UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

FCA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
UNESP | BOTUCATU

MARCOS VINICIUS JUNQUEIRA DOMINGUES

DESEMPENHO FERMENTATIVO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* CEPA BG1 EM FUNÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS DO MOSTO, DO TEMPO DE ALIMENTAÇÃO E DO INÓCULO

Botucatu

2018

MARCOS VINICUS JUNQUEIRA DOMINGUES

DESEMPENHO FERMENTATIVO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* CEPA BG1 EM FUNÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS DO MOSTO, DO TEMPO DE ALIMENTAÇÃO E DO INÓCULO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Energia na Agricultura.

Orientador: Waldemar G. Venturini Filho

Botucatu

2018

D671d

Domingues, Marcos Vinicius Junqueira
Desempenho fermentativo da levedura Saccharomyces cerevisiae cepa BG1 em função dos açúcares redutores totais do mosto, do tempo de alimentação e do inóculo / Marcos Vinicius Junqueira Domingues. -- Botucatu, 2018
77 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu
Orientador: Waldemar Gastoni Venturini Filho

1. Fermentação alcoólica. 2. Eficiência industrial. 3. Etanol. 4. Levedura. I. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESEMPENHO FERMENTATIVO DA LEVEDURA Saccharomyces cerevisiae CEPA BG1 EM FUNÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS DO MOSTO, DO TEMPO DE ALIMENTAÇÃO E DO INÓCULO

AUTOR: MARCOS VINICIUS JUNQUEIRA DOMINGUES
ORIENTADOR: WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO
Horticultura / UNESP/ Câmpus de Botucatu

Drª MARIA MARCIA PEREIRA SARTORI
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP

Prof.ª Drª MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Botucatu, 27 de setembro de 2018

RESUMO

O setor sucroenergético busca por processos mais eficientes e produtivos, sendo que um dos principais desafios tecnológicos enfrentados por elas é a forma como se adaptam a variabilidade de situações no decorrer da safra. Na fabricação do etanol, conhecer o desempenho fermentativo da levedura é de suma importância; por intermédio deste, realiza-se a maximização produtiva de um produto de interesse (etanol ou levedura) ou a otimização de tais rendimentos. A presente pesquisa teve como objetivo geral identificar o desempenho fermentativo (m^3 etanol / m^3 dorna, Y p/s, t. m.s. levedura / m^3 dorna, Y x/s e Y p/s + Y x/s) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa BG1, normalmente utilizada no setor, sendo alimentada com mosto sintético (açúcar cristal, extrato de levedura, ureia, sulfato de magnésio e fosfato monopotássico). Para o levantamento dos dados, utilizou-se uma planta piloto com fermentadores de 45 litros e para o planejamento dos experimentos, um delineamento composto central rotacional (DCCR), constituído de um fatorial completo de 2^3, aliado a 6 pontos axiais e mais 3 repetições no ponto central, obtendo-se assim 17 ensaios. O desempenho fermentativo foi avaliado em função dos açúcares redutores totais (ART) do mosto (18,95 a 25,26 %m/m - 18 a 24 ºBrix), do inóculo da dorna (8 a 12 %v/v) e do tempo de alimentação do mosto na dorna (1 a 4 h), faixas de trabalho adotadas entre as usinas para absorver as variabilidades da safra. Para a análise dos dados utilizou-se o *software* Minitab® 17.1.0 a fim de obter os efeitos, modelos preditos e as superfícies de respostas das variáveis de interesse. Para a produção de etanol, o máximo desempenho foi de 0,1258 m^3 etanol / m^3 dorna e os parâmetros para tal foram 25,26 %m/m de ART e 8,00 %v/v de inóculo. O valor máximo do rendimento de etanol, Y p/s, foi de 0,4594 e os parâmetros para tal foram 25,26 %m/m de ART, 1,00 h de alimentação e 12,00 %v/v de inóculo. Para a produção de levedura, o máximo desempenho foi de 0,0125 t. m.s. levedura / m^3 dorna, e os parâmetros para tal foram 19,83 %m/m de ART, 3,00 h de alimentação e 8,00 %v/v de inóculo. O valor máximo do rendimento de levedura, Y x/s, foi de 0,065 e os parâmetros para tal foram 18,94 %m/m de ART, 2,60 h de alimentação e 8,00 %v/v de inóculo. O valor máximo do rendimento de etanol e levedura, Y p/s + Y x/s, foi de 0,4954 e os parâmetros para tal foram 20,14 %m/m de ART, 2,89 h de alimentação e 8,00 %v/v de inóculo.

Palavras-chave: fermentação alcoólica; eficiência industrial; etanol; levedura.

ABSTRACT

The sugar-energy sector is looking for more efficient and productive processes, and one of the main technological challenges faced by them is the way they adapt to the variability of situations during the harvest. In the manufacture of ethanol, knowing the fermentative performance of the yeast is of paramount importance; through this, the production maximization of a product of interest (ethanol or yeast) or the optimization of such yields is carried out. The present research aimed to identify the fermentative performance (m^3 ethanol / m^3 fermenter, Y p/s, t. d.m. yeast / m^3 fermenter, Y x/s and Y p/s + Y x/s) of the yeast Saccharomyces cerevisiae, strain BG1 , normally used in the sector, being fed with synthetic wort (crystal sugar, yeast extract, urea, magnesium sulfate and monopotassium phosphate). For the data collection, a pilot plant with 45 liter fermenters was used and for the planning of the experiments, a central rotational composite design (CRCD), consisting of a complete factorial of 23, combined with 6 axial points and 3 more repetitions at the central point, thus obtaining 17 trials. Fermentation performance was evaluated as a function of the total reducing sugars (TRS) of the wort (18.95 to 25.26 %m/m - 18 to 24 ºBrix), the fermenter inoculum (8 to 12 %v/v) and the wort feeding time in the fermenter (1 to 4 h), working ranges adopted between the plants to absorb the variability of the harvest. For data analysis, Minitab® 17.1.0 software was used in order to obtain the effects, predicted models and response surfaces of the variables of interest. For ethanol production, the maximum performance was 0.1258 m^3 ethanol / m^3 fermenter and the parameters for this were 25.26 %m/m TRS and 8.00 %v/v inoculum. The maximum ethanol yield value, Y p/s, was 0.4594 and the parameters for this were 25.26 % m/m of TRS, 1.00 h of feeding and 12.00 %v/v of inoculum. For yeast production, the maximum performance was 0.0125 t. d.m. yeast / m^3 fermenter, and the parameters for this were 19.83 %m/m of TRS, 3.00 h of feeding and 8.00 %v/v of inoculum. The maximum yeast yield, Y x/s, was 0.065 and the parameters for this were 18.94 %m/m TRS, 2.60 h of feeding and 8.00 %v/v of inoculum. The maximum yield value of ethanol and yeast, Y p/s + Y x/s, was 0.4954 and the parameters for this were 20.14 %m/m of TRS, 2.89 h of feeding and 8,00 %v/v inoculum.

Keywords: alcoholic fermentation; industrial efficiency; ethanol; yeast.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma de um processo fermentativo do tipo batelada alimentada ou Melle-Boinot.....29
Figura 2 - Representação esquemática de uma dorna de fermentação contendo levedura e água.....30
Figura 3 - Representação esquemática de uma dorna de fermentação contendo levedura, água e mosto.....31
Figura 4 - Planta piloto de testes de uma usina do interior do estado de São Paulo, janeiro, 2017.....35
Figura 5 - Superfície de resposta relacionando o ART e o inóculo com o etanol produzido por volume de dorna (m^3 etanol / m^3 dorna).....42
Figura 6 - Gráfico de contorno relacionando o ART e inóculo com o etanol produzido por volume de dorna (m^3 etanol / m^3 dorna).....43
Figura 7 - Efeitos isolados do ART e inóculo no etanol produzido por volume de dorna (m^3 etanol / m^3 dorna).....44
Figura 8 - Parâmetros de otimização do etanol produzido por volume de dorna (m^3 etanol / m^3 dorna).....45
Figura 9 - Superfície de resposta relacionando o ART, tempo de alimentação e o inóculo com o rendimento de etanol (Y p/s).....47
Figura 10 - Gráfico de contorno relacionando o ART, tempo de alimentação e inóculo com o rendimento de etanol (Y p/s).....48
Figura 11 - Efeitos isolados do ART e tempo de alimentação no rendimento de etanol (Y p/s).....49
Figura 12 - Efeitos associados do inóculo x ART e inóculo x tempo de alimentação no rendimento de etanol (Y p/s).....50
Figura 13 - Parâmetros de otimização do rendimento de etanol (Y p/s).....51
Figura 14 - Superfície de resposta relacionando o ART, tempo de alimentação e o inóculo com a levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m^3 dorna).....54
Figura 15 - Gráfico de contorno relacionando o ART, tempo de alimentação e inóculo com a levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m^3 dorna).....55

Figura 16 - Efeitos isolados do ART, tempo de alimentação e inóculo na levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m³ dorna) 56
Figura 17 - Efeito associado do inóculo x ART na levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m³ dorna)..... 57
Figura 18 - Parâmetros de otimização da levedura produzida por volume de dorna (t m.s. levedura / m³ dorna) 58
Figura 19 - Superfície de resposta relacionando o ART, tempo de alimentação e o inóculo com o rendimento de levedura (Y x/s) 60
Figura 20 - Gráfico de contorno relacionando o ART, tempo de alimentação e inóculo com o rendimento de levedura (Y x/s) 61
Figura 21 - Efeitos isolados do ART, tempo de alimentação e inóculo no rendimento de levedura (Y x/s) 62
Figura 22 - Efeitos associados do inóculo x ART e inóculo x tempo de alimentação no rendimento de levedura (Y x/s) 63
Figura 23 - Parâmetros de otimização do rendimento de levedura (Y x/s) 64
Figura 24 - Superfície de resposta relacionando o ART, tempo de alimentação e o inóculo com o rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s) 66
Figura 25 - Gráfico de contorno relacionando o ART, tempo de alimentação e inóculo com o rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s) 67
Figura 26 - Efeitos isolados do ART, tempo de alimentação e inóculo no rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s) 68
Figura 27 - Efeitos associados do inóculo x ART e inóculo no rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s)..... 69
Figura 28 - Parâmetros de otimização do rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s) 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimentos, produtividades, velocidades e conversão de leveduras tradicionais 23
Tabela 2 - Intervalo de avaliação do DCCR para ART do mosto, tempo de alimentação e inóculo 32
Tabela 3 - Valores codificados e não codificados do ART do mosto, tempo de alimentação e o inóculo para os 17 ensaios.....33
Tabela 4 - Parâmetros e respostas do ART adicionado, etanol e levedura produzida dos testes realizados em planta piloto de uma usina do interior do estado de São Paulo, janeiro, 2017 39
Tabela 5 - Respostas das variáveis dependentes dos testes realizados em uma usina do interior do estado de São Paulo, janeiro, 2017.....40
Tabela 6 - Regressão e efeitos para o etanol produzido por volume de dorna (m^3 etanol / m^3 dorna).....41
Tabela 7 - ANOVA ou análise de variância para o etanol produzido por volume de dorna (m^3 etanol / m^3 dorna).....42
Tabela 8 - Regressão e efeitos para o rendimento de etanol (Y p/s) 46
Tabela 9 - ANOVA ou análise de variância para o rendimento de etanol (Y p/s).....47
Tabela 10 - Regressão e efeitos para a levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m^3 dorna) 52
Tabela 11 - ANOVA ou análise de variância para a levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m^3 dorna) 53
Tabela 12 - Regressão e efeitos para o rendimento de levedura (Y x/s) 59
Tabela 13 - ANOVA ou análise de variância para o rendimento de levedura (Y x/s) 59
Tabela 14 - Regressão e efeitos para o rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s).....65
Tabela 15 - ANOVA ou análise de variância para o rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s).....66
Tabela 16 - Parâmetros operacionais e respectivos rendimentos e produções 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART	Açúcares redutores totais
m^3 etanol / m^3 dorna	Relação de etanol produzido por dorna
Y p/s	Rendimento de etanol em relação ao ART adicionado
t. m.s. levedura / m^3 dorna	Relação de massa seca de levedura produzida por dorna
Y x/s	Rendimento de levedura em relação ao ART adicionado
Y p/s + Y x/s	Rendimento de etanol e levedura em relação ao ART adic.
Prod	Rendimento de etanol em relação à volume e tempo
VCS	Consumo de ART em relação à volume e tempo
Conv	Relação entre o ART consumido e o inicial
Prod Esp	Rendimento de etanol em relação à volume, tempo e célula
VCS Esp	Consumo de ART em relação à volume, tempo e célula
% m/m do ART do mosto	Concentração mássica do ART no mosto
% v/v do inóculo	Concentração volumétrica da levedura na dorna

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Material	26
3.1.1	Matérias-primas	26
3.2	Métodos	28
3.2.1	Detalhamento das variáveis independentes	28
3.2.2	Planejamento experimental	32
3.2.3	Processamento	33
3.2.4	Análise físico-química	37
3.2.5	Análise estatística	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Etanol produzido por volume de dorna	41
4.2	Rendimento de etanol	46
4.3	Levedura produzida por volume de dorna	52
4.4	Rendimento de levedura	58
4.5	Rendimento de etanol e levedura	65
4.6	Desempenho fermentativo	71
5	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

As empresas buscam continuamente menores custos de produção e maiores lucratividades, sendo assim a busca pela excelência operacional é contínua.

A excelência é prioridade à medida que a concorrência e a escala de produção aumentam e as margens de retorno são reduzidas. Exemplo claro desse modelo, é o setor sucroenergético, sendo que a maximização da eficiência industrial (ART Produtos / ART Adicionado) e da produtividade (capacidade de produção) determinam a permanência da empresa no mercado.

Por conseguinte, um dos diferenciais entre as usinas está em como as mesmas se adaptam a variabilidade de situações encontradas. O período de safra das usinas na região sudeste é de março/abril até novembro/dezembro, sendo assim o setor enfrenta inúmeros desafios com o decorrer do mesmo, alguns destes são considerados a seguir:

- Mudanças no perfil da cana-de-açúcar (teor de açúcares, fibra, umidade, dextrana, amido, compostos fenólicos e minerais, passando pela variabilidade e a quantidade da carga microbiana entre outros);
- Mudanças de planejamento de produção (mix etanol e açúcar);
- Mudanças na capacidade de troca térmica da planta industrial (inverno e verão);
- Falhas mecânicas em equipamentos e indisponibilidade de linhas de produção.

A maximização da eficiência industrial (ART Produtos / ART Adicionado) e da produtividade (capacidade de produção) é resultante de um conjunto de parâmetros, ações e procedimentos alterados constantemente visando sobrepujar os desafios encontrados, proporcionando o melhor desempenho dentro das possibilidades operacionais.

Na fábrica de etanol não é diferente, diante desses desafios diários se faz necessário a leitura do processo industrial de forma rápida e eficaz, por meio da avaliação da qualidade da cana-de-açúcar que adentra a usina.

Deve-se considerar também a distribuição do montante de açúcares entre a linha de produção do etanol e do açúcar (planejamento de produção de açúcar e etanol na safra ou alguma característica específica do dia).

Outro ponto a ser avaliado é o tratamento, térmico e químico, diretamente empregado no caldo extraído da cana-de-açúcar, já que esse irá trazer particularidades que irão compor o mosto a ser fermentado.

Já na fermentação, outros pontos devem ser avaliados, como o aumento da produtividade (capacidade de produção) ou do rendimento (ART Produto / ART adicionado) do produto de interesse (etanol ou massa seca de levedura).

Ainda na fermentação, as características do processo, como a disponibilidade de equipamentos (fermentadores, centrífugas e aparelhos de destilação), além da capacidade de troca térmica dos fermentadores, possibilitando assim um aumento no teor de ART no mosto.

Não menos importante é a capacidade de secagem diária de levedura que irá nos nortear com relação aos parâmetros a serem adotados para evitar o acúmulo de levedura em processo e o descarte.

Neste cenário, é de interesse econômico da companhia, e foi o intuito desse trabalho, buscar o entendimento da forma de condução da levedura durante a fermentação, para a maximização dos rendimentos e das produções de etanol e de levedura.

Em outras palavras, por meio da manipulação das variáveis, ART do mosto (%m/m), inóculo da dorna (%v/v) e tempo de alimentação do mosto (h), objetivou-se identificar o desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa BG1, normalmente utilizada no setor, adotando como desempenho fermentativo as variáveis:

- Etanol produzido por volume de dorna - m^3 etanol / m^3 dorna
- Rendimento de etanol - Y p/s
- Levedura produzida por volume de dorna - t. m.s. levedura / m^3 dorna
- Rendimento de levedura - Y x/s
- Rendimento de etanol e levedura - Y p/s + Y x/s

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os combustíveis a base de petróleo, fonte não renovável de energia, expressam a maior parcela da matriz energética mundial. Os mesmos, são responsáveis pelo aumento da temperatura global e por inúmeras alterações climáticas. Devido a essas adversidades, buscou-se evoluir o mercado de combustíveis derivados de biomassa para uso em motores de combustão interna, tornando se capaz de substituir os combustíveis de origem fóssil (SUHAIMI et al., 2012).

Neste cenário, o interesse comum da sociedade vem impulsionando a comunidade científica a pesquisar e desenvolver estratégias para o aproveitamento de fontes alternativas de energia menos poluentes e renováveis, reduzindo o impacto ambiental (DUPONT; GRASSI; ROMITTI, 2015).

O etanol é uma opção de fonte energética menos poluente e renovável. A utilização do etanol e suas misturas como combustíveis são alternativas ambientalmente interessantes, já que as emissões de poluentes são menores quando comparados a gasolina. O etanol apresenta uma tolerância à combustão com excesso de ar, fato que possibilita uma queima mais completa e com menor emissão de CO e de material particulado (GUARIEIRO; VASCONCELLOS; SOLCI, 2011).

No Brasil, um dos marcos na utilização de fontes de energia alternativas e renováveis se deu na década de 70, por meio do Programa Nacional do Álcool, o Proálcool, um dos maiores e mais duradouros esforços de substituição de combustível fóssil por biocombustível renovável em termos mundiais (NITSCH, 1991).

Segundo Dunham, Bomtempo e Fleck (2011), o sucesso do Programa Nacional do Álcool se deu em função de seis motores de transformação que catalisaram a inovação e o aumento de produção sendo estes: 1) o processo de modernização de 1875 e a instalação dos engenhos centrais; 2) superação da crise do mosaico de cana; 3) formação do mercado de álcool combustível; 4) o desenvolvimento de variedades de cana após a crise do mosaico; 5) a expansão produtiva da agroindústria sucroalcooleira em São Paulo; 6) o relacionamento da agroindústria sucroalcooleira com a indústria de equipamentos.

Desde então o Brasil vem se destacando como um dos maiores produtores mundiais de etanol. Segundo Wosch (2010), em 2008 o Brasil produziu 24,5 bilhões de litros de etanol, ocupando a 2ª posição no ranking mundial, ficando atrás somente

dos Estados Unidos que produziu 35 bilhões de litros de etanol, produtores estes que juntos representaram 90% da produção mundial

Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA) na safra 2017 / 2018, tivemos uma moagem de 641.066.000 toneladas de cana e uma produção de 16.492.000 m³ de etanol hidratado e 11.366.000 m³ de etanol anidro (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2018).

A produção de etanol se dá através por meio da transformação do açúcar em álcool etílico pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar dos esforços visando a utilização de outros microrganismos para a obtenção de etanol nas destilarias brasileiras, a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* continua sendo a mais adequada, pois por se tratar de processos não estéreis, necessita se de um microrganismo “robusto”, capaz de suportar condições drásticas. (REIS, 2011)

As leveduras são organismos eucarióticos pertencente ao reino dos fungos, apresentam-se, normalmente, na forma unicelular, medindo de 2 a 8 µm de diâmetro e reproduzem-se basicamente por brotamento, mas eventualmente podem se reproduzir sexuadamente (TOSETTO, 2008).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* apresentam alta eficiência fermentativa, crescimento rápido, eficiente metabolização de açúcares, habilidade na produção e consumo de etanol, tolerância a elevados teores alcoólicos e baixos níveis de oxigênio, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura e atividade celular em ambientes ácidos que são fundamentais na sua utilização industrial (ANDRIETTA et al., 2007).

Devido à importância biotecnológica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de alimentos e bebidas alcoólicas em todo o mundo e em combustíveis renováveis no Brasil, este microrganismo tornou-se um dos mais estudados. Consequentemente, seu metabolismo é um dos mais conhecidos, sendo amplamente utilizado no processo de fermentação alcoólica (SHULER; KARGI, 2002).

As leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, fazem uso de carboidratos em seu metabolismo, são classificados como microrganismos facultativos já que podem catabolizar açúcares para a produção de energia química celular (ATP) pelas vias aeróbia e anaeróbia (VENTURINI FILHO et al., 2013).

A catabolização dos açúcares pela via aeróbica, também conhecida como respiração, é o processo no qual uma molécula de sacarose é oxidada na presença

de oxigênio, resultando em gás carbônico e água conforme a equações 1 e 2 (LEHNINGER, 2002):

$$\underset{342\ g/mol}{C_{12}H_{22}O_{11}} + \underset{18\ g/mol}{H_2O} \rightarrow \underset{180\ g/mol}{C_6H_{12}O_6} + \underset{180\ g/mol}{C_6H_{12}O_6} \quad (1)$$

$$\underset{360\ g/mol}{2\ C_6H_{12}O_6} + \underset{384\ g/mol}{12\ O_2} \rightarrow \underset{528\ g/mol}{12\ CO_2} + \underset{216\ g/mol}{12\ H_2O} \quad (2)$$

Já para a catabolização dos açúcares pela via anaeróbica, também conhecida como fermentação alcoólica, uma molécula de sacarose é oxidada na ausência de oxigênio dando origem ao etanol e ao gás carbônico conforme equações 3 e 4 (LEHNINGER, 2002):

$$\underset{342\ g/mol}{C_{12}H_{22}O_{11}} + \underset{18\ g/mol}{H_2O} \rightarrow \underset{180\ g/mol}{C_6H_{12}O_6} + \underset{180\ g/mol}{C_6H_{12}O_6} \quad (3)$$

$$\underset{360\ g/mol}{2\ C_6H_{12}O_6} \rightarrow \underset{184\ g/mol}{4\ C_2H_5OH} + \underset{176\ g/mol}{4\ CO_2} \quad (4)$$

A partir da estequiometria da reação global da glicólise, temos que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g) juntamente com 2 moles de dióxido de carbono (88 g), portando o rendimento teórico (Y p/s) para a produção de etanol é de 0,511 g/g (TOSETTO, 2002).

Inúmeros fatores influenciam nas reações catalisadas enzimaticamente no metabolismo celular, fatores como pH, temperatura, pressão, concentração de reagentes, concentração de nutrientes, etc., afetam os parâmetros cinéticos que definem as taxas de reprodução celular, consumo de substrato e produção de etanol e levedura (TOSETTO, 2002).

A levedura como entidade viva independente realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto desse processo. Se o homem pretende beneficiar-se dessa habilidade metabólica, ele deve buscar os conhecimentos que lhe permitam propiciar às leveduras, condições ideais para que as mesmas trabalhem a

seu favor, isto é, com maior eficiência na produção de etanol (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

No dia a dia da indústria é de suma importância conhecer o desempenho da levedura utilizada no processo, e o quanto ela se adapta ao processo industrial gerando altos rendimentos (Y p/s e Y x/s). Segundo dados citados por Ferrari (2008), os rendimentos em biomassa (Y x/s) e em etanol (Y p/s) variam de um autor para outro. Lee, Pollard e Coulman (1983), assumem estes valores como sendo 0,06 e 0,375. Daugulis e Swaine (1987) assumem valores destes rendimentos como sendo 0,08 e 0,425. Andrietta e Stupiello (1990) atribuem a estes, valores de 0,033 e 0,445.

Em um trabalho de Ferreira (2008) citado por Reis (2011), as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* cepa SA-1 (Usina Santa Adélia - Copersucar), BG-1 (Usina Barra Grande - Copersucar), CAT-1 (Usina Catanduva - Fermentec/ESALQ) e PE-2 (Usina da Pedra - Fermentec/ESALQ) apresentaram características conforme a Tabela 1:

Tabela 1 - Rendimentos, produtividades, velocidades e conversão de leveduras tradicionais

VARIÁVEL	UNIDADE	SIGLA	*REF.	SA1	BG1	CAT	PE2
Rendimento de leveduras	g células produzida em massa seca/ g ART consumido	Y x/s	0,0400	0,0440	0,0463	0,0409	0,0479
Rendimento de etanol	g de etanol produzido/ g ART consumido	Y p/s	0,4600	0,4665	0,4642	0,4694	0,4637
Produtividade	g de etanol / Volume de meio x hora	Prod	2,5000	2,6579	2,1971	2,5674	2,5113
Velocidade de consumo de substrato	g de ART / volume de meio x hora	VCS	5,8000	6,0803	5,0518	5,8369	5,7802
Conversão de substrato	g de ART consumido x 100/ g de ART inicial	Conv	90,000	93,960	79,070	90,480	89,820
Produtividade específica	g de etanol / Volume de meio x hora x g de célula em massa seca	Prod Esp	0,4800	0,4420	0,4183	0,4799	0,4042
Velocidade de consumo de substrato específica	g de ART consumido / volume de meio x hora x g de células em massa seca	VCS Esp	1,0500	0,9535	0,9535	1,0288	0,8772

Fonte: Reis et al. (2011)

A cepa BG1 é uma das mais utilizadas no setor sucroenergético. Por meio da Tabela 1 contida no trabalho de Ferreira (2008) citado por Reis (2011), identifica-se um grande potencial desta levedura no rendimento de etanol (Y p/s), ou seja, na conversão de açúcares a etanol. Essa característica, aliada a robustez e a capacidade de adaptação da mesma para diferentes condições operacionais possibilitam altas eficiências industriais (ART Produtos / ART Adicionado).

Outra característica marcante da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa BG1, é a capacidade de produção de massa seca de levedura ou o rendimento de leveduras

(Y x/s), essa característica atrai muita atenção para unidades industriais que comercializam levedura seca e seus derivados, possibilitando então uma nova oportunidade de negócio.

Segundo Kocková-Kratochvílová (1990), a respiração e a fermentação são mutualmente acopladas, a maior frequência de um ou outro depende da levedura utilizada e de outros fatores, como a concentração celular e a de açúcares. Para a concentração celular, o aumento do número de células inoculadas diminui a energia reprodutiva da cultura, reduzindo assim a intensidade do processo respiratório em favor de processos fermentativos. Já para a concentração de açúcares, uma elevada concentração inibe a biossíntese de enzimas respiratórias, efeito Custer´s, em paralelo, temos a inibição da atividade das enzimas respiratórias, efeito Crabtree. Nesse cenário a mesma dividiu as leveduras em três grupos em função de sua capacidade respiratória: a) prevalência da respiração - leveduras forrageiras (a respiração é responsável por 100 % do catabolismo); b) respiração e fermentação são semelhantes - leveduras patogênicas, de panificação e cervejeira de alta fermentação (a respiração corresponde a 40-50 % do catabolismo); c) prevalência da fermentação - leveduras de destilaria, vinho e cervejeira de baixa fermentação (a respiração responde por 10-15 % do catabolismo) (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990).

Briggs et al. (2004) relataram que leveduras facultativas podem ser classificadas como: tipo respiratório (mais de 70 % do açúcar metabolizado por respiração) e tipo fermentativo (menos de 10 % do açúcar é respirado). Esses autores enumeraram vários tipos de catabolismo de açúcar em leveduras: a) efeito Crabtree short-term – atenuação da respiração pela presença de glicose; b) efeito Crabtree long-term – repressão e inativação da respiração pela presença de glicose; c) efeito Pasteur – redução da glicólise sob condições aeróbias; d) efeito Kluyver – utilização aeróbia obrigatória de dissacarídeos; e) efeito Custer’s – estimulação aeróbia da fermentação da glicose.

De acordo com Venturini Filho et al. (2013), as leveduras catabolizam o açúcar tanto pelo metabolismo aeróbio como pelo anaeróbio, com prevalência do segundo. A atividade metabólica anaeróbia é proporcional à concentração inicial de sólidos solúveis do mosto, quanto maior for a concentração de açúcares, maior será a atividade metabólica anaeróbia e menor a do metabolismo aeróbio. No mesmo estudo, os autores relatam a taxa de fermentação no mosto de melaço que ficou entre 80,02

% (10 °Brix) e 91,58 % (30 °Brix), já para mosto de caldo de cana esses valores foram de 83,17 % (10 °Brix) e 89,16 % (30 °Brix) indicando a presença do efeito Crabtree.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Matérias-primas

Água

A água utilizada no preparo do mosto foi a de captação e tratamento da própria da usina.

Açúcar

O açúcar ($C_{12}H_{22}O_{11}$) utilizado para o preparo do mosto sintético foi o açúcar cristal tipo 3C do mesmo lote de produção, fornecedor Copersucar. O açúcar tipo 3C, se caracteriza por possuir cor ICUMSA (ICUMSA, 2011) de máximo 400 UI, resíduo insolúvel gravimétrico de no máximo 100 mg/kg, pontos pretos de no máximo 40 N/100 g, polarização maior ou igual a 99,50 ºZ, umidade de no máximo 0,07%, cinzas de no máximo 0,1%, sulfito de no máximo 10 mg/kg e granulometria de 0,5 a 0,8 mm.

Extrato de levedura

O extrato de levedura utilizado para se preparar o mosto foi o produto BYEMF, marca Biorigin de mesmo lote de produção.

Ureia

A ureia ($(NH_2)_2CO$) utilizada na produção do mosto sintético foi da marca Aksell de mesmo lote de produção, contendo uma pureza de 46%.

Sulfato de magnésio

O sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) utilizado na elaboração do mosto sintético foi da marca Base Química de mesmo lote de produção, contendo uma pureza de 98%.

Fosfato monopotássico

O fosfato monopotássico (KH_2PO_4) utilizado na criação do mosto foi da marca Dinâmica Química de mesmo lote de produção, contendo uma pureza de 99%.

Mosto sintético

A elaboração do mosto sintético baseou-se no trabalho de Sonego et al. (2014), neste o açúcar cristal é dissolvido em água, sendo adicionado extrato de levedura (6,80 g/l), ureia (5,32 g/l), sulfato de magnésio (1,40 g/l) e fosfato monopotássico (5,60 g/l).

Levedura

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa BG1, foi utilizada na forma líquida advindo de cultura pura, da marca Biorigin de mesmo lote de produção.

Para a pesquisa utilizou-se da cepa BG1 por se tratar de uma cepa muito empregada no setor sucroenergético.

Para a realização dos testes preparou-se um volume de levedura suficiente para a realização de todos os ensaios, não sendo necessária a reprodução da mesma em laboratório.

A levedura, por se tratar do mesmo lote de produção e em paralelo constar com uma armazenagem a 5 ^oC em câmara de refrigeração manteve as suas características durante a realização dos ensaios. Monitorou-se a viabilidade por meio de contagem microscópica via corante eritrosina, e a mesma se manteve acima de 95 %, o teor de proteína, via determinação de nitrogênio por sistema automatizado Leco PF-50, mantendo-se acima de 50 %, o teor de fosfato, via método espectrofotométrico do molibdovanadato praticado acima de 2,5 ppm e o teor de bactérias totais por contagem

de bastonetes vivos em lâmina, permanecendo esse abaixo de 10^5 em todos os ensaios realizados.

Antimicrobiano – Betabio 45

O antimicrobiano utilizado nos ensaios foi da marca Betabio 45 %, utilizou-se o insumo de mesmo lote de produção.

O Betabio 45 % é composto de beta ácidos extraídos do lúpulo como princípio ativo.

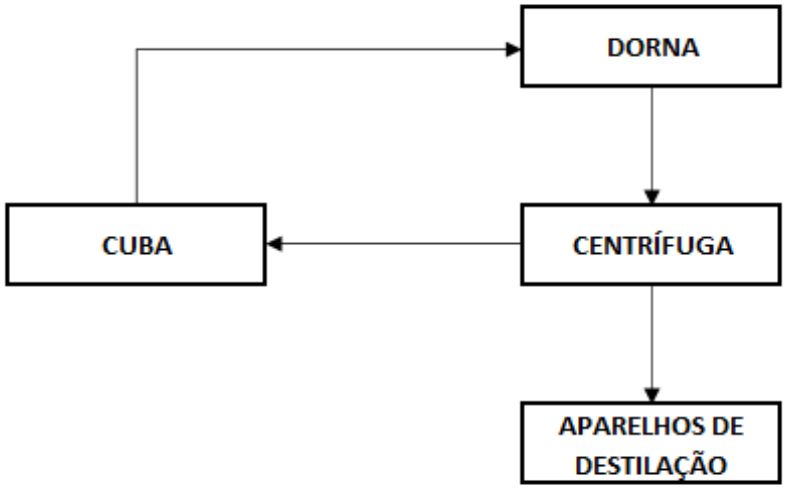
Para os ensaios utilizou-se de uma dosagem de 100 ppm no mosto.

3.2 Métodos

3.2.1 Detalhamento das variáveis independentes

Geralmente, a produção de etanol no Brasil em destilarias, se dá pelo processo de batelada alimentada ou Melle-Boinot. Nesse processo temos uma alimentação contínua da levedura, via mosto, até o atingimento do volume de trabalho do fermentador. Concluída a fermentação, a levedura é recuperada por centrifugação. A seguir, a mesma é encaminhada para um tratamento nas cubas, neste, o levedo é diluído e sofre uma correção do seu pH, com ácido sulfúrico. Em seguida, adiciona-se os minerais e antimicrobianos, dando início a um novo ciclo fermentativo. O vinho delevedurado é encaminhado para destilação, onde o etanol será concentrado e purificado até atingir as especificações do etanol hidratado carburante. Abaixo segue fluxograma do processo:

Figura 1 - Fluxograma de um processo fermentativo do tipo batelada alimentada ou Melle-Boinot



As variáveis independentes adotadas no trabalho são algumas das principais variáveis manipuladas para parametrização das dornas de fermentação nas plantas industriais, sendo estas o teor de ART do mosto (%m/m), o tempo de alimentação (h) e a concentração de inóculo (%v/v), um maior detalhamento das mesmas será dado a seguir.

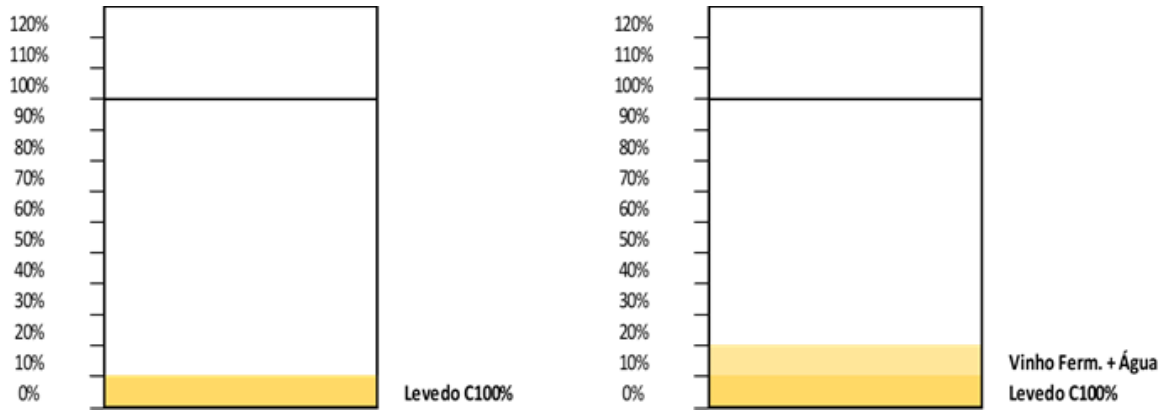
O preparo da dorna de fermentação se dá, em primeiro lugar, pela definição do volume útil ou volume de trabalho da mesma, definido esse valor, se faz necessário definir o inóculo, ou seja, o %v/v de levedura ocupada na dorna de fermentação; mediante essas informações determina-se o volume de levedura na concentração 100 %v/v necessário para atender o inóculo. Porém a levedura não se encontra em uma concentração de 100 %v/v, em vista disso se faz necessário compensar esse montante em função de sua concentração real, ou seja, a concentração da levedura que foi recuperada após a centrifugação da dorna de fermentação do ciclo fermentativo anterior. Após identificar e segregar o volume de levedura necessário para o próximo ciclo fermentativo, se faz necessário adicionar água ao mesmo para reduzir a concentração de compostos nocivos a própria levedura, como ácidos orgânicos e até mesmo o próprio etanol.

Para exemplificar, em uma dorna de fermentação com capacidade de 400 m³ e um volume útil de 330 m³ (70 m³ reservado para espuma, formada durante a fermentação), adotando um inóculo de 10 %v/v e uma levedura recuperada da centrifugação da dorna de fermentação do ciclo anterior com uma concentração de 60

%v/v, aonde que 40 %v/v se trata de vinho fermentado do ciclo anterior, serão necessários 55 m³ da mesma para atender o inóculo solicitado. Ainda neste exemplo, fez-se uso de 20 m³ de água para diluição dos compostos nocivos a levedura. Sendo assim:

- Dorna (Capacidade) = 400 m³
- Dorna (Volume útil) = 330 m³
- Inóculo = 10 %v/v
- Levedura na concentração 100 %v/v = 330 m³ x 10 %v/v = 33 m³
- Concentração da levedura recuperada = 60 %v/v
- 33 m³ _____ 60 %v/v
- X m³ _____ 100%v/v
- X = 55 m³ de levedura + 20 m³ de água = 75 m³

Figura 2 - Representação esquemática de uma dorna de fermentação contendo levedura e água



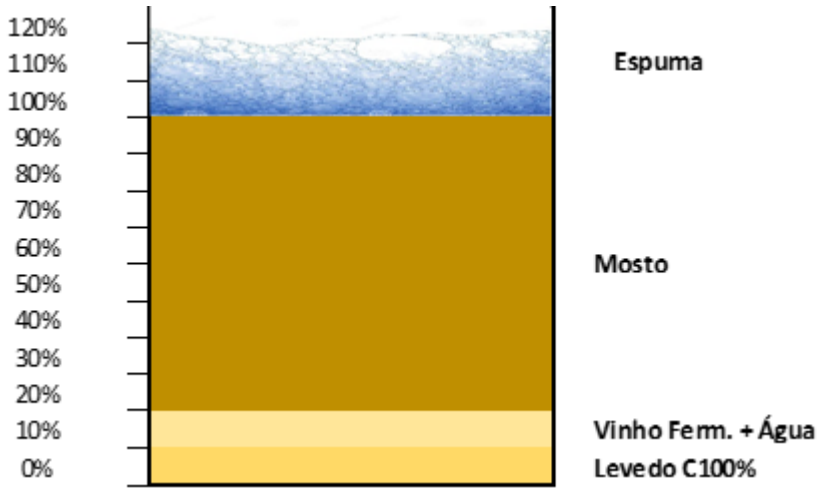
A diferença entre o volume útil da dorna e o volume de levedura diluída será o volume de mosto a ser adicionado na dorna de fermentação. Entende-se como tempo de alimentação o tempo utilizado para bombear todo o volume de mosto para a dorna de fermentação. O mosto nada mais é que uma solução contendo carboidratos (sacarose, glicose, frutose...), minerais (zinco, magnésio, manganês...) e vitaminas (biotina, tiamina, riboflavina...) que servem de meios de manutenção da levedura. Esse teor de carboidratos (%m/m do ART do mosto) é manipulado na planta industrial por via do seu teor de sólidos (ºBrix) e este é alterado através da proporção de mel B

(50 – 80 ºBrix, material não cristalizado durante a produção de açúcar) e caldo tratado (8 – 15 ºBrix) no preparo do mosto.

Fazendo uso do mesmo exemplo citado acima:

- Levedura para dorna (Inóculo) = 75 m³
- Mosto = 330 m³ - 75 m³ = 255 m³
- Tempo de alimentação = 4 h
- Vazão de mosto = 255 m³ / 4 h = 63,75 m³/h
- Mosto - Brix = 21 ºBrix / ART = 18,9 %m/m / Dens. = 1,06 t / m³
- Mosto - ART = 12,77 t / h

Figura 3 - Representação esquemática de uma dorna de fermentação contendo levedura, água e mosto



O exemplo citado acima trata-se de uma dorna em uma escala industrial, porém o conceito detalhado acima pode ser aplicado a dornas em menores escalas como foi o caso da fase de levantamento de dados dessa pesquisa.

3.2.2 Planejamento experimental

O planejamento experimental se deu por intermédio de um delineamento composto central rotacional (DCCR). Esse planejamento foi adotado para se conhecer os efeitos das variáveis independentes sobre as dependentes e a superfície de resposta das mesmas. O delineamento composto central rotacional (DCCR) é constituído de um fatorial completo de 2^3, aliado a 6 pontos axiais e mais 3 repetições no ponto central, obtendo-se assim 17 ensaios (8 + 6 + 3 = 17) (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Tabela 2 - Intervalo de avaliação do DCCR para ART do mosto, tempo de alimentação e inóculo

Variáveis	Código	Níveis					
		-1,68	*-1,00*	*0,00*	*+1,00*	*+1,68*	**D**
ART	x_1	18,95	20,23	22,11	23,98	25,26	1,88
TEMPO	x_2	1,00	1,61	2,50	3,39	4,00	0,89
INÓCULO	x_3	8,00	8,81	10,00	11,19	12,00	1,19

Foram adotadas como variáveis independentes o ART do mosto (18,95 a 25,26 %m/m equivalente a 18 a 24 ºBrix, sabe-se que M.M. sacarose = 342 g/mol e M.M. glicose e frutose = 180 g/mol, portanto % ART = ºBrix x 360 / 342), o inóculo (8 a 12 %v/v) e o tempo de alimentação (1 a 4 h), faixas de operação normalmente adotadas entre as usinas.

Mediante este planejamento fatorial e a realização dos ensaios, obteve-se a avaliação dos efeitos e a significância dos modelos preditivos obtidos por meio da análise da variância; em seguida, as superfícies de resposta e os gráficos de contorno com relação ao desempenho fermentativo, etanol produzido por volume de dorna, m^3 etanol / m^3 dorna, rendimento de etanol, Y p/s, produção de levedura por volume de dorna, t. m.s. levedura / m^3 dorna, rendimento de levedura, Y x/s e rendimento de etanol e levedura, Y p/s + Y x/s.

3.2.3 Processamento

Após a definição das faixas de operação das variáveis independentes, e a execução do planejamento experimental obteve-se o teor de ART do mosto (%m/m), a concentração de inóculo (%v/v) e o tempo de alimentação (h) para cada ensaio.

Tabela 3 - Valores codificados e não codificados do ART do mosto, tempo de alimentação e o inóculo para os 17 ensaios

	ART	Tempo	Inóculo	BRIX	ART	Tempo	Inóculo
	% m/m	h	%	% m/m	% m/m	h	%
1	-1,00	-1,00	-1,00	19,21	20,23	1,61	8,81
2	+1,00	-1,00	-1,00	22,79	23,98	1,61	8,81
3	-1,00	+1,00	-1,00	19,21	20,23	3,39	8,81
4	+1,00	+1,00	-1,00	22,79	23,98	3,39	8,81
5	-1,00	-1,00	+1,00	19,21	20,23	1,61	11,19
6	+1,00	-1,00	+1,00	22,79	23,98	1,61	11,19
7	-1,00	+1,00	+1,00	19,21	20,23	3,39	11,19
8	+1,00	+1,00	+1,00	22,79	23,98	3,39	11,19
9	-1,68	0,00	0,00	18,00	18,95	2,50	10,00
10	+1,68	0,00	0,00	24,00	25,26	2,50	10,00
11	0,00	-1,68	0,00	21,00	22,11	1,00	10,00
12	0,00	+1,68	0,00	21,00	22,11	4,00	10,00
13	0,00	0,00	-1,68	21,00	22,11	2,50	8,00
14	0,00	0,00	+1,68	21,00	22,11	2,50	12,00
15	0,00	0,00	0,00	21,00	22,11	2,50	10,00
16	0,00	0,00	0,00	21,00	22,11	2,50	10,00
17	0,00	0,00	0,00	21,00	22,11	2,50	10,00

A levedura advinda de cultura pura foi armazenada em câmara de refrigeração (5 ^{o}C) para manter as suas características originais. Para a realização dos testes coletou-se o volume necessário para o preparo da dorna, diluiu-se o mesmo com água até 43 %v/v (+ / - 2%) de concentração e posteriormente adicionou-se à dorna conforme o %v/v de inóculo de cada ensaio, este volume após ser coletado era levado à balança para a determinação da sua massa.

Abaixo segue exemplo:

- Dorna (Capacidade) = 45 litros
- Dorna (Volume útil) = 30 litros
- Inóculo = 10 %v/v
- Levedura na concentração 100 %v/v = 30 l x 10 %v/v = 3 l
- Concentração do levedo diluído = 43 %v/v
- 3 l _____ 43 %v/v
- X l _____ 100 %v/v
- X = 6,97 l de levedo diluído

Neste momento, entrava em operação a bomba de recirculação do fermentador com uma vazão de 60 litros / hora, visando manter o levedo em suspensão. A diferença entre o volume útil do fermentador (30 litros) e o volume a ser adicionado de levedura diluída era o volume de mosto a ser adicionado no mesmo, este volume após ser coletado era levado à balança para a determinação da sua massa. A faixa adotada de trabalho foi de 18,95 a 25,26 %m/m para açúcares redutores totais (ART), esta faixa é equivalente a 18 a 24 ºBrix, sabe-se que M.M. sacarose = 342 g/mol e M.M. glicose e frutose = 180 g/mol, portanto % ART = ºBrix x 360 / 342, desta maneira o açúcar cristal era dissolvido em água até atingir o ºBrix solicitado pelo ensaio.

Após dissolver o açúcar, adicionou-se o extrato de levedura (6,80 g / l de mosto), ureia (5,32 g / l de mosto), sulfato de magnésio (1,40 g / l de mosto) e fosfato monopotássico (5,60 g / l de mosto), este preparo foi adotado para todos os ensaios (SONEGO et al., 2014).

Posteriormente, realizou-se a parametrização da temperatura do banho termostático do fermentador em 32 ºC, este era responsável por manter a temperatura do meio fermentativo nos 32 ºC durante todo o ensaio.

Na sequência corrigiu-se a vazão da bomba de alimentação de mosto das dornas para atender o tempo de enchimento solicitado para cada ensaio, essa vazão era obtida por meio do volume de mosto a ser adicionado no fermentador dividido pelo tempo de alimentação do respectivo ensaio.

Abaixo segue exemplo:

- Levedura para dorna (Inóculo) = 6,97 l
- Mosto = 30 l – 6,97 l = 23,03 l
- Tempo de alimentação = 4 h
- Vazão de mosto = 23,03 l / 4 h = 5,75 l / h

Após concluir as etapas mencionadas, iniciou-se os testes, ou seja, a alimentação da levedura com o mosto sintético por meio da bomba de alimentação.

No decorrer da fermentação monitorou-se o ºBrix do meio fermentativo a cada 30 minutos, mediante um sacarímetro até a estabilização do mesmo, adotando esse momento como o término da fermentação, ou seja, tomou-se esse como sendo o momento na qual ocorria o consumo total dos carboidratos por parte da levedura. Com a conclusão do ensaio, o vinho fermentado era levado a balança para a determinação da sua massa. Abaixo segue foto da planta piloto dos ensaios:

Figura 4 - Planta piloto de testes de uma usina do interior do estado de São Paulo, janeiro, 2017



A cada ensaio, determinou-se o ART adicionado, o etanol produzido e a levedura produzida. Em paralelo, as variáveis do desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa BG1, sendo estas, o etanol produzido por volume de dorna (m^3 etanol / m^3 dorna), o rendimento de etanol (Y p/s), a levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m^3 dorna), o rendimento de levedura (Y x/s) e o rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s).

Para a determinação do ART Adicionado de cada ensaio utilizou-se da seguinte equação:

$$\text{Sacarose (kg)} = \text{Mosto adicionado (kg)} \times \text{Brix do mosto} \left(\%\frac{m}{m}\right) \quad (5)$$

Pela estequiometria (equação 3), temos 1 mol de glicose e 1 mol de frutose para cada 1 mol de sacarose, sendo assim:

$$\text{ART adicionado (kg)} = \frac{\text{Sacarose (kg)} \times 2 \times \text{M.M. glic. e frut.} \left(180{,}16 \frac{g}{mol}\right)}{\text{M.M. sacarose} \left(342{,}3 \frac{g}{mol}\right)} \quad (6)$$

Para a determinação do etanol produzido de cada ensaio utilizou-se da seguinte equação:

$$\text{Etanol inicial (kg)} = \text{Levedura adicionada (kg)} \times \frac{\text{Teor alc. (INPM)}}{100} \quad (7)$$

$$\text{Etanol final (kg)} = \text{Vinho fermentado (kg)} \times \frac{\text{Teor alc. (INPM)}}{100} \quad (8)$$

$$\text{Etanol produzido (kg)} = \text{Etanol final (kg)} - \text{Etanol inicial (kg)} \quad (9)$$

Para a determinação da levedura produzida de cada ensaio utilizou-se da seguinte equação:

$$\text{Levedura inicial (kg)} = \text{Levedura adicionada (kg)} \times \text{Massa seca} \left(\%\frac{m}{m}\right) \quad (10)$$

$$\text{Levedura final (kg)} = \text{Vinho fermentado (kg)} \times \text{Massa seca} \left(\%\frac{m}{m}\right) \quad (11)$$

$$\text{Levedura produzida (kg)} = \text{Levedura final (kg)} - \text{Levedura inicial (kg)} \quad (12)$$

Para a determinação do etanol produzido por volume de dorna, m³ etanol / m³ dorna, de cada ensaio utilizou-se da seguinte equação:

$$\frac{m^3 \text{etanol}}{m^3 \text{dorna}} = \frac{\text{Etanol produzido (kg)}}{\text{Densidade do etanol } \left(\frac{kg}{l}\right) \times \text{Volume final da dorna (l)}} \quad (13)$$

Para a determinação do rendimento de etanol, Y p/s, de cada ensaio utilizou-se da seguinte equação:

$$Y\ p/s = \frac{\text{Etanol produzido (kg)}}{\text{ART adicionado (kg)}} \quad (14)$$

Para a determinação da levedura produzida por volume de dorna, t. m.s. de levedura / m³ de dorna, de cada ensaio utilizou-se da seguinte equação:

$$\frac{\text{t. m.s. levedura}}{m^3 \text{ dorna}} = \frac{\text{Levedura produzida (kg)}}{\text{Volume final da dorna (l)}} \quad (15)$$

Para a determinação do rendimento de levedura, Y x/s, de cada ensaio utilizou-se da seguinte equação:

$$Y\ x/s = \frac{\text{Levedura produzida (kg)}}{\text{ART adicionado (kg)}} \quad (16)$$

Para a determinação do rendimento de etanol e levedura, Y p/s + Y x/s, de cada ensaio utilizou-se da seguinte equação:

$$Y\ p/s + Y\ x/s = Y\ p/s + Y\ x/s \quad (17)$$

3.2.4 Análise físico-química

- Brix refratométrico do mosto: conforme CTC (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2011)

- Brix do meio fermentado: conforme CTC (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2011)

- Concentração de levedura concentrada e diluída %v/v: conforme Fermentec (FC4M19/03) (FERMENTEC, 2012)

- Massa seca de levedura concentrada e diluída %m/m: conforme CTC (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2011)

- Teor alcoólico do vinho fermentado: conforme Fermentec (FC4M16/03) (FERMENTEC, 2012)

3.2.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com auxílio do software Minitab® 17.1.0 (MINITAB INC., 2013) para determinação das variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Em paralelo determinou-se a significância dos modelos preditivos por meio da análise da variância (ANOVA), e posteriormente foram geradas superfícies de resposta e gráficos de contorno a partir dos modelos preditivos possibilitando avaliar o desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa BG1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Definido o planejamento experimental e a forma de condução dos experimentos realizou-se a coleta dos dados dos respectivos ensaios:

Tabela 4 - Parâmetros e respostas do ART adicionado, etanol e levedura produzida dos testes realizados em planta piloto de uma usina do interior do estado de São Paulo, janeiro, 2017

	ART	Tempo	Inóculo	ART Adicionado	Etanol Produzido	Levedura Produzida
	%m/m	h	%v/v	kg	kg	Kg
1	20,23	1,61	8,81	20,23	2,20	0,23
2	23,98	1,61	8,81	23,98	2,72	0,14
3	20,23	3,39	8,81	20,23	2,29	0,30
4	23,98	3,39	8,81	23,98	2,71	0,15
5	20,23	1,61	11,19	20,23	2,02	0,06
6	23,98	1,61	11,19	23,98	2,60	0,08
7	20,23	3,39	11,19	20,23	1,97	0,17
8	23,98	3,39	11,19	23,98	2,57	0,19
9	18,95	2,50	10,00	18,95	2,04	0,20
10	25,26	2,50	10,00	25,26	2,82	0,06
11	22,11	1,00	10,00	22,11	2,39	0,10
12	22,11	4,00	10,00	22,11	2,42	0,20
13	22,11	2,50	8,00	22,11	2,57	0,31
14	22,11	2,50	12,00	22,11	2,30	0,12
15	22,11	2,50	10,00	22,11	2,45	0,25
16	22,11	2,50	10,00	22,11	2,46	0,23
17	22,11	2,50	10,00	22,11	2,42	0,26

Mediante os resultados obtidos na tabela 4, determinou-se o etanol produzido por volume de dorna, m³ etanol / m³ dorna, o rendimento de etanol, Y p/s, a produção de levedura por volume de dorna, t. m.s. levedura / m³ dorna, o rendimento de levedura, Y x/s, e o rendimento de etanol e levedura, Y p/s + Y x/s, dos respectivos ensaios, os mesmos estão agrupados na tabela a seguir:

Tabela 5 - Respostas das variáveis dependentes dos testes realizados em uma usina do interior do estado de São Paulo, janeiro, 2017

	Etanol	Y p/s	Levedura	Y x/s	Y p/s + Y x/s
	m³ etanol / m³ dorna		t. m.s. / m³ dorna		
1	$9,3.10^{-2}$	0,42	$7,6.10^{-3}$	0,04	0,46
2	$1,1.10^{-1}$	0,43	$4,7.10^{-3}$	0,02	0,45
3	$9,7.10^{-2}$	0,44	$1,0.10^{-2}$	0,06	0,50
4	$1,1.10^{-1}$	0,44	$5,1.10^{-3}$	0,02	0,46
5	$8,5.10^{-2}$	0,43	$2,1.10^{-3}$	0,01	0,44
6	$1,1.10^{-1}$	0,44	$2,7.10^{-3}$	0,01	0,46
7	$8,3.10^{-2}$	0,42	$5,6.10^{-3}$	0,04	0,45
8	$1,1.10^{-1}$	0,43	$6,3.10^{-3}$	0,03	0,47
9	$8,6.10^{-2}$	0,43	$6,7.10^{-3}$	0,04	0,47
10	$1,2.10^{-1}$	0,44	$2,1.10^{-3}$	0,01	0,45
11	$1,0.10^{-1}$	0,43	$3,5.10^{-3}$	0,02	0,45
12	$1,0.10^{-1}$	0,43	$6,6.10^{-3}$	0,04	0,47
13	$1,1.10^{-1}$	0,43	$1,0.10^{-2}$	0,05	0,49
14	$9,7.10^{-2}$	0,43	$3,9.10^{-3}$	0,02	0,46
15	$1,0.10^{-1}$	0,44	$8,4.10^{-3}$	0,05	0,48
16	$1,0.10^{-1}$	0,44	$7,7.10^{-3}$	0,04	0,48
17	$1,0.10^{-1}$	0,43	$8,7.10^{-3}$	0,05	0,48

4.1 Etanol produzido por volume de dorna

Por meio dos resultados obtidos para o etanol produzido por volume de dorna, m³ etanol / m³ dorna, determinou-se os coeficientes de regressão e os efeitos das variáveis independentes (p-valor) sobre a variável dependente.

Tabela 6 - Regressão e efeitos para o etanol produzido por volume de dorna (m³ etanol / m³ dorna)

Fatores	Coeficiente de Regressão		Erro Padrão	T - Valor	P – Valor
	Codificado	Não codificado			
MÉDIA	$1{,}03.10^{-1}$	$2{,}10.10^{-2}$	0,001	97,770	0,000
ART	$1{,}06.10^{-2}$	$8{,}12.10^{-3}$	0,000	21,430	0,000
TEMPO	$1{,}69.10^{-4}$	$9{,}40.10^{-2}$	0,000	0,340	0,744
INÓCULO	$-3{,}72.10^{-3}$	$-7{,}30.10^{-3}$	0,000	-7,500	0,000
ART*ART	$-6{,}03.10^{-4}$	$-1{,}71.10^{-4}$	0,001	-1,100	0,306
TEMPO*TEMPO	$-8{,}76.10^{-4}$	$-1{,}10.10^{-3}$	0,001	-1,610	0,152
INÓCULO*INÓCULO	$-4{,}66.10^{-4}$	$-3{,}29.10^{-4}$	0,001	-0,850	0,421
ART*TEMPO	$-4{,}22.10^{-4}$	$-2{,}53.10^{-4}$	0,001	-0,650	0,535
ART*INÓCULO	$1{,}29.10^{-3}$	$5{,}77.10^{-4}$	0,001	1,990	0,087
TEMPO*INÓCULO	$-8{,}51.10^{-4}$	$-8{,}04.10^{-4}$	0,001	-1,310	0,230

Para a análise dos dados, utilizou-se de um nível de confiança de 95 %, dessa forma observou-se que as variáveis ART e Inóculo foram estatisticamente significativas ao nível de significância de 5 % (p-valor <0,05) sobre a variável m³ etanol / m³ dorna. Já as variáveis Tempo, ART², Tempo², Inóculo², ART x Tempo, ART x Inóculo, Tempo x Inóculo não foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% (p-valor <0,05) sobre a variável m³ etanol / m³ dorna.

A seguir, segue reparametrização do modelo com os termos estatisticamente significativos (não codificadas) para o etanol produzido por volume de dorna:

$$\frac{m^3 etanol}{m^3 dorna} = 0{,}00794 + 0{,}005655 \times ART\ (\%) - 0{,}003126 \times INÓCULO\ (\%) \quad (18)$$

Determinou-se a significância dos modelos preditivos por meio da análise da variância (ANOVA):

Tabela 7 - ANOVA ou análise de variância para o etanol produzido por volume de dorna (m³ etanol / m³ dorna)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F_{calc}	P - Valor
Regressão	2,000	0,002	0,001	221,660	0,000
Resíduos	14,000	0,000	0,000		
Total	16,000	0,002			

Pela tabela acima identifica-se que a regressão foi altamente significativa (P-valor < 0,05) e a porcentagem de variação explicada via software Minitab® foi de 96,50 %.

Por artifício do modelo preditivo determinou-se as superfícies de resposta, gráficos de contorno e os efeitos das variáveis dependentes sobre a relação m³ etanol / m³ dorna:

Figura 5 - Superfície de resposta relacionando o ART e o inóculo com o etanol produzido por volume de dorna (m³ etanol / m³ dorna)

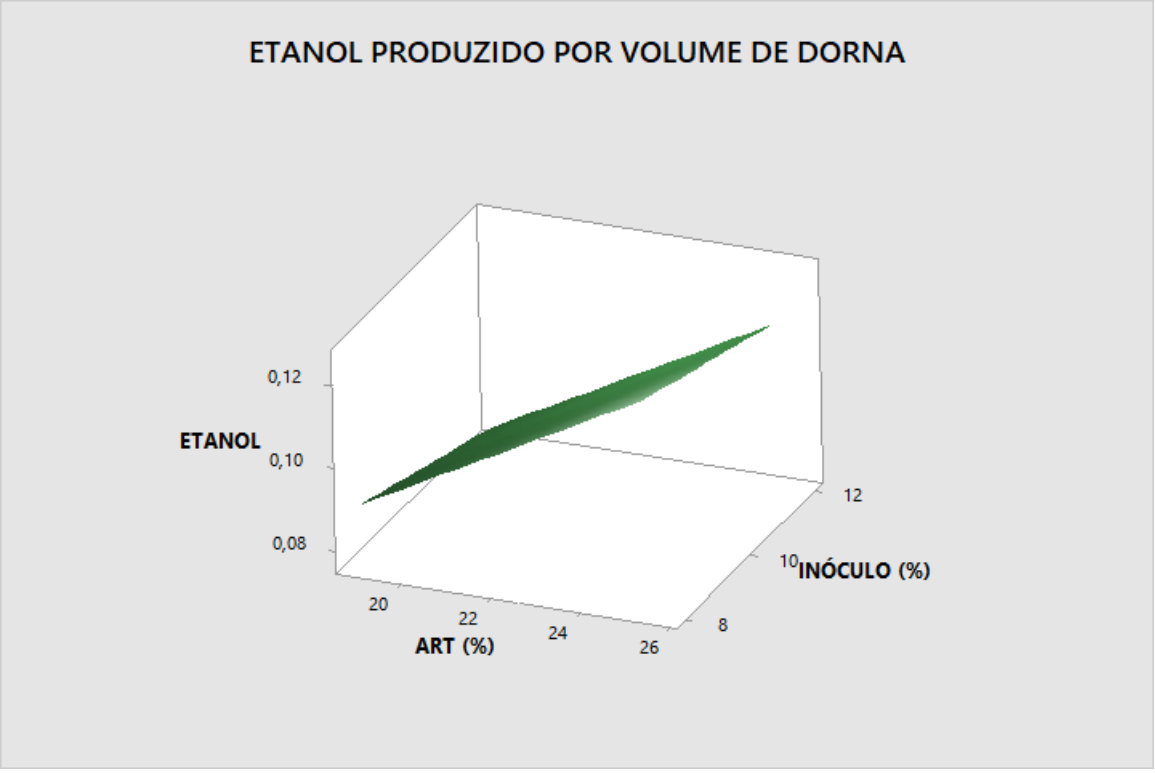


Figura 6 - Gráfico de contorno relacionando o ART e inóculo com o etanol produzido por volume de dorna (m³ etanol / m³ dorna)

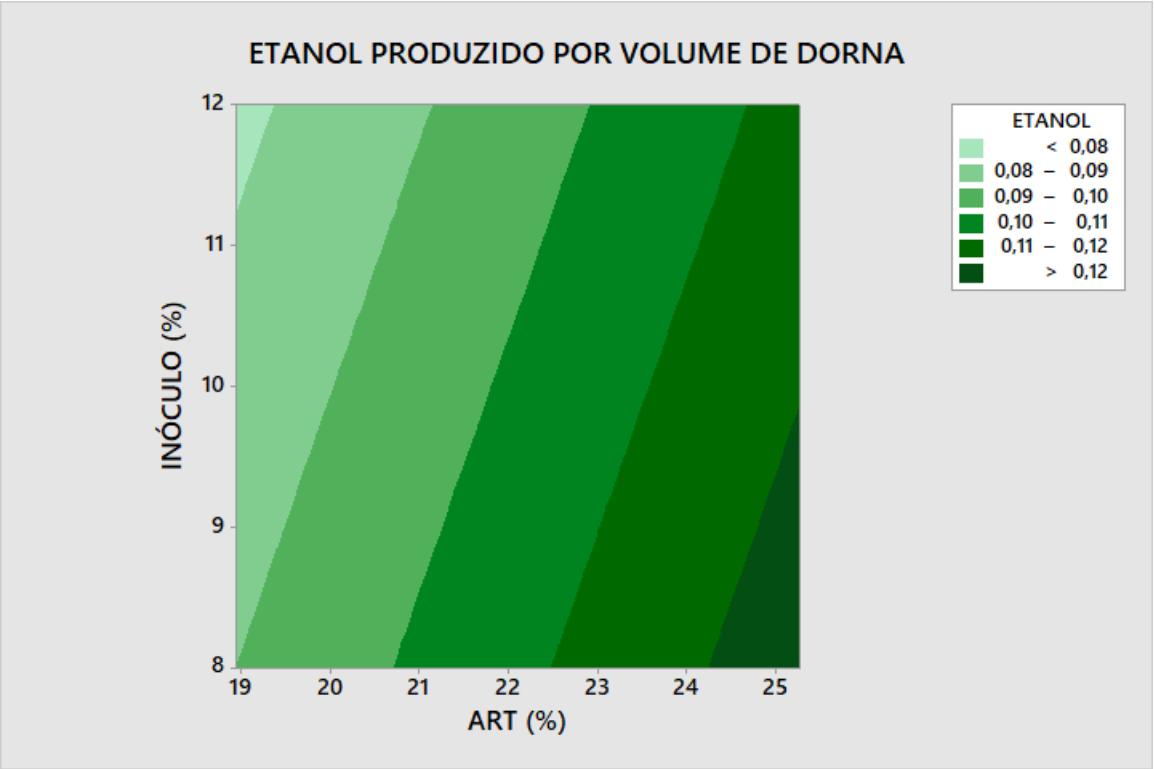
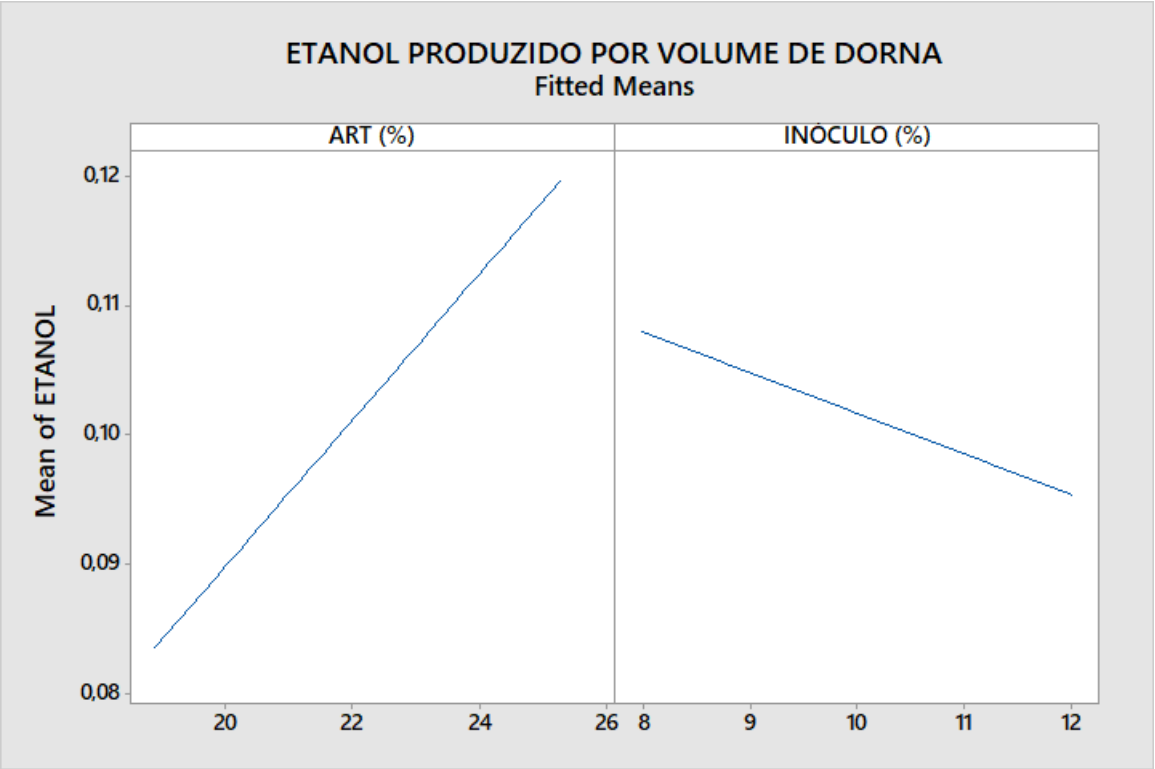
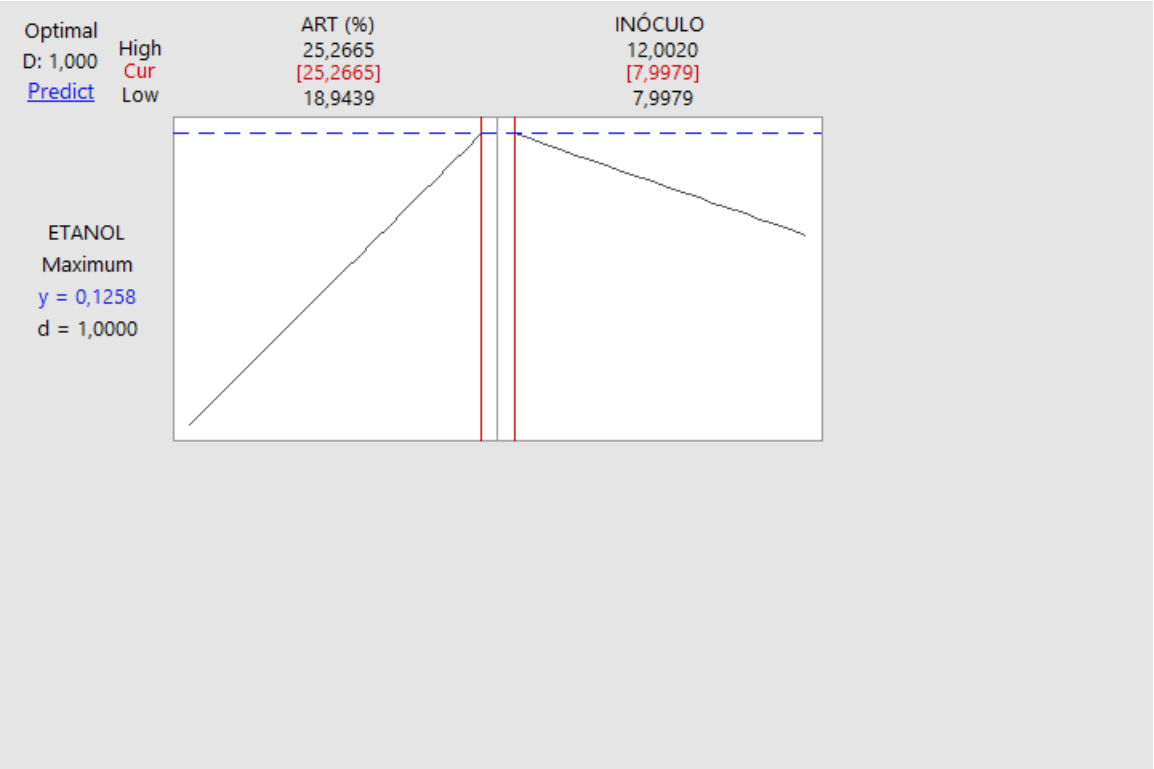


Figura 7 - Efeitos isolados do ART e inóculo no etanol produzido por volume de dorna (m³ etanol / m³ dorna)



Mediante análise da superfície de resposta, do gráfico de contorno e do comportamento isolado, conclui-se que a maximização do etanol produzido por volume de dorna, m³ etanol / m³ dorna, se dá à medida que aumentamos o teor do ART no mosto (25 á 26 %) e reduzimos o inóculo na dorna (8 %), ou seja, à medida que disponibilizamos mais carboidratos para a fermentação, seja via aumento do Brix do mosto (primeiro caso), seja via redução do volume de levedo na dorna (segundo caso). Deste modo, maiores produções de etanol são obtidas por meio de uma maior concentração de carboidratos no meio fermentativo, maximizando a atividade metabólica anaeróbica suprimindo a atividade metabólica aeróbica, comportamento análogo identificado por Venturini Filho et al. (2013).

Figura 8 - Parâmetros de otimização do etanol produzido por volume de dorna (m³ etanol / m³ dorna)



Por recurso da ferramenta de otimização de resposta do software Minitab® 17.1.0 (MINITAB INC., 2013) identificou-se que o ponto de máximo desempenho foi de 0,1258 m³ etanol / m³ dorna e os parâmetros para tal são 25,26 %m/m de ART e 8,00 %v/v de inóculo.

4.2 Rendimento de etanol

Por meio dos resultados obtidos para o rendimento de etanol, Y p/s, determinou-se os coeficientes de regressão e os efeitos das variáveis independentes (p-valor) sobre a variável dependente.

Tabela 8 - Regressão e efeitos para o rendimento de etanol (Y p/s)

Fatores	Coeficiente de Regressão		Erro Padrão	T - Valor	P - Valor
	Codificado	Não codificado			
MÉDIA	$4{,}38.10^{-1}$	$-8{,}40.10^{-2}$	0,002	210,010	0,000
ART	$4{,}76.10^{-3}$	$2{,}76.10^{-2}$	0,001	4,850	0,002
TEMPO	$1{,}24.10^{-3}$	$1{,}06.10^{-1}$	0,001	1,260	0,248
INÓCULO	$-5{,}70.10^{-5}$	$1{,}08.10^{-2}$	0,001	-0,060	0,956
ART*ART	$-2{,}87.10^{-3}$	$-8{,}17.10^{-4}$	0,001	-2,660	0,032
TEMPO*TEMPO	$-2{,}60.10^{-3}$	$-3{,}29.10^{-3}$	0,001	-2,410	0,047
INÓCULO*INÓCULO	$-1{,}78.10^{-3}$	$-1{,}26.10^{-3}$	0,001	-1,650	0,143
ART*TEMPO	$-1{,}82.10^{-3}$	$-1{,}09.10^{-3}$	0,001	-1,420	0,199
ART*INÓCULO	$3{,}07.10^{-3}$	$1{,}37.10^{-3}$	0,001	2,390	0,048
TEMPO*INÓCULO	$-6{,}82.10^{-3}$	$-6{,}44.10^{-3}$	0,001	-5,330	0,001

Para a análise dos dados, utilizou-se de um nível de confiança de 95 %, dessa forma observou-se que as variáveis ART, ART², Tempo², ART x Inóculo e Tempo x Inóculo foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5 % (p-valor <0,05) sobre a variável Y p/s. Já as variáveis Tempo, Inóculo, Inóculo² e ART x Tempo não foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% (p-valor <0,05) sobre a variável Y p/s.

A seguir, segue reparametrização do modelo com os termos estatisticamente significativos (não codificadas) para o Y p/s:

$$Y\frac{p}{s} = 0{,}43596 + 0{,}00476 \times ART\ (\%) - 0{,}00235 \times ART(\%)^2 - 0{,}00208 \times TEMPO\ (h)^2 \times 0{,}00307 \times ART\ (\%) \times INÓCULO\ (\%) - 0{,}00682 \times TEMPO\ (h) \times INÓCULO\ (\%) \quad (19)$$

Tabela 9 - ANOVA ou análise de variância para o rendimento de etanol (Y p/s)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F_{calc}	P - Valor
Regressão	5,000	0,001	0,000	10,770	0,001
Resíduos	11,000	0,000	0,000		
Total	16,000	0,001			

Pela tabela acima identifica-se que a regressão foi altamente significativa (P-valor < 0,05) e a porcentagem de variação explicada via software Minitab® foi de 75,33 %.

Por artifício do modelo preditivo determinou-se as superfícies de resposta, gráficos de contorno e os efeitos das variáveis dependentes sobre o Y p/s:

Figura 9 - Superfície de resposta relacionando o ART, tempo de alimentação e o inóculo com o rendimento de etanol (Y p/s)

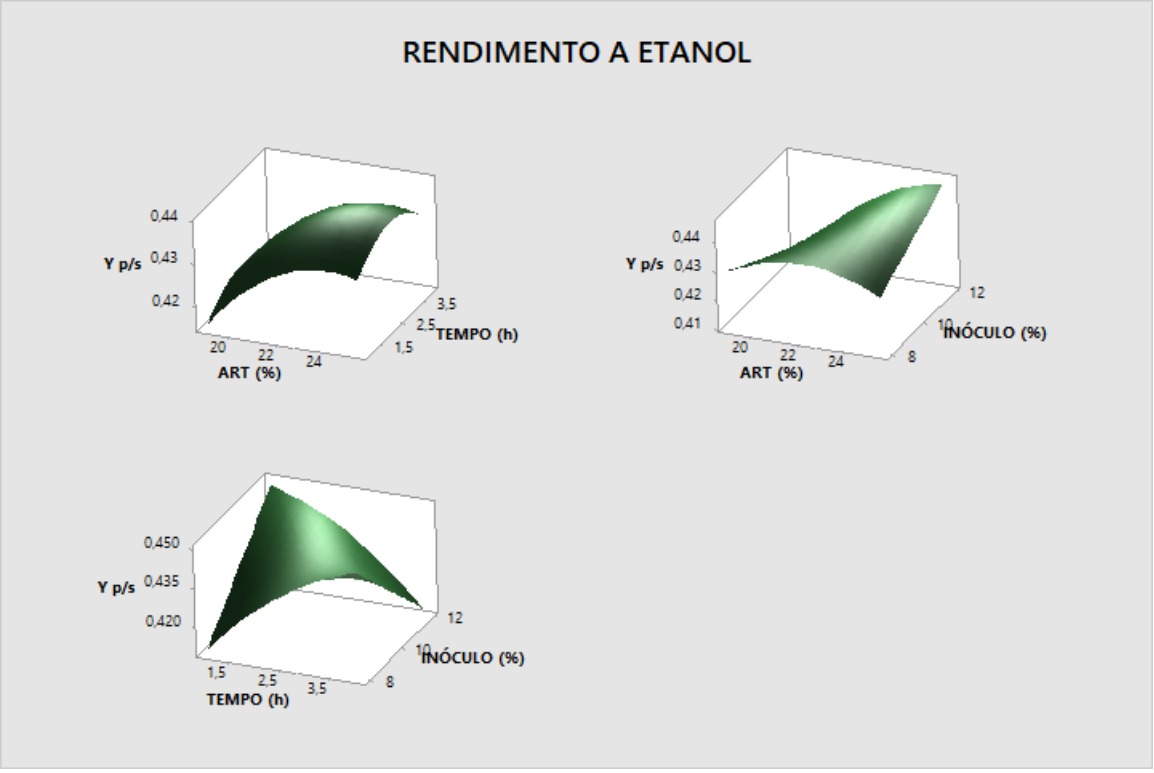


Figura 10 - Gráfico de contorno relacionando o ART, tempo de alimentação e inóculo com o rendimento de etanol (Y p/s)

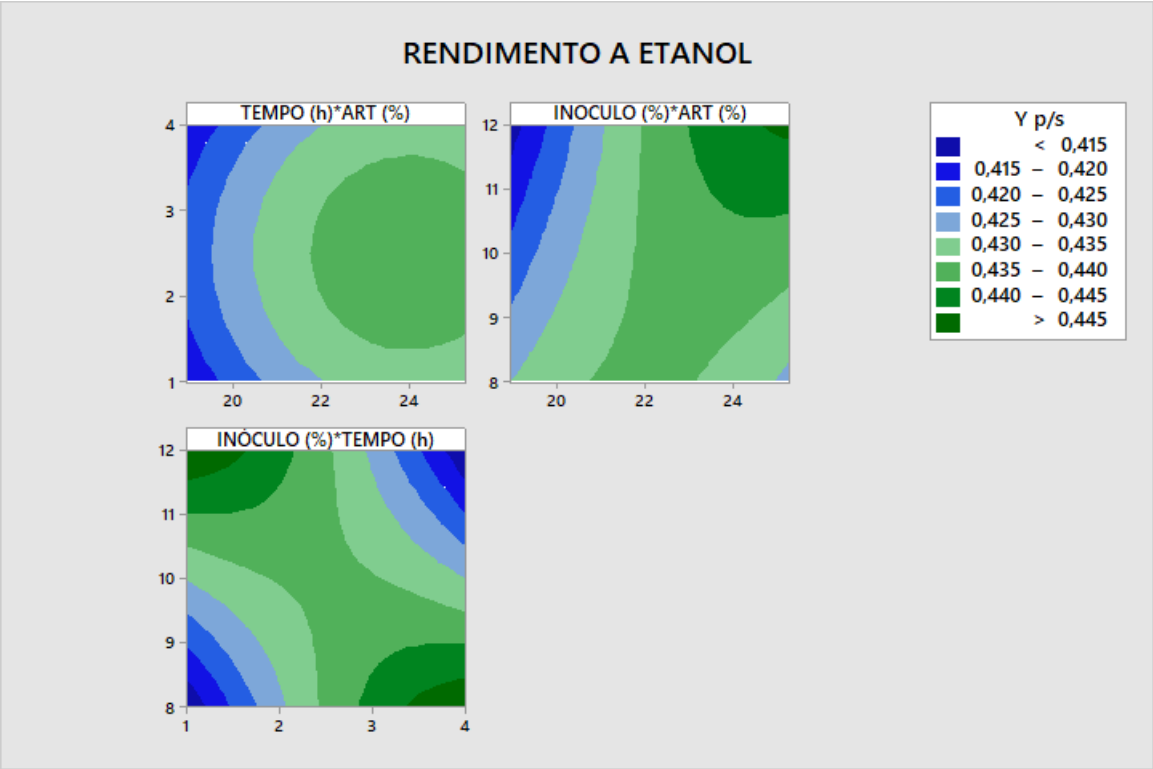


Figura 11 - Efeitos isolados do ART e tempo de alimentação no rendimento de etanol (Y p/s)

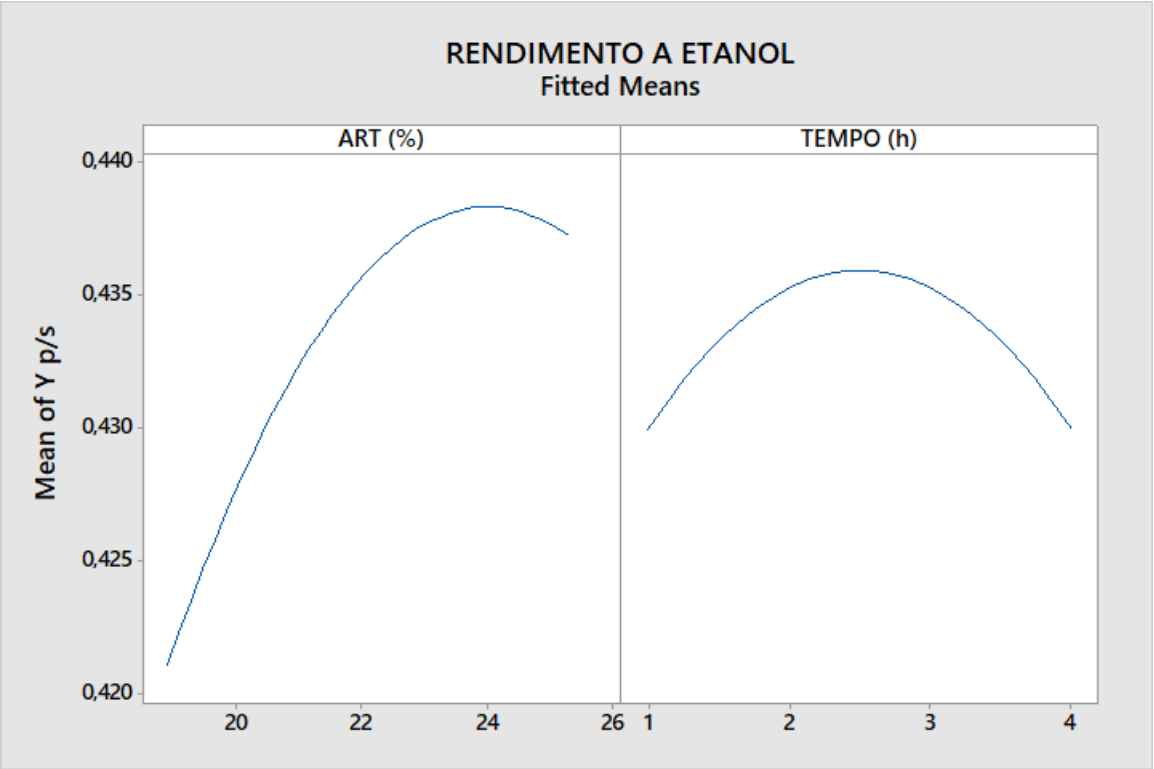
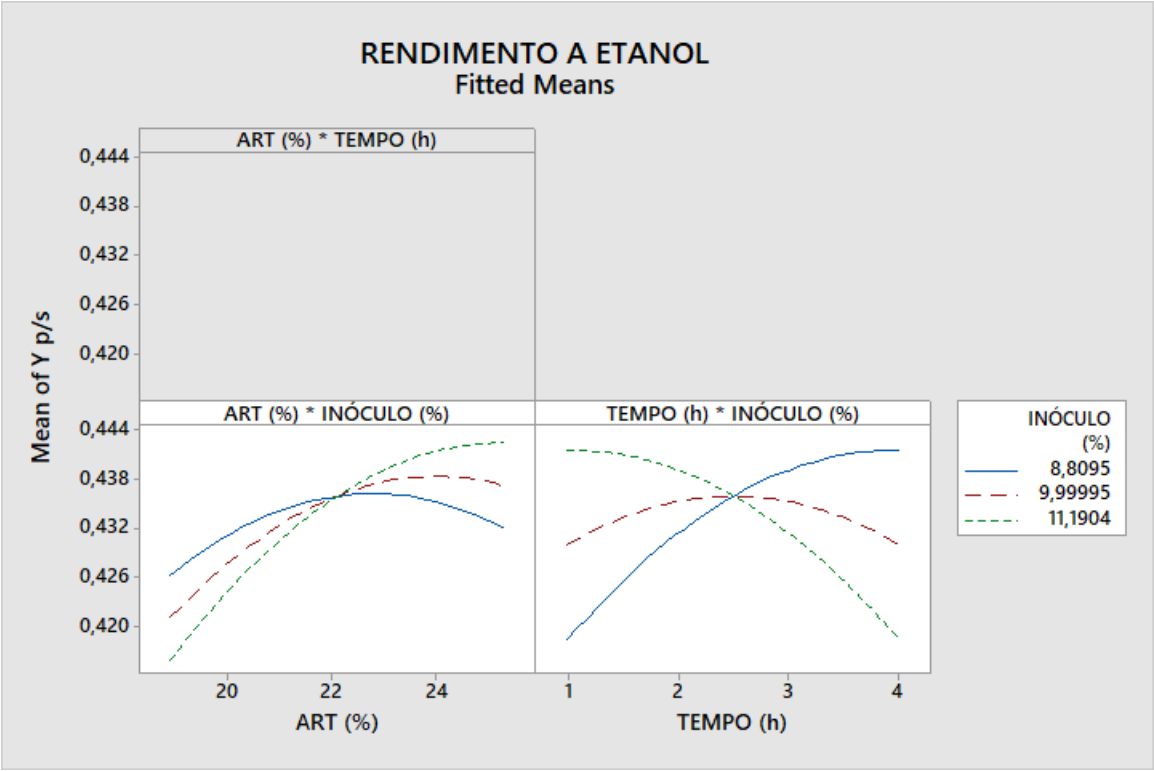
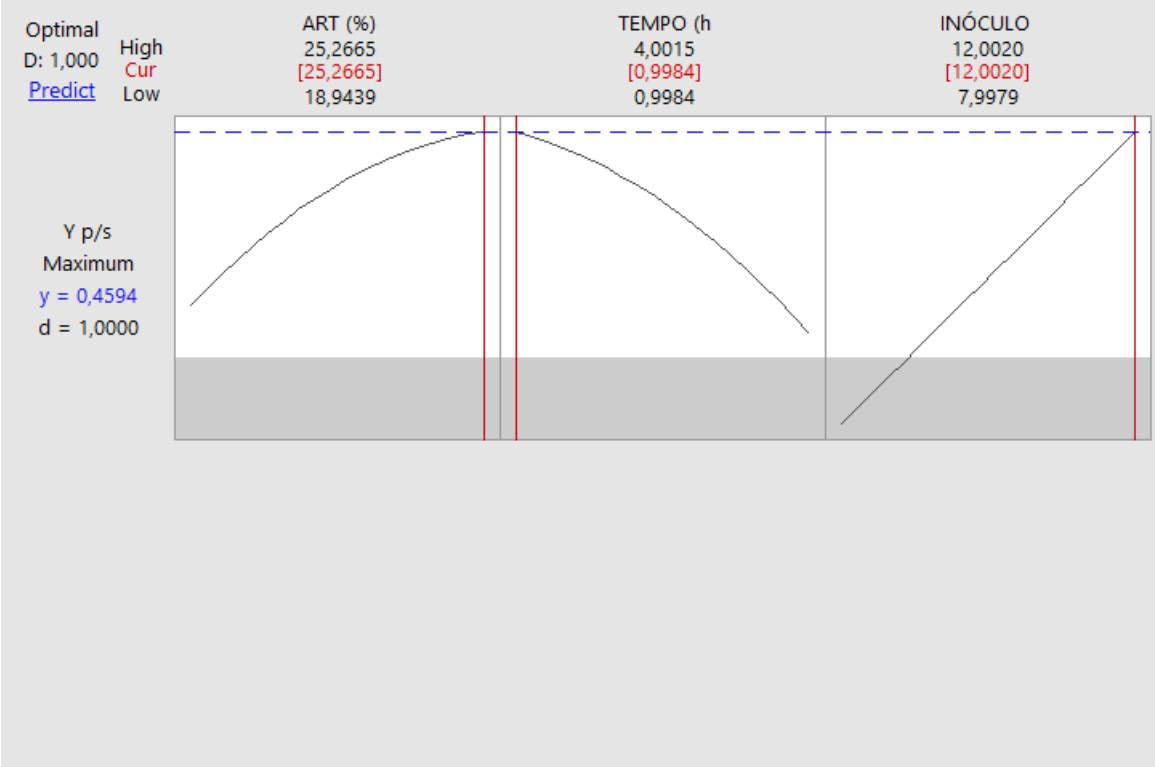


Figura 12 - Efeitos associados do inóculo x ART e inóculo x tempo de alimentação no rendimento de etanol (Y p/s)



Mediante análise da superfície de resposta, do gráfico de contorno, do comportamento isolado e das correlações, conclui-se que a maximização do rendimento de etanol, Y p/s, se dá à medida que aumentamos o ART do mosto juntamente com o inóculo. Já para a relação tempo de alimentação e inóculo, alimentações lentas são indicadas para um reduzido inóculo, 4 horas para 8,8 % de inóculo, e alimentações rápidas são indicadas para um elevado inóculo, 1 hora para 11,2 % de inóculo, evidenciando um equilíbrio entre a concentração celular e de substrato. Deste modo, maiores rendimentos na produção de etanol são obtidos por meio de uma maior concentração de carboidratos no meio fermentativo maximizando a atividade metabólica anaeróbica, comportamento similar identificado por Venturini Filho et al. (2013).

Figura 13 - Parâmetros de otimização do rendimento de etanol (Y p/s)



Por recurso da ferramenta de otimização de resposta do software Minitab® 17.1.0 (MINITAB INC., 2013) identificou-se que o ponto de máximo desempenho foi de 0,4594 para o Y p/s e os parâmetros para tal são 25,26 %m/m de ART, 1,00 h de alimentação e 12,00 %v/v de inóculo.

4.3 Levedura produzida por volume de dorna

Por meio dos resultados obtidos para a produção de levedura (expresso em tonelada) por volume de dorna, t. m.s. levedura / m³ dorna, determinou-se os coeficientes de regressão e os efeitos das variáveis independentes (p-valor) sobre a variável dependente.

Tabela 10 - Regressão e efeitos para a levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m³ dorna)

Fatores	Coeficiente de Regressão		Erro Padrão	T – Valor	P – Valor
	Codificado	Não codificado			
MÉDIA	$8{,}25.10^{-3}$	$-7{,}25.10^{-2}$	0,000	20,180	0,000
ART	$-1{,}04.10^{-3}$	$1{,}14.10^{-2}$	0,000	-5,440	0,001
TEMPO	$1{,}12.10^{-3}$	$6{,}34.10^{-3}$	0,000	5,810	0,001
INÓCULO	$-1{,}57.10^{-3}$	$-8{,}35.10^{-3}$	0,000	-8,160	0,000
ART*ART	$-1{,}32.10^{-3}$	$-3{,}75.10^{-4}$	0,000	-6,240	0,000
TEMPO*TEMPO	$-1{,}11.10^{-3}$	$-1{,}40.10^{-3}$	0,000	-5,240	0,001
INÓCULO*INÓCULO	$-3{,}75.10^{-4}$	$-2{,}65.10^{-4}$	0,000	-1,780	0,119
ART*TEMPO	$-2{,}38.10^{-4}$	$-1{,}42.10^{-4}$	0,000	-0,950	0,375
ART*INÓCULO	$1{,}12.10^{-3}$	$5{,}01.10^{-4}$	0,000	4,460	0,003
TEMPO*INÓCULO	$5{,}35.10^{-4}$	$5{,}05.10^{-4}$	0,000	2,130	0,070

Para a análise dos dados, utilizou-se de um nível de confiança de 95 %, dessa forma observou-se que as variáveis ART, ART², Tempo, Tempo², Inóculo e ART x Inóculo foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% (p-valor <0,05) sobre a variável t. m.s. levedura / m³ dorna. Já as variáveis Inóculo², ART x Tempo e Tempo x Inóculo não foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% (p-valor <0,05) sobre a variável t. m.s. levedura / m³ dorna.

A seguir, segue reparametrização do modelo com os termos estatisticamente significativos (não codificadas) para a levedura produzida por volume de dorna:

$$\frac{\text{t. m.s. levedura}}{\text{m}^3\text{dorna}} = -0{,}0344+0{,}00956 \times \text{ART}(\%) + 0{,}00750 \times \text{TEMPO}$$

$$(\text{h}) - 0{,}01236 \times \text{INÓCULO}\ (\%) - 0{,}000342 \times \text{ART}\ (\%)^2 - 0{,}001251 \times \text{TEMPO}$$

$$(\text{h})^2 + 0{,}000500 \times \text{ART}\ (\%) \times \text{INÓCULO}\ (\%) \qquad (20)$$

Tabela 11 - ANOVA ou análise de variância para a levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m³ dorna)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F_{calc}	P - Valor
Regressão	6,000	0,000	0,000	21,270	0,000
Resíduos	10,000	0,000	0,000		
Total	16,000	0,000			

Pela tabela acima identifica-se que a regressão foi altamente significativa (P-valor < 0,05) e a porcentagem de variação explicada via software Minitab® foi de 88,37 %.

Por artifício do modelo preditivo determinou-se as superfícies de resposta, gráficos de contorno e os efeitos das variáveis dependentes sobre a t. m.s. levedura / m³ dorna:

Figura 14 - Superfície de resposta relacionando o ART, tempo de alimentação e o inóculo com a levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m³ dorna)

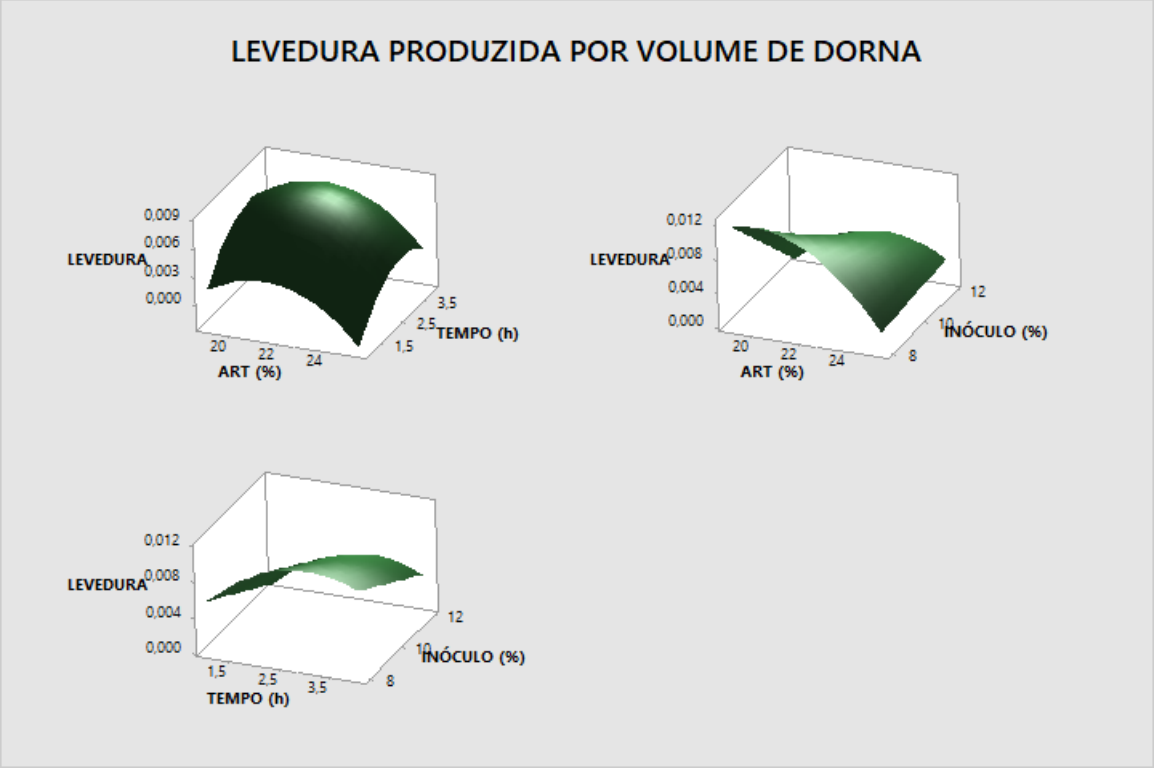


Figura 15 - Gráfico de contorno relacionando o ART, tempo de alimentação e inóculo com a levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m³ dorna)

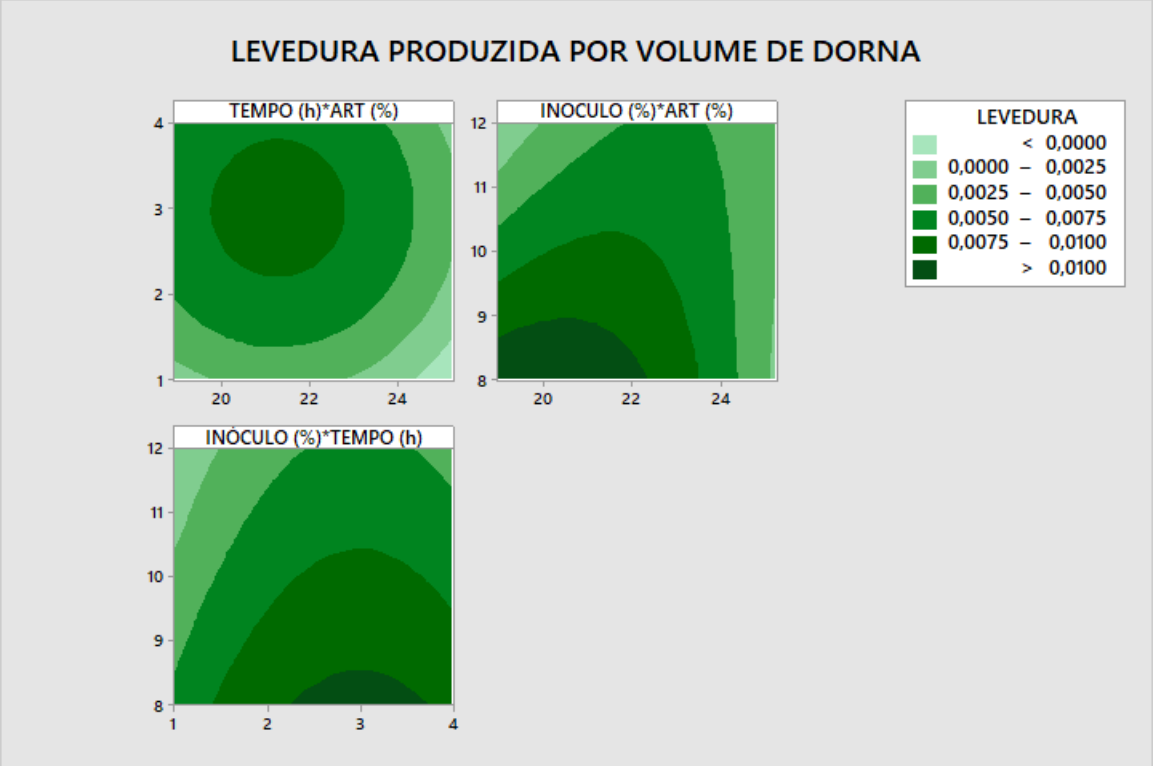


Figura 16 - Efeitos isolados do ART, tempo de alimentação e inóculo na levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m³ dorna)

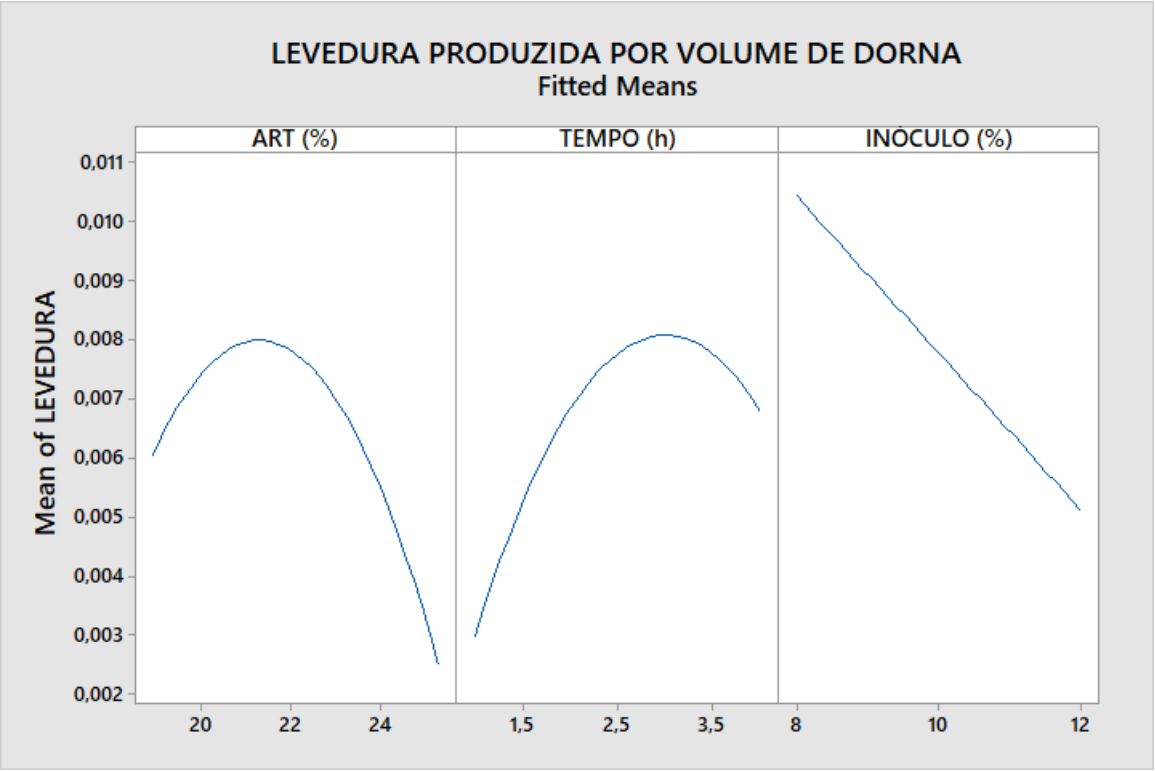
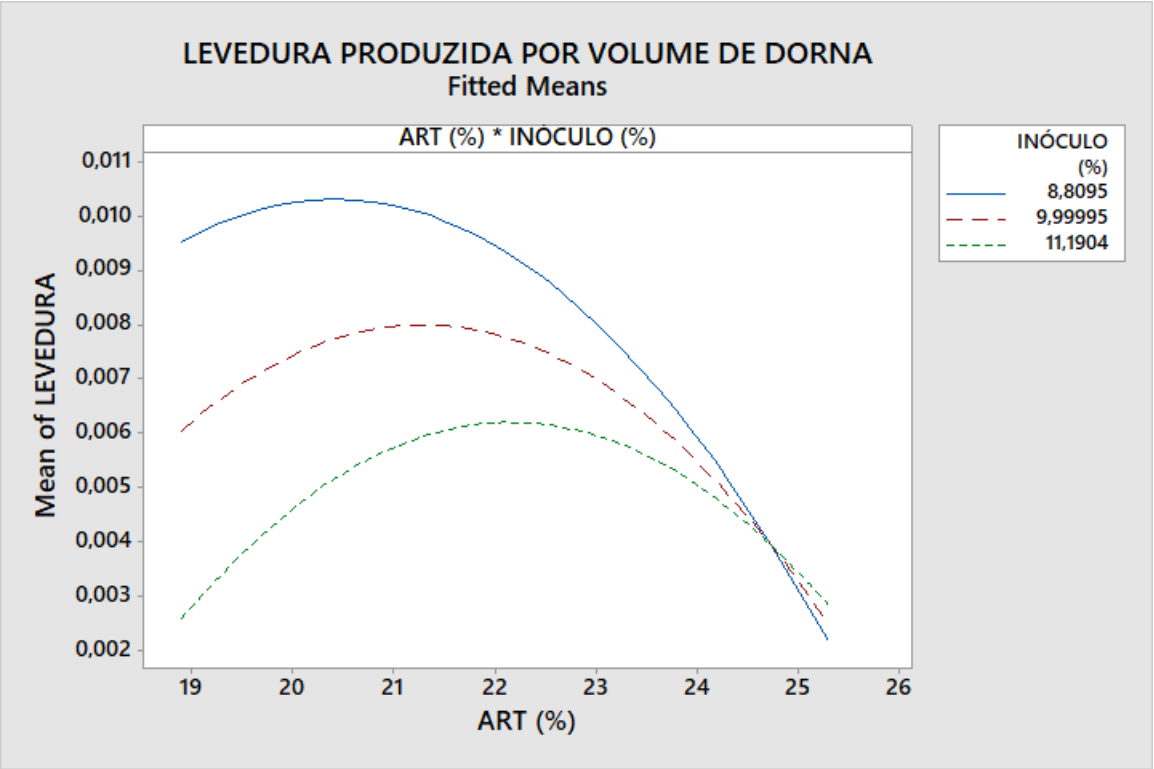
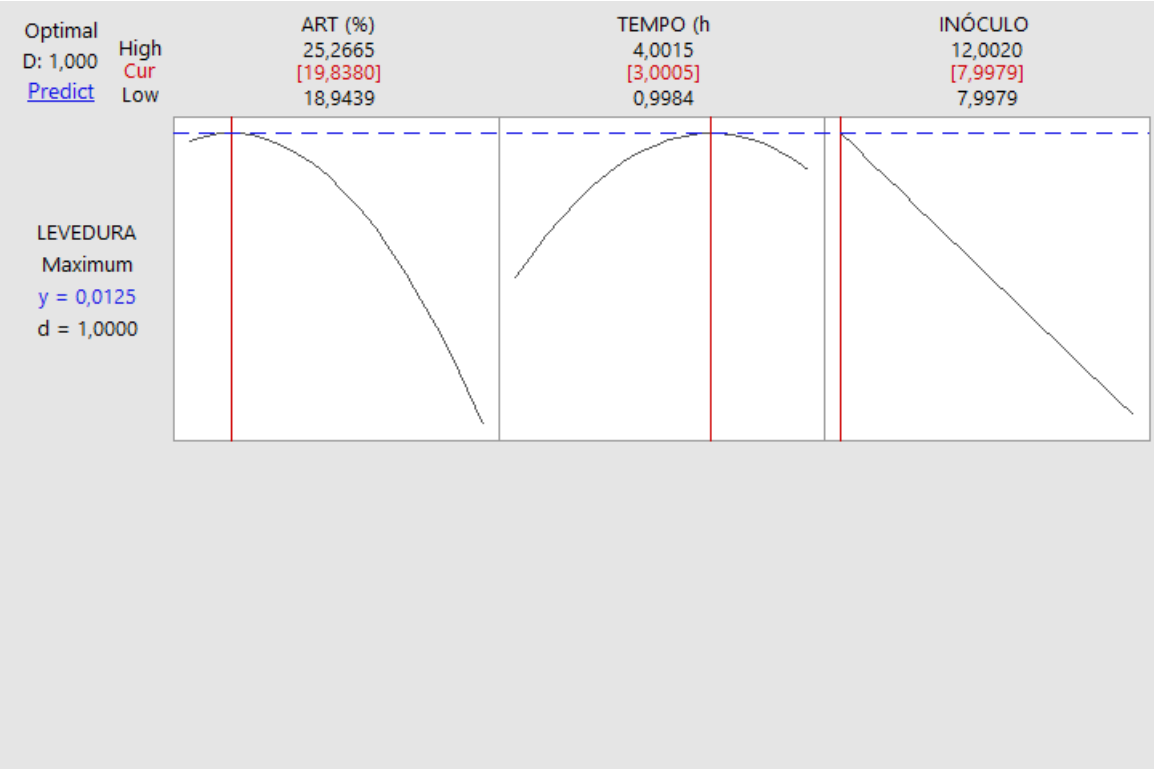


Figura 17 - Efeito associado do inóculo x ART na levedura produzida por volume de dorna (t. m.s. levedura / m³ dorna)



Mediante análise da superfície de resposta, do gráfico de contorno, do comportamento isolado e das correlações, conclui-se que a maximização da levedura produzida por volume de dorna, t. m.s. levedura / m³ dorna, se dá em um reduzido ART do mosto (20 a 21 %) e inóculo (8 %). Com relação ao tempo de alimentação, é possível identificar uma maior produção de levedura quando se faz uso de alimentações lentas (3 h) quando comparadas a alimentações rápidas (1h). Deste modo, maiores produções de levedura são obtidas por meio de uma redução da concentração celular (diminuição da energia reprodutiva) e da redução da concentração de açúcares (biossíntese de enzimas respiratórias, efeito Custer´s, em paralelo, potencialização das atividades das enzimas respiratórias, efeito Crabtree), comportamentos equivalentes relatados por Kocková-Kratochvílová (1990).

Figura 18 - Parâmetros de otimização da levedura produzida por volume de dorna (t m.s. levedura / m³ dorna)



Por recurso da ferramenta de otimização de resposta do software Minitab® 17.1.0 (MINITAB INC., 2013) identificou-se que o ponto de máximo desempenho foi de 0,0125 t. m.s. levedura / m³ dorna e os parâmetros para tal são 19,83 %m/m de ART, 3,00 h de alimentação e 8,00 %v/v de inóculo.

4.4 Rendimento de levedura

Por meio dos resultados obtidos para o rendimento de levedura, Y p/s, determinou-se os coeficientes de regressão e os efeitos das variáveis independentes (p-valor) sobre a variável dependente.

Tabela 12 - Regressão e efeitos para o rendimento de levedura (Y x/s)

Fatores	Coeficiente de Regresão		Erro Padrão	T - Valor	P – Valor
	Codificado	Não codificado			
MÉDIA	$4{,}44.10^{-2}$	$-7{,}00.10^{-2}$	0,002	22,660	0,000
ART	$-8{,}15.10^{-3}$	$4{,}95.10^{-2}$	0,001	-8,860	0,000
TEMPO	$6{,}27.10^{-3}$	$4{,}80.10^{-2}$	0,001	6,820	0,000
INÓCULO	$-7{,}57.10^{-3}$	$-4{,}19.10^{-2}$	0,001	-8,230	0,000
ART*ART	$-6{,}27.10^{-3}$	$-1{,}78.10^{-3}$	0,001	-6,190	0,000
TEMPO*TEMPO	$-5{,}92.10^{-3}$	$-7{,}48.10^{-3}$	0,001	-5,850	0,001
INÓCULO*INÓCULO	$-2{,}34.10^{-3}$	$-1{,}66.10^{-3}$	0,001	-2,320	0,054
ART*TEMPO	$-2{,}02.10^{-3}$	$-1{,}21.10^{-3}$	0,001	-1,680	0,137
ART*INÓCULO	$6{,}24.10^{-3}$	$2{,}80.10^{-3}$	0,001	5,190	0,001
TEMPO*INÓCULO	$2{,}90.10^{-3}$	$2{,}74.10^{-3}$	0,001	2,410	0,046

Para a análise dos dados, utilizou-se de um nível de confiança de 95 %, dessa forma observou-se que as variáveis ART, ART², Tempo, Tempo², Inóculo, ART x Inóculo e Tempo x Inóculo foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% (p-valor <0,05) sobre a variável Y x/s. Já as variáveis Inóculo² e ART x Tempo não foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% (p-valor <0,05) sobre a variável Y x/s.

A seguir, segue reparametrização do modelo com os termos estatisticamente significativos (não codificadas) para o Y x/s:

$$Y\frac{x}{s} = 0{,}056 + 0{,}0375 \times \text{ART}\ (\%) + 0{,}0125 \times \text{TEMPO}\ (h) - 0{,}0748 \times \text{INÓCULO}\ (\%) - 0{,}001577 \times \text{ART}(\%)^2 - 0{,}00656 \times \text{TEMPO}\ (h)^2 + 0{,}002787 \times \text{ART}\ (\%) \times \text{INÓCULO}\ (\%) + 0{,}00273 \times \text{TEMPO}\ (h) \times \text{INÓCULO}\ (\%) \quad (21)$$

Tabela 13 - ANOVA ou análise de variância para o rendimento de levedura (Y x/s)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F_{calc}	P – Valor
Regressão	7,000	0,003	0,000	23,410	0,000
Resíduos	9,000	0,000	0,000		
Total	16,000	0,003			

Pela tabela acima identifica-se que a regressão foi altamente significativa (P-valor < 0,05) e a porcentagem de variação explicada via software Minitab® foi de 90,74 %.

Por artifício do modelo preditivo determinou-se as superfícies de resposta e os gráficos de contorno para o Y x/s:

Figura 19 - Superfície de resposta relacionando o ART, tempo de alimentação e o inóculo com o rendimento de levedura (Y x/s)

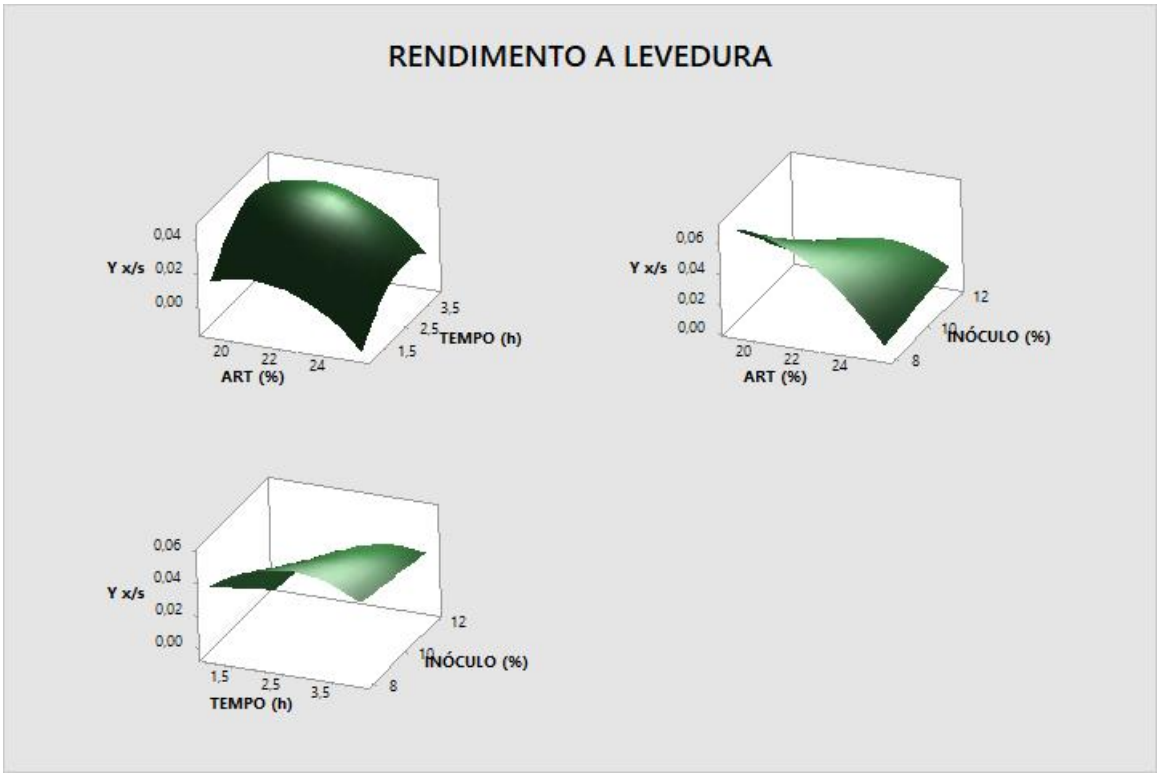


Figura 20 - Gráfico de contorno relacionando o ART, tempo de alimentação e inóculo com o rendimento de levedura (Y x/s)

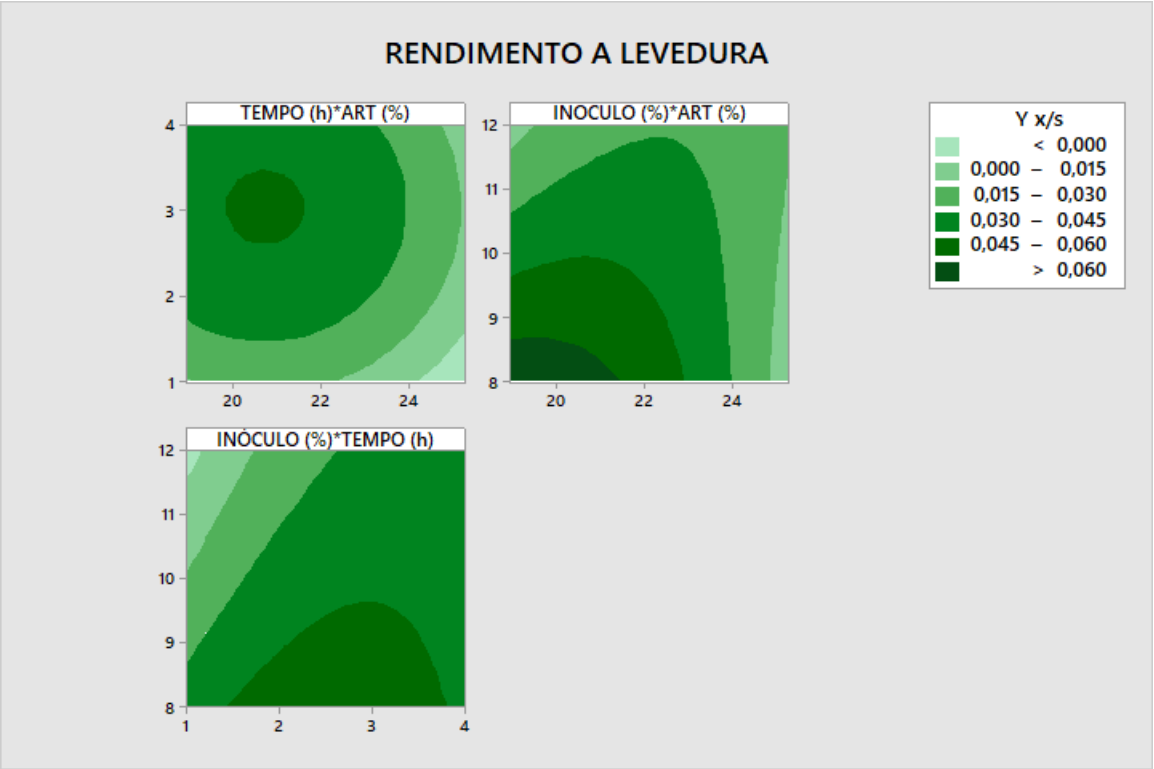


Figura 21 - Efeitos isolados do ART, tempo de alimentação e inóculo no rendimento de levedura (Y x/s)

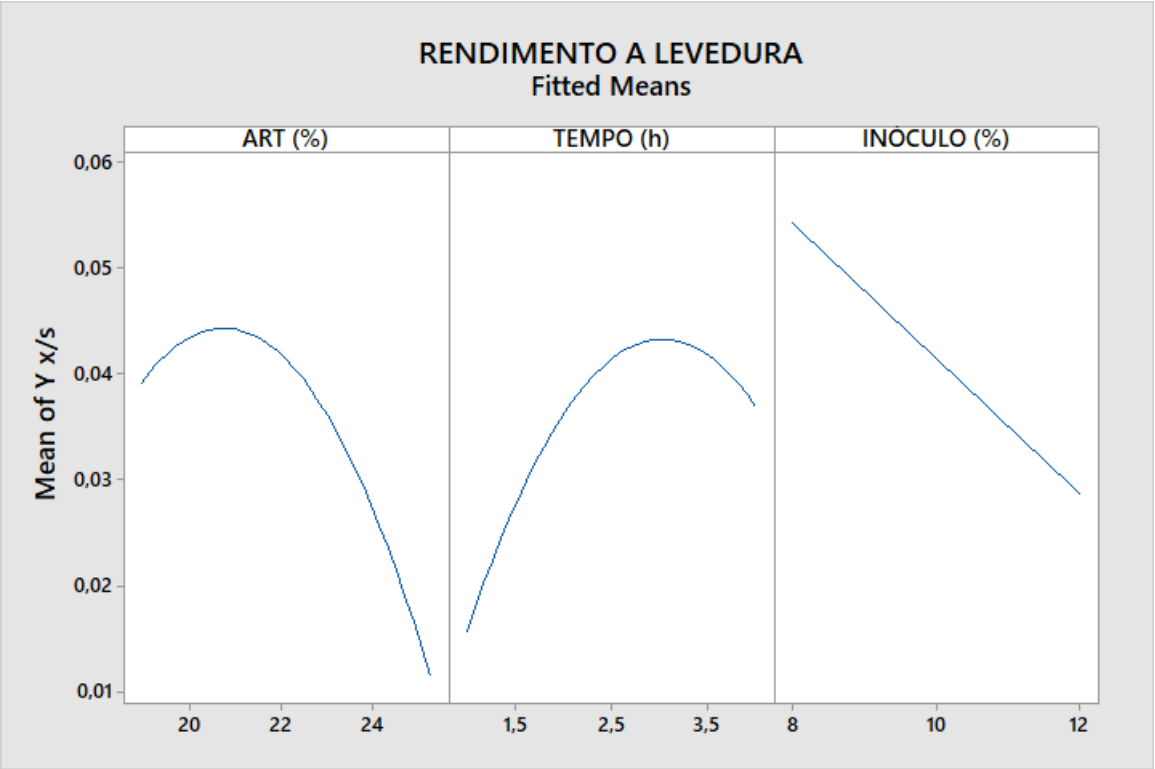
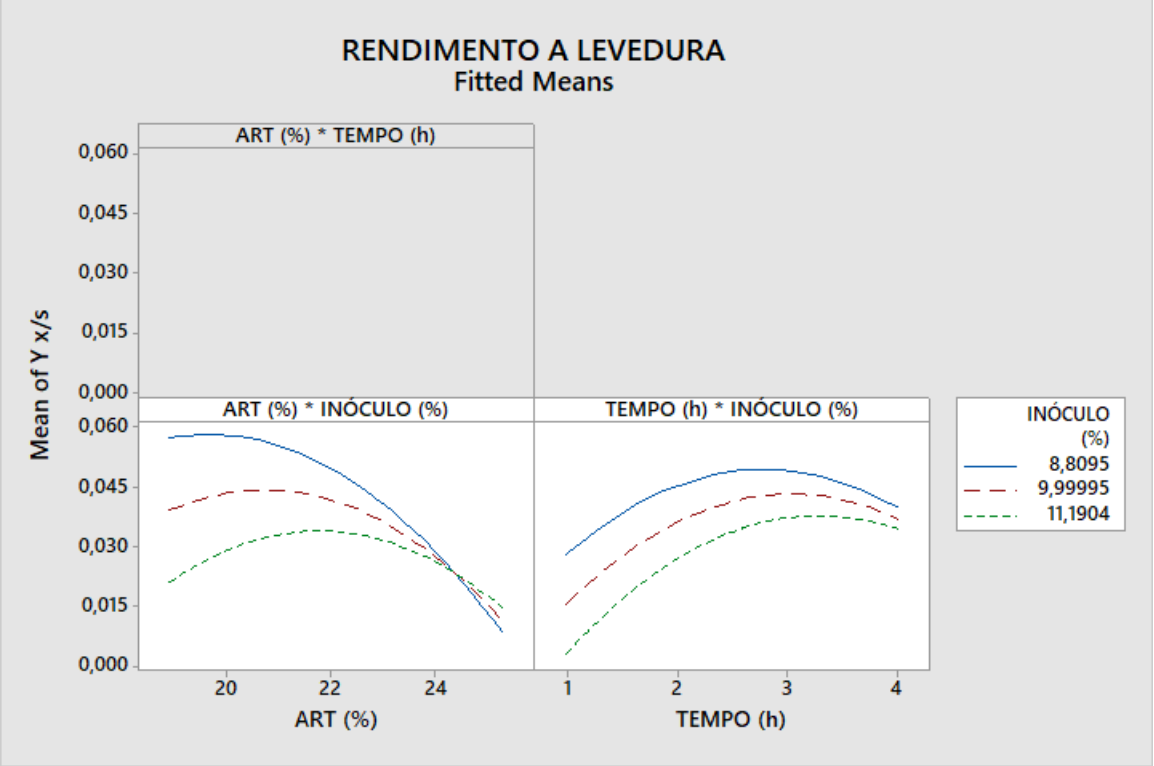


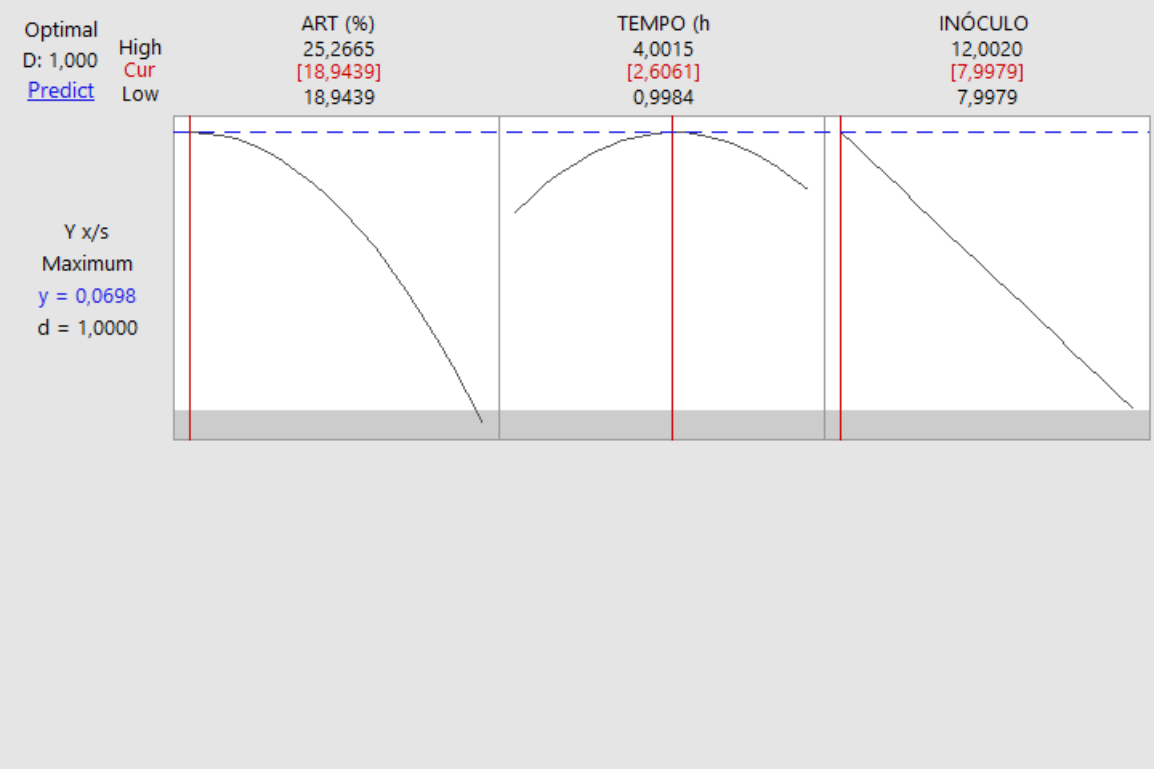
Figura 22 - Efeitos associados do inóculo x ART e inóculo x tempo de alimentação no rendimento de levedura (Y x/s)



Mediante análise das superfícies de resposta e dos gráficos de contorno, do comportamento isolado e das correlações, conclui-se que a maximização do rendimento de levedura, Y x/s, se dá operando com um reduzido ART no mosto (18 a 20 %) e inóculo (8 %). Com relação ao tempo de alimentação é possível identificar um maior rendimento de levedura quando se faz uso de alimentações lentas (2,4 a 3,0 h) quando comparadas a alimentações rápidas (1 h).

Deste modo, a atividade metabólica aeróbica (respiração), é inversamente proporcional à concentração inicial de sólidos solúveis do mosto e a concentração celular. No primeiro caso, quanto menor for a concentração de açúcares, maior será a atividade metabólica aeróbica, comportamento análogo identificado por Venturini Filho et al. (2013). Para o segundo caso, quanto menor a concentração celular inicial, maiores serão as taxas de reprodução (diminuição da energia reprodutiva), comportamento similar relatado por Kocková-Kratochvílová (1990).

Figura 23 - Parâmetros de otimização do rendimento de levedura (Y x/s)



Por recurso da ferramenta de otimização de resposta do software Minitab® 17.1.0 (MINITAB INC., 2013) identificou-se que o ponto de máximo desempenho foi de 0,069 para Y x/s e os parâmetros para tal são 18,94 %m/m de ART, 2,60 h de alimentação e 8,00 %v/v de inóculo.

4.5 Rendimento de etanol e levedura

Por meio dos resultados obtidos para o rendimento de etanol e levedura, Y p/s + Y x/s, determinou-se os coeficientes de regressão e os efeitos das variáveis independentes (p-valor) sobre a variável dependente.

Tabela 14 - Regressão e efeitos para o rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s)

Fatores	Coeficiente de Regresão		Erro Padrão	T - Valor	P – Valor
	Codificado	Não codificado			
MÉDIA	$4,83.10^{-1}$	$-3,61.10^{-1}$	0,003	160,260	0,000
ART	$-3,40.10^{-3}$	$7,72.10^{-2}$	0,001	-2,400	0,047
TEMPO	$7,51.10^{-3}$	$1,01.10^{-1}$	0,001	5,310	0,001
INÓCULO	$-7,63.10^{-3}$	$-3,11.10^{-2}$	0,001	-5,390	0,001
ART*ART	$-9,14.10^{-3}$	$-2,60.10^{-3}$	0,002	-5,870	0,001
TEMPO*TEMPO	$-8,53.10^{-3}$	$-1,08.10^{-1}$	0,002	-5,480	0,001
INÓCULO*INÓCULO	$-4,12.10^{-3}$	$-2.91.10^{-2}$	0,002	-2,650	0,033
ART*TEMPO	$-3,84.10^{-3}$	$-2,30.10^{-3}$	0,002	-2,080	0,076
ART*INÓCULO	$9,30.10^{-3}$	$4,17.10^{-3}$	0,002	5,030	0,002
TEMPO*INÓCULO	$-3,92.10^{-3}$	$-3,70.10^{-3}$	0,002	-2,120	0,072

Para a análise dos dados, utilizou-se de um nível de confiança de 95 %, dessa forma observou-se que as variáveis ART, ART², Tempo, Tempo², Inóculo, Inóculo² e ART x Inóculo foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% (p-valor <0,05) sobre a variável Y p/s + Y x/s. Já as variáveis ART x Tempo e Tempo x Inóculo não foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% (p-valor <0,05) sobre a variável Y p/s + Y x/s.

A seguir, segue reparametrização do modelo com os termos estatisticamente significativos (não codificadas) para o Y p/s + Y x/s:

$$Y\frac{p}{s} + Y\frac{x}{s} = - 0,137 + 0,0710 \times ART\ (\%) + 0,0619 \times TEMPO\ (h) - 0,0401 \times INÓCULO\ (\%) - 0,002586 \times ART(\%)^2 - 0,01070 \times TEMPO\ (h)^2 - 0,00291 \times INÓCULO\ (\%)^2 + 0,00416 \times ART\ (\%) \times INÓCULO\ (\%) \quad (22)$$

Tabela 15 - ANOVA ou análise de variância para o rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F_{calc}	P - Valor
Regressão	7,000	0,004	0,001	11,240	0,001
Resíduos	9,000	0,000	0,000		
Total	16,000	0,004			

Pela tabela acima identifica-se que a regressão foi altamente significativa (P-valor < 0,05) e a porcentagem de variação explicada via software Minitab® foi de 81,75 %.

Por artifício do modelo preditivo determinou-se as superfícies de resposta e os gráficos de contorno para o Y p/s + Y x/s:

Figura 24 - Superfície de resposta relacionando o ART, tempo de alimentação e o inóculo com o rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s)

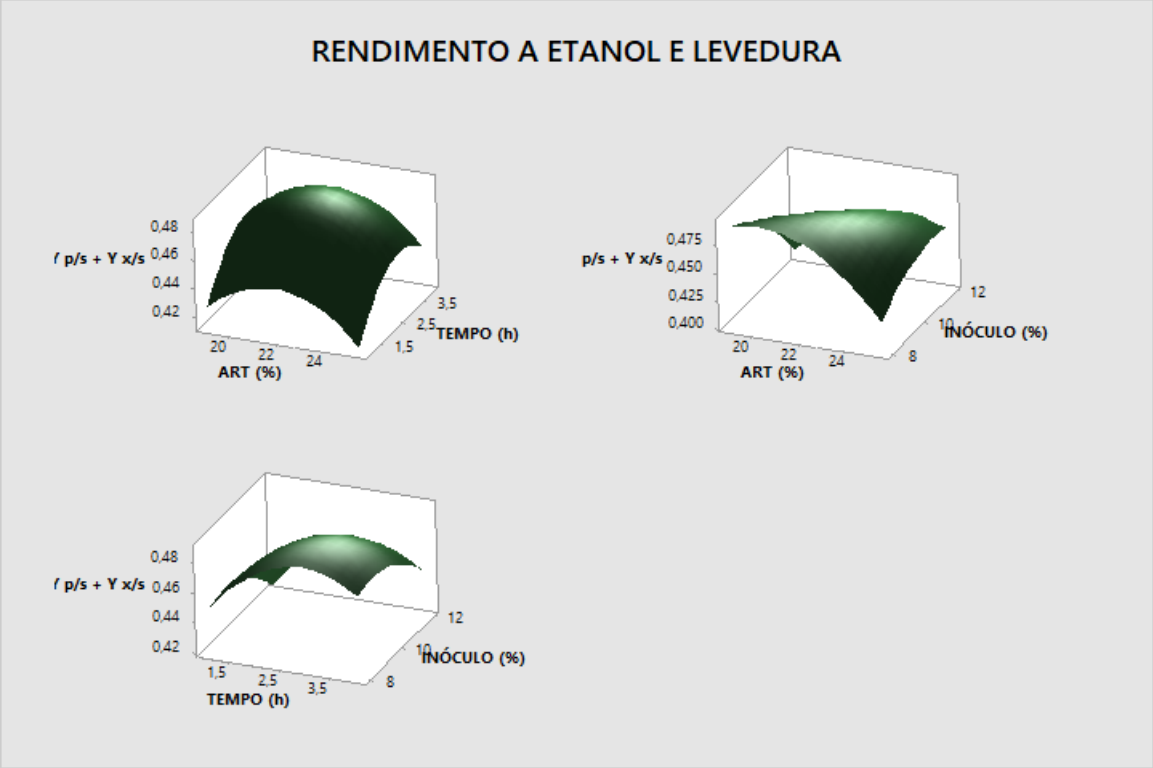


Figura 25 - Gráfico de contorno relacionando o ART, tempo de alimentação e inóculo com o rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s)

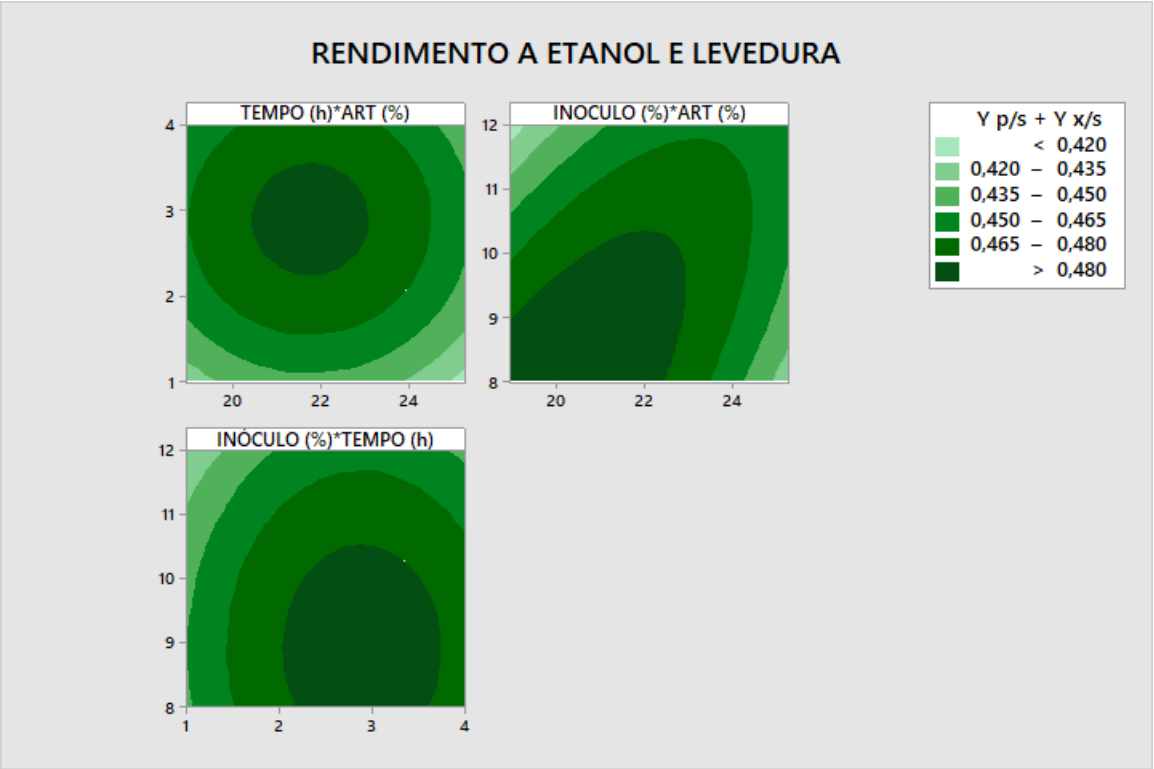


Figura 26 - Efeitos isolados do ART, tempo de alimentação e inóculo no rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s)

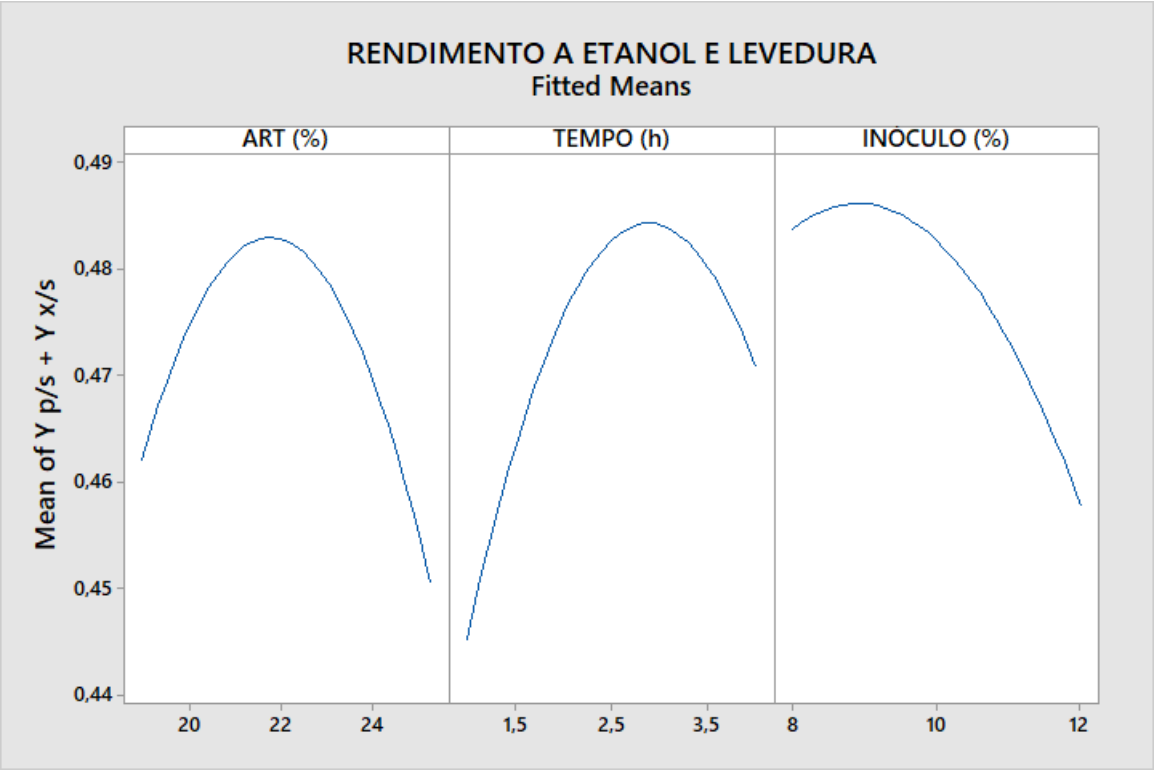
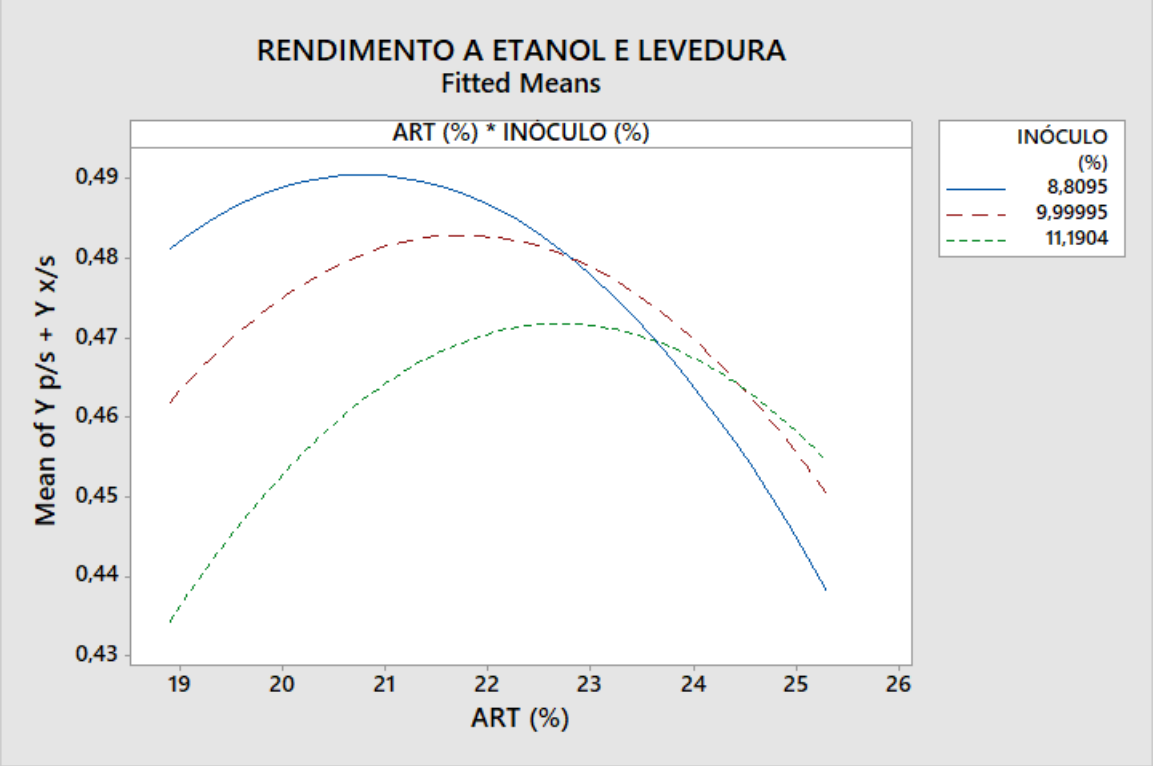
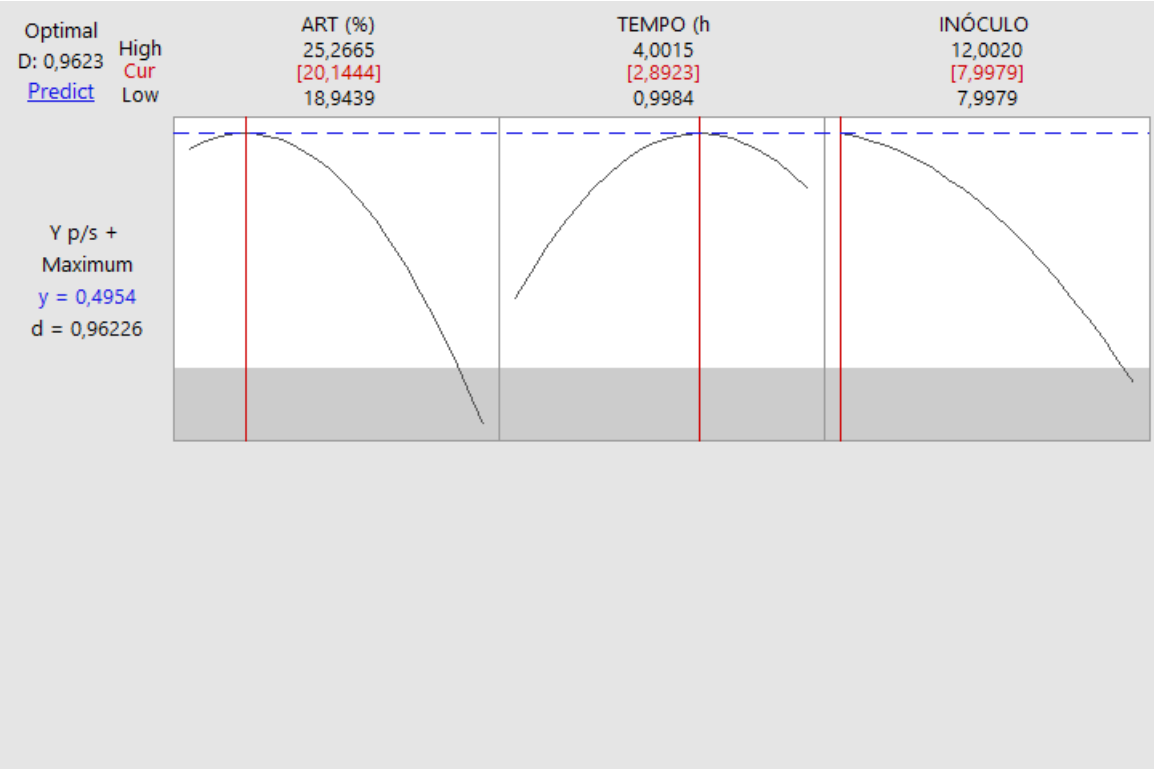


Figura 27 - Efeitos associados do inóculo x ART e inóculo no rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s)



Mediante análise das superfícies de resposta e dos gráficos de contorno, do comportamento isolado e das correlações, conclui-se que a maximização do rendimento de etanol e levedura, Y p/s + Y x/s, se dá com um menor teor do ART no mosto (20 a 21 %) aliado a uma alimentação lenta (2,7 a 3,2 h) e um baixo inóculo (8 %). Esse comportamento reforça a necessidade de se encontrar uma relação saudável entre a produção de etanol e a reprodução da levedura quando se busca a maximização da eficiência industrial (ART Produtos / ART Adicionado), ou seja, melhores rendimentos são dependentes de parâmetros que tragam bem-estar a levedura, possibilitando a sua manutenção e perpetuação, sendo o etanol um coadjuvante desse processo, comportamento símile exposto por Amorim, Basso e Alves (1996).

Figura 28 - Parâmetros de otimização do rendimento de etanol e levedura (Y p/s + Y x/s)



Por recurso da ferramenta de otimização de resposta do software Minitab® 17.1.0 (MINITAB INC., 2013) identificou-se que o ponto de máximo desempenho foi de 0,4954 para Y p/s + Y x/s e os parâmetros para tal são 20,14 %m/m de ART, 2,89 h de alimentação e 8,00 %v/v de inóculo.

4.6 Desempenho fermentativo

Na tabela abaixo, serão apresentados os parâmetros operacionais (variáveis dependentes) e os respectivos resultados do desempenho fermentativo (variáveis independentes):

Tabela 16 - Parâmetros operacionais e respectivos rendimentos e produções

ART	Tempo	Inóculo	Etanol*	Rend.** etanol	Levedura***	Rend.** levedura	Rend.** etanol e levedura
%	h	%	m³ / m³	Y p/s	t. / m³	Y x/s	t. / m³
25,26	0,00	8,00	**0,126**	0,383	-0,009	-0,038	0,338
25,26	1,00	12,00	0,113	**0,459**	-0,002	-0,017	0,416
19,84	3,00	8,00	0,095	0,439	**0,012**	0,067	0,495
18,95	2,61	8,00	0,090	0,431	0,012	**0,069**	0,491
20,14	2,89	8,00	0,097	0,438	0,012	0,067	**0,495**

* Etanol produzido por volume de dorna
** Rendimento
*** Levedura produzida por volume de dorna

Dessa forma, fica claro que a maximização da produção do etanol, ou seja, do metabolismo anaeróbico, se dá em altas concentrações de carboidratos no meio fermentativo. Essa elevada concentração de carboidratos é obtida por meio de um incremento no teor de ART no mosto seguido de uma alimentação rápida.

Nestas condições, a reprodução celular e o metabolismo aeróbico ficam comprometidos, o que pode, quando mau gerenciado, ocasionar problemas na manutenção da população celular dos fermentadores, comprometendo os próximos ciclos fermentativos.

Com relação ao inóculo, ou seja, a concentração celular, altas populações são recomendadas quando o objetivo da planta industrial é maximizar o rendimento de etanol (Y p/s), porém este deve ser seguido de um elevado ART do mosto (25,26 %) e um curto tempo de alimentação (1 h).

Já para a maximização da produção de levedura, ou seja, do metabolismo aeróbico, deve-se operacionalizar o fermentador com um reduzido teor de ART no mosto, seguido de alimentações lentas, essas ações resultam em menores concentrações de carboidratos no meio fermentativo, potencializando a respiração.

Reduzidas concentrações celulares potencializam a reprodução do mesmo, isto ocorre devido a diminuição da energia reprodutiva e a catalisação das enzimas respiratórias.

Quando o foco de uma unidade industrial é a maximização da eficiência industrial (ART Produtos / ART Adicionado), deve-se optar pelo aprimoramento do Y p/s + Y x/s. Neste, a parametrização do fermentador prima pelo equilíbrio entre o metabolismo aeróbico e anaeróbico, ou seja, pela harmonia ente reprodução e fermentação, sendo assim, reduzidas concentrações de carboidratos no meio fermentativo são os mais indicados, portanto deve-se operar com um diminuto teor de ART no mosto e alimentações lentas. Para o inóculo, reduzidas concentrações são indicadas quando comparadas a altas concentrações.

Esses resultados corroboram que a respiração e a fermentação estão presentes no metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa BG1, da qual a maximização de um ou outro depende da concentração dos açúcares e das células, comportamentos mencionados por Kocková-Kratochvílová (1990).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa BG1, tem predominância pelo metabolismo anaeróbio (fermentação alcoólica), em relação ao aeróbio (respiração). Esse distanciamento é proporcional à concentração de carboidratos do mosto, comportamento identificado por Venturini Filho et al. (2013).

Portanto, a maximização da conversão dos carboidratos a produtos (etanol e levedura), em paralelo, a maximização da eficiência industrial (ART Produtos / ART Adicionado), é dependente de uma parametrização que permita a obtenção de energia

química para sua sobrevivência e perpetuação da espécie, atestando que o etanol é somente um subproduto desse processo (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

5 CONCLUSÕES

Para se maximizar o etanol produzido por volume de dorna, ou seja, fomentar a relação m³ etanol / m³ dorna, deve-se aumentar o ART do mosto e reduzir o inóculo na dorna, sendo que o ponto de máximo desempenho foi de 0,1258 m³ etanol / m³ dorna e os parâmetros para tal são 25,26 %m/m de ART e 8,00 %v/v de inóculo.

Para se maximizar o rendimento de etanol, ou seja, intensificar o Y p/s, deve-se aumentar o ART do mosto; já para o tempo de alimentação e o inóculo da dorna, alimentações lentas são indicadas para um reduzido inóculo, 4 horas e 8,8 % de inóculo; alimentações rápidas são indicadas para um elevado inóculo, 1 hora para 11,2 % de inóculo, sendo que o ponto de máximo desempenho foi de 0,4594 para o Y p/s e os parâmetros para tal são 25,26 %m/m de ART, 1,00 h de alimentação e 12,00 %v/v de inóculo.

Para se maximizar a levedura produzida por volume de dorna, ou seja, incrementar a relação t. m.s. levedura / m³ dorna, deve-se reduzir o inóculo na dorna, o ART do mosto e o tempo de alimentação, sendo que o ponto de máximo desempenho foi de 0,0125 t. m.s. levedura / m³ dorna e os parâmetros para tal são 19,83 %m/m de ART, 3,00 h de alimentação e 8,00 %v/v de inóculo.

Para se maximizar o rendimento de levedura, ou seja, fortalecer o Y x/s, deve-se reduzir o ART no mosto (18 a 20 %) e inóculo (8 %). Com relação ao tempo de alimentação é possível identificar um maior rendimento de levedura quando se faz uso de alimentações lentas quando comparadas a alimentações rápidas (2,4 a 3,0 h), sendo que o ponto de máximo desempenho foi de 0,0698 para Y x/s e os parâmetros para tal são 18,94 %m/m de ART, 2,60 h de alimentação e 8,00 %v/v de inóculo.

Para se maximizar o rendimento de etanol e levedura, ou seja, estimular o Y p/s + Y x/s, deve-se reduzir o ART do mosto (20 a 21 %) e o inóculo da dorna (8 %), já para o tempo de alimentação, alimentações lentas (2,7 a 3,2 h), sendo que o ponto de máximo desempenho foi de 0,4954 para Y p/s + Y x/s e os parâmetros para tal são 20,14 %m/m de ART, 2,89 h de alimentação e 8,00 %v/v de inóculo.

REFERÊNCIAS

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool**: controle e monitoramento. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC, 1996.

ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, J. P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica por batelada alimentada. **STAB**, Piracicaba, v. 9, n. 2, p. 45-51, 1990.

ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol - Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Londres, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007. Disponível em: http://repositorio.unesp.br/handle/11449/69535. Acesso em: 31 jan. 2018.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, A. Metabolism of wort by yeast. In: BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, A. **Brewing**: science and practice. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. p. 401-468.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. Métodos analíticos. In: CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Manual de controle químico da fabricação de açúcar**. Piracicaba: CTC, 2011. cap. 4, p. 1-49.

DAUGULIS, A. J.; SWAINE, D. E. Examination of substrate and product inhibition kinetics on the production of ethanol by suspended and immobilized cell reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 29, p. 639-645, 1987.

DUNHAM, F.; BOMTEMPO, J.; FLECK, D. A. Estruturação do Sistema de Produção e Inovação Sucroalcooleiro como Base para o Proálcool. **Revista Brasileira de Inovação**, Campinas, v. 1, n. 10, p. 35-72, 2011.

DUPONT, F. H.; GRASSI, F.; ROMITTI, L. Energias renováveis: buscando por uma matriz energética sustentável. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 19, n. 1, p. 70-81, 2015.

FERMENTEC. **Métodos analíticos para o controle da produção de açúcar e álcool**. 4. ed. Piracicaba: FERMENTEC, 2012.

GUARIEIRO, L. L. N.; VASCONCELLOS, P. C.; SOLCI, M. C. Poluentes atmosféricos provenientes da queima de combustíveis fósseis e biocombustíveis: uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 3, n. 5, p. 434-445, 2011.

INTERNATIONAL COMISSION FOR UNIFORM METHODS OF SUGAR ANALYSIS. **Method ICUMSA GS1/2/3/9-1**: the determination of polarization of raw sugar by polarimetry - official. Stamford: England, 2011.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Yeast metabolism. In: KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. **Yeast and yeast-like organisms**. Weinheim: VCH,1990. p.304-390.

LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 25, n. 2, p. 497-511, 1983.

LEHNINGER, A. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

MINITAB INC. **Minitab**. Version 17.1.0. State College: Minitab Inc, 2013.

NITSCH, M. O programa de biocombustíveis Proálcool no contexto da estratégia energética brasileira. **Revista de Economia Política**, São Paulo, v. 11, p. 123-138, 1991.

REIS, V. R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-18102011-160541/pt-br.php. Acesso em: 31 jan. 2018.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2005.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering**: basic concepts. 2 ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2002.

SONEGO, J. L. S.; LEMOS, D. A.; RODRIGUEZ; G. Y.; CRUZ, A. J. G.; BADINO; A. C. Extractive Batch Fermentation with CO_2 Stripping for Ethanol Production in a Bubble Column Bioreactor: Experimental and Modeling. **Energy Fuels**, São Carlos, v. 28, n. 12, p. 7552-7559, 2014. Disponível em: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef5018797. Acesso em: 31 jan. 2018.

SUHAIMI, S. N.; PHANG, L. Y.; MAEDA, T.; ABD-AZIZ, S.; WAKISAKA, M.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. Bioconversion of glycerol for bioethanol production using isolated Escherichia coli SS1. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 506-516, 2012.

TOSETTO, M. G. **Influência da Matéria-Prima no Comportamento Cinético de Levedura na Produção de Etanol**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

TOSETTO, M. G. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibidores no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2017/2018**. São Paulo: ÚNICA, 2018. Disponível em: http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-

moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=1984&safra=2017%2F2018&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR. Acesso em: 01 out. 2018.

VENTURINI FILHO, W. G.; BRUNELLI, L. T.; TONIATO, J.; NOJIMOTO; T.; NOVAES; F.V. Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 31, n. 2, p. 227-236, 2013.

WOSCH, L. F. O. O desafio do etanol brasileiro no cenário do comércio mundial. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, Curitiba, n. 118, p. 10, 2010.