870	0,410	0,550	0,610	0,570	0,470	0,140	0,060	0,013	0,030							
	0,890	0,400	0,540	0,620	0,570	0,480	0,150	0,050	0,030	0,020							
	0,895	0,408	0,553	0,620	0,568	0,453	0,135	0,053	0,023	0,023							
S1T2	1,090	0,420	0,540	0,550	0,500	0,430	0,180	0,050	0,030	0,013							
	1,110	0,410	0,550	0,550	0,520	0,430	0,160	0,050	0,030	0,020							
	1,090	0,390	0,560	0,530	0,510	0,430	0,220	0,060	0,030	0,020							
	1,070	0,410	0,530	0,550	0,510	0,430	0,200	0,050	0,030	0,013							
	1,090	0,408	0,545	0,545	0,510	0,430	0,190	0,053	0,030	0,017							
S2T1	0,670	0,410	0,500	0,590	0,610	0,560	0,480	0,430	0,390	0,390	0,340	0,130	0,060	0,020			
	0,640	0,410	0,480	0,590	0,620	0,570	0,470	0,450	0,430	0,370	0,350	0,160	0,050	0,013			
	0,670	0,390	0,510	0,590	0,620	0,560	0,490	0,440	0,410	0,390	0,360	0,150	0,050	0,020			
	0,680	0,350	0,520	0,590	0,610	0,570	0,490	0,450	0,400	0,400	0,360	0,190	0,050	0,030			
	0,665	0,390	0,503	0,590	0,615	0,565	0,483	0,443	0,408	0,388	0,353	0,158	0,053	0,021			
S2T2	0,800	0,370	0,470	0,530	0,540	0,500	0,470	0,420	0,380	0,350	0,300	0,270	0,200	0,150			
	0,890	0,430	0,500	0,560	0,530	0,530	0,460	0,430	0,410	0,320	0,300	0,230	0,160	0,070			
	0,890	0,440	0,520	0,540	0,560	0,500	0,470	0,430	0,430	0,320	0,300	0,230	0,190	0,090			
	0,830	0,430	0,480	0,550	0,550	0,500	0,490	0,440	0,390	0,350	0,290	0,250	0,180	0,090			
	0,853	0,418	0,493	0,545	0,545	0,508	0,473	0,430	0,403	0,335	0,298	0,245	0,183	0,100			
S3T1	0,530	0,310	0,430	0,520	0,590	0,590	0,540	0,450	0,450	0,410	0,410	0,380	0,370	0,350	1,150	0,160	
	0,540	0,320	0,420	0,510	0,590	0,630	0,530	0,470	0,450	0,430	0,420	0,390	0,390	0,340	1,150	0,160	
	0,480	0,270	0,440	0,490	0,590	0,610	0,550	0,450	0,430	0,430	0,410	0,390	0,370	0,340	1,230	0,190	
	0,490	0,310	0,440	0,500	0,590	0,610	0,530	0,470	0,480	0,440	0,400	0,390	0,400	0,330	1,210	0,170	
	0,510	0,303	0,433	0,505	0,590	0,610	0,538	0,460	0,453	0,428	0,410	0,388	0,383	0,340	1,185	0,170	
S3T2	0,610	0,290	0,400	0,450	0,520	0,520	0,530	0,450	0,440	0,390	0,390	0,330	0,320	0,270	0,930	0,510	
	0,650	0,370	0,470	0,540	0,570	0,550	0,500	0,450	0,430	0,390	0,350	0,310	0,290	0,270	0,970	0,570	
	0,750	0,370	0,500	0,540	0,600	0,590	0,490	0,490	0,430	0,390	0,350	0,360	0,300	0,270	1,000	0,670	
	0,590	0,350	0,460	0,510	0,560	0,540	0,510	0,450	0,430	0,400	0,360	0,320	0,290	0,250	0,950	0,590	
	0,650	0,345	0,458	0,510	0,563	0,550	0,508	0,460	0,433	0,393	0,363	0,330	0,300	0,265	0,963	0,585	
S4T1	0,370	0,210	0,310	0,450	0,540	0,560	0,570	0,560	0,430	0,430	0,430	0,410	0,370	0,370	1,310	1,740	0,760
	0,410	0,220	0,310	0,430	0,520	0,570	0,570	0,530	0,450	0,440	0,410	0,410	0,370	0,370	1,340	1,760	0,790
	0,390	0,190	0,320	0,440	0,510	0,560	0,550	0,540	0,460	0,430	0,410	0,410	0,380	0,390	1,290	1,700	0,780
	0,360	0,200	0,320	0,410	0,510	0,570	0,560	0,550	0,460	0,450	0,420	0,390	0,380	0,390	1,340	1,720	0,770
	0,383	0,205	0,315	0,433	0,520	0,565	0,563	0,545	0,450	0,438	0,418	0,405	0,375	0,380	1,320	1,730	0,775
S4T2	0,610	0,300	0,410	0,470	0,550	0,550	0,520	0,520	0,450	0,440	0,390	0,350	0,330	0,330	1,170	1,110	0,500
	0,600	0,300	0,430	0,520	0,560	0,570	0,530	0,510	0,440	0,420	0,390	0,360	0,340	0,330	1,130	1,200	0,600
	0,530	0,300	0,400	0,500	0,550	0,570	0,520	0,510	0,450	0,420	0,390	0,370	0,330	0,310	1,110	1,170	0,530
	0,330	0,310	0,410	0,530	0,550	0,570	0,530	0,530	0,440	0,410	0,370	0,370	0,330	0,330	1,130	1,230	0,620
	0,518	0,303	0,413	0,505	0,553	0,565	0,525	0,518	0,445	0,423	0,385	0,363	0,333	0,325	1,135	1,178	0,563

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

Tabela A8 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $5,12 \times 10^4$ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	pH do Vinho	Fermento			Etanol	Rendimento	Açúcar	Glicerol	Viabilidade	Células				
		Úmido	Seco	Matéria										
											da	Residual	Celular	Viáveis
		(g/100mL)	(%)	(% v/v)	(%)	(g/100mL)	(%)	(cel/mL)						
S1T1	3,16	2,00	0,45	22,47	4,54	87	0,00156	0,2600	0	0				
	3,13	1,80	0,41	22,59	4,66	89	0,00153	0,2400						
	3,12	2,00	0,45	22,52	4,66	89	0,00128	0,2780						
	3,05	2,00	0,44	21,86	4,66	89	0,00121	0,2520	0	0				
	Média	3,12	1,95	0,44	22,36	4,63	89	0,00139	0,2575	0	0			
		3,17	1,80	0,39	21,60	4,66	89	0,00115	0,2420	0	0			
S1T2	2,94	1,90	0,41	21,63	4,66	89	0,00184	0,2390						
	2,94	1,90	0,41	21,43	4,54	87	0,00200	0,2560						
	2,90	1,90	0,40	20,98	4,66	89	0,00156	0,2600	0	0				
	Média	2,99	1,88	0,40	21,41	4,63	89	0,00164	0,2493	0	0			
		2,80	2,10	0,49	23,48	6,92	89	0,00165	0,4520	0	0			
		2,83	2,10	0,52	24,61	6,92	89	0,00190	0,4480					
S2T1	2,84	2,00	0,49	24,32	6,92	89	0,00168	0,4570						
	2,81	2,40	0,58	24,08	6,92	89	0,00165	0,4290	0	0				
	Média	2,82	2,15	0,52	24,12	6,92	89	0,00172	0,4465	0	0			
		2,81	2,10	0,53	25,12	7,06	91	0,00209	0,3890	0	0			
		2,79	1,90	0,48	25,48	7,06	91	0,00212	0,3700					
		2,81	1,90	0,47	24,92	7,06	91	0,00200	0,3780					
S2T2	2,78	1,70	0,42	24,39	6,92	89	0,00187	0,3640	0	0				
	Média	2,80	1,90	0,48	24,98	7,03	91	0,00202	0,3753	0	0			
		2,81	2,10	0,54	25,58	9,22	89	0,00212	0,6190	0	0			
		2,81	1,80	0,46	25,70	9,08	87	0,00215	0,6260					
		2,81	2,10	0,54	25,51	9,22	89	0,00190	0,6510					
	S3T1	2,81	2,00	0,52	25,98	9,08	87	0,00256	0,6380	0	0			
Média	2,81	2,00	0,52	25,69	9,15	88	0,00219	0,6335	0	0				
S3T2	2,82	1,90	0,52	27,22	9,22	89	0,21330	0,4760	4,4	2,00 x 10 ⁷				
	2,84	1,80	0,50	27,97	9,22	89	0,21550	0,5630						
	2,81	1,90	0,54	28,46	9,22	89	0,21340	0,5310						
		2,79	1,90	0,53	27,96	9,22	89	0,21150	0,5490	5,06	3,60 x 10 ⁷			
	Média	2,82	1,88	0,52	27,90	9,22	89	0,21343	0,5298	4,73	2,80 x 10 ⁷			
		2,83	1,90	0,54	28,41	11,90	91	0,00541	0,7900	0	0			
S4T1	2,83	2,10	0,64	30,48	11,14	86	0,00463	0,9090						
	2,83	1,70	0,51	30,23	11,44	88	0,00576	0,8160						
	2,83	2,10	0,63	30,17	11,30	87	0,00435	0,7830	0	0				
	Média	2,83	1,95	0,58	29,82	11,45	88	0,00504	0,8245	0	0			
		2,82	1,90	0,56	29,42	9,80	75	2,68120	0,6630	0	0			
		2,81	1,80	0,53	29,65	10,08	77	1,92430	0,6860					
S4T2	3,04	1,70	0,50	29,51	10,24	79	2,00740	0,6920						
	3,03	1,70	0,51	29,77	10,24	79	2,25030	0,7020	0	0				
	Média	2,93	1,78	0,53	29,59	10,09	78	2,21580	0,6858	0	0			

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

Tabela A9 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 3,50 e inóculo de $5,12 \times 10^4$ células viáveis / mL (média) com 90% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	Fator de Conversão Substrato em Produto	Fator de Conversão Substrato em Produto	Velocidade Média de Crescimento Celular	Velocidade Média de Formação de Etanol	Velocidade Média de Consumo de Substrato
	(Y _{XS})	(Y _{PS})	(g/L/h)	(mL/L/h)	(g/L/h)
S1T1 Média	0,05591	0,44523	0,22500	2,270	4,024
	0,05094	0,45700	0,20500	2,330	4,024
	0,05591	0,45698	0,22500	2,330	4,024
	0,05467	0,45698	0,22000	2,330	4,024
	0,05436	0,45405	0,21875	2,315	4,024
	0,04845	0,45698	0,19500	2,330	4,024
	0,05094	0,45702	0,20500	2,330	4,024
S1T2 Média	0,05094	0,44526	0,20500	2,270	4,024
	0,04970	0,45700	0,20000	2,330	4,024
	0,05001	0,45406	0,20125	2,315	4,024
	0,04087	0,45561	0,19600	2,768	4,795
S2T1 Média	0,04338	0,45561	0,20800	2,768	4,795
	0,04087	0,45561	0,19600	2,768	4,795
	0,04838	0,45561	0,23200	2,768	4,795
	0,04338	0,45561	0,20800	2,768	4,795
	0,04421	0,46484	0,22083	2,942	4,995
S2T2 Média	0,04004	0,46484	0,20000	2,942	4,995
	0,03921	0,46484	0,19583	2,942	4,995
	0,03503	0,45561	0,17500	2,883	4,995
	0,03962	0,46253	0,19792	2,927	4,995
S3T1 Média	0,03359	0,45263	0,17419	2,974	5,186
	0,02861	0,44576	0,14839	2,929	5,186
	0,03359	0,45262	0,17419	2,974	5,186
	0,03234	0,44577	0,16774	2,929	5,186
	0,03203	0,44920	0,16613	2,952	5,186
	0,03277	0,45866	0,15758	2,794	4,808
	0,03152	0,45872	0,15151	2,794	4,807
S3T2 Média	0,03403	0,45866	0,16364	2,794	4,808
	0,03340	0,45860	0,16061	2,794	4,809
	0,03293	0,45866	0,15833	2,794	4,808
	0,02687	0,46742	0,13171	2,902	4,901
S4T1 Média	0,03185	0,43755	0,15610	2,717	4,901
	0,02538	0,44936	0,12439	2,790	4,901
	0,03135	0,44383	0,15366	2,756	4,901
	0,02886	0,44954	0,14146	2,791	4,901
	0,03215	0,44407	0,13658	2,390	4,248
	0,02916	0,43774	0,12927	2,459	4,433
	0,02764	0,44673	0,12195	2,498	4,413
S4T2 Média	0,02857	0,45280	0,12439	2,498	4,354
	0,02936	0,44531	0,12805	2,461	4,362

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

Tabela A10 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) durante a fermentação alcoólica com pH inicial 5,0 e inóculo de 4,20 x 10⁴ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h	19 h	20 h	21 h	22 h	23 h	24 h	25 h	26 h	27 h	31 h	38 h	49 h
g CO ₂ /100mL																	
S1T1	1,460	0,660	0,720	0,570	0,230	0,060	0,030	0,010	0,020	0,020							
	1,420	0,660	0,700	0,560	0,250	0,040	0,030	0,010	0,020	0,010							
	1,390	0,640	0,710	0,580	0,240	0,060	0,030	0,010	0,020	0,010							
	1,360	0,650	0,690	0,580	0,280	0,050	0,050	0,000	0,030	0,010							
	1,408	0,653	0,705	0,573	0,250	0,053	0,035	0,008	0,023	0,013							
Media	1,210	0,490	0,530	0,580	0,560	0,310	0,060	0,050	0,020	0,030							
S1T2	1,190	0,510	0,530	0,580	0,550	0,320	0,070	0,030	0,040	0,030							
	1,220	0,490	0,520	0,570	0,540	0,350	0,080	0,050	0,010	0,030							
	1,150	0,490	0,550	0,570	0,560	0,320	0,080	0,050	0,020	0,030							
	1,193	0,495	0,533	0,575	0,553	0,325	0,073	0,045	0,023	0,030							
	1,100	0,610	0,700	0,600	0,570	0,520	0,500	0,470	0,230	0,090	0,030	0,030	0,020				
S2T1	1,030	0,600	0,680	0,630	0,560	0,510	0,470	0,490	0,270	0,100	0,030	0,030	0,040				
	1,070	0,590	0,700	0,610	0,570	0,530	0,520	0,430	0,270	0,090	0,030	0,020	0,030				
	1,050	0,590	0,700	0,630	0,580	0,510	0,530	0,410	0,330	0,090	0,050	0,030	0,010				
	1,063	0,598	0,695	0,618	0,570	0,518	0,505	0,450	0,275	0,093	0,035	0,028	0,025				
	0,870	0,430	0,490	0,530	0,570	0,550	0,480	0,470	0,410	0,380	0,290	0,100	0,040				
Media	0,980	0,480	0,530	0,550	0,570	0,550	0,490	0,450	0,390	0,370	0,160	0,070	0,030				
S2T2	0,960	0,470	0,530	0,550	0,580	0,530	0,510	0,450	0,380	0,370	0,190	0,070	0,040				
	0,920	0,470	0,520	0,550	0,590	0,550	0,510	0,450	0,410	0,350	0,230	0,070	0,040				
	0,933	0,463	0,518	0,545	0,578	0,545	0,498	0,455	0,398	0,368	0,218	0,078	0,038				
	0,770	0,440	0,560	0,670	0,620	0,530	0,570	0,540	0,510	0,460	0,430	0,420	0,390	0,330	0,250	0,100	
	0,750	0,430	0,570	0,670	0,610	0,550	0,550	0,510	0,490	0,450	0,430	0,450	0,390	0,330	0,270	0,100	
S3T1	0,690	0,410	0,540	0,670	0,610	0,540	0,520	0,510	0,490	0,440	0,420	0,400	0,370	0,330	0,370	0,100	
	0,710	0,430	0,550	0,660	0,650	0,550	0,560	0,540	0,470	0,460	0,430	0,430	0,430	0,310	0,280	0,100	
	0,730	0,428	0,555	0,668	0,623	0,543	0,550	0,525	0,490	0,453	0,428	0,425	0,395	0,330	0,290	0,100	
	0,590	0,250	0,350	0,480	0,530	0,590	0,560	0,510	0,470	0,450	0,410	0,400	0,350	0,350	0,980	0,230	
	0,750	0,330	0,470	0,570	0,630	0,590	0,490	0,500	0,470	0,390	0,410	0,390	0,360	0,350	0,880	0,220	
S3T2	0,690	0,330	0,440	0,570	0,600	0,600	0,520	0,490	0,450	0,420	0,400	0,400	0,370	0,330	0,940	0,200	
	0,660	0,320	0,460	0,550	0,590	0,620	0,510	0,490	0,460	0,440	0,410	0,390	0,370	0,320	0,970	0,210	
	0,673	0,308	0,430	0,543	0,588	0,600	0,520	0,498	0,463	0,425	0,408	0,395	0,363	0,340	0,940	0,220	
	0,450	0,320	0,290	0,540	0,610	0,650	0,530	0,570	0,530	0,450	0,470	0,440	0,420	0,380	1,550	1,250	0,250
	0,450	0,330	0,290	0,520	0,610	0,640	0,570	0,530	0,560	0,470	0,470	0,450	0,430	0,390	1,460	1,320	0,280
S4T1	0,450	0,310	0,270	0,510	0,590	0,620	0,520	0,540	0,530	0,450	0,460	0,430	0,400	0,380	1,460	1,370	0,280
	0,450	0,280	0,310	0,510	0,590	0,630	0,530	0,540	0,540	0,440	0,470	0,440	0,420	0,420	1,510	1,320	0,240
	0,450	0,310	0,290	0,520	0,600	0,635	0,538	0,545	0,540	0,453	0,468	0,440	0,418	0,390	1,500	1,320	0,260
	0,360	0,150	0,120	0,240	0,330	0,430	0,530	0,570	0,570	0,480	0,470	0,450	0,430	0,410	1,460	1,610	1,190
	0,410	0,170	0,160	0,310	0,380	0,510	0,590	0,610	0,550	0,490	0,470	0,440	0,430	0,410	1,470	1,590	1,100
S4T2	0,350	0,170	0,160	0,290	0,350	0,500	0,550	0,590	0,590	0,450	0,490	0,450	0,410	0,390	1,470	1,530	1,070
	0,330	0,170	0,150	0,290	0,350	0,480	0,550	0,600	0,610	0,460	0,490	0,460	0,430	0,410	1,420	1,670	1,090
	0,363	0,165	0,148	0,283	0,353	0,480	0,555	0,593	0,580	0,470	0,480	0,450	0,425	0,410	1,460	1,600	1,110
	0,363	0,165	0,148	0,283	0,353	0,480	0,555	0,593	0,580	0,470	0,480	0,450	0,425	0,410	1,460	1,600	1,110
	0,363	0,165	0,148	0,283	0,353	0,480	0,555	0,593	0,580	0,470	0,480	0,450	0,425	0,410	1,460	1,600	1,110

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

Tabela A11 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 5,0 e inóculo de $4,20 \times 10^4$ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	pH do Vinho	Fermento			Etanol	Rendimento	Açúcar	Glicerol	Viabilidade	Células				
		Úmido	Seco	Matéria							da	Residual	Celular	Viáveis
Seca			Fermentação											
		(g/100mL)	(%)	(% v/v)	(%)	(g/100mL)	(%)	(cel/mL)						
S1T1 Média	3,21	3,60	0,67	18,70	4,26	82	0,00331	0,3870	92	3,92 x 10 ⁸				
	3,44	3,40	0,69	20,39	4,26	82	0,00369	0,3220						
	3,39	3,60	0,77	21,26	4,24	82	0,00334	0,3320						
	3,39	3,40	0,70	20,55	4,24	82	0,00284	0,3450	85	4,56 x 10 ⁸				
	3,36	3,50	0,71	20,23	4,25	82	0,00330	0,3465	89	4,24 x 10 ⁸				
	3,42	3,10	0,66	21,35	4,30	83	0,00291	0,3090	83	3,24 x 10 ⁸				
	3,47	3,10	0,65	21,01	4,30	83	0,00303	0,2690						
S1T2 Média	3,44	3,00	0,66	22,15	4,32	83	0,00353	0,3480						
	3,42	3,00	0,65	21,73	4,34	84	0,00356	0,3080	72	2,44 x 10 ⁸				
	3,44	3,05	0,66	21,56	4,32	83	0,00326	0,3085	78	2,84 x 10 ⁸				
	3,48	4,10	0,91	22,15	6,38	80	0,00463	0,5090	96	4,28 x 10 ⁸				
	3,37	3,70	0,81	21,86	6,42	80	0,00441	0,5230						
S2T1 Média	3,47	3,80	0,85	22,26	6,44	81	0,00510	0,5250						
	3,47	3,90	0,86	21,93	6,40	80	0,00472	0,5170	99	4,92 x 10 ⁸				
	3,45	3,88	0,86	22,05	6,41	80	0,00472	0,5185	98	4,6 x 10 ⁸				
	3,38	3,00	0,72	23,94	6,50	81	0,00410	0,4660	84	2,72 x 10 ⁸				
S2T2 Média	3,43	3,10	0,74	23,94	6,50	81	0,00472	0,4500						
	3,39	3,10	0,76	24,43	6,50	81	0,00479	0,4160						
	3,36	3,10	0,75	24,16	6,50	81	0,00507	0,4580	78	2,88 x 10 ⁸				
	3,39	3,08	0,74	24,12	6,50	81	0,00467	0,4475	81	2,80 x 10 ⁸				
	3,40	3,90	0,97	24,79	8,68	83	0,00639	0,6280	93	5,48 x 10 ⁸				
S3T1 Média	3,40	3,90	0,96	24,62	8,64	83	0,00673	0,6410						
	3,43	3,90	0,96	24,64	8,70	83	0,00610	0,6280						
	3,43	3,80	0,93	24,52	8,64	83	0,00670	0,6250	84	3,88 x 10 ⁸				
	3,42	3,88	0,96	24,64	8,67	83	0,00648	0,6305	89	4,68 x 10 ⁸				
	3,41	2,30	0,70	30,26	8,80	84	0,00651	0,5940	18	6,00 x 10 ⁷				
S3T2 Média	3,43	2,30	0,66	28,76	8,72	84	0,00604	0,5930						
	3,43	2,20	0,63	28,60	8,76	84	0,00642	0,6080						
	3,65	2,40	0,68	28,35	8,80	84	0,00639	0,5940	28	1,60 x 10 ⁸				
	3,48	2,30	0,67	28,99	8,77	84	0,00634	0,5973	23	2,20 x 10 ⁸				
	3,80	3,20	0,85	26,47	10,94	82	0,00670	0,7900	58	3,40 x 10 ⁸				
S4T1 Média	3,72	3,10	0,84	27,23	10,84	81	0,00642	0,8070						
	3,68	3,10	0,84	26,95	10,94	82	0,00626	0,7920						
	3,68	3,00	0,82	27,36	10,88	82	0,00676	0,8340	49	2,92 x 10 ⁸				
	3,72	3,10	0,84	27,00	10,90	82	0,00654	0,8058	54	3,16 x 10 ⁸				
	3,58	1,80	0,59	32,96	11,06	83	0,00657	0,7950	6	4,80 x 10 ⁸				
S4T2 Média	3,61	2,10	0,68	32,49	10,92	82	0,00657	0,8150						
	3,58	1,80	0,60	33,45	10,98	82	0,00657	0,8390						
	3,57	1,80	0,60	33,39	10,96	82	0,00657	0,8380	8	4,80 x 10 ⁸				
	3,59	1,88	0,62	33,07	10,98	82	0,00657	0,8218	7	4,80 x 10 ⁸				

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

Tabela A12 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final de fermentação, com pH inicial 5,0 e inóculo de $4,20 \times 10^4$ células viáveis / mL (média) com 88% de viabilidade, em função da concentração de substrato e temperatura, em meio sintético de glicose.

Tratamentos	Fator de Conversão Substrato em Células	Fator de Conversão Substrato em Produto	Velocidade Média de Crescimento Celular	Velocidade Média de Formação de Etanol	Velocidade Média de Consumo de Substrato
	(Y _{XS})	(Y _{PS})	(g/L/h)	(mL/L/h)	(g/L/h)
S1T1 Média	0,08378	0,42048	0,37222	2,367	4,443
	0,08629	0,42050	0,38333	2,367	4,442
	0,09629	0,41850	0,42778	2,356	4,443
	0,08753	0,41848	0,38889	2,356	4,443
	0,08879	0,41949	0,39444	2,361	4,443
	0,08253	0,42440	0,34737	2,263	4,209
	0,08128	0,42441	0,34210	2,263	4,209
S1T2 Média	0,08254	0,42641	0,34737	2,274	4,209
	0,08129	0,42839	0,34210	2,284	4,209
	0,08253	0,42640	0,34737	2,274	4,209
	0,07389	0,40890	0,41364	2,900	5,598
S2T1 Média	0,06577	0,41145	0,36818	2,918	5,598
	0,06902	0,41276	0,38636	2,927	5,598
	0,06983	0,41018	0,39091	2,909	5,598
	0,06983	0,41082	0,39091	2,914	5,598
	0,05846	0,41657	0,30000	2,708	5,132
	0,06009	0,41659	0,30833	2,708	5,131
	0,06171	0,41659	0,31667	2,708	5,131
S2T2 Média	0,06090	0,41660	0,31250	2,708	5,131
	0,06009	0,41659	0,30833	2,708	5,131
	0,06020	0,42518	0,34643	3,100	5,755
	0,05958	0,42323	0,34286	3,086	5,755
S3T1 Média	0,05958	0,42615	0,34286	3,107	5,755
	0,05772	0,42323	0,33214	3,086	5,755
	0,05958	0,42469	0,34286	3,096	5,755
	0,04344	0,43106	0,23333	2,933	5,371
	0,04096	0,42713	0,22000	2,907	5,371
	0,03910	0,42910	0,21000	2,920	5,371
	0,04220	0,43105	0,22667	2,933	5,371
S3T2 Média	0,04158	0,42958	0,22333	2,923	5,371
	0,04134	0,41992	0,22368	2,879	5,411
	0,04085	0,41608	0,22105	2,853	5,411
	0,04085	0,41991	0,22105	2,879	5,412
S4T1 Média	0,03988	0,41762	0,21579	2,863	5,411
	0,04085	0,41838	0,22105	2,868	5,411
	0,02869	0,42452	0,13409	2,514	4,674
	0,03307	0,41915	0,15454	2,482	4,674
S4T2 Média	0,02918	0,42145	0,13636	2,495	4,674
	0,02918	0,42069	0,13636	2,491	4,674
	0,03015	0,42145	0,14091	2,495	4,674

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L. T1 - 32°C; T2 - 38°C.

7.3. A fermentação alcoólica em diferentes substratos

7.3.1. A fermentação alcoólica em substrato de sacarose

7.3.2. A fermentação alcoólica em substrato de xarope

7.3.3. A fermentação alcoólica em substrato de melaço de menor pureza

7.3.4. A fermentação alcoólica em substrato de melaço de maior pureza

7.4. Cinética de liberação de CO₂ em diferentes substratos

7.4.1. Substrato de sacarose

7.4.2. Substrato de xarope industrial de fabricação de açúcar

7.4.3. Substrato de melaço de menor pureza, de fabricação de açúcar

7.4.4. Substrato de melaço de maior pureza, de fabricação de açúcar

Tabela A13 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de sacarose com 80g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,880	0,760	0,787	0,873	0,825
2	1,813	1,793	1,820	1,807	1,808
3	0,807	0,893	0,880	0,800	0,845
4	0,100	0,140	0,100	0,133	0,118
5	0,047	0,040	0,040	0,067	0,049
6	0,033	0,047	0,047	0,047	0,044
7	0,033	0,033	0,033	0,033	0,033
8	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027

Tabela A14 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de sacarose com 120g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,860	0,700	0,747	0,800	0,777
2	1,833	1,733	1,787	1,813	1,792
3	1,540	1,633	1,620	1,567	1,590
4	0,933	1,040	0,987	0,973	0,983
5	0,247	0,260	0,260	0,267	0,259
6	0,073	0,080	0,067	0,073	0,073
7	0,040	0,033	0,033	0,033	0,035
8	0,040	0,027	0,027	0,020	0,029

Tabela A15 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de sacarose com 160g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				
	1	2	3	4	Média
1	0,727	0,693	0,660	0,680	0,690
2	1,687	1,687	1,620	1,680	1,669
3	1,567	1,600	1,573	1,573	1,578
4	1,227	1,267	1,293	1,247	1,259
5	0,867	0,900	0,887	0,860	0,879
6	0,633	0,633	0,673	0,620	0,640
7	0,473	0,473	0,447	0,447	0,460
8	0,300	0,287	0,320	0,320	0,307
9	0,127	0,120	0,133	0,133	0,128
10	0,053	0,067	0,040	0,047	0,052

Tabela A16 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de sacarose com 200g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,527	0,493	0,527	0,540	0,522
2	1,407	1,367	1,413	1,440	1,407
3	1,513	1,533	1,520	1,520	1,522
4	1,307	1,307	1,333	1,320	1,317
5	0,993	1,047	1,007	0,980	1,007
6	0,760	0,807	0,800	0,767	0,784
7	0,647	0,660	0,647	0,627	0,645
8	0,533	0,560	0,573	0,553	0,555
9	0,480	0,493	0,520	0,507	0,500
10	0,413	0,420	0,440	0,400	0,418
11	0,380	0,373	0,380	0,380	0,378
12	0,287	0,260	0,267	0,273	0,272

Tabela A17 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de xarope com 80g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,813	1,853	1,880	1,900	1,862
2	1,273	1,293	1,273	1,267	1,277
3	0,440	0,400	0,367	0,380	0,397
4	0,073	0,087	0,073	0,093	0,082
5	0,053	0,033	0,060	0,060	0,052
6	0,033	0,033	0,040	0,040	0,037
7	0,027	0,033	0,047	0,033	0,035
8	0,033	0,027	0,033	0,033	0,032

Tabela A18 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de xarope com 120g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,547	1,533	1,547	1,580	1,552
2	1,813	1,827	1,787	1,820	1,812
3	1,387	1,393	1,367	1,347	1,374
4	0,573	0,560	0,487	0,580	0,550
5	0,147	0,153	0,153	0,147	0,150
6	0,053	0,053	0,067	0,047	0,055
7	0,053	0,053	0,047	0,047	0,050
8	0,053	0,053	0,047	0,047	0,050
9	0,053	0,053	0,047	0,047	0,050
10	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013

Tabela A19 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de xarope com 160g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁶ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,627	1,553	1,573	1,600	1,588
2	1,893	1,853	1,893	1,847	1,872
3	1,493	1,480	1,467	1,460	1,475
4	1,020	1,047	1,013	1,007	1,022
5	0,660	0,680	0,655	0,653	0,662
6	0,487	0,473	0,460	0,453	0,468
7	0,287	0,313	0,287	0,320	0,302
8	0,107	0,153	0,127	0,140	0,132
9	0,060	0,120	0,067	0,073	0,080
10	0,060	0,073	0,060	0,067	0,065

Tabela A20 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de xarope com 200g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				
	1	2	3	4	Média
1	1,533	1,407	1,453	1,433	1,457
2	1,940	1,933	1,940	1,880	1,923
3	1,453	1,467	1,460	1,447	1,457
4	1,040	1,080	1,053	1,067	1,060
5	0,780	0,773	0,767	0,780	0,775
6	0,580	0,587	0,593	0,627	0,597
7	0,440	0,447	0,453	0,447	0,447
8	0,327	0,347	0,393	0,407	0,369
9	0,260	0,313	0,267	0,260	0,275
10	0,180	0,173	0,207	0,247	0,202
11	0,187	0,187	0,200	0,213	0,197
12	0,153	0,133	0,133	0,120	0,135
13	0,067	0,133	0,107	0,187	0,124
14	0,080	0,100	0,153	0,087	0,105
15	0,067	0,093	0,067	0,107	0,084
16	0,057	0,053	0,033	0,053	0,049

Tabela A21 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melaço de menor pureza com 80g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,907	0,900	0,927	0,947	0,920
2	1,393	1,440	1,400	1,373	1,402
3	0,860	0,867	0,827	0,827	0,845
4	0,267	0,273	0,267	0,267	0,269
5	0,127	0,093	0,093	0,113	0,107
6	0,047	0,053	0,067	0,047	0,054
7	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040
8	0,027	0,020	0,033	0,033	0,028

Tabela A22 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melaço de menor pureza com 120g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁶ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				
	1	2	3	4	Média
1	0,320	0,320	0,327	0,313	0,320
2	0,413	0,413	0,420	0,413	0,415
3	0,360	0,387	0,360	0,380	0,372
4	0,287	0,333	0,320	0,320	0,315
5	0,267	0,320	0,273	0,300	0,290
6	0,227	0,240	0,247	0,253	0,242
7	0,220	0,227	0,247	0,233	0,232
8	0,173	0,213	0,200	0,207	0,198
9	0,187	0,200	0,207	0,207	0,200
10	0,140	0,180	0,167	0,153	0,160
11	0,160	0,173	0,153	0,180	0,167
12	0,153	0,120	0,153	0,107	0,133
13	0,147	0,160	0,127	0,167	0,150
14	0,120	0,140	0,153	0,147	0,140
15	0,133	0,127	0,127	0,127	0,129
16	0,107	0,113	0,100	0,113	0,108

Tabela A23 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melaço de menor pureza com 160g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,247	0,220	0,227	0,227	0,230
2	0,320	0,320	0,327	0,307	0,319
3	0,273	0,273	0,260	0,260	0,267
4	0,173	0,213	0,220	0,200	0,202
5	0,160	0,180	0,160	0,167	0,167
6	0,153	0,167	0,153	0,140	0,153
7	0,127	0,147	0,140	0,160	0,144
8	0,113	0,120	0,127	0,107	0,117
9	0,113	0,127	0,120	0,107	0,117
10	0,100	0,100	0,100	0,087	0,097
11	0,093	0,013	0,073	0,087	0,067
12	0,080	0,073	0,127	0,093	0,093
13	0,080	0,093	0,073	0,107	0,088
14	0,060	0,067	0,087	0,053	0,067
15	0,067	0,100	0,073	0,087	0,082
16	0,073	0,060	0,087	0,060	0,070

Tabela A24 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melaço de menor pureza com 200g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁶ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,140	0,113	0,127	0,120	0,125
2	0,160	0,193	0,173	0,167	0,173
3	0,120	0,120	0,127	0,140	0,127
4	0,093	0,107	0,107	0,093	0,100
5	0,067	0,073	0,073	0,067	0,070
6	0,053	0,067	0,047	0,053	0,055
7	0,040	0,047	0,053	0,047	0,047
8	0,047	0,047	0,047	0,033	0,044
9	0,033	0,027	0,027	0,027	0,029
10	0,033	0,047	0,047	0,033	0,040
11	0,040	0,033	0,040	0,027	0,035
12	0,040	0,033	0,033	0,040	0,037
13	0,027	0,040	0,033	0,033	0,033
14	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027

Tabela A25 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melaço de maior pureza com 80g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,780	1,873	1,793	1,827	1,818
2	1,447	1,367	1,400	1,327	1,385
3	0,233	0,187	0,213	0,173	0,202
4	0,073	0,053	0,067	0,100	0,073
5	0,047	0,060	0,040	0,040	0,047
6	0,040	0,033	0,033	0,033	0,035

Tabela A26 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melaço de maior pureza com 120g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,873	1,827	1,800	1,833	1,833
2	1,820	1,853	1,867	1,820	1,840
3	0,933	0,920	0,920	0,940	0,928
4	0,420	0,447	0,413	0,413	0,423
5	0,200	0,193	0,180	0,207	0,195
6	0,067	0,067	0,073	0,080	0,072

Tabela A27 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melaço de maior pureza com 160g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				
	1	2	3	4	Média
1	1,427	1,400	1,380	1,360	1,392
2	1,720	1,727	1,700	1,707	1,714
3	1,060	1,053	1,040	1,040	1,048
4	0,660	0,660	0,660	0,673	0,663
5	0,520	0,507	0,500	0,507	0,509
6	0,313	0,333	0,353	0,380	0,345
7	0,280	0,280	0,260	0,240	0,265
8	0,187	0,220	0,213	0,220	0,210
9	0,173	0,167	0,173	0,140	0,163
10	0,160	0,133	0,107	0,120	0,130
11	0,093	0,113	0,087	0,087	0,095
12	0,067	0,040	0,093	0,087	0,072
13	0,053	0,060	0,047	0,053	0,053
14	0,033	0,047	0,032	0,033	0,036
15	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027
16	0,027	0,027	0,027	0,020	0,025

Tabela A28 – Resultados da cinética de liberação de CO₂ (g/100mL de vinho) em substrato de melaço de maior pureza com 200g / L de ART, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,147	1,173	1,120	1,127	1,142
2	1,253	1,220	1,260	1,187	1,230
3	0,807	0,793	0,820	0,773	0,798
4	0,593	0,593	0,573	0,553	0,578
5	0,467	0,467	0,440	0,427	0,450
6	0,353	0,367	0,360	0,367	0,362
7	0,320	0,300	0,287	0,260	0,292
8	0,247	0,247	0,293	0,207	0,249
9	0,227	0,213	0,147	0,207	0,199
10	0,180	0,153	0,140	0,127	0,150
11	0,147	0,133	0,140	0,120	0,135
12	0,133	0,113	0,093	0,073	0,103
13	0,113	0,080	0,087	0,073	0,088
14	0,087	0,080	0,067	0,053	0,072
15	0,087	0,053	0,067	0,053	0,065
16	0,067	0,047	0,040	0,040	0,049

Tabela A29 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final da fermentação, com o meio de sacarose, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.

Tratamentos	pH	Fermento			Etanol	Rendimento Fermentação	Açúcar Residual	Glicerol	Viabilidade Celular	Células Viáveis
		Úmido	Seco	Matéria Seca						
S1	3,63	9,80	2,39	24,41	4,40	88	0,08800	0,78800	77	$3,96 \times 10^8$
	3,62	9,90	2,42	24,42	4,40	88	0,08600	0,85100	60	$4,96 \times 10^8$
	3,60	9,98	2,43	24,37	4,38	88	0,08400	0,80700	72	$3,76 \times 10^8$
	3,62	9,78	2,40	24,53	4,40	88	0,08400	0,83800	54	$3,76 \times 10^8$
	Media	3,62	9,87	2,41	24,43	4,40	88	0,08550	0,82100	66
S2	3,70	8,80	2,31	26,25	6,46	89	0,11500	1,05300	47	$3,00 \times 10^8$
	3,56	9,18	2,43	26,46	6,42	89	0,11500	1,05900	55	$3,28 \times 10^8$
	3,59	9,15	2,41	26,33	6,44	89	0,10300	1,09800	39	$1,84 \times 10^8$
	3,60	9,05	2,38	26,26	6,48	89	0,11000	1,06400	49	$3,88 \times 10^8$
	Média	3,61	9,05	2,38	26,33	6,45	89	0,11075	1,06850	48
S3	3,68	8,33	2,36	28,33	8,88	87	0,12200	1,29700	48	$4,24 \times 10^8$
	3,65	8,50	2,42	28,49	8,80	87	0,12700	1,30000	32	$2,28 \times 10^8$
	3,69	8,50	2,39	28,16	8,80	87	0,13400	1,29200	29	$2,12 \times 10^8$
	3,69	8,50	2,38	28,04	8,88	87	0,12900	1,22100	35	$3,04 \times 10^8$
	Média	3,68	8,46	2,39	28,26	8,84	87	0,12800	1,27750	36
S4	3,63	8,30	2,44	29,40	11,10	87	0,10000	1,50000	37	$2,76 \times 10^8$
	3,63	8,33	2,47	29,65	10,96	86	0,10000	1,47200	38	$3,32 \times 10^8$
	3,69	8,43	2,44	28,92	11,06	87	0,10300	1,43400	34	$3,08 \times 10^8$
	3,68	8,35	2,42	28,94	11,08	87	0,10500	1,43900	45	$3,80 \times 10^8$
	Media	3,66	8,35	2,44	29,23	11,05	87	0,10200	1,46125	39

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L.

Tabela A30 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final da fermentação, com o meio de xarope, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.

Tratamentos	pH	Fermento			Etanol	Rendimento	Açúcar Residual	Glicerol	Viabilidade Celular	Células Viáveis
		Úmido	Seco	Matéria Seca						
		(g/100mL)	(%MS)	(%v/v)	(%)		(g/100mL)	(%)		
S1	3,87	9,68	2,29	23,64	4,22	89	0,14800	0,84600	74	4,40 x 10 ⁸
	3,87	9,80	2,28	23,30	4,18	88	0,14600	0,85600	81	4,16 x 10 ⁸
	3,88	9,95	2,33	23,41	4,22	88	0,16800	0,82600	78	3,88 x 10 ⁸
	3,92	9,85	2,31	23,50	4,22	88	0,14600	0,81100	78	5,24 x 10 ⁸
Média	3,89	9,82	2,30	23,46	4,21	88	0,15200	0,83475	78	4,42 x 10 ⁸
S2	3,98	8,95	2,31	25,83	6,22	84	0,18000	1,06100	65	2,44 x 10 ⁸
	3,99	9,28	2,35	25,36	6,24	84	0,17900	1,14500	64	4,68 x 10 ⁸
	3,97	9,20	2,32	25,23	6,26	84	0,17900	1,14000	67	3,48 x 10 ⁸
	3,98	9,10	2,31	25,33	6,30	85	0,18000	1,16000	64	3,80 x 10 ⁸
Média	3,98	9,13	2,32	25,44	6,26	84	0,17950	1,12650	65	3,60 x 10 ⁸
S3	4,09	6,75	1,99	29,53	8,42	84	0,15500	1,33400	19	9,60 x 10 ⁷
	4,08	6,95	2,00	28,84	8,42	84	0,17500	1,31900	29	1,80 x 10 ⁸
	4,08	6,88	2,00	29,10	8,48	84	0,28700	1,29700	24	1,60 x 10 ⁸
	4,08	6,88	2,00	29,05	8,44	84	0,21600	1,36100	19	1,36 x 10 ⁸
Média	4,08	6,87	2,00	29,13	8,44	84	0,20825	1,32775	23	1,43 x 10 ⁸
S4	4,13	6,90	2,07	30,01	10,02	79	0,39900	1,51800	20	9,60 x 10 ⁷
	4,11	7,08	2,07	29,20	10,32	81	0,39900	1,55100	17	1,60 x 10 ⁸
	4,13	7,13	2,08	29,16	10,36	81	0,40700	1,53400	11	6,40 x 10 ⁷
	4,10	6,95	2,02	29,13	10,32	81	0,35400	1,50500	17	1,16 x 10 ⁸
Média	4,12	7,02	2,06	29,38	10,26	81	0,38975	1,52700	16	1,09 x 10 ⁸

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L.

Tabela A31 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final da fermentação, com o meio de melaço de menor pureza, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.

Tratamentos	pH	Fermento			Etanol	Rendimento	Açúcar Residual	Glicerol	Viabilidade Celular	Células Viáveis
		Úmido	Seco	Matéria Seca						
S1	3,96	7,60	2,15	28,29	4,20	85	0,25800	0,62500	41	2,56 x 10 ⁸
	3,96	7,70	2,17	28,23	4,24	86	0,25100	0,62500	40	1,92 x 10 ⁸
	3,96	7,98	2,24	28,07	4,24	86	0,25800	0,62500	46	3,24 x 10 ⁸
	3,96	7,70	2,16	28,11	4,22	85	0,25100	0,62500	37	2,20 x 10 ⁸
Média	3,96	7,75	2,18	28,18	4,23	86	0,25450	0,62500	41	2,48 x 10 ⁸
S2	3,96	7,48	2,26	30,23	4,00	52	3,58100	0,47900	51	4,24 x 10 ⁸
	3,96	7,58	2,27	29,93	4,20	55	3,35100	0,46000	57	2,64 x 10 ⁸
	3,96	7,55	2,28	30,16	4,12	54	3,27400	0,45300	56	3,64 x 10 ⁸
	3,96	7,60	2,30	30,23	4,08	53	3,99900	0,43400	54	2,80 x 10 ⁸
Média	3,96	7,55	2,28	30,14	4,10	54	3,55125	0,45650	55	3,33 x 10 ⁸
S3	3,94	7,78	2,60	33,39	2,48	28	7,48900	0,28600	44	3,12 x 10 ⁸
	3,93	7,93	2,63	33,11	2,62	29	6,15100	0,32300	47	3,52 x 10 ⁸
	3,93	7,93	2,63	33,21	2,54	28	5,88700	0,31800	37	2,40 x 10 ⁸
	3,92	7,90	2,64	33,40	2,50	28	7,44700	0,33200	39	2,04 x 10 ⁸
Media	3,93	7,89	2,63	33,28	2,54	28	6,74350	0,31475	42	2,77 x 10 ⁸
S4	3,87	7,55	2,94	38,91	0,82	7	16,33000	0,12700	22	1,64 x 10 ⁸
	3,88	7,98	3,14	39,30	0,88	7	16,66000	0,13400	26	1,56 x 10 ⁸
	3,88	7,88	3,09	39,18	0,84	7	16,04000	0,15000	20	1,84 x 10 ⁸
	3,88	7,90	3,13	39,56	0,82	7	16,09000	0,13600	24	1,44 x 10 ⁸
Media	3,88	7,83	3,07	39,24	0,84	7	16,28000	0,13675	23	1,62 x 10 ⁸

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L.

Tabela A32 – Resultados de variáveis analisadas no vinho, no final da fermentação, com o meio de melaço de maior pureza, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.

Tratamentos	pH	Fermento			Etanol	Rendimento	Açúcar Residual	Glicerol	Viabilidade Celular	Células Viáveis
		Úmido	Seco	Matéria Seca						
S1	4,07	6,73	1,96	29,13	3,96	86	0,13100	0,61500	11	$7,20 \times 10^7$
	4,08	7,00	2,04	29,09	3,98	86	0,17500	0,63100	14	$6,00 \times 10^7$
	4,06	6,90	1,98	28,64	3,98	86	0,15800	0,66400	10	$4,80 \times 10^7$
	4,08	7,08	2,02	28,48	3,98	86	0,20100	0,64700	17	$1,32 \times 10^8$
Média	4,07	6,93	2,00	28,84	3,98	86	0,16625	0,63925	13	$7,80 \times 10^7$
S2	4,03	6,18	1,94	31,43	5,70	77	0,19200	0,83900	4	$2,80 \times 10^7$
	4,03	5,90	1,86	31,52	5,76	78	0,23000	0,82900	2	$8,00 \times 10^6$
	4,02	6,00	1,90	31,59	5,78	78	0,22000	0,84600	2	$7,70 \times 10^6$
	4,02	6,03	1,88	31,21	5,74	77	0,26800	0,81500	6	$3,60 \times 10^7$
Média	4,03	6,03	1,90	31,44	5,75	78	0,22750	0,83225	4	$1,99 \times 10^7$
S3	3,98	6,40	2,06	32,16	7,20	77	0,61500	1,02400	3	$1,60 \times 10^7$
	3,98	6,38	2,06	32,27	7,22	78	0,73900	1,02700	4	$2,00 \times 10^7$
	3,97	6,33	2,02	31,95	7,22	78	0,86200	0,93700	2	$1,20 \times 10^7$
	3,97	6,28	2,03	32,30	7,24	78	0,71600	1,07200	6	$3,60 \times 10^7$
Média	3,98	6,35	2,04	32,17	7,22	78	0,73300	1,01500	4	$2,10 \times 10^7$
S4	3,92	6,38	2,23	34,88	6,32	55	6,83000	1,00700	13	$9,20 \times 10^7$
	3,93	6,45	2,26	35,04	6,16	54	6,65000	1,02100	8	$5,20 \times 10^7$
	3,92	6,33	2,22	35,03	6,32	55	6,94000	1,02700	8	$4,00 \times 10^7$
	3,92	6,35	2,24	35,31	6,18	54	6,73000	0,99500	8	$5,20 \times 10^7$
Média	3,92	6,38	2,24	35,07	6,25	55	6,78750	1,01250	9	$5,90 \times 10^7$

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L.

Tabela A33 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final da fermentação, em meio de sacarose, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.

Tratamentos	Fator de Conversão Substrato em Produto (Y_{PS})	Velocidade Média de Formação de Etanol (mL/L/h)	Velocidade Média de Consumo de Substrato (g/L/h)
	0,42518	14,667	25,400
	0,43901	14,667	25,400
	0,42715	14,600	25,400
S1	0,43110	14,667	25,400
Média	0,43111	14,667	25,400
	0,42912	16,150	27,725
	0,43701	16,050	27,725
	0,43306	16,100	27,725
S2	0,42713	16,200	27,725
Média	0,43207	16,125	27,725
	0,41109	12,686	22,200
	0,41495	12,571	22,200
	0,40721	12,571	22,200
S3	0,40593	12,686	22,200
Média	0,40980	12,629	22,200
	0,40594	12,333	21,722
	0,40333	12,178	21,722
	0,40205	12,289	21,722
S4	0,40854	12,311	21,722
Média	0,40529	12,278	21,722

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L.

Tabela A34 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final da fermentação, em meio de xarope, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.

Tratamentos	Fator de Conversão Substrato em Células (Y_{XS})	Fator de Conversão Substrato em Produto (Y_{PS})	Velocidade Média de Crescimento Celular (g/L/h)	Velocidade Média de Formação de Etanol (mL/L/h)	Velocidade Média de Consumo de Substrato (g/L/h)
S1	0,03587	0,46249	0,86117	14,067	24,007
	0,03517	0,45798	0,84467	13,933	24,013
	0,04167	0,46378	0,99765	14,067	23,940
	0,03953	0,46236	0,94917	14,067	24,013
	Média	0,03803	0,46165	0,91257	14,033
		0,04087	0,43446	1,15446	15,550
		0,04455	0,43582	1,25852	15,600
S2		0,04169	0,43722	1,17790	15,650
		0,04027	0,44005	1,13758	15,750
	Média	0,04183	0,43724	1,18168	15,650
		0,00281	0,43141	0,07213	14,033
		0,00353	0,43197	0,09063	14,033
		0,00341	0,43824	0,08680	14,133
		0,00317	0,43416	0,08107	14,067
S3	Média	0,00334	0,43394	0,08538	14,067
		0,00783	0,41082	0,25115	16,700
		0,00765	0,42312	0,24560	17,200
		0,00827	0,42494	0,26518	17,267
		0,00542	0,42214	0,17423	17,200
	S4				32,160
	Média	0,00740	0,42046	0,23746	17,100

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L.

Observação: o meio de xarope (A) foi o único que apresentou crescimento celular.

Tabela A35 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final da fermentação, em meio de melaço de menor pureza, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.

Tratamentos	Fator de Conversão Substrato em Produto (Y_{PS})	Velocidade Média de Formação de Etanol (mL/L/h)	Velocidade Média de Consumo de Substrato (g/L/h)
S1	0,42518	10,500	18,500
	0,43901	10,600	18,500
	0,42715	10,600	18,500
	0,43110	10,550	18,500
	0,43111	10,575	18,500
Média	0,42912	13,333	27,700
S2	0,43701	14,000	27,700
	0,43306	13,733	27,700
	0,42713	13,600	27,700
	0,43207	13,667	27,700
	0,41109	2,480	7,090
S3	0,41495	2,620	7,090
	0,40721	2,540	7,090
	0,40593	2,500	7,090
	0,40980	2,540	7,090
	0,40594	0,586	1,707
S4	0,40333	0,629	1,707
	0,40205	0,600	1,707
	0,40854	0,586	1,707
	0,40529	0,600	1,707
	0,40529	0,600	1,707

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L.

Tabela A36 – Resultados de parâmetros cinéticos no vinho, no final da fermentação, em meio de melaço de maior pureza, nas condições de pH 3,50 e temperatura de 38°C.

Tratamentos	Fator de Conversão Substrato em Produto (Y_{PS})	Velocidade Média de Formação de Etanol (mL/L/h)	Velocidade Média de Consumo de Substrato (g/L/h)
	0,44722	13,200	23,297
	0,45233	13,267	23,150
	0,45122	13,267	23,207
S1	0,45403	13,267	23,063
Média	0,45176	13,267	23,179
	0,39857	14,250	28,220
	0,40412	14,400	28,125
	0,40516	14,450	28,150
S2	0,40408	14,350	28,030
Média	0,40298	14,363	28,131
	0,41346	14,400	27,490
	0,41838	14,440	27,242
	0,42219	14,440	26,996
S3	0,41883	14,480	27,288
Média	0,41820	14,440	27,254
	0,45556	15,800	27,375
	0,43685	15,400	27,825
	0,46018	15,800	27,100
S4	0,44144	15,450	27,625
Média	0,44841	15,613	27,481

S1 - 80gART/L; S2 - 120gART/L; S3 - 160gART/L; S4 - 200gART/L.

7.5. A cinética da fermentação alcoólica em substrato de glicose

Tabela A37 – Resultados da cinética da liberação de CO₂ (g/100mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo inicial de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,041	1,116	1,131	1,182	1,118
2	1,709	1,737	1,739	1,770	1,739
3	0,432	0,355	0,263	0,278	0,332
4	0,054	0,051	0,055	0,045	0,051
5	0,039	0,040	0,034	0,032	0,036
6	0,027	0,030	0,028	0,021	0,027
7	0,025	0,031	0,022	0,024	0,026
8	0,020	0,017	0,020	0,028	0,021

Tabela A38 – Resultados da cinética da liberação de CO₂ (g/100mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo inicial de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,116	1,180	1,110	1,312	1,180
2	1,815	1,833	1,863	1,847	1,840
3	1,399	1,452	1,427	1,316	1,399
4	0,497	0,547	0,479	0,366	0,472
5	0,064	0,064	0,064	0,059	0,063
6	0,039	0,045	0,043	0,053	0,045
7	0,046	0,033	0,034	0,030	0,036
8	0,033	0,025	0,031	0,028	0,029
9	0,018	0,019	0,028	0,025	0,023
10	0,020	0,021	0,021	0,019	0,020

Tabela A39 – Resultados da cinética da liberação de CO₂ (g/100mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,129	1,161	1,163	1,242	1,174
2	1,809	1,816	1,825	1,779	1,807
3	1,491	1,459	1,464	1,491	1,476
4	1,073	1,082	1,077	1,049	1,070
5	0,699	0,746	0,696	0,738	0,720
6	0,377	0,446	0,386	0,416	0,406
7	0,152	0,109	0,152	0,100	0,128
8	0,060	0,067	0,066	0,073	0,067
9	0,042	0,049	0,034	0,04	0,041
10	0,022	0,030	0,033	0,029	0,029

Tabela A40 – Resultados da cinética da liberação de CO₂ (g/100mL vinho), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10⁸ células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,876	0,918	0,929	0,989	0,928
2	1,646	1,664	1,673	1,662	1,661
3	1,509	1,446	1,445	1,433	1,458
4	1,203	1,169	1,195	1,177	1,186
5	0,934	0,943	0,928	0,922	1,182
6	0,613	0,673	0,614	0,659	0,640
7	0,327	0,403	0,341	0,385	0,364
8	0,203	0,243	0,219	0,236	0,225
9	0,141	0,170	0,157	0,164	0,158
10	0,095	0,122	0,100	0,110	0,107

Tabela A41 – Resultados da cinética da formação de etanol (% v/v), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,900	2,000	2,060	2,160	2,030
2	3,920	3,980	4,020	4,140	4,015
3	4,140	4,160	4,040	4,160	4,125
4	4,160	4,160	4,100	4,180	4,150
5	4,180	4,180	4,140	4,200	4,175
6	4,240	4,240	4,20	4,260	4,235
7	4,240	4,220	4,160	4,240	4,215
8	4,200	4,220	4,160	4,240	4,205

Tabela A42 – Resultados da cinética da formação de etanol (% v/v), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	2,020	1,900	2,020	2,280	2,055
2	4,420	4,200	4,220	4,540	4,345
3	5,620	5,640	5,720	5,680	5,665
4	6,040	6,100	6,100	6,080	6,080
5	6,020	6,120	6,120	6,120	6,095
6	6,280	6,200	6,280	6,280	6,260
7	6,200	6,300	6,280	6,280	6,265
8	6,220	6,300	6,320	6,300	6,285
9	6,180	6,280	6,280	6,300	6,260
10	6,20	6,320	6,320	6,320	6,290

Tabela A43 – Resultados da cinética da formação de etanol (% v/v), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^6 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	2,020	2,060	2,100	2,320	2,125
2	4,160	4,240	4,260	4,240	4,225
3	5,880	5,920	6,000	6,140	5,985
4	7,140	7,180	7,180	7,180	7,170
5	7,860	7,960	7,860	7,980	7,915
6	8,340	8,480	8,300	8,480	8,400
7	8,340	8,480	8,440	8,500	8,440
8	8,360	8,560	8,400	8,520	8,460
9	8,380	8,580	8,480	8,520	8,490
10	8,360	8,560	8,380	8,500	8,450

Tabela A44 – Resultados da cinética da formação de etanol (% v/v), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,700	1,780	1,780	1,960	1,805
2	3,720	3,840	3,880	3,980	3,855
3	5,440	5,540	5,580	5,640	5,550
4	6,880	6,90	6,940	7,000	6,930
5	7,900	7,980	8,000	8,000	7,970
6	8,580	8,680	8,680	8,720	8,665
7	8,860	9,260	8,980	9,100	9,050
8	9,120	9,340	9,20	9,280	9,235
9	9,120	9,420	9,320	9,480	9,335
10	9,180	9,520	9,380	9,560	9,410

Tabela A45 – Resultados de rendimento da fermentação (%), em substratos com 80, 120, 160, e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

g glicose / L	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
80	80,83	80,90	79,81	81,24	80,70
120	79,82	81,49	81,30	81,32	80,98
160	80,51	82,38	80,73	82,00	81,41
200	71,11	73,64	72,64	73,92	72,83

Tabela A46 – Resultados da cinética de consumo de substrato (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	8,025078	8,056426	8,050157	8,059561	8,047806
1	4,796238	4,557994	4,338558	4,068966	4,440439
2	0,166144	0,172413	0,163009	0,181818	0,170846
3	0,081191	0,081505	0,081818	0,081505	0,081505
4	0,005329	0,005172	0,004765	0,00627	0,005384
5	0,005862	0,007398	0,006176	0,006019	0,006364
6	0,006082	0,005141	0,004201	0,004295	0,004929
7	0,005768	0,005925	0,006426	0,00674	0,006215
8	0,007053	0,006771	0,004922	0,005455	0,00605

Tabela A47 – Resultados da cinética de consumo de substrato (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	11,99687	11,97806	12,00627	12,00314	11,99608
1	7,658307	7,799373	7,579937	7,065830	7,525862
2	3,062695	3,498432	3,37304	2,827586	3,190438
3	0,702194	0,783699	0,721003	0,768025	0,743730
4	0,005423	0,004389	0,003856	0,005204	0,004718
5	0,005078	0,003918	0,005047	0,004859	0,004726
6	0,007931	0,005705	0,00652	0,006740	0,006724
7	0,006771	0,007053	0,006489	0,005611	0,006481
8	0,006677	0,007367	0,007241	0,006207	0,006873
9	0,005611	0,007273	0,006803	0,005580	0,006317
10	0,005361	0,006583	0,005956	0,005705	0,005901

Tabela A48 – Resultados da cinética de consumo de substrato (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	16,03762	16,04702	16,03135	16,0094	16,03135
1	11,73041	11,84953	11,60815	11,37931	11,64185
2	7,357367	7,601881	7,366771	7,451411	7,444357
3	4,247649	4,467085	4,103448	4,15674	4,24373
4	2,047022	2,166144	2,081505	2,075235	2,092476
5	0,686520	0,730408	0,711599	0,652038	0,695141
6	0,068871	0,069655	0,068966	0,068777	0,069067
7	0,005298	0,005172	0,005423	0,00558	0,005368
8	0,005392	0,005235	0,005266	0,00511	0,005251
9	0,005361	0,00558	0,005455	0,005549	0,005486
10	0,004859	0,005674	0,004702	0,005643	0,005219

Tabela A49 – Resultados da cinética de consumo de substrato (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	19,93730	19,96552	19,94357	19,97492	19,95533
1	16,49843	16,52052	16,50224	16,35083	16,46801
2	13,07524	13,26019	12,47962	12,66144	12,86912
3	9,551724	9,680251	9,438872	9,626959	9,574452
4	6,915361	7,087774	6,84326	7,297806	7,036050
5	4,996865	5,009404	4,905956	4,705329	4,904389
6	3,404389	3,420063	3,622257	3,451411	3,474530
7	3,010972	2,656740	2,996865	2,721003	2,846395
8	2,678683	2,264890	2,539185	2,373041	2,463950
9	2,490596	2,098746	2,449843	2,167712	2,301724
10	2,311912	1,970219	2,322884	1,979624	2,146160

Tabela A50 – Resultados da cinética da formação de glicerol (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,299408	0,347928	0,328994	0,358579	0,333727
2	0,571597	0,560946	0,527810	0,577514	0,559467
3	0,589349	0,547928	0,533727	0,562130	0,558284
4	0,573964	0,602366	0,569230	0,521893	0,566863
5	0,605917	0,594082	0,592899	0,600000	0,598225
6	0,691124	0,601183	0,626035	0,615384	0,633432
7	0,585798	0,570414	0,585798	0,502958	0,561242
8	0,583431	0,566863	0,545562	0,579881	0,568934

Tabela A51 – Resultados da cinética da formação de glicerol (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,345562	0,342011	0,402366	0,417751	0,376923
2	0,617751	0,608284	0,629585	0,624852	0,620118
3	0,771597	0,766863	0,749112	0,731360	0,754733
4	0,745562	0,659171	0,762130	0,779881	0,736686
5	0,823668	0,704142	0,758579	0,762130	0,762130
6	0,778698	0,743195	0,707692	0,728994	0,739645
7	0,712426	0,653254	0,824852	0,728994	0,729882
8	0,758579	0,753846	0,724260	0,656804	0,723372
9	0,733727	0,641420	0,732544	0,749112	0,714201
10	0,766863	0,792899	0,753846	0,814201	0,781952

Tabela A52 – Resultados da cinética da formação de glicerol (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^6 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,369230	0,368047	0,376331	0,398816	0,378106
2	0,604733	0,648520	0,633136	0,628402	0,628698
3	0,824852	0,801183	0,807100	0,840236	0,818343
4	0,885207	0,882840	0,862721	0,861538	0,873077
5	0,841420	0,899408	0,899408	0,913609	0,888461
6	0,897041	0,931360	0,889940	0,918343	0,909171
7	0,920710	0,911242	0,927810	0,927810	0,921893
8	0,965680	0,910059	0,899408	0,921893	0,924260
9	0,928994	0,957396	0,936094	0,943195	0,941420
10	0,960946	0,900591	0,930177	0,944378	0,934023

Tabela A53 – Resultados da cinética da formação de glicerol (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^6 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,440236	0,452071	0,472189	0,553846	0,479586
2	0,818934	0,817751	0,728994	0,789349	0,788757
3	0,942011	0,956213	0,927810	0,899408	0,931361
4	1,039053	0,992899	1,055621	0,998816	1,021597
5	1,059171	1,041420	1,009467	1,001183	1,027810
6	0,959763	1,054437	1,063905	1,088757	1,041716
7	1,095858	1,018934	1,041420	1,072189	1,057100
8	1,046153	1,086390	1,106508	1,078106	1,079289
9	1,062721	1,100591	1,061538	1,073372	1,074556
10	1,072721	1,054437	1,104142	1,108875	1,085044

Tabela A54 – Resultados do teor do fermento úmido (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	6,930	7,300	6,950	7,180	7,090
1	5,950	5,950	6,130	6,180	6,053
2	6,800	6,750	7,280	7,400	7,058
3	6,650	6,500	6,600	6,480	6,558
4	6,680	6,500	6,450	6,430	6,515
5	5,980	6,000	6,000	6,180	6,040
6	6,400	6,400	6,400	6,430	6,406
7	6,280	6,080	6,250	6,280	6,223
8	6,000	6,030	6,000	6,080	6,028

Tabela A55 – Resultados do teor do fermento úmido (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	6,930	7,280	7,250	6,950	7,103
1	6,400	6,530	6,600	6,580	6,528
2	7,430	7,050	6,580	6,650	6,928
3	6,400	6,600	6,630	6,650	6,570
4	6,780	6,780	6,780	6,650	6,748
5	6,430	6,480	6,630	6,600	6,535
6	6,500	6,550	6,500	6,450	6,500
7	6,530	6,800	6,680	6,530	6,635
8	6,500	6,580	6,700	6,580	6,590
9	6,380	6,500	6,480	6,400	6,440
10	6,530	6,630	6,600	6,550	6,578

Tabela A56 – Resultados do teor do fermento úmido (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	7,730	7,600	8,000	8,080	7,853
1	5,930	6,180	6,100	6,280	6,123
2	6,000	6,050	6,150	6,150	6,088
3	6,150	6,130	6,330	6,250	6,215
4	6,150	6,150	6,300	6,200	6,200
5	6,280	6,250	6,350	6,350	6,308
6	6,530	6,430	6,500	6,380	6,460
7	6,430	6,280	6,480	6,430	6,405
8	6,380	6,300	6,930	6,700	6,578
9	6,780	6,580	6,730	6,500	6,648
10	6,550	6,500	6,630	6,430	6,528

Tabela A57 – Resultados do teor do fermento úmido (g/100mL), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	7,180	7,150	7,380	7,430	7,285
1	6,530	6,630	6,630	6,630	6,605
2	6,150	6,050	6,280	6,150	6,158
3	6,250	6,230	6,430	6,200	6,278
4	6,130	6,080	6,050	6,050	6,078
5	6,250	6,230	6,280	6,230	6,248
6	6,280	6,180	6,330	6,130	6,230
7	6,380	6,280	6,430	6,500	6,398
8	6,180	6,150	6,200	6,200	6,183
9	6,400	6,380	6,500	6,350	6,408
10	6,350	6,350	6,380	6,400	6,370

Tabela A58 – Resultados da matéria seca do fermento (%MS), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	27,34	27,18	27,13	27,94	27,40
1	34,32	34,77	34,12	33,91	34,28
2	33,27	33,65	31,6	31,68	32,55
3	32,98	32,85	32,65	32,73	32,80
4	31,86	31,96	32,11	31,58	31,88
5	33,66	33,48	33,31	32,76	33,30
6	32,03	31,95	31,7	31,59	31,82
7	32,15	31,69	31,65	31,48	31,74
8	33,06	32,88	32,74	32,22	32,73

Tabela A59 – Resultados da matéria seca do fermento (%MS), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	29,60	28,15	28,72	29,33	28,95
1	33,07	32,56	33,03	33,56	33,06
2	32,02	33,5	35,29	35,68	34,12
3	35,52	35,63	35,09	34,4	35,16
4	32,94	33,23	32,92	32,89	33,00
5	33,42	33,57	33,27	33,03	33,32
6	32,38	32,3	32,01	32,01	32,18
7	31,46	31,46	31,27	31,23	31,36
8	31,37	31,43	31,02	30,77	31,15
9	31,61	31,46	31,3	31,12	31,37
10	31,07	31,00	30,71	30,56	30,84

Tabela A60 – Resultados da matéria seca do fermento (%MS), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	27,48	28,54	26,91	27,17	27,53
1	34,95	34,74	34,62	34,6	34,73
2	39,46	39,19	38,81	38,48	38,99
3	37,78	37,56	36,79	36,61	37,19
4	36,13	35,99	35,61	35,26	35,73
5	34,72	34,59	33,85	33,82	34,25
6	32,82	33,12	32,62	32,66	32,81
7	32,55	32,75	32,21	32,17	32,42
8	32,24	32,28	29,65	30,08	31,06
9	31,14	30,97	30,75	30,58	30,86
10	31,20	31,15	30,84	30,88	31,02

Tabela A61 – Resultados da matéria seca do fermento (%MS), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	29,76	30,14	29,36	29,55	29,70
1	32,52	32,92	32,8	32,72	32,74
2	38,34	38,70	38,02	37,89	38,24
3	38,69	38,50	38,32	37,78	38,32
4	37,93	38,00	38,42	38,28	38,16
5	35,99	36,28	35,91	35,70	35,97
6	34,71	35,04	34,51	34,8	34,77
7	33,88	33,81	33,65	33,48	33,71
8	34,14	33,88	33,79	33,44	33,81
9	32,74	32,45	32,61	32,19	32,50
10	32,59	32,16	32,17	32,08	32,25

Tabela A62 – Resultados do teor de fermento seco (g/100 mL), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^6 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	1,894662	1,984140	1,885535	2,006092	1,942607
1	2,042040	2,068815	2,091556	2,095638	2,074512
2	2,262360	2,271375	2,300480	2,344320	2,294634
3	2,193170	2,135250	2,154900	2,120904	2,151056
4	2,128248	2,077400	2,071095	2,030594	2,076834
5	2,012868	2,008800	1,998600	2,024568	2,011209
6	2,049920	2,044800	2,028800	2,031237	2,038689
7	2,019020	1,926752	1,978125	1,976944	1,975210
8	1,983600	1,982664	1,964400	1,958976	1,972410

Tabela A63 – Resultados do teor de fermento seco (g/100 mL), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^6 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	2,051280	2,049320	2,082200	2,038435	2,055309
1	2,116480	2,126168	2,179980	2,208248	2,157719
2	2,379086	2,361750	2,322082	2,372720	2,358910
3	2,273280	2,351580	2,326467	2,287600	2,309732
4	2,233332	2,252994	2,231976	2,187185	2,226372
5	2,148906	2,175336	2,205801	2,179980	2,177506
6	2,104700	2,115650	2,080650	2,064645	2,091411
7	2,054338	2,139280	2,088836	2,039319	2,080443
8	2,039050	2,068094	2,078340	2,024666	2,052538
9	2,016718	2,044900	2,028240	1,991680	2,020385
10	2,028871	2,055300	2,026860	2,001680	2,028178

Tabela A64 – Resultados do teor de fermento seco (g/100 mL), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	2,124204	2,169040	2,152800	2,195336	2,160345
1	2,072535	2,146932	2,111820	2,172880	2,126042
2	2,367600	2,370995	2,386815	2,366520	2,372983
3	2,323470	2,302428	2,328807	2,288125	2,310708
4	2,221995	2,213385	2,243430	2,186120	2,216233
5	2,180416	2,161875	2,149475	2,147570	2,159834
6	2,143146	2,129616	2,12030	2,083708	2,119193
7	2,092965	2,056700	2,087208	2,068531	2,076351
8	2,056912	2,033640	2,054745	2,015360	2,040164
9	2,111292	2,037826	2,069475	1,98770	2,051573
10	2,043600	2,024750	2,044692	1,985584	2,024657

Tabela A65 – Resultados do teor de fermento seco (g/100 mL), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	2,136768	2,155010	2,166768	2,195565	2,163528
1	2,123556	2,182596	2,174640	2,169336	2,162532
2	2,357910	2,341350	2,387656	2,330235	2,354288
3	2,418125	2,398550	2,463976	2,342360	2,405753
4	2,325109	2,310400	2,324410	2,315940	2,318965
5	2,249375	2,260244	2,255148	2,224110	2,247219
6	2,179788	2,165472	2,184483	2,133240	2,165746
7	2,161544	2,123268	2,163695	2,176200	2,156177
8	2,109852	2,083620	2,094980	2,073280	2,090433
9	2,095360	2,070310	2,119650	2,044065	2,082346
10	2,069465	2,042160	2,052446	2,053120	2,054298

Tabela A66 – Resultados da viabilidade celular (%), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	83	83	83	83	83
1	71	76	67	75	72
2	57	73	71	71	68
3	56	62	58	61	59
4	51	61	62	60	59
5	52	45	50	60	52
6	43	56	59	59	54
7	46	57	53	55	53
8	45	53	43	50	48

Tabela A67 – Resultados da viabilidade celular (%), de fermentação alcoólica em Substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	78	80	87	86	83
1	74	75	79	81	77
2	78	80	83	78	80
3	56	63	66	62	62
4	53	54	55	52	54
5	45	47	46	50	47
6	41	32	40	44	39
7	40	36	34	37	37
8	41	37	36	37	38
9	33	36	26	32	32
10	30	26	27	32	29

Tabela A68 – Resultados da viabilidade celular (%), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	86	84	85	84	85
1	83	76	79	81	80
2	74	80	81	81	79
3	70	75	69	75	72
4	59	59	58	66	61
5	47	48	49	45	47
6	14	22	18	27	20
7	9	17	15	18	15
8	7	13	8	16	11
9	12	15	7	9	11
10	1,33	1,5	0,6	1,29	1,18

Tabela A69 – Resultados da viabilidade celular (%), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	78	79	79	78	79
1	73	76	74	68	73
2	70	70	68	66	69
3	64	63	68	74	67
4	73	68	72	78	73
5	64	71	63	59	64
6	42	41	41	47	43
7	35	28	34	27	31
8	17	27	24	14	21
9	13	18	10	11	13
10	13	7	10	12	11

Tabela A70 – Resultados do n° células viáveis / mL, de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	$4,88 \times 10^8$	$4,84 \times 10^8$	$5,64 \times 10^8$	$5,24 \times 10^8$	$5,15 \times 10^8$
1	$5,48 \times 10^8$	$6,88 \times 10^8$	$4,16 \times 10^8$	$5,64 \times 10^8$	$5,54 \times 10^8$
2	$3,96 \times 10^8$	$5,24 \times 10^8$	$4,96 \times 10^8$	$4,96 \times 10^8$	$4,78 \times 10^8$
3	$4,64 \times 10^8$	$4,32 \times 10^8$	$4,24 \times 10^8$	$5,20 \times 10^8$	$4,60 \times 10^8$
4	$3,48 \times 10^8$	$5,68 \times 10^8$	$4,52 \times 10^8$	$4,64 \times 10^8$	$4,58 \times 10^8$
5	$4,00 \times 10^8$	$3,24 \times 10^8$	$2,84 \times 10^8$	$4,40 \times 10^8$	$3,62 \times 10^8$
6	$4,48 \times 10^8$	$3,72 \times 10^8$	$3,96 \times 10^8$	$5,56 \times 10^8$	$4,43 \times 10^8$
7	$3,76 \times 10^8$	$4,44 \times 10^8$	$4,60 \times 10^8$	$3,96 \times 10^8$	$4,19 \times 10^8$
8	$2,64 \times 10^8$	$4,52 \times 10^8$	$3,56 \times 10^8$	$3,48 \times 10^8$	$3,55 \times 10^8$

Tabela A71 – Resultados do n° células viáveis / mL, de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	$6,08 \times 10^8$	$5,60 \times 10^8$	$6,40 \times 10^8$	$4,48 \times 10^8$	$5,64 \times 10^8$
1	$3,00 \times 10^8$	$4,88 \times 10^8$	$4,96 \times 10^8$	$4,64 \times 10^8$	$4,37 \times 10^8$
2	$5,76 \times 10^8$	$5,52 \times 10^8$	$5,00 \times 10^8$	$5,80 \times 10^8$	$5,52 \times 10^8$
3	$4,00 \times 10^8$	$3,96 \times 10^8$	$3,12 \times 10^8$	$5,24 \times 10^8$	$4,08 \times 10^8$
4	$2,88 \times 10^8$	$3,28 \times 10^8$	$3,80 \times 10^8$	$3,36 \times 10^8$	$3,33 \times 10^8$
5	$3,40 \times 10^8$	$3,36 \times 10^8$	$3,56 \times 10^8$	$3,12 \times 10^8$	$3,36 \times 10^8$
6	$2,84 \times 10^8$	$2,80 \times 10^8$	$2,80 \times 10^8$	$4,28 \times 10^8$	$3,18 \times 10^8$
7	$2,36 \times 10^8$	$3,36 \times 10^8$	$2,00 \times 10^8$	$2,08 \times 10^8$	$2,45 \times 10^8$
8	$2,98 \times 10^8$	$2,40 \times 10^8$	$3,04 \times 10^8$	$2,44 \times 10^8$	$2,72 \times 10^8$
9	$2,92 \times 10^8$	$2,04 \times 10^8$	$1,72 \times 10^8$	$2,36 \times 10^8$	$2,26 \times 10^8$
10	$1,56 \times 10^8$	$1,84 \times 10^8$	$2,20 \times 10^8$	$2,32 \times 10^8$	$1,98 \times 10^8$

Tabela A72 – Resultados do n° células viáveis / mL, de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				
	1	2	3	4	Média
0	$5,60 \times 10^8$	$5,52 \times 10^8$	$4,48 \times 10^8$	$5,80 \times 10^8$	$5,35 \times 10^8$
1	$6,72 \times 10^8$	$4,08 \times 10^8$	$5,48 \times 10^8$	$5,88 \times 10^8$	$5,54 \times 10^8$
2	$4,44 \times 10^8$	$5,25 \times 10^8$	$4,64 \times 10^8$	$5,12 \times 10^8$	$4,86 \times 10^8$
3	$4,44 \times 10^8$	$6,76 \times 10^8$	$4,40 \times 10^8$	$4,52 \times 10^8$	$5,03 \times 10^8$
4	$3,84 \times 10^8$	$4,24 \times 10^8$	$4,60 \times 10^8$	$4,64 \times 10^8$	$4,33 \times 10^8$
5	$2,72 \times 10^8$	$2,96 \times 10^8$	$3,04 \times 10^8$	$3,32 \times 10^8$	$3,01 \times 10^8$
6	$9,20 \times 10^7$	$1,60 \times 10^8$	$1,20 \times 10^8$	$2,12 \times 10^8$	$1,46 \times 10^8$
7	$6,80 \times 10^7$	$1,36 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8$	$1,20 \times 10^8$	$1,06 \times 10^8$
8	$5,60 \times 10^7$	$8,80 \times 10^7$	$6,40 \times 10^7$	$9,20 \times 10^7$	$7,50 \times 10^7$
9	$7,20 \times 10^7$	$8,00 \times 10^7$	$4,40 \times 10^7$	$6,00 \times 10^7$	$6,40 \times 10^7$
10	$8,00 \times 10^6$	$4,00 \times 10^7$	$4,00 \times 10^6$	$8,00 \times 10^6$	$1,50 \times 10^7$

Tabela A73 – Resultados do nº células viáveis / mL, de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	$4,04 \times 10^8$	$4,48 \times 10^8$	$5,08 \times 10^8$	$6,24 \times 10^8$	$4,96 \times 10^8$
1	$4,68 \times 10^8$	$4,52 \times 10^8$	$4,76 \times 10^8$	$4,64 \times 10^8$	$4,65 \times 10^8$
2	$4,68 \times 10^8$	$5,04 \times 10^8$	$3,08 \times 10^8$	$5,28 \times 10^8$	$4,52 \times 10^8$
3	$3,92 \times 10^8$	$5,28 \times 10^8$	$5,12 \times 10^8$	$4,60 \times 10^8$	$4,73 \times 10^8$
4	$3,80 \times 10^8$	$4,08 \times 10^8$	$4,40 \times 10^8$	$5,24 \times 10^8$	$4,38 \times 10^8$
5	$4,84 \times 10^8$	$5,84 \times 10^8$	$4,28 \times 10^8$	$4,28 \times 10^8$	$4,81 \times 10^8$
6	$2,52 \times 10^8$	$3,24 \times 10^8$	$2,48 \times 10^8$	$3,08 \times 10^8$	$2,83 \times 10^8$
7	$2,00 \times 10^8$	$1,40 \times 10^8$	$2,56 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$	$1,94 \times 10^8$
8	$1,16 \times 10^8$	$1,84 \times 10^8$	$1,88 \times 10^8$	$7,60 \times 10^7$	$1,41 \times 10^8$
9	$8,80 \times 10^7$	$1,12 \times 10^8$	$8,40 \times 10^7$	$6,80 \times 10^7$	$8,80 \times 10^7$
10	$9,60 \times 10^7$	$4,80 \times 10^7$	$8,00 \times 10^7$	$7,60 \times 10^7$	$7,50 \times 10^7$

Tabela A74 – Resultados do pH do vinho, de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
1	3,88	3,89	3,87	3,85	3,87
2	3,71	3,75	3,68	3,75	3,72
3	3,76	3,80	3,78	3,83	3,79
4	3,77	3,82	3,8	3,86	3,81
5	3,8	3,83	3,82	3,87	3,83
6	3,79	3,84	3,82	3,87	3,83
7	3,82	3,87	3,84	3,90	3,86
8	3,85	3,89	3,87	3,93	3,89

Tabela A75 – Resultados do pH do vinho, de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
1	3,76	3,79	3,83	3,84	3,81
2	3,68	3,71	3,82	3,78	3,75
3	3,80	3,83	3,81	3,84	3,82
4	3,84	3,80	3,84	3,87	3,84
5	3,86	3,82	3,84	3,85	3,84
6	3,88	3,88	3,84	3,85	3,86
7	3,87	3,84	3,81	3,89	3,85
8	3,81	3,79	3,81	3,89	3,83
9	3,85	3,86	3,84	3,87	3,86
10	3,87	3,88	3,90	3,93	3,90

Tabela A76 – Resultados do pH do vinho, de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
1	3,93	3,88	3,98	3,85	3,91
2	3,68	3,70	3,70	3,69	3,69
3	3,95	3,96	3,97	3,95	3,96
4	3,91	3,90	3,94	4,04	3,95
5	3,90	3,90	3,80	3,84	3,86
6	3,80	3,84	3,82	3,85	3,83
7	3,81	3,85	3,83	3,87	3,84
8	3,82	3,87	3,86	3,89	3,86
9	3,84	3,90	3,89	3,93	3,89
10	3,86	3,92	3,89	3,94	3,90

Tabela A77 – Resultados do pH do vinho, de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
0	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
1	3,79	3,78	3,79	3,78	3,79
2	3,85	3,86	3,84	3,88	3,86
3	3,83	3,85	3,84	3,87	3,85
4	3,84	3,85	3,85	3,88	3,86
5	3,85	3,86	3,86	3,90	3,87
6	3,87	3,88	3,88	3,92	3,89
7	3,89	3,90	3,89	3,93	3,90
8	3,89	4,03	3,91	3,95	3,95
9	3,91	3,93	3,93	3,96	3,93
10	3,93	3,95	3,95	3,98	3,95

Tabela A78 – Resultados da velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	19,000	20,000	20,600	21,600	20,300
2	19,600	19,900	20,100	20,700	20,075
3	13,800	13,867	13,467	13,867	13,750
4	10,400	10,400	10,250	10,450	10,375
5	8,360	8,360	8,280	8,400	8,350
6	7,067	7,067	7,000	7,100	7,058
7	6,057	6,029	5,943	6,057	6,021
8	5,250	5,275	5,200	5,300	5,256

Tabela A79 – Resultados da velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	20,200	19,000	20,200	22,800	20,550
2	22,100	21,000	21,100	22,700	21,725
3	18,733	18,800	19,067	18,933	18,883
4	15,100	15,250	15,250	15,200	15,200
5	12,040	12,240	12,240	12,240	12,190
6	10,467	10,333	10,467	10,467	10,433
7	8,857	9,000	8,971	8,971	8,950
8	7,775	7,875	7,900	7,875	7,856
9	6,867	6,978	6,978	7,000	6,956
10	6,200	6,320	6,320	6,320	6,290

Tabela A80 – Resultados da velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	20,200	20,600	21,000	23,200	21,250
2	20,800	21,200	21,300	21,200	21,125
3	19,600	19,733	20,000	20,467	19,950
4	17,850	17,950	17,950	17,950	17,925
5	15,720	15,920	15,720	15,960	15,830
6	13,900	14,133	13,833	14,133	14,000
7	11,914	12,114	12,057	12,143	12,057
8	10,450	10,700	10,500	10,650	10,575
9	9,311	9,533	9,422	9,467	9,433
10	8,360	8,560	8,380	8,500	8,450

Tabela A81 – Resultados da velocidade média de formação de etanol (mL/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	17,000	17,800	17,800	19,600	18,050
2	18,600	19,200	19,400	19,900	19,275
3	18,133	18,467	18,600	18,800	18,500
4	17,200	17,250	17,350	17,500	17,325
5	15,800	15,960	16,000	16,000	15,940
6	14,300	14,467	14,467	14,533	14,442
7	12,657	13,229	12,829	13,000	12,929
8	11,400	11,675	11,500	11,600	11,544
9	10,133	10,467	10,356	10,533	10,372
10	9,180	9,520	9,380	9,560	9,410

Tabela A82 – Resultados da velocidade média de consumo de substrato (g/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	32,288	34,984	37,116	39,906	36,074
2	39,295	39,420	39,436	39,389	39,385
3	26,480	26,583	26,561	26,594	26,554
4	20,049	20,128	20,113	20,133	20,106
5	16,038	16,098	16,088	16,107	16,083
6	13,365	13,419	13,410	13,425	13,405
7	11,456	11,501	11,491	11,504	11,488
8	10,023	10,062	10,057	10,068	10,052

Tabela A83 – Resultados da velocidade média de consumo de substrato (g/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	43,386	41,787	44,263	49,373	44,702
2	44,671	42,398	43,166	45,878	44,028
3	37,649	37,315	37,618	37,450	37,508
4	29,979	29,934	30,006	29,995	29,978
5	23,984	23,948	24,002	23,997	23,983
6	19,982	19,954	20,000	19,994	19,982
7	17,129	17,101	17,143	17,139	17,128
8	14,988	14,963	14,999	14,996	14,987
9	13,324	13,301	13,333	13,331	13,322
10	11,992	11,971	12,000	11,997	11,990

Tabela A84 – Resultados da velocidade média de consumo de substrato (g/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	43,072	41,975	44,232	46,301	43,895
2	43,401	42,226	43,323	42,790	42,935
3	39,300	38,600	39,760	39,509	39,292
4	34,976	34,702	34,875	34,835	34,847
5	30,702	30,633	30,640	30,715	30,672
6	26,615	26,629	26,604	26,568	26,604
7	22,903	22,917	22,894	22,863	22,894
8	20,040	20,052	20,033	20,005	20,033
9	17,814	17,824	17,807	17,782	17,807
10	16,033	16,041	16,027	16,004	16,026

Tabela A85 – Resultados da velocidade média de consumo de substrato (g/L/h), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	34,389	34,450	34,413	36,241	34,873
2	34,310	33,527	37,320	36,567	35,431
3	34,619	34,284	35,016	34,493	34,603
4	32,555	32,194	32,751	31,693	32,298
5	29,881	29,912	30,075	30,539	30,102
6	27,555	27,576	27,202	27,539	27,468
7	24,180	24,727	24,210	24,648	24,441
8	21,573	22,126	21,755	22,002	21,864
9	19,385	19,852	19,437	19,786	19,615
10	17,625	17,995	17,621	17,995	17,809

Tabela A86 – Resultados da velocidade específica média de formação de etanol (μ_p), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,734398	0,763046	0,777392	0,813541	0,772094
2	0,683812	0,691523	0,689636	0,696940	0,690478
3	0,496648	0,512584	0,493259	0,516052	0,504636
4	0,385703	0,395144	0,390630	0,406196	0,394418
5	0,327818	0,328482	0,326999	0,327483	0,327696
6	0,272095	0,272776	0,272333	0,275892	0,273274
7	0,236793	0,246962	0,237128	0,241833	0,240679
8	0,208904	0,209998	0,208937	0,213545	0,210346

Tabela A87 – Resultados da velocidade específica média de formação de etanol (μ_p), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,753320	0,705339	0,731376	0,814947	0,751245
2	0,733203	0,701823	0,717211	0,75513	0,726842
3	0,650435	0,631016	0,646874	0,653265	0,645398
4	0,533661	0,534259	0,539290	0,54853	0,538935
5	0,442233	0,444117	0,437983	0,443171	0,441876
6	0,392519	0,385513	0,397056	0,400134	0,393805
7	0,340301	0,332060	0,339000	0,347231	0,339648
8	0,300964	0,300554	0,300022	0,307001	0,302135
9	0,268747	0,269332	0,271544	0,277409	0,271758
10	0,241201	0,242708	0,246113	0,249209	0,244808

Tabela A88 – Resultados da velocidade específica média de formação de etanol (μ_p), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,769293	0,757340	0,784882	0,842741	0,788564
2	0,693421	0,705744	0,704373	0,707079	0,702654
3	0,665827	0,676482	0,677858	0,706008	0,681544
4	0,634070	0,640103	0,631530	0,648086	0,638447
5	0,569056	0,581239	0,577248	0,586581	0,578531
6	0,511924	0,523824	0,514958	0,535365	0,521518
7	0,449312	0,464910	0,455954	0,463341	0,458379
8	0,400998	0,415290	0,403342	0,417099	0,409182
9	0,348093	0,369249	0,359365	0,375914	0,363155
10	0,322888	0,333691	0,323488	0,337888	0,329489

Tabela A89 – Resultados da velocidade específica média de formação de etanol (μ_p), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,631869	0,643708	0,646063	0,713134	0,658694
2	0,622627	0,647257	0,641316	0,674055	0,646314
3	0,591890	0,607690	0,595825	0,633500	0,607226
4	0,583885	0,589310	0,589154	0,596421	0,589693
5	0,554418	0,557339	0,559999	0,567814	0,559892
6	0,517802	0,527300	0,522711	0,537734	0,526387
7	0,462183	0,491757	0,467977	0,471505	0,473355
8	0,426476	0,442263	0,433271	0,441613	0,435906
9	0,381712	0,399039	0,385613	0,406737	0,393275
10	0,350128	0,367950	0,360722	0,367524	0,361581

Tabela A90 – Resultados da velocidade específica média de consumo de substrato (μ_s), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,581183	1,691032	1,774564	1,904239	1,737754
2	1,736888	1,735515	1,714240	1,680177	1,716705
3	1,207368	1,244963	1,232592	1,253877	1,234700
4	0,942060	0,968910	0,971152	0,991495	0,968404
5	0,796795	0,801377	0,804962	0,795581	0,799679
6	0,651976	0,656241	0,660978	0,660949	0,657536
7	0,567412	0,596897	0,580906	0,581910	0,581781
8	0,505270	0,507502	0,511940	0,513923	0,509659

Tabela A91 – Resultados da velocidade específica média de consumo de substrato (μ_s), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	2,049896	1,965361	2,030447	2,235849	2,070388
2	1,877649	1,795200	1,858942	1,933552	1,866336
3	1,656150	1,586786	1,616939	1,637104	1,624245
4	1,342327	1,328640	1,344371	1,371390	1,346682
5	1,116083	1,100900	1,088151	1,100770	1,101476
6	0,949378	0,943158	0,961218	0,968399	0,955538
7	0,833783	0,799402	0,820674	0,840444	0,823576
8	0,735035	0,723534	0,721671	0,740674	0,730229
9	0,660659	0,650441	0,657355	0,669315	0,659443
10	0,591043	0,582469	0,592064	0,599368	0,591236

Tabela A92 – Resultados da velocidade específica média de consumo de substrato (μ_s), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	2,078234	1,955111	2,094497	2,130854	2,064674
2	1,833133	1,780927	1,815092	1,808138	1,809323
3	1,691432	1,676482	1,707298	1,726692	1,700476
4	1,574103	1,567833	1,554522	1,593481	1,572485
5	1,408089	1,416975	1,425441	1,430208	1,420178
6	1,241846	1,250410	1,254727	1,275021	1,255501
7	1,094300	1,114257	1,096881	1,105258	1,102674
8	0,974290	0,986027	0,974944	0,992645	0,981976
9	0,843731	0,874649	0,860438	0,894605	0,868366
10	0,784535	0,792263	0,783817	0,805997	0,791653

Tabela A93 – Resultados da velocidade específica média de consumo de substrato (μ_s), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	1,619406	1,578396	1,625199	1,670603	1,612600
2	1,455116	1,431937	1,563028	1,569258	1,504835
3	1,431629	1,429373	1,421104	1,472583	1,438672
4	1,400143	1,393454	1,408993	1,368463	1,392763
5	1,328408	1,323407	1,333625	1,373097	1,339634
6	1,264107	1,273430	1,245246	1,290956	1,268435
7	1,118667	1,164565	1,118900	1,132637	1,133692
8	1,022502	1,061892	1,038458	1,061234	1,046021
9	0,925150	0,958889	0,917013	0,967963	0,942254
10	0,851688	0,881190	0,858521	0,876485	0,866971

Tabela A94 – Resultados do fator de conversão de substrato em produto (Y_{ps}), de fermentação alcoólica em substrato com 80g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,464461	0,451231	0,438075	0,427226	0,445248
2	0,393699	0,398454	0,402298	0,414802	0,402313
3	0,411348	0,411727	0,40018	0,411565	0,408705
4	0,409425	0,407823	0,402234	0,40968	0,407291
5	0,411421	0,409897	0,406229	0,411628	0,409794
6	0,417338	0,415664	0,412016	0,417419	0,415609
7	0,417322	0,413744	0,408205	0,415585	0,413714
8	0,413451	0,413787	0,408128	0,415519	0,412721

Tabela A95 – Resultados do fator de conversão de substrato em produto (Y_{ps}), de fermentação alcoólica em substrato com 120g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,367492	0,358886	0,360205	0,364491	0,362768
2	0,39049	0,390944	0,385817	0,39054	0,389448
3	0,39274	0,397669	0,400061	0,399037	0,397377
4	0,397565	0,40211	0,401147	0,399981	0,400201
5	0,396237	0,403412	0,402502	0,402601	0,401188
6	0,413448	0,408747	0,413076	0,413191	0,412115
7	0,408142	0,415386	0,413075	0,413152	0,412439
8	0,409455	0,415397	0,415732	0,414489	0,413768
9	0,406786	0,414075	0,413085	0,414467	0,412103
10	0,408094	0,416689	0,415687	0,415787	0,414064

Tabela A96 – Resultados do fator de conversão de substrato em produto (Y_{ps}), de fermentação alcoólica em substrato com 160g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,370167	0,387364	0,374736	0,395494	0,381940
2	0,378271	0,396279	0,388065	0,391053	0,388417
3	0,393647	0,403513	0,397036	0,408879	0,400769
4	0,402814	0,408272	0,406254	0,406711	0,406012
5	0,404134	0,410197	0,404961	0,410136	0,407357
6	0,412228	0,418922	0,410414	0,419887	0,415363
7	0,410593	0,417238	0,415682	0,419215	0,415682
8	0,41158	0,421176	0,413708	0,420189	0,416663
9	0,412564	0,422169	0,417653	0,420201	0,418147
10	0,411567	0,421187	0,412709	0,419217	0,41617

Tabela A97 – Resultados do fator de conversão de substrato em produto (Y_{ps}), de fermentação alcoólica em substrato com 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Amostras (Repetições)				Média
	1	2	3	4	
1	0,390189	0,407824	0,408259	0,429194	0,408867
2	0,427888	0,452015	0,410303	0,429538	0,429936
3	0,413438	0,425144	0,419269	0,430196	0,422012
4	0,417018	0,422913	0,418138	0,435833	0,423476
5	0,417355	0,42114	0,419907	0,413528	0,417982
6	0,409619	0,414079	0,419765	0,41654	0,415001
7	0,413155	0,422267	0,418247	0,41629	0,41749
8	0,417091	0,416486	0,417226	0,416132	0,416734
9	0,412595	0,416147	0,420509	0,420199	0,417362
10	0,411099	0,417561	0,420167	0,419316	0,417036

Tabela A98 – Velocidade instantânea de formação de etanol (mL/L/h) durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Velocidade Instantânea de Formação de Etanol (mL/L/h)			
	g glicose / L			
	80	120	160	200
1,00	7,869	11,956	19,850	17,011
1,50	23,264	22,093	21,580	18,853
2,00	24,252	24,706	21,850	19,644
2,50	18,161	22,622	20,999	19,589
3,00	9,981	17,968	19,319	18,879
3,50	2,720	12,243	17,057	17,689
4,00		6,382	14,423	16,180
4,50		0,826	11,581	14,497
5,00			8,662	12,771
5,50			5,758	11,117
6,00			2,927	9,636
6,50				8,413
7,00				7,519
7,50				7,009
8,00				6,924

Tabela A99 – Velocidade instantânea de consumo de substrato (g/L/h) durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Velocidade Instantânea de Consumo de Glicose (g/L/h)			
	g glicose / L			
	80	120	160	200
1,00	2,546	33,937	43,018	33,261
1,50	43,401	46,993	44,789	35,364
2,00	49,854	48,588	43,993	36,166
2,50	39,043	43,169	41,333	35,873
3,00	22,830	34,145	37,421	34,681
3,50	8,640	24,005	32,785	32,781
4,00		14,428	27,870	30,354
4,50		6,393	23,050	27,576
5,00			18,633	24,613
5,50			14,867	21,626
6,00			11,948	18,766
6,50			10,026	16,179
7,00				14,001
7,50				12,363
8,00				11,386

Tabela A100 – Velocidade específica de formação de etanol (μ_P) durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Velocidade Específica de Formação de Etanol (μ_P)			
	g glicose / L			
	80	120	160	200
1	0,299396	0,437354	0,736956	0,620882
2	0,834212	0,826672	0,726785	0,658586
3	0,366239	0,614017	0,659893	0,619398
4		0,226257	0,513651	0,550714
5			0,316548	0,448561
6			0,109035	0,351181
7				0,275244
8				0,261435

Tabela A101 – Velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) durante a fermentação alcoólica, conduzida em substratos com 80, 120, 160 e 200g / L de glicose, nas condições de inóculo de 10^8 células viáveis / mL, pH inicial 3,50 e temperatura 38°C.

Tempo (h)	Velocidade Específica de Consumo de Substrato (μ_S)			
	g glicose / L			
	80	120	160	200
1	0,122728	1,572818	2,023375	1,538058
2	2,172634	2,059765	1,853895	1,536176
3	1,061339	1,478310	1,619478	1,441586
4		0,648050	1,257549	1,308946
5			0,862705	1,095265
6			0,563790	0,866491
7				0,649344
8				0,544672

