



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**



**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM LEVEDURAS DE
CARACTERÍSTICAS FLOCULANTES EM REATOR TIPO TORRE
COM ESCOAMENTO ASCENDENTE**

THÁLYTA FRAGA PACHECO

Uberlândia - MG
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



**FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM LEVEDURAS DE
CARACTERÍSTICAS FLOCULANTES EM REATOR TIPO TORRE
COM ESCOAMENTO ASCENDENTE**

Thályta Fraga Pacheco

Orientador: Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Uberlândia - MG
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P116f Pacheco, Thályta Fraga, 1985-
Fermentação alcoólica com leveduras de características flocculantes em
reator tipo torre com escoamento ascendente [manuscrito] / Thályta Fraga
Pacheco. - 2010.

106 f. : il.

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui bibliografia.

1. Álcool - Teses. 2. Fermentação - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Júlio. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. III. Título.

CDU: 663.52

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 26 DE FEVEREIRO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Orientador (PPGEQ/UFU)

Prof^a. Dra. Miriam Maria de Resende
Co-Orientadora (PPGEQ/UFU)

Prof^a. Dra. Vicelma Luiz Cardoso
(PPGEQ/UFU)

Prof^a. Dra. Eliana Setsuko Kamimura
(FZEA/USP)

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível:

Ao professor doutor Eloízio Júlio Ribeiro, orientador desta dissertação, pela confiança em meu trabalho, por todo o conhecimento transferido, pela sabedoria e amizade.

À professora doutora Miriam Maria de Resende, pela co-orientação, disponibilidade irrestrita, empenho, paciência, estímulo e dedicação.

À professora doutora Vicelma Luiz Cardoso, pelo apoio, prestatividade e auxílio estatístico no trabalho.

Aos demais professores e funcionários da FEQUI/UFU, pela contribuição no meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições.

Aos meus pais, meus heróis, sou-lhes grata por todo apoio, carinho e esforço dispensados para o meu engrandecimento como pessoa.

Ao meu irmão e familiares, que muito me apoiaram e incentivaram nesta caminhada.

A todos os amigos que conquistei nesse caminho, que já deixam saudades, mas que serão levados comigo por onde for. Pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviram e sensatez com que sempre me ajudaram. Pela diversão, aprendizado e convivência, que muito me estimularam nessa jornada.

À aluna de graduação Hávala Barbosa Reis, pelo companheirismo e imensa contribuição na execução da parte experimental do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo apoio financeiro durante os anos do curso.

Também sou grata a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me deram oportunidades, confiaram em mim, me incentivaram a lutar pelos meus ideais e me acompanharam.

Agradeço, por fim, a Deus, que me concedeu o privilégio de nascer e viver entre estas pessoas sensacionais que são o alicerce desta conquista.

*Volta teu rosto sempre na direção do sol,
e então, as sombras ficarão para trás.*

(Sabedoria Oriental)

Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas	iii
Resumo.....	iv
Abstract	v
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Histórico	6
2.2. Condução da fermentação alcoólica.....	6
2.2.1. Processo em Batelada	7
2.2.2. Processo em Batelada Alimentada	8
2.2.3. Processo Contínuo	9
2.2.4. Recirculação de Leveduras	10
2.2.5. Tratamentos finais	12
2.3 Fatores que Afetam a Fermentação Alcoólica	12
2.4. O Agente da Fermentação Alcoólica.....	13
2.5. Bioquímica da Fermentação Alcoólica	17
2.6. Rendimento da Fermentação Alcoólica.....	20
2.7. Aumento da Produtividade	21
2.7.1. Biorreatores com Imobilização	22
2.7.2. A Levedura Floculante.....	24
2.8. Biorreatores Empregados.....	29
2.8.1. Biorreatores Tipo Torre	30
2.9. Estudo Cinético da Fermentação Alcoólica.....	32
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Material.....	36
3.2. Métodos	37
3.2.1. Metodologia Experimental.....	37
3.2.2. Metodologia Analítica	39
3.3. Testes Preliminares.....	41
3.4. Planejamento Experimental	42
3.5. Cálculos das Respostas das Fermentações	44
3.5.1. Rendimento	44

3.5.2. Produtividade	45
3.6. Modelagem Matemática	45
3.6.1. Ajuste dos parâmetros cinéticos	48
3.6.2. Validação do Modelo.....	48
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Testes Preliminares.....	49
4.2. Planejamento Experimental	51
4.2.1. Rendimento	52
4.2.2. Produtividade	58
4.2.3. Sacarose Residual	66
4.3. Reprodutibilidade do Ponto Otimizado	73
4.5. Modelagem Matemática	77
4.5.1. Validação do Modelo.....	79
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	82
CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
APÊNDICE A - CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	93

Lista de Figuras

1.1 - Brasil: produção de cana-de-açúcar, açúcar e etanol (Fonte: Unica, 2009)	2
2.1 - Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fonte: Lima, Basso, Amorim, 2001)	19
2.2 - Células floculantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observadas em microscopia eletrônica de varrimento (barra corresponde a 10 μ m) (Fonte: Domingues, 2001)	26
2.3 - Leito de leveduras floculadas (Fonte: Andrietta, 2005)	26
3.1 - Representação esquemática da unidade de trabalho	37
3.2 - Unidade de trabalho utilizada nos experimentos	39
4.1 - Aparência das leveduras utilizadas quando consumida toda a sacarose do meio	49
4.2 - Perfis de concentração celular, substrato e inóculo em função do tempo	50
4.3 - Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para o rendimento	54
4.4 - Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento	55
4.5 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose	55
4.6 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular no inóculo e da vazão de recirculação	56
4.7 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração inicial de sacarose e da vazão de recirculação	57
4.8 - Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para a produtividade	60
4.9 - Distribuição dos resíduos para a resposta produtividade	61
4.10 - Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose	61
4.11 - Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração celular no inóculo e vazão de recirculação	62
4.12 - Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração inicial de sacarose e da vazão de recirculação	63
4.13 - Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para a resposta sacarose residual	67
4.14 - Distribuição dos resíduos para a resposta sacarose residual	68

4.15 - Superfície de resposta e curva de contorno para a concentração residual de sacarose em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose	69
4.16 - Superfície de resposta e curva de contorno para a concentração residual de sacarose em função da concentração celular no inóculo e vazão de recirculação	70
4.17 - Superfície de resposta e curva de contorno para a concentração residual de sacarose em função da concentração inicial de sacarose e da vazão de recirculação	71
4.18 - Perfis de concentração celular, substrato e inóculo em função do tempo para a condição máxima das superfícies de resposta	75
4.19 - Perfis de concentração celular, substrato e inóculo em função do tempo para a condição máxima do rendimento	76
4.20 - Perfil de concentração celular e de substrato ao longo do tempo e da posição do reator para o experimento 16.....	77
4.21 - Variação na concentração de biomassa (■), sacarose (o), etanol (▲) para o experimento de validação das condições de otimização obtido pela superfície de resposta e curvas de contorno. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas representam o ajuste do modelo proposto para os dados adimensionalizados	78
4.22 - Variação na concentração de biomassa (■), sacarose (o), etanol (▲) para o experimento de validação das condições de otimização obtido pela superfície de resposta e curvas de contorno. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas representam o ajuste do modelo proposto para os dados dimensionais	79
4.23 - Variação na concentração de biomassa (■), sacarose (o), etanol (▲) para o experimento (16) do ponto central. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas representam a aplicação do modelo aos dados experimentais	80
4.24 - Variação na concentração de biomassa (■), sacarose (o) e etanol (▲) para o experimento de validação das condições do experimento de validação do ponto ótimo do rendimento. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas representam a aplicação do modelo proposto aos dados experimentais	81

Lista de Tabelas

1.1 - Indicadores da evolução tecnológica da indústria sucroalcooleira (Fonte: DEDINI, 2008)	4
2.1 - Composição Molecular de Levedura Comercial (Fonte: HARRISON, 1971)	16
2.2 - Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica (Fonte: AMORIM, 2005)	17
3.1 – Relação entre concentrações celulares no inóculo e no reator	38
3.2 - Valores utilizados no planejamento para as três variáveis independentes	43
3.3 - Matriz do DCC com valores codificados e originais das variáveis	44
4.1 - Variáveis utilizadas no DCC e suas respostas após 7 horas de fermentação	52
4.2 - Regressão múltipla para a resposta rendimento	53
4.3 - Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento	53
4.4 - Regressão múltipla para a resposta produtividade	59
4.5 - Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta produtividade	59
4.6 - Regressão múltipla para a resposta sacarose residual	66
4.7 - Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta sacarose residual	67
4.8 - Parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do modelo	78
4.9 – Parâmetros calculados para as duas condições de validação	80

Resumo

O etanol tem sido considerado como um combustível alternativo para diminuir problemas ambientais e energéticos no mundo, em razão da escassez e alta dos preços dos combustíveis fósseis, e da poluição causada por estes. O setor sucroalcooleiro brasileiro acredita que será um dos maiores fornecedores mundiais de álcool combustível e de tecnologias para montagem de destilarias em outros países. Portanto, tecnologias capazes de melhorar o desempenho da produção do setor ganham importância fundamental no país. Dessa forma, o presente trabalho estudou o processo de produção de etanol utilizando um reator tubular de escoamento ascendente com recirculação externa e uma cepa de leveduras com características floculantes. Avaliou-se o rendimento, a produtividade de etanol e a concentração residual de sacarose por meio de um delineamento composto central, no qual a porcentagem de células no inóculo variou de 4,7 a 45,3%, a concentração de sacarose de 100 a 220 g/L e a vazão de recirculação de 2,6 a 17,1 mL/s como variáveis. Todos os experimentos foram conduzidos até o completo consumo da sacarose presente no meio, entretanto, fixou-se o tempo de análise das respostas em sete horas, com base nos testes preliminares realizados. A cepa não apresentou capacidade de flocular e formar flocos bem definidos, porém teve alta capacidade de sedimentação. A vazão de recirculação exerceu pouca influência sobre as respostas analisadas. Estas foram fortemente influenciadas pela concentração celular no inóculo. Foram avaliadas duas condições de máximo, uma fornecida pela análise das superfícies de resposta (45% de células no inóculo, concentração inicial de sacarose de 200 g/L e vazão de recirculação de 15 mL/s) e outra pelo ponto estacionário do rendimento (33% de células no inóculo, concentração inicial de sacarose de 180 g/L e vazão de recirculação de 12,7 mL/s). O ponto estacionário do rendimento foi a melhor condição, dentre as avaliadas, para se conduzir uma fermentação alcoólica utilizando-se esta cepa e a configuração de reator em estudo. Obteve-se, nesse experimento, um rendimento de 98%, produtividade de 13,4 g_{etanol}/L.h e concentração residual de sacarose de 3,1 g/L. Os modelos obtidos pelo método das superfícies de resposta apresentaram boa reprodutibilidade, pois previram, para esse caso, um rendimento de 100%, produtividade de 13,5 g_{etanol}/L.h e concentração residual de sacarose de 7,4 g/L. Foi feito também um estudo cinético desse processo de fermentação alcoólica nas condições otimizadas pelo planejamento experimental. O modelo cinético de Tosetto foi ajustado para os dados experimentais. A fermentação alcoólica, usando um reator tipo torre com uma cepa de leveduras com características floculantes forneceu maior produtividade e rendimentos quando comparados a dados reportados pela literatura ou a processos industriais de produção de etanol.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, levedura floculante, reator de escoamento ascendente, etanol

Abstract

Ethanol has been considered an alternative biofuel to replace oil reducing environmental and energy problems in the world. The Brazilian sugar industry believes that it will be one of the world's largest suppliers of alcohol fuel and technology to other countries. Therefore, technologies that improve the performance of the sector output gain importance in the country. Thus, in this work was studied the ethanol fermentation using upflow tower reactor with external recirculation and one strain of yeast with flocculent characteristics. It was evaluated the ethanol yield, productivity and the residual sucrose concentration through a central composite design (CCD), in which the percentage of cells in the inoculum ranged from 4.7 to 45.3%, sucrose concentration from 100 to 220 g/L and the recycle flow rate from 2.6 to 17.1 mL/s as variables. All experiments were conducted until the complete consumption of medium sucrose, however it was chosen seven hours for analysis of responses in the CCD. The strain did not show ability to form flakes well defined, but presented capacity of sedimentation. The recirculation stream exerted little influence on the analyzed responses. These were heavily influenced by the inoculum cell concentration. The responses were also influenced by initial sucrose concentration. It was evaluated two conditions of maximum responses, one by an analysis of response surfaces (45% of cells in the inoculum, initial sucrose concentration 200 g/L and recirculation flow rate of 15 mL/s) and the other by the yield stationary point (33% of cells in the inoculum, initial sucrose concentration in 180 g/L and recycled flow of 12.7 mL/s). The yield stationary point was the best condition among those evaluated to conduct an alcoholic fermentation using this strain and reactor configuration under study. It was obtained in this experiment, an ethanol yield of 98%, productivity of 13.4 g_{ethanol}/L.h and a residual sucrose concentration of 3.1 g/L. The models obtained by the response surface presented a good reproducibility, as predicted, for this case, a 100% of yield, 13.5 g/L.h for ethanol productivity and the residual sucrose concentration of 7.4 g/L. A kinetic study of fermentation was realized on the optimized conditions by experimental design. The Tostetto kinetic model was adjusted to the experimental results. The ethanol fermentation in tower reactor using the strain of yeast with flocculent characteristics presented a greater productivity and higher yield when compared to data reported in the literature or in the industrial processes for ethanol production.

Key Words: alcoholic fermentation, flocculent yeast, upflow reactor, ethanol.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O etanol tem sido considerado uma alternativa para diminuir problemas ambientais e energéticos no mundo, em razão da escassez e alta dos preços dos combustíveis fósseis e da poluição causada por estes. Comparado com combustíveis fósseis, o etanol apresenta as vantagens de ser uma fonte renovável de energia, que contribui com a redução das emissões de dióxido de carbono.

A crise do petróleo, na década de 70, conduziu ao desenvolvimento do Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool), que visava, principalmente, substituir a gasolina por um combustível alternativo. Através do Pró-álcool, pesquisadores brasileiros foram encorajados a desenvolver processos de produção de um biocombustível com baixos custos. Optou-se, então, pela produção de etanol a partir da cana-de-açúcar por via fermentativa, em razão da baixa nos preços do açúcar na época. No início do século XXI, na certeza de escassez e de crescente elevação no preço dos combustíveis fósseis, priorizam-se novamente os investimentos na pesquisa e produção de etanol (ALTINTAS *et al.*, 2002).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, o maior exportador mundial, líder internacional da tecnologia de produção, a primeira economia do globo a atingir o uso sustentável dos biocombustíveis, e juntamente com os Estados Unidos foi responsável por 90% da produção mundial de etanol combustível em 2006 (DUARTE, LOURENÇO e RIVEIRO, 2006).

Embora os Estados Unidos da América em 2006 tenham sido apontados como os maiores produtores de etanol no mundo, produzindo 4265 milhões de galões de etanol contra 4227 produzidos no mesmo período no Brasil, a utilização da cana-de-açúcar como substrato faz com que o custo de produção por litro de etanol brasileiro seja consideravelmente inferior ao obtido pelos americanos. Enquanto as 97 plantas instaladas naquele país processam principalmente o milho, matéria prima que necessita de um processo de hidrólise para obtenção dos açúcares fermentescíveis, a cana-de-açúcar possui os açúcares já na forma disponível para a levedura fermentá-lo. O custo de produção do etanol brasileiro é de US\$ 0,17/L contra US\$ 0,32/L para esse combustível produzido pelos Estados Unidos da América (ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2006).

O mercado consumidor de etanol crescerá ainda mais, tanto nacional quanto mundialmente, em um futuro próximo devido às legislações ambientais que obrigam o uso de

biocombustíveis em meios de transporte, ao cumprimento das exigências do Protocolo de Kyoto, à mistura deste na gasolina e a disponibilização crescente de automóveis bicombustíveis.

Na prática, o álcool já avança sobre a gasolina. No primeiro semestre de 2008, a soma do consumo de álcool hidratado (o combustível) e do álcool anidro (misturado à proporção de 25% na gasolina) foi de 9,037 bilhões de litros, enquanto o de gasolina A (sem a mistura) foi de 9,038 bilhões de litros, segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP, maio/2009).

O Brasil possui 2,9 milhões de hectares em que se cultiva cana-de-açúcar destinada à produção de etanol, e outros 3,2 milhões de hectares utilizados na produção de açúcar. Somadas essas áreas, ocupa-se menos de 10% da área cultivável do território nacional, indicando elevado potencial para crescimento (GOLDEMBERG, 2008).

Outro estudo, divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) aponta que a demanda interna pelo etanol deve saltar de 16,47 bilhões de litros no ano de 2008 para 24,78 bilhões de litros em 2011, um incremento de 50,46%. De acordo com a pesquisa, as exportações também terão crescimento. No ano de 2008 foram enviados a outros países 4,17 bilhões de litros, ou 18,21% a mais que os 3,53 bilhões de litros de 2007. Já em 2011 as exportações devem chegar a 6,10 bilhões de litros, um aumento de 72,85% sobre o resultado de 2007 (ETHANOL BRASIL BLOG, maio/2009).

Esse crescimento da demanda, que pode ser observada na Figura 1.1, foi o motor propulsor da expansão da produção de etanol, que saltou de 14,8 bilhões de litros na safra 2003/04 para mais de 22 bilhões em 2007/08, devendo atingir 27 bilhões de litros na safra 2008/09 (RODRIGUES, 2008).

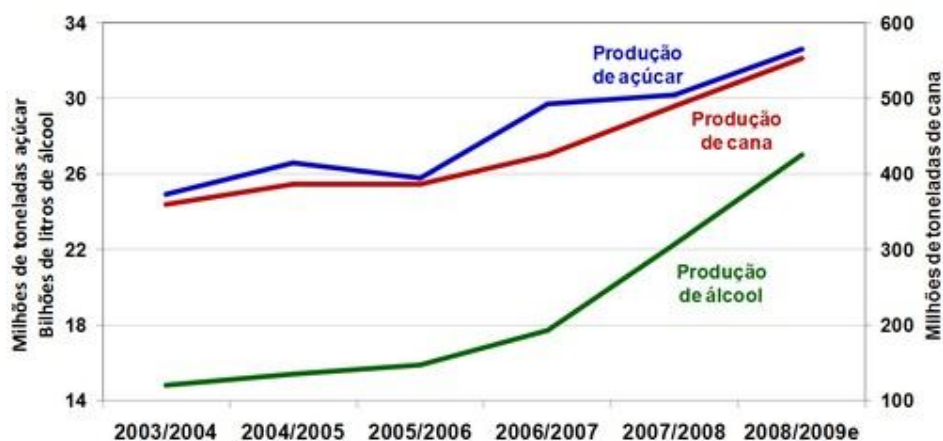


Figura 1.1 – Brasil: produção de cana-de-açúcar, açúcar e etanol (Fonte: Unica, 2009)

São várias as vantagens do uso do etanol como combustível no Brasil, tais como:

- Menor dependência de combustíveis fósseis importados, e da variação do preço destes;
- Menor emissão de poluentes (grande parte dos poluentes resultantes da queima do etanol no motor são reabsorvidos no ciclo de crescimento da cana-de-açúcar, e os resíduos das usinas são totalmente reaproveitados na lavoura e na indústria);
- Maior geração de empregos, sobretudo no campo, diminuindo o êxodo rural;
- Os subprodutos da cana são utilizados no próprio ciclo produtor de álcool, como fonte de energia elétrica obtida pela queima do bagaço, e como fertilizante da terra utilizada no plantio, tornando uma usina de álcool auto-suficiente em termos energéticos;
- Fonte de geração de divisas internacionais, sobretudo em tempos de escassez de petróleo e consciência ecológica (RODRIGUES, 2008).

Nesse cenário, tecnologias capazes de melhorar o desempenho da produção do setor ganham importância fundamental no país. O setor sucroalcooleiro brasileiro acredita que será um dos supridores mundiais de álcool combustível e de tecnologias modernas para montagem de destilarias em outros países do mundo. Especialistas alertam que ganhos de eficiência na produção do etanol são fatores preponderantes para competitividade em mercados mundiais (ABARCA, 2005).

No período 1975-1994, foi incrementada a capacidade de moagem em 100%, o processo de extração elevou sua eficiência de 93% para 97%, enquanto que a eficiência do processo de fermentação aumentou de 80% para 91%. Por outro lado, a recuperação geral na produção de álcool aumentou em 30% e o consumo de vapor na destilação foi reduzido em 44%, entre outros indicadores (ABARCA, 2005).

A Tabela 1.1 apresenta alguns dos indicadores da evolução tecnológica na área industrial do complexo sucroalcooleiro entre 1975 e 2008.

Esses ganhos foram alcançados, exclusivamente, a partir de inovações incrementais, pela instalação de uma série de equipamentos periféricos e de novos procedimentos operativos nas moendas e na extração, que resultou na elevação diferencial do rendimento industrial (ABARCA, 2005).

Tabela 1.1 – Indicadores da evolução tecnológica da indústria sucroalcooleira

Variável	Tecnologia	1975	2008
Capacidade de moagem (TCD)	DH1 / MCD01	5.500	13.000
Tempo de fermentação (h)	CODISTIL Ferm. Bat. / Cont.	12	4 / 6
Teor alcoólico do vinho (OGL)	CODISTIL Fermentação	7,5	10
Rendimento extração (% açúcar cana)	DH1/ MCD01/ Difusor	93	97
Rendimento fermentativo (%)	CODISTIL Ferm. Bat/ Cont	80	91
Rendimento da destilação (%)	Destiltech	98	99,5
Rendimento Total ($L_{álcool} / t_{cana}$)	Tecnologia CODISTIL	66	91
Consumo total de vapor (kg/t_{cana})	Tecnologia CODISTIL	600	380
Consumo de vapor- hidratado (kg/L)	Destiltech	3,4	2
Consumo vapor-anidro (kg/L)	Destiltech (+) Destilplus/ Peneira Molecular / MEG	4,5	2,8
Caldeira-Eficiência (% PCI)	AZ/ AT/ COGEMAX	66	87
Pressão (bar) / Temperatura (°C)		21 / 300	100 / 530
Bagaço excedente (%)	Tecnologia CODISTIL	Até 8	Até 78

(Fonte: DEDINI, 2008)

Baseado no exposto, o presente trabalho apresenta como objetivo geral estudar o processo de produção de etanol utilizando um reator tubular de escoamento ascendente com recirculação externa, que garante maior eficiência de produção com menor tempo de fermentação e uma cepa de leveduras com características floculantes.

Como objetivos específicos pode-se citar:

- Estudar o efeito da concentração celular, da concentração do substrato e da vazão de recirculação neste processo de fermentação alcoólica utilizando a metodologia de superfícies de resposta;
- Validar os experimentos nas condições ótimas calculadas;

- Realizar um estudo cinético do processo de fermentação alcoólica nas condições otimizadas pelo delineamento composto central.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

Produtos de fermentação são usados desde a Antigüidade. Há registros que comprovam o uso de alimentos fermentados pelos sumérios, egípcios antigos, assírios e babilônios. A produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida antes do ano 6.000 a.C. (VILLEN, 2009).

Atribui-se a Bechner, no século XVII, a afirmação de que somente os líquidos açucarados são capazes de entrar em fermentação alcoólica. Ao contrário do que pensavam alguns pesquisadores que o antecederam, para Bechner o álcool se formava durante o processo de fermentação, julgando erradamente, no entanto, a necessidade de ar para causar o fenômeno que ele considerava semelhante à combustão. Os primeiros estudos envolvendo o mecanismo da fermentação alcoólica relacionavam apenas à formação dos produtos inicial e final. Foi Black que primeiro postulou, no século XVIII, que o álcool etílico e gás carbônico eram os únicos produtos formados do açúcar durante a fermentação alcoólica (MENEZES, 1980).

Entretanto, o primeiro a efetuar um estudo quantitativo da fermentação alcoólica foi provavelmente Lavoisier, em 1789. Coube a Pasteur, a partir de 1857, a explicação clara sobre a natureza da fermentação alcoólica, atribuindo-a a seres vivos, as leveduras, como agentes causais. Segundo ele, 100 partes de sacarose proporcionam 105,4 partes de açúcar invertido, que, por sua vez, produzem 51,1 partes de etanol, 49,4 partes de gás carbônico, 3,2 partes de glicerol, 0,7 parte de ácido succínico e uma parte de outras substâncias. As pesquisas subseqüentes no desvendamento das reações intermediárias receberam novo ímpeto com a constatação por Büchner, em 1897, que extratos livres de células de levedura possuíam a capacidade de provocar, a fermentação alcoólica (MENEZES, 1980).

2.2. Condução da fermentação alcoólica

Há várias maneiras de se conduzir a fermentação. O reator biológico pode ser operado de forma descontínua, semicontínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação do fermento

(SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Na produção industrial de etanol em grande escala, os processos fermentativos se classificam em processos em batelada e contínuos, sendo que a denominação batelada na prática industrial da produção de etanol se refere à batelada alimentada.

A nível industrial, os biorreatores, também denominados de dornas, que são reatores de aço do tipo tanque agitado, normalmente fechadas e mantidas a uma temperatura entre 33 e 35°C até o final do processo, quando a concentração de etanol se situa entre 7 e 12° GL. Nas dornas fechadas é usual a presença de um sistema de lavagem do gás de saída para recuperação do etanol evaporado (as perdas por evaporação correspondem a 1,5% de todo etanol gerado). No início da fermentação é utilizada alta concentração celular inicial (10^6 a 10^7 células/mL) e ao fim da fermentação a concentração celular atinge valores 10 a 100 vezes maiores que o inicial (concentração final de 10^8 células/mL) (DUARTE, LOURENÇO e RIVEIRO, 2006).

2.2.1. Processo em Batelada

Esse processo também é conhecido como processo descontínuo cuja descrição típica pode ser enunciada da seguinte forma: prepara-se um meio de cultura adequado à nutrição e ao desenvolvimento do micro-organismo e também ao acúmulo do produto desejado; coloca-se este meio de cultura em um biorreator; adiciona-se o micro-organismo responsável pelo processo biológico e se aguarda que o processo ocorra. Após um determinado tempo de fermentação, retira-se o caldo fermentado do reator e executam-se as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

No que se refere à manutenção e assepsia, o processo descontínuo é considerado o mais seguro, pois, ao final de cada batelada, o reator pode ser esterilizado juntamente com um novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo que deve ser submetido a todos os controles necessários para assegurar a presença única do micro-organismo responsável pelo processo (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Além do menor risco de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação pela possibilidade de utilização dos fermentadores para a fabricação de diferentes produtos e por permitir uma melhor condição de controle com relação à estabilidade genética do micro-organismo (CARVALHO e SATO, 2001).

A fermentação em batelada pode levar a baixos rendimentos e produtividades quando o substrato adicionado de uma só vez, no início da fermentação, exerce efeitos de inibição, repressão ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (CARVALHO e SATO, 2001).

Assim, o processo batelada é sempre utilizado como base para as comparações de eficiências atingidas com relação aos outros processos, mas a sua baixa eficiência estimula o surgimento de formas alternativas (SCHIMIDELL e FACCIOITI, 2001).

A condução da fermentação alcoólica por processo batelada praticamente só ocorre em escala de laboratório e em pequenas destilarias de aguardente.

2.2.2. Processo em Batelada Alimentada

Os processos em batelada alimentada são eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive nos de fermentação alcoólica. Em tais processos, especialmente naqueles com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio em fermentação. A batelada alimentada permite o controle da concentração de açúcar, minimizando os efeitos de inibição pelo substrato e permitindo a sua adição em momentos propícios durante a fermentação (MACNEIL e HARVEY, 1990; VIEGAS, 2003).

O processo batelada alimentada, também conhecido como “Melle-Boinot”, é um processo em que o substrato é alimentado sob condições controladas até atingir o volume do biorreator. Este processo, apesar de antigo, é muito conveniente e satisfatório quanto à operação e eficiência de conversão de açúcares a álcool (ZARPELON e ANDRIETTA, 1992; CARVALHO e SATO, 2001).

Tais processos possibilitam uma vazão de alimentação constante ou variável com o tempo e a adição de mosto de forma contínua ou intermitente. Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, nos processos batelada alimentada é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (CARVALHO e SATO, 2001). É possível também que se trabalhe com altas concentrações de substrato tendo-se um acréscimo em produtividade do etanol e uma diminuição do volume do reator e da quantidade de vinhaça produzida (IMPE VAN *et al.*, 1994).

A migração das plantas de batelada alimentada para contínua ocorre de forma lenta nas indústrias brasileiras. Acredita-se que no Brasil 70% das destilarias instaladas ainda utilizem o processo do tipo batelada alimentada (ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2006).

2.2.3. Processo Contínuo

O processo contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua do meio de cultura a uma determinada vazão, sendo o volume de reação mantido constante pela retirada contínua do caldo de fermentação (FACCIOTTI, 2001). É importante manter o cultivo contínuo sob regime estacionário, isto é, quando as propriedades do meio permanecem constantes com o tempo em cada ponto (MENEZES, 1980).

O processo contínuo de fermentação alcoólica pode ser dividido em três partes: unidade de tratamento ácido, fermentadores e unidade de separação de células (centrífugas). O número total de dornas de fermentação e o volume de cada uma delas tem sido objeto de estudo para diversos pesquisadores (VIEGAS, 2003). Ghose e Thyagi (1979) concluíram que na operação utilizando-se duas dornas iguais em série, o volume total de reatores é 58% menor do que usando um reator.

Tal processo pode ser mais vantajoso que o de batelada ou batelada alimentada, pois inclui otimização das condições de processo para uma maior produtividade, período longo de produtividade contínua, maior produtividade volumétrica, maior uniformidade do produto, redução dos custos laboratoriais uma vez alcançado o estado desejado, redução do tempo de limpeza e sanitização das dornas e maior facilidade de controle automático. A maior desvantagem é que as fermentações contínuas são mais suscetíveis à contaminação bacteriana por longos prazos de exposição (CYSEWSKI e WILKIE, 1978; FACCIOTTI, 2001).

Várias indústrias montaram processos contínuos de produção de etanol, que quando bem operados levam a uma maior produtividade, porém a custos iniciais e de operação muito maiores, exigindo sistemas de controle mais sofisticados. Além disso, a fermentação contínua é um processo que requer maior conhecimento do comportamento do micro-organismo em relação ao meio ambiente onde ele atua. Fatores como pH, temperatura, concentração de sacarose e álcool, concentração de biomassa, viabilidade celular dentre outros, influenciam na produtividade do sistema, requerendo assim, maior controle sobre o processo (ATALA *et al.*, 2000).

Segundo Zarpellon e Andrietta (1992) vários processos para fermentação contínua tem sido utilizados e alguns dos quais não tiveram êxito. Os principais processos podem ser divididos em dois grupos: fermentação em dorna única, onde todo o processo é realizado numa única dorna, de mistura completa, onde o teor de açúcares e de álcool é constante e fermentação em cascata, onde as dornas individuais são conectadas em série, passando-se consecutivamente de uma para outra.

A escolha entre processo contínuo ou em batelada para produção de etanol por fermentação gera muita discussão. Tradicionalmente as destilarias e usinas brasileiras usam o sistema descontínuo ou de batelada alimentada, processo que começa a enfrentar concorrência do modelo contínuo, porém a polêmica entre processos concorrentes sempre existiu na área industrial das usinas. No Brasil, o sistema de batelada é considerado mais confiável por muitos engenheiros, por apresentar sistema de assepsia mais fácil. Não há estatísticas exatas, mas os pesquisadores acreditam que o processo contínuo seja responsável pela produção de 25% a 30% do etanol fabricado no Brasil – o sistema batelada domina o mercado das operações fermentativas. Algumas usinas voltaram ao processo batelada após alguns anos de operação contínua. Quando se faz açúcar e álcool, o sistema mais aceito pelos técnicos é o batelada alimentada, porém o assunto está longe de ser esgotado, sendo exigido ainda muito estudo de Engenharia e Cinética da Fermentação Alcoólica (ALCOOLBRÁS, 2006).

Segundo Amorim (2005), o sistema em batelada alimentada apresenta maior rendimento, maior teor alcoólico no final da fermentação, maior flexibilidade e é menos sujeito à contaminações. O sistema contínuo apresenta menor custo de instalação, automatização mais fácil e menor volume de equipamentos, tais como dornas e trocadores de calor.

2.2.4. Recirculação de Leveduras

Após o término da fermentação alcoólica em um processo industrial, as leveduras devem ser separadas do produto ou resíduo produzido. Estas são novamente utilizadas no processo, garantindo menor custo para reposição de fermento e melhores condições de operação, pois os micro-organismos reciclados não necessitam consumir substrato para fase de crescimento e já estão adaptados ao meio. As células devem ser separadas do produto produzido também a fim de evitar a contaminação deste (LIMA, 2004).

Para se obter melhores valores de conversões, ou quando é necessário um aumento da concentração celular no interior do reator, utilizam-se reatores contínuos com reciclo. O

reciclo de células é usual em diversas fermentações como a fermentação alcoólica e tratamento de resíduos (BELTER, CUSSTER e HU, 1988).

No processo de reciclo a vazão da saída do reator passa por um separador, e uma bomba, geralmente centrífuga, para o reenvio de células para o reator. No processo de separação das células, usam-se centrífugas, filtros e decantadores (COUTINHO FILHO, 2007). Segundo Furtado e Scandiffio (2006), nos processos convencionais usados por praticamente todas as cerca de 400 usinas brasileiras, o processo de separação do mosto fermentado utilizado é a centrífuga, onde ocorre a separação das leveduras e do etanol. O vinho gerado é encaminhado para as colunas de destilação, o passo final do processo de produção do etanol, enquanto o fermento centrifugado, contendo as células de leveduras, passa por um tratamento severo antes de retornar ao processo fermentativo, que consiste em diluição com água e adição de ácido sulfúrico até, normalmente, $\text{pH} = 2,5$, ou mais baixo ($\text{pH} = 2$) no caso de haver infecção bacteriana. Esta suspensão de fermento diluído e acidificado, conhecido na prática com o nome pé-de-cuba, permanece em agitação de uma a três horas, antes de retornar à dorna de fermentação (FURTADO e SCANDIFFIO, 2006).

Esse tratamento ácido é pratica comum para o controle de bactérias contaminantes contidas no leite de leveduras. Observa-se a redução de 44,3% da microbiota contaminante, em função do vigor e tempo desse tratamento. Entretanto, o tratamento ácido da levedura, quando floculada indesejavelmente pela ação de bactérias, induz a dispersão do fermento e das bactérias, mas não a sua total eliminação (SOUZA e MUTTON, 2004).

A corrente reenviada por reciclo contém concentração celular maior que a da saída do reator e possibilita o processamento de uma maior quantidade de material e maiores taxas de diluição do que a utilizada em um reator sem reciclo (COUTINHO FILHO, 2007).

Aumentando-se a taxa de reciclo celular, a taxa de crescimento celular se torna maior que a taxa de diluição, que causa a diminuição dos efeitos de perturbações e consequentemente o aumento da estabilidade do processo, além de se economizar substrato, pois as células que entram no processo em uma alimentação nova consomem substrato para crescer, e as células que voltam ao processo pela corrente de reciclo já se encontram aptas à fermentação e adaptadas ao meio (BELTER, CUSSTER e HU, 1988).

Existem, logicamente, limites para a razão de reciclo utilizada em processos aeróbios, pois, à medida que a fração de células recuperada aumenta, a concentração de células no meio cresce até se tornar impossível o suprimento de oxigênio a estas. Isto não se aplica ao processo anaeróbio, em que não há esta limitação, mas há outras limitações como as associadas ao suprimento dos nutrientes (COUTINHO FILHO, 2007).

2.2.5. Tratamentos finais

Concluída a fermentação, o produto contido nas dornas denomina-se vinho, que é uma mistura hidroalcoólica, contendo além dos componentes principais – o etanol e a água – outras substâncias como dióxido de carbono que se encontra dissolvido em pequenas quantidades, células de leveduras, micro-organismos, sais minerais, açúcares não fermentados, partículas sólidas em suspensão provenientes da matéria-prima, óleo fúsel, aldeídos, ésteres e ácidos orgânicos.

As leveduras são separadas por centrifugação e da mistura líquida restante separa-se o etanol pelo processo de destilação-retificação, o qual decompõe essa solução múltipla em seus constituintes, recolhendo-se o álcool como o principal. Isso se consegue selecionando as condições de temperatura e pressão ótimas de maneira tal que uma fase líquida e uma fase vapor coexistam e se obtenha uma diferença de concentração relativa das substâncias a serem separadas nessas duas fases. Quando as duas fases estão em estado de equilíbrio físico ocorrerá diferença relativa máxima da concentração nessas fases (BELTER, CUSSTER e HU, 1988).

O álcool hidratado obtido apresenta uma concentração alcoólica de 96 a 97,2% em volume. Quando se deseja obter álcool absoluto é preciso desidratar o álcool, pois o processo de destilação fracionada não consegue separar o álcool da água em uma concentração alcoólica de 97,2%, quando se forma uma mistura azeotrópica, isto é, uma mistura que apresenta ponto de ebulição fixo, assim como vapor com a mesma composição que o líquido com o qual está em equilíbrio. A desidratação do álcool pode ser feita por processos químicos ou físicos, utilizando substâncias desidratantes ou promovendo-se o deslocamento do ponto azeotrópico (MENEZES, 1980).

2.3 Fatores que Afetam a Fermentação Alcoólica

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana), afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Durante a fermentação, a levedura pode estar exposta a vários fatores estressantes. Dentre esses fatores, os mais frequentemente mencionados são os altos teores alcoólicos, a temperatura elevada, a acidez do meio (inclusive no tratamento ácido), a presença de sulfito, a

contaminação bacteriana e, mais raramente documentada, a contaminação com leveduras não *Saccharomyces* (BASSO, 1991; BASSO, 2004).

Segundo Menezes (1980), a faixa de temperatura recomendada está entre 25 e 36°C. Temperaturas inferiores ao limite retardam a fermentação e temperaturas superiores ocasionam a evaporação do álcool e favorecem o aparecimento de contaminações. A temperatura adequada deve ser mantida na fermentação por meio de dispositivos para o resfriamento de dornas. À medida que a temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol. As linhagens industriais de *S. cerevisiae* são normalmente resistentes a alta temperatura, mas este fator interfere na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol ou meio com baixo pH (SILVA FILHO *et al.*, 2005). As leveduras são mesófilas. A faixa de temperatura ideal para a fermentação é um aspecto bastante divergente entre os técnicos. Um ponto considerado é que temperatura acima de 35°C favorece a multiplicação de bactérias, reduz a viabilidade do fermento e aumenta a acidez. Amorim (2005) afirma que a temperatura poderá chegar aos 35°C se conseguir manter a contaminação entre 5.10^6 a 1.10^7 bactérias/mL. Nesta temperatura a levedura multiplica menos e aumenta o rendimento.

O pH correto para favorecer a levedura e inibir o desenvolvimento de muitos tipos de bactérias está entre 4,0 e 5,0 (MENEZES, 1980). Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5. No processo com reutilização da levedura, é realizado tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2,0 a 3,2, durante uma a duas horas, visando à redução da carga microbiana. Desta forma, a fermentação alcoólica se inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0 (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

2.4. O Agente da Fermentação Alcoólica

As leveduras são os micro-organismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Bactérias, entre as quais a *Zymomonas mobilis*, são tidas como capazes de produzir etanol, mas, economicamente, as leveduras ainda são os agentes largamente utilizados (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

O gênero *Saccharomyces* é um dos grupos de micro-organismos mais estudados pela comunidade científica. Esse interesse é função da ampla aplicação desses micro-organismos

na indústria de biotecnologia. Essa levedura tem sido relatada como agente de transformação desde 1800 (ANDRIETTA, STECKELBERG, ANDRIETTA, 2006).

As leveduras são agentes biológicos ativos responsáveis pela fermentação alcoólica e, por isso, a escolha da linhagem apropriada é de importância fundamental para o êxito da fermentação. São definidas como fungos especializados, monocelulares, desclorofilados. Do aspecto das exigências nutricionais esse grupo situa-se entre aquele que se desenvolve em substratos mais simples, constituídos por fontes de carbono e sais minerais, e aquele que exige meios mais complexos (MENEZES, 1980).

A fermentação alcoólica é, portanto, um processo biológico conduzido pela levedura, normalmente *Saccharomyces cerevisiae*, na forma unicelular com 2 a 8 micrômetros de diâmetro, cuja fisiologia e bioquímica tem sido negligenciada em favor de uma visão físico-química e mecânica do processo. Porém, trata-se de um organismo vivo, com múltiplas habilidades metabólicas, podendo alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações no meio, com grande impacto no rendimento do processo (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001). Estas se reproduzem basicamente por gemação (brotamento), em que a célula mãe, após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula (STECKELBERG, 2001).

Somente poucas espécies desses micro-organismos são utilizadas na fabricação de álcool. Entre as espécies indicadas é muito importante a escolha de linhagens selecionadas e aclimatadas para realização da fermentação alcoólica e que devem apresentar certos requisitos para a boa eficiência da fermentação:

- Velocidade de fermentação: a quantidade de açúcar transformado em álcool por unidade de tempo e de massa de levedura deve ser elevada;

- Resistência ao álcool: é de grande interesse a obtenção de leveduras que podem resistir a concentrações elevadas de etanol, uma vez que se pode operar com mostos com concentrações elevadas de açúcar. Isso possibilita a obtenção de vinhos com maior teor alcoólico reduzindo os custos com a destilação;

- Eficiência de conversão: representa a capacidade da levedura de converter o açúcar em álcool. Leveduras que não utilizam ou utilizam pouco substrato para transformá-lo em etanol não se prestam à fermentação alcoólica;

- Resistência ao pH e antissépticos: além da resistência ao álcool, a levedura precisa tolerar o baixo pH do meio e antissépticos, uma vez que um dos recursos usados para combater as infecções do mosto e do vinho é baixar o pH ou adicionar antisséptico;

- Estabilidade genética: essas propriedades mencionadas devem ser mantidas nas gerações subseqüentes da linhagem genitora. Ou seja, as transferências contínuas e sucessivas em meios de cultura não devem alterar suas propriedades fermentativas desejáveis (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

A necessidade de determinação do desempenho industrial de uma levedura se justifica pela ocorrência de cepas que apresentam diferenças significativas de desempenho fermentativo, mesmo apresentando padrões cromossômicos iguais. A determinação do desempenho fermentativo, além de avaliar a performance industrial de uma cepa de levedura, pode proporcionar a diferenciação final entre cepas *S. cerevisiae* de mesmo cariótipo (STROPPIA, ANDRIETTA e ANDRIETTA, 2003).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são micro-organismos de alta eficiência fermentativa. Este fato tem permitido a seleção de cepas industriais com características adquiridas que as tornam produtores superiores de etanol mais tolerantes aos produtos da fermentação. Estudos relacionados com a melhoria das características da levedura ou com o processo de produção de etanol têm sido apresentados na literatura com o objetivo de aumentar o rendimento e a produtividade dos processos fermentativos. Estes estudos incluem a utilização de novas cepas de micro-organismos, mudanças na composição e concentração de nutrientes do meio de cultura e reciclagem de resíduos (AMORIM, 2005).

As leveduras (organismos saprófitos) exigem uma fonte de carbono elaborada – glicose ou outro açúcar – que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio. A Tabela 2.1 ilustra a composição molecular de levedura comercial (HARRISON, 1971).

Fontes de carbono, nitrogênio e fósforo são imprescindíveis à fermentação (MENEZES, 1980). O meio de cultura, além do carbono, hidrogênio e oxigênio deve, igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Segundo AMORIM (2005), as células de leveduras, durante o processo de fermentação alcoólica, apresentam necessidades nutricionais e os nutrientes influenciam diretamente a multiplicação e o crescimento celular e também a eficiência da transformação do açúcar em álcool.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza o nitrogênio nas formas amoniacal, (NH_4^+), amídica (uréia) ou amínica (na forma de aminoácidos), não tendo habilidade metabólica para aproveitar o nitrato e com pouquíssima ou nenhuma capacidade de utilizar as

proteínas do meio. O fósforo é absorvido na forma de íon H_2PO_4^- , forma predominante em pH 4,5, enquanto enxofre pode ser assimilado do sulfato, sulfito ou tiosulfato (AMORIM, 2005).

Tabela 2.1 - Composição Molecular de Levedura Comercial *Saccharomyces cerevisiae*

Constituinte	Levedura (g/100g matéria seca)
Carbono (C)	45,00 - 47,00
Hidrogênio (H)	6,00 - 6,50
Oxigênio (O)	31,00 - 32,00
Nitrogênio (N)	7,50 - 9,00
Potássio (K)	0,90 - 3,5 0
Fósforo (P)	1,10- 2,00
Enxofre (S)	0,30 - 0,50
Magnésio (Mg)	0,15 - 0,50
Cálcio (Ca)	0,04 - 0,90
Sódio (Na)	0,02 - 0,20
Zinco (Z)	0,004 -0,13
Ferro (Fe)	0,003-0,10
Cobre (Cu)	0,002 -0,12
Manganês (Mn)	0,0004 -0,0035
Cobalto (Co)	0,0005
Molibdênio (Mo)	0,000005 - 0,000009
Cloro (Cl)	0,004 -0,10
Iodo (I)	0,00005 -0,0004
Chumbo (Pb)	0,0001 -0,0007
Arsênio (As)	0,00001

(Fonte: HARRISON, 1971)

A Tabela 2.2 apresenta as concentrações dos principais nutrientes minerais para uma boa fermentação alcoólica. Tais nutrientes podem já estar presentes no mosto, sendo desnecessárias adições (AMORIM, 2005).

Tabela 2.2 - Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica

Mineral	Variação no Mosto (mg/L)	Recomendação (mg/L)
N-assimilável (NH_4^+ R - NH_2)	7 – 350	100 – 300
Fósforo (P)	20 – 200	50 – 250
Potássio (K)	300 – 1200	700 – 1300
Magnésio (Mg)	80 – 3900	100 – 200
Enxofre (S)	80 – 3900	Menor que 80
Cálcio (Ca)	150 – 2000	Menor que 150
Zinco (Zn)	0,45 – 9	1 – 5
Cobre (Cu)	0,20 – 8	1 – 5
Manganês (Mn)	2 – 8	1 – 5
Alumínio (Al)	5 – 240	<300 (mosto de caldo)

2.5. Bioquímica da Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é a ação de leveduras sobre açúcares fermentescíveis contidos em uma solução. É um processo biológico no qual a energia fornecida por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para o crescimento de leveduras e a oxidação parcial anaeróbia da hexose na produção de álcool e CO_2 (LIMA e MARCONDES, 2002).

A transformação da sacarose em etanol e CO_2 envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica, conforme apresentado na Figura 2.1. Tal aparato enzimático encontra-se confinado no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Os carboidratos considerados substratos para a fermentação tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como o glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

A principal rota metabólica envolvida na fermentação etanólica é a glicólise, na qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas. Sob condições anaeróbias, o piruvato é convertido a etanol com desprendimento de CO_2 . Teoricamente, o rendimento é 0,511 para etanol e 0,489 para CO_2 em base mássica, utilizando como substrato uma hexose. Dois ATPs produzidos na glicólise são usados na condução da biossíntese das leveduras, que envolve diversas biorreações que requerem energia. Portanto, a produção de etanol está fortemente relacionada com o crescimento das leveduras, o que

significa que leveduras devem ser produzidas como subproduto. Sem o consumo contínuo de ATP pelo crescimento celular, o metabolismo glicolítico seria interrompido imediatamente, em razão do acúmulo intracelular de ATP, que inibe a fosfofrutoquinase, uma das mais importantes enzimas reguladoras da glicólise (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

O objetivo principal da levedura, ao metabolizar anaerobiamente o açúcar, é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e CO₂ resultantes se constituem tão somente em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

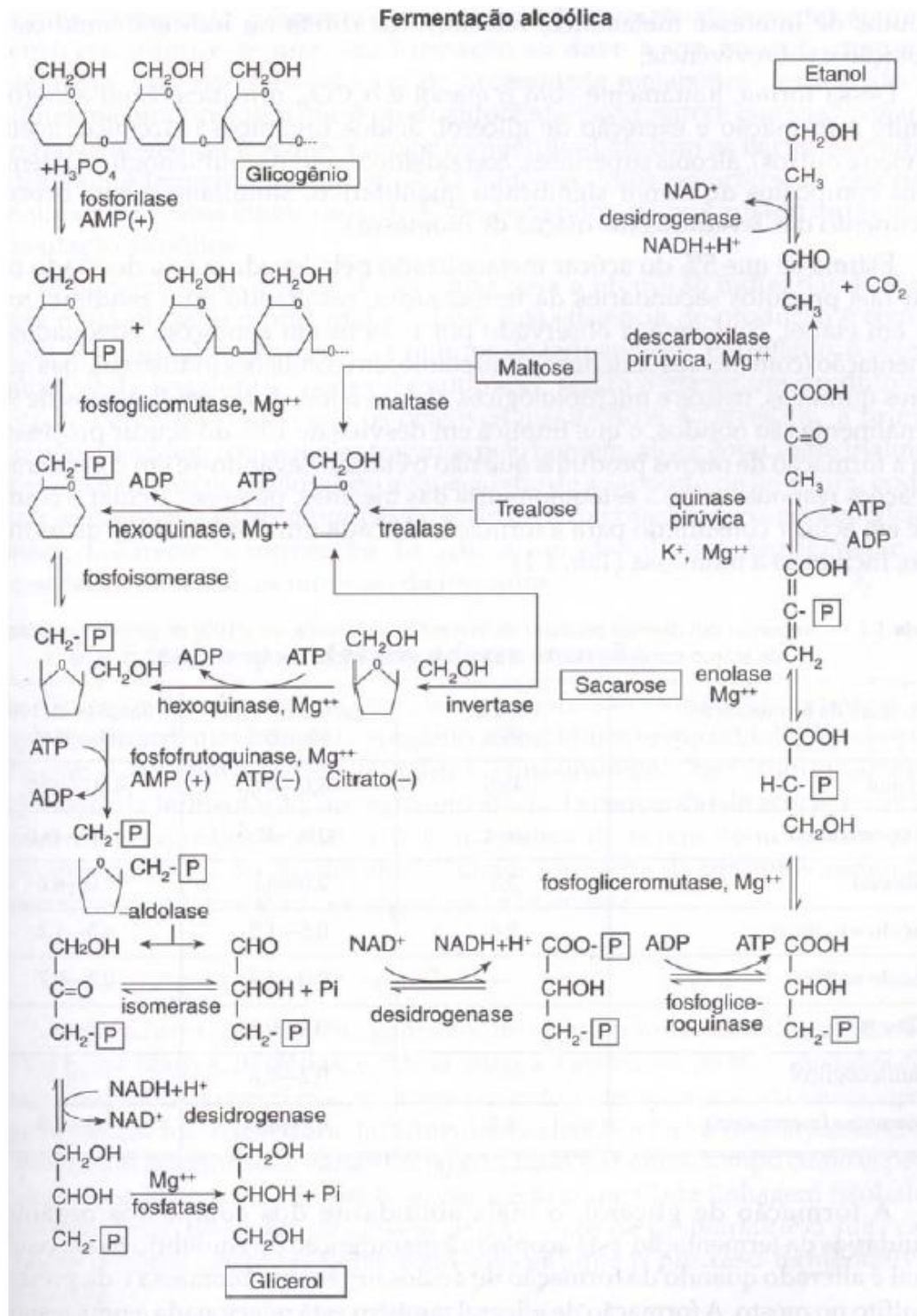


Figura 2.1 - Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae* (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001)

Durante a fermentação, as leveduras sofrem vários tipos de estresse. Alguns em razão do meio, como deficiência nutricional, alta temperatura e contaminação, outros pelo próprio

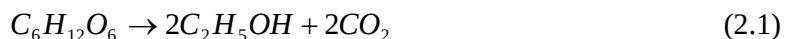
metabolismo da levedura, como o acúmulo de etanol e a conseqüente inibição do crescimento celular e produção de etanol. Alguns desses estresses afetam mais severamente as leveduras que outros, reduzindo a viabilidade celular e diminuindo o rendimento do etanol (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

2.6. Rendimento da Fermentação Alcoólica

Por razões econômicas é importante exercer uma constante e sistemática vigilância da produção de uma destilaria, o que deve ser efetuado por um balanço material e energético, além do próprio balanço econômico. Quanto mais completo o balanço material, considerando todos os insumos e exumos materiais, representados pelas matérias-primas, pelos subprodutos e resíduos, tanto mais efetivo será o controle do processo, permitindo uma melhor fiscalização de sua economicidade (MENEZES, 1980).

O caldo da cana, até o presente momento é a única matéria-prima utilizada em escala industrial para a produção do etanol no Brasil, apresenta rendimento perto de 80 litros de etanol por tonelada de cana-de-açúcar (ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2006). Para produzir um quilograma de etanol são necessários 30,1 quilogramas de cana-de-açúcar (LUO, VOET e HUPPES, 2008).

Pode-se estabelecer assim que a eficiência geral de fabricação é o produto da eficiência de preparo da matéria-prima (moagem, extração do caldo) pela eficiência da fermentação e pela eficiência da destilação. Para os substratos indiretamente fermentescíveis inclui-se também a eficiência da hidrólise. Partindo-se da equação de Gay Lussac



obter-se-ia, estequiometricamente, a partir de 100 g de glicose, 51,11 g de álcool ou 64 mL. Entretanto, em condições de trabalho, embora com todo o rigor da técnica, obtém-se a partir de 100 g de glicose em torno de 48,5 g de etanol ou 61 mL de etanol a 15°C. Isto porque aproximadamente 5% do açúcar são reservados para o crescimento celular e para a formação dos subprodutos da fermentação, como glicerol, ácido succínico, etc. (MENEZES, 1980).

As hexoses são reagentes primários no metabolismo da fermentação alcoólica. Estequiometricamente, o rendimento do processo fermentativo é 0,511 g/g de hexose, porém ocorrem, juntamente com a fermentação alcoólica, reações secundárias, resultando na redução de rendimento teórico. Quando se trabalha com substratos complexos, em processos industriais, notadamente na presença de corpos estranhos ao meio (fibras, gomas, leveduras

selvagens) observa-se a geração de novos subprodutos e o rendimento industrial é reduzido para até 90% (LIMA e MARCONDES, 2002).

Quando se considera o substrato formado de sacarose, juntamente com pequenas porcentagens de glicose e frutose, como na indústria brasileira de etanol, o açúcar é definido como açúcar redutor total (ART) e o rendimento estequiométrico da fermentação é 0,511 g de etanol por grama de ART. Quando o rendimento estequiométrico é calculado com base na sacarose o valor do mesmo é 0,538 g de etanol por grama de sacarose. Na prática industrial o rendimento da fermentação alcoólica bem conduzida atinge de 90 a 92% do rendimento estequiométrico, havendo um consumo de açúcar para formação de biomassa celular e subprodutos. Se ocorrer contaminação acentuada do meio, este rendimento é ainda menor (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

O etanol representa o produto principal da fermentação alcoólica e pode alcançar concentrações de até 12 a 14% v/v em fermentação normal. O gás carbônico, segundo produto da fermentação alcoólica, tem um rendimento de 0,4 a 0,5 gramas de CO₂ por grama de açúcar degradado consumido (BARRE *et al.*, 2004).

Segundo Viegas (2003), uma unidade de fermentação contínua convencional, ou seja, que utiliza separadoras centrífugas e células de leveduras não floculantes, geralmente opera com rendimento de 87% e produtividade de 7,9 g_{etanol}/L.h quando melaço é utilizado como matéria-prima.

A quantidade e o número de subprodutos presentes dependem de uma série de fatores. Os principais são o tipo de matéria-prima, a linhagem de levedura empregada e o processo de fabricação. Frequentemente, encontram-se os seguintes produtos: glicerol, ácido succínico, ácido acético, álcoois superiores, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, gás sulfídrico, furfural e óleos essenciais. O gás carbônico e óleo fúsel (álcoois superiores) são os únicos subprodutos úteis da fermentação alcoólica (MENEZES, 1980).

2.7. Aumento da Produtividade

Atualmente, células livres suspensas no meio fermentativo são amplamente utilizadas em plantas industriais de produção de etanol. Entretanto, não se consegue operar com altas densidades de leveduras e a produção de etanol é inevitavelmente mais baixa, a menos que as células sejam separadas por centrifugação e recicladas ao reator. Altos investimentos de capital e elevado custo energético de operação das centrífugas entravam sua aplicação em

plantas químicas produtoras de etanol, especialmente em países em desenvolvimento, nas quais o custo energético é relativamente alto (XU, ZHAO e BAI, 2005).

Após o término da fermentação no processo industrial, os micro-organismos (leveduras e nutrientes para mantê-las) devem ser separados do produto produzido. O ponto em que a fermentação acaba é monitorado pela avaliação da concentração de açúcar (Brix) no meio (CUNHA *et al.*, 2006).

A forma mais usual de promover a separação das leveduras é o uso de centrífugas, visto que a sedimentação natural se mostra inviável (a deposição das células pode ser até 6000 vezes mais rápida na centrifugação que na sedimentação natural, sob ação da força gravitacional somente) (COUTINHO FILHO, 2007).

Entretanto, o uso de centrífugas nesse processo requer alto investimento de capital, elevado custo energético na operação, além de ser um setor do processo que não admite automação total. Tais fatores, somados ao custo de tratamento e bombeamento da corrente de reciclo, elevam o custo do produto final (ABARCA, 2005).

Em reatores contínuos com centrifugação de células, pode não ser economicamente vantajoso trabalhar com altas concentrações celulares, pois se empregaria um grande número de centrífugas na separação, tornando o processo inviável economicamente, pelo alto custo do equipamento, considerável consumo de energia e necessidade de manutenção periódica (VIEGAS, ANDRIETTA e ANDRIETTA, 2002).

Segundo ABARCA (2005), tecnologias capazes de melhorar o desempenho da produção do setor ganham importância fundamental no país. O setor sucroalcooleiro brasileiro acredita que será um dos supridores mundiais de álcool combustível e de tecnologias modernas para montagem de destilarias em outros países do mundo. Especialistas alertam que ganhos de eficiência na produção do etanol são fatores preponderantes para competitividade em mercados mundiais.

Uma alternativa possível para o aumento da concentração celular no interior dos fermentadores, e conseqüente aumento da produtividade, é a utilização de células imobilizadas (BAPTISTA *et al.*, 2006).

2.7.1. Biorreatores com Imobilização

Estratégias para a retenção das células no interior do biorreator incluem a separação da corrente de produto seguida do reciclo para o fermentador ou imobilização no interior do biorreator. A separação das células da corrente de produto pode ser feita por sedimentação,

centrifugação ou separação por membrana e reciclo, ou ainda pela imobilização do agente da fermentação no interior do fermentador. Processos de separação e reciclo requerem equipamentos adicionais e consumo de energia, sendo, portanto, menos adequado por aumentarem o custo de produção da fonte renovável de energia. Já a imobilização das células não requer separação nem reciclo (BAPTISTA *et al.*, 2006).

Essa imobilização pode ser artificial, incorporada em um gel polimérico ou natural, suportadas por biomassa ou anexadas a suportes sólidos.

Numerosos estudos têm sugerido a produção de etanol pelo uso de células imobilizadas (ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2008). Fermentações utilizando leveduras *Saccharomyces* em biorreatores batelada tradicionais para produção de etanol têm sua produtividade limitada a somente 1,8-2,3 g/L.h, que não é viável economicamente. Embora fermentações contínuas possam aumentar esse valor de produtividade, maiores valores podem ser conseguidos se as células forem retidas no fermentador (BAPTISTA *et al.*, 2006).

Fermentações alcoólicas utilizando células imobilizadas podem aumentar significativamente a produtividade e diminuir o investimento de capital na construção dos fermentadores. Entretanto, tecnologias de imobilização convencional com suportes inertes tem se mostrado não competitivas com tecnologias de fermentação alcoólica utilizando células livres suspensas em razão do custo do suporte, imobilização das células em escala industrial e prevenção de contaminação durante o processamento (GE, ZHANG e BAI, 2006).

Joekes *et al.* (1998) imobilizou *Saccharomyces cerevisiae* em crisotila. O rendimento final foi 26% maior que com células livres. Wendhausem *et al.* (2001) trabalhou com um fermentador contínuo e células imobilizadas, conseguindo um rendimento de etanol de 97,3%. Esse mesmo sistema conduzido com células livres garante um rendimento menor que 84,5%. Najafpour *et al.* (2004) estudou a fermentação alcoólica em reator com *S. cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio, atingindo rendimento de até 83,53% do rendimento teórico com uma conversão máxima de sacarose de 92,68%.

Os principais problemas da imobilização artificial são: a necessidade de uma operação unitária para produzir partículas de células imobilizadas, aumentando o custo do processo; e o fato de células imobilizadas terem um menor tempo de meia-vida, por perderem a atividade ou morrerem (BAPTISTA *et al.*, 2006). Além disso, células imobilizadas em suporte, especialmente em géis, tem seu crescimento significativamente retardado por fatores como restrições físicas, diminuição de nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos, em razão da potencial limitação da transferência de massa (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

Portanto, a produção de etanol usando leveduras imobilizadas em gel não se mostra produtiva. Alguns outros métodos de imobilização, especialmente adsorção de superfície, tem mostrado melhores resultados que imobilização em gel, retenção por membrana ou micro-encapsulação. Quando células são imobilizadas por adsorção, seu crescimento não é significativamente afetado, porém as células podem ser arrastadas para fora do biorreator, pois a adsorção das células é geralmente fraca (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

Por essas razões, utiliza-se imobilização natural, em que a retenção de células em um biorreator resulta em uma maior concentração de biomassa comparada com uma cultura suspensa. A imobilização natural de células ativas operando em leito fluidizado apresenta diversas vantagens quando comparada a outros tipos de imobilização, especialmente quando comparada a métodos de imobilização que envolvem incorporação em géis poliméricos (BAPTISTA *et al.*, 2006).

A tecnologia de floculação espontânea de células, e consequente aumento da concentração celular pela retenção dos flocos no interior do reator, sem o uso de um suporte inerte, se mostra economicamente competitiva e representa um novo conceito de imobilização (GE, ZHANG e BAI, 2006).

A habilidade de flocular de cepas de *S. cerevisiae* tem sido considerada como a produção de etanol em sistema auto-imobilizado. Células floculantes permanecem no interior do reator sem que seja necessário um suporte inerte (ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2008).

2.7.2. A Levedura Floculante

Dentre as várias técnicas de imobilização, a utilização de células floculantes é muito atraente devido à sua simplicidade e baixo custo, não havendo necessidade de suporte. Esta é uma vantagem substancial frente a outros sistemas de imobilização, uma vez que o suporte está associado ao maior custo de células imobilizadas (DOMINGUES, 2001).

Com o objetivo de melhorar o desempenho de plantas industriais, aumentar a densidade celular no interior de fermentadores e diminuir os custos de produção pesquisadores conseguiram selecionar linhagens de leveduras que desempenham papel diferenciado no processo de fermentação do álcool. Estas são ditas “leveduras floculantes” e têm a habilidade de se agregarem espontaneamente e formar flocos. Após transformar os açúcares presentes no caldo da cana em álcool, esta levedura se agrega em forma de flocos e concentra-se no fundo do reator. Dessa forma, o combustível pode ser extraído sem a

necessidade da centrifugação, pois a levedura floculante fica retida no reator e pode ser reutilizada sem necessidade de qualquer cuidado extra (PARAZZI, 2007; XU, ZHAO e BAI, 2005).

Até bem pouco tempo acreditava-se que a floculação ocorria exclusivamente quando da presença de algum tipo de bactéria nas dornas. Hoje se conhece algumas linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces* que apresentam propriedade de floculação. Essas linhagens apresentam, em sua composição genômica, genes que expressam proteínas conhecidas como floculinas que permitem que essas leveduras cresçam de forma floculada (ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2006).

Para que ocorresse essa agregação das células era necessário um mecanismo que funcionasse como floculante para a levedura ou a capacidade de a substância se juntar sozinha e descer ao fundo da dorna. Pesquisas em leveduras indicavam a existência de um gene, o FL01, capaz de fazer a levedura se agregar e sedimentar. Apesar de haver um gene expresso com esta capacidade não havia como controlar esta floculação (BAPTISTA *et al.*, 2006).

Buscava-se um gene que, expresso na levedura, tivesse capacidade de deflagrar o processo de sedimentação quando a fermentação fosse concluída, ou seja, quando toda a glicose fosse convertida em álcool. A pesquisa identificou então um promotor chamado álcool desidrogenase (ADH2), conhecido por ser regulado pela presença da glicose. O gene é dividido em duas partes, estrutural e promotora, esta responsável por informar à parte estrutural a necessidade de executar uma função. Foi então efetuada a troca da posição do promotor ADH2 no gene para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a espécie mais utilizada em processos industriais. A mudança de posição do promotor é que permitiu o mecanismo de ativação e desativação do funcionamento da levedura. Em laboratório, a levedura geneticamente modificada (não transgênica), já com o promotor que funciona com a ausência da glicose, respondeu exatamente como previsto (BAPTISTA *et al.*, 2006).

Enquanto há glicose presente no meio, a levedura permanece em suspensão promovendo a conversão do açúcar em álcool. Com o fim da glicose, o promotor ADH2 inicia a aglomeração das leveduras, que se decantam por estarem pesadas. O mosto fermentado sobre a levedura é então retirado para a destilação. Ao adicionar nova carga de caldo de cana, o gene percebe a presença de glicose, o promotor emite a informação e a levedura se desaglomera para reiniciar o processo. A substância fica em suspensão até o fim do processo, quando sedimenta novamente (BAPTISTA *et al.*, 2006).

Na Figura 2.2, pode-se observar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, essa agregação espontânea, que forma flocos macroscópicos.

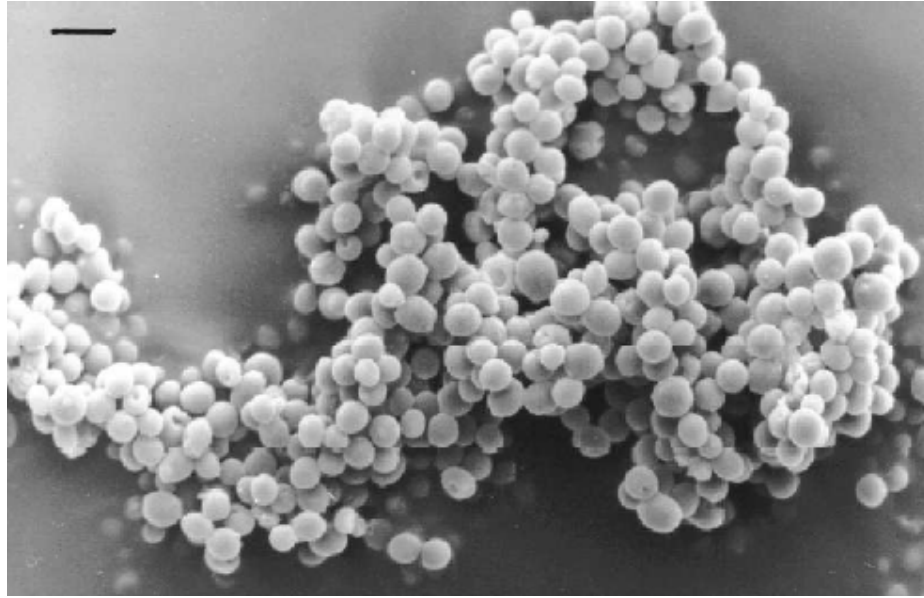


Figura 2.2 – Células floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* observadas em microscopia eletrônica de varredura (barra corresponde a 10 μm) (Fonte: Domingues, 2001)

No processo de flocculação de leveduras fenômenos biológicos, químicos e físicos estão envolvidos (GINOVART *et al.*, 2006).

Na Figura 2.3 pode-se observar a aparência do leito de leveduras quando estas se encontram aglomeradas e decantadas. Essa aglomeração ocorre pois formam-se ligações entre as proteínas e a parede da célula. Formam-se pontes entre os grupos funcionais aniônicos nas superfícies das células adjacentes por cátions divalentes, ocorrendo a neutralização das cargas da superfície celular (PARAZZI, 2007).



Figura 2.3 - Leito de leveduras floculadas (Fonte: Andrietta, 2005)

Segundo Stan e Despa (2000), a floculação requer a presença de proteínas e receptores de íons na superfície celular, sendo a floculação uma propriedade intrínseca da parede celular. No entanto, não se sabe como fatores regulatórios agem nos genes envolvidos na produção de proteínas e como estas se tornam receptoras, sendo a regulação da floculação um desafio para as indústrias até o momento.

Entretanto, algumas características importantes desse processo de floculação de *Saccharomyces* já foram identificadas: íons Ca^{2+} são necessários para induzir o processo, íons Na^+ têm um efeito inibitório na floculação, alguns tipos de açúcares inibem a floculação, células não floculantes podem interagir com floculantes, a floculação é afetada pelas condições do meio de cultivo e está fortemente relacionada com o aumento da hidrofobicidade da parede celular. A floculação de leveduras é uma interação entre as paredes celulares, em que íons Ca^{2+} atuam como cofatores ativando o processo (TEIXEIRA *et al.*, 1995).

A floculação de cepas de levedura é um processo diretamente associado a proteínas “tipo” lectinas (*lectin-like proteins*), também conhecidas como floculinas, saem da parede celular das leveduras floculantes e atuam se ligando seletivamente a resíduos de manose (mananas) presentes na parede celular de outras cepas que compõem o meio (GALASSI, 2007).

Fatores protéicos associados a sais minerais e às mananas estão envolvidos na floculação de leveduras e a ação de proteases é eficaz na desfloculação do fermento. Para que a floculação se desenvolva é necessária a movimentação entre as células, para que se acelere o processo de floculação, provavelmente devido ao aumento de colisão entre as células, facilitando a adesão (VIEGAS, 2003).

As células de leveduras se agregam devido à forças de Van der Waals, que na ausência de outro tipo de força atrativa, estas são importantes para que as células de leveduras superem as forças de repulsão eletrostáticas promovendo então a floculação das mesmas (STRATFORD, 1996).

Com a aplicação industrial dessa tecnologia as usinas obterão uma economia significativa, visto que não precisarão investir na aquisição e manutenção de equipamentos de centrifugação, nem tampouco no tratamento químico. Cálculos realizados previamente indicam que o emprego dessa nova tecnologia representará uma economia entre R\$ 0,02 e R\$ 0,03 por litro de etanol produzido, o que é muito significativo para as usinas. A eliminação dos estágios de centrifugação e reciclo representa uma economia de 16% nos custos de

processamento. Para os custos de instalação, a economia é de 10% (ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2008).

Comparada com a tecnologia de imobilização celular desenvolvida previamente, a levedura floculante é um sistema de imobilização que não utiliza nenhum suporte, o que torna essa técnica potencialmente mais competitiva do ponto de vista econômico (XU, ZHAO e BAI, 2005). Além disso, a auto-imobilização elimina a possibilidade de contaminação; o crescimento celular não é significativamente afetado; os flocos podem ser retirados do fermentador sob condições controladas, mantendo a concentração de biomassa nos níveis desejados; os flocos podem ser recuperados do reator por sedimentação, dispensando investimento com centrífuga e diminuindo o gasto energético (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

Comparando-se o desempenho de uma fermentação que utiliza levedura floculante e outra que utiliza células comuns, pode-se perceber que, para os mesmos níveis de etanol e açúcar residual no efluente, o tempo médio requerido pela cepa de leveduras floculantes foi aproximadamente 50% do requerido pela cepa comum e a produtividade média na fermentação com floculantes foi o dobro, em razão da alta concentração celular no interior do reator. Além disso, a perda da viabilidade na fermentação que utiliza leveduras floculantes é menor (XU, ZHAO e BAI, 2005). Entretanto, pesquisas ainda são necessárias para transformar esse processo em um sistema industrial rentável e robusto (BAPTISTA *et al.*, 2006).

A Usina Noroeste Paulista, no município de Sebastianópolis, no estado de São Paulo utiliza o processo de produção de etanol, em processo contínuo, utilizando leveduras com características floculantes, separando o fermento após o último reator da série por decantação.

Apesar da aplicação de células floculantes estar muito bem estabelecida na indústria cervejeira, a sua aplicação em outras indústrias biotecnológicas é fortuita. A floculação de células de levedura apresenta potencialidades ainda não exploradas devidamente (DOMINGUES, 2001).

Embora os estudos utilizando levedura floculante em escala de laboratório se mostrem promissores, o mesmo pode não ocorrer em escala industrial, pois o substrato a ser fermentado (normalmente melaço de cana-de-açúcar) contém micro-organismos nativos que podem dominar o processo e conseqüentemente eliminar a cepa floculante utilizada como inóculo (ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2008).

2.8. Biorreatores Empregados

Usualmente, em fermentações alcoólicas industriais, utilizam-se reatores de mistura não agitados mecanicamente. O principal problema deste tipo de reator é que as leveduras tendem a decantar em sua parte cônica, o que implica em diminuição da produtividade, pois o micro-organismo deixa de estar em contato com o substrato (PARAZZI, 2007).

Em decorrência disso, inovações tecnológicas têm sido empregadas com o intuito de melhorar o desempenho das fermentações alcoólicas. Alguns processos industriais já empregam agitadores mecânicos na parte inferior das dornas, evitando, assim, a decantação das células (PARAZZI, 2007).

O projeto do reator e o estudo das condições de operação são determinantes na eficiência de um sistema contínuo de elevada densidade celular com células floculantes. Estas permitem modelar e manter o tamanho, forma e densidade dos flocos de forma a permitir a retenção de biomassa no reator, mas mantendo simultaneamente a atividade celular. Isto significa que o compromisso entre as condições hidrodinâmicas do reator e as propriedades físicas do floco devem ser mantidos (DOMINGUES, 2001).

Diferentes configurações de fermentadores, incluindo air-lift, leito fluidizado simples e leito fluidizado em dois estágios em série, leito suspenso em CO₂ acoplado com um tanque de separação foram desenvolvidos para fermentação alcoólica. Entretanto, algumas dessas configurações não são aplicáveis industrialmente à tecnologia das leveduras floculantes em razão da baixa produtividade de etanol, baixo consumo de açúcar ou pequenos rendimentos (XU, ZHAO, BAI, 2005).

Como o processo de inibição é bem conhecido na fermentação etanólica, sistemas de fermentadores em série são amplamente utilizados na indústria (XU, ZHAO e BAI, 2005).

A fermentação contínua em um sistema constituído de três tanques agitados, associados em série, com dois sedimentadores, operando com leveduras floculantes, reduz em um terço o tempo de fermentação, além de aumentar em 2,5 vezes a produtividade e em dez vezes a concentração celular, comparada com um fermentador convencional com células suspensas, para um mesmo nível de produção de etanol e de açúcar residual. Comparado com um sistema sem recirculação de células o tempo de fermentação é reduzido a 42% e a produtividade aumentada em 70% (WANG *et al.*, 2006).

Andrietta, Steckelberg e Andrietta (2008) estudaram o processo de fermentação contínua com uma cepa de leveduras com características floculantes em um sistema de dois

reatores ligados em série, simulando as condições operacionais da indústria, obtendo rendimento de 83,53%, e uma conversão menor que a esperada.

2.8.1. Biorreatores Tipo Torre

As vantagens de se empregar biorreatores de leito fluidizado são relatadas em vários estudos. A alta produtividade e estabilidade são alguns dos fatores que são levados em conta quando se trabalha com biorreatores de leito fluidizado (VIEGAS, ANDRIETTA e ANDRIETTA, 2002).

Segundo Gòdia e Solá (1995), a depender das condições de operação, o líquido escoar em um biorreator de leito fluidizado de forma empistonada, o que é extremamente vantajoso principalmente em reações que sofrem inibição pelo produto, como é o caso da fermentação alcoólica.

Harshbarger *et al.* (1995) analisaram o impacto econômico da utilização de um biorreator de leito fluidizado de uma planta para produção de etanol comparado a um processo tradicional em batelada. Utilizando-se o biorreator de leito fluidizado operando continuamente com 30% de catalisador v/v e uma concentração de glicose na alimentação de 15%, obteve um rendimento em etanol de 98% e uma conversão de substrato de 99,5%. O pesquisador concluiu que o custo da planta industrial utilizando-se o biorreator de leito fluidizado é cerca de 17% mais baixo comparado ao processo tradicional.

Trabalhando com um sistema de fermentação contínua com reciclo de células formado por dois fermentadores tipo torre e um decantador utilizando leveduras flocculantes para produção de etanol, Viegas (2003) obteve conversão de substrato maior que 98% e produtividade de 26,3 g_{etanol}/L.h, trabalhando com diferentes concentrações de substrato (125 a 181 g/L) e diferentes condições de aeração num sistema estável por 80 dias operando continuamente. O autor ressalta ainda que tal produtividade é cerca de seis vezes a obtida pelo processo batelada Melle-Boinot.

Segundo Liu, Wang e Ou-Yang (2009) um reator contínuo de leito fluidizado com células imobilizadas demonstrou significativo aumento da produtividade volumétrica quando comparado com sistemas batelada tradicionais ou outros reatores contínuos.

Quando opera com leveduras com características flocculantes em um sistema contínuo com recirculação de células, o reator de leito fluidizado fornece uma conversão de substrato maior que 95%, com estabilidade por um longo período de tempo (VIEGAS, ANDRIETTA e

ANDRIETTA, 2002). Estes mesmo autores, operando com dois reatores do tipo torre conectados em série obtiveram uma produtividade de 15,4 g_{etanol}/L.h com rendimento de 93%.

Segundo Paiva *et al.* (1996), é possível operar um reator tipo torre com alta concentração de células e alta produtividade (18 g_{etanol}/L.h) utilizando decantadores como unidade de separação quando a cepa de levedura utilizada possui características floculantes.

Utilizando uma estirpe floculante e um reator de leito fluidizado alimentado com meio contendo glicose, Bu'Lock *et al.* (1984), referido em Domingues (2001), conseguiram uma produtividade volumétrica máxima em etanol de 50 g/L.h para uma concentração de etanol de 75 g/L e um rendimento médio de 83% do teórico.

A fermentação contínua de melaços com uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliada utilizando um reator de leito fluidizado, obtendo-se produtividades entre 15 e 20 g/L.h (WIECZOREK e MICHALSKI, 1994). Com essa mesma estirpe, Souza *et al.* (1994) referem uma produtividade máxima em etanol de 12,9 g/L.h na fermentação de meio contendo glicose usando um reator tipo airlift de circulação interna.

Os sistemas de reatores de leito fluidizado com células de leveduras floculantes apresentam alta estabilidade e produtividade (25 mL etanol/L.h), enquanto que os processos contínuos otimizados com centrifugação de células atingem 12 mL etanol/L.h (VIEGAS, 2003).

Segundo Viegas (2003) é possível operar reatores tipo torre com altas produtividades e elevados rendimentos sem a necessidade de se utilizar unidade de separação de células (centrífugas). A maior dificuldade de operação desses reatores é a manutenção da estabilidade do leito de células formado no primeiro reator para altas taxas de aplicação de substrato (g substrato/h). Esse fato se deve à grande quantidade de CO₂ produzido em função da alta velocidade de fermentação alcançados nestas condições, o que causa uma fluidização excessiva do leito, arrastando as células para o segundo reator.

Sipsas *et al.* (2009) fizeram um estudo comparativo da produção em batelada e contínua em fermentadores de torre, multi-estágios de leito fixo. O sistema multi-estágios de leito fixo resultou em maior produtividade de álcool quando comparado a um único fermentador de leito fixo. A produção batelada e contínua nos fermentadores de leito fixo resultaram em produtividades de etanol similares a de fermentadores tradicionais.

Prince e Barford (1982) relatam a capacidade de um fermentador tipo torre operando continuamente por 14 semanas com leveduras floculantes acumular altas concentrações celulares (70-90 g/L), em que a produtividade e conversão em etanol são obtidos em função da vazão de alimentação e da concentração de glicose.

Paiva *et al.* (1996) obtiveram produtividade de etanol de 14,4 g/L.h e rendimento de 88,3% usando um sistema de reatores tipo torre de leito fluidizado com reciclo e separação de células por decantação. Viegas (2003) estudou o desempenho de leveduras com características floculantes em um sistema de três reatores em série, obtendo um elevado rendimento, 27,5 g/L.h, atribuído à cepa de leveduras utilizada.

Diante da viabilidade observada no emprego de biorreatores de leito fluidizado em escala laboratorial, alguns estudos tentaram seu scale-up para aplicação industrial (VIEGAS, ANDRIETTA e ANDRIETTA, 2002).

Prince e Barford (1982) ressaltam que a configuração dos reatores tipo torre pode ser também um avanço comparado aos sistemas convencionais com respeito ao controle de contaminação microbiológica, uma vez que as bactérias presentes no início do processo são rapidamente eliminadas do sistema, uma vez que os contaminantes são “lavados” do reator. Outra vantagem citada é a alta concentração de células de leveduras acumuladas no reator, o que torna o sistema apropriado para operar com altas produtividades.

Outro ponto relevante para a aplicação industrial deste processo é a relação entre a concentração de glicose na alimentação e a concentração dos flocos de leveduras na saída do sistema, uma vez que o aumento da concentração de açúcar na alimentação aumenta a viscosidade do meio fermentativo, aumentando assim o carregamento hidráulico dos flocos de células (VIEGAS, 2003).

2.9. Estudo Cinético da Fermentação Alcoólica

O objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é o de quantificar a taxa de crescimento celular, de consumo de substrato e formação de produtos e demais parâmetros relacionados, além de avaliar a influência de fatores externos como pH, temperatura, inibidores, etc. nestas taxas. No caso da fermentação alcoólica, estes valores são essenciais para se projetar adequadamente uma unidade industrial de produção de etanol (VIEGAS, 2003).

A cinética da fermentação alcoólica é um assunto de interesse dos centros de pesquisa especializados, tendo em vista seu potencial industrial e econômico (LIMA e MARCONDES, 2002).

Segundo Bailey e Ollis (1986), os modelos cinéticos normalmente usados em fermentações podem ser divididos em: não-estruturados e não segregados, nos quais as células

de micro-organismos são consideradas como soluto; estruturados e não segregados, onde as células são tratadas como seres individuais de múltiplos componentes, porém com composição média semelhante; não-estruturados e segregados, onde as células são tratadas como seres individuais distintos, porém descritos por um único componente; e estruturados e segregados, onde as células de micro-organismos são consideradas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes. Para o estudo da fermentação alcoólica, o modelo não-estruturado e não segregado é o mais utilizado para descrever o comportamento das variáveis envolvidas.

A complexidade da descrição cinética que é requerida e apropriada depende das situações físicas e da aplicação pretendida. Não é possível a formulação de um modelo que inclua todas as características e detalhes celulares. O modelo deve ser formulado a partir de algumas aproximações (STREMEL, 2001).

A equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que considera a presença de substrato como limitante para o crescimento (LUONG, 1985), sendo descrita matematicamente pela Equação 2.2.

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

Em que: μ é a taxa de crescimento celular, $\mu_{m\acute{a}x}$ é a máxima taxa de crescimento celular, S a concentração do substrato limitante e K_s a constante de Monod, que representa o valor de S no qual a taxa específica de crescimento é a metade do seu valor máximo. Componentes presentes em altas concentrações no meio de cultura não afetam significativamente a taxa de crescimento celular segundo esse modelo, ou seja, a equação de Monod somente se aplica para casos em que não há presença de inibidores de crescimento no meio de cultura (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

Entretanto, na fermentação alcoólica, o rendimento de biomassa diminui com aumento da concentração de etanol, indicando uma relação entre o rendimento da biomassa e a inibição pelo produto. O etanol começa a ter efeito inibitório na taxa de crescimento celular acima de 15 g/L. A concentração máxima de etanol permitida, acima da qual as células não crescem, foi predita em 112 g/L. O fenômeno de inibição pelo substrato é normalmente menos importante do que a inibição pelo etanol (THATIPALAMA, ROHAI e HILL, 1992). Este autor propõe o modelo descrito pela Equação 2.3.

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S_{max} - S}{S_{max} - S_{min}} \right) \quad (2.3)$$

Sendo: $S_{m\acute{a}x}$ é a máxima concentração de substrato acima da qual não existe crescimento celular e S_{min} a concentração onde se inicia o efeito de inibição.

Thatipamala *et al.* (1992) apresentaram um modelo que representa a diminuição do rendimento da biomassa ($Y_{x/s}$) com o aumento das concentrações iniciais de etanol e de substrato e a diminuição da taxa de crescimento específico com o aumento da concentração inicial de substrato. Os autores sugeriram um modelo específico para a fase *Lag* e observaram experimentalmente que a inibição pelo substrato afetou mais o rendimento em etanol do que a inibição pelo produto, por provocar a diminuição da viabilidade celular. Observaram ainda que a fase *Lag* aumentou com o aumento da concentração inicial de substrato.

Moulin *et al.* (1980) propuseram duas diferentes expressões para representar a inibição pelo substrato, a primeira delas para $S > 100$ g/L e $P < 32$ g/L (Equação 2.4) e a segunda para $S > 100$ g/L e $P > 32$ g/L (Equação 2.5).

$$\mu = \mu_i^{[K_1(S-100)]} \quad (2.4)$$

$$\mu = \mu_i^{[K_1(S-100)][K_2(S-100)P]} \quad (2.5)$$

Em que: K_1 e K_2 são constantes empíricas e μ_i possui dependência exponencial com o produto (P).

Tosetto (2002) analisou o comportamento cinético da cepa de levedura Y904 em nove diferentes matérias-primas provenientes de unidades produtoras de açúcar e álcool. Estudou-se as cinéticas de produção de etanol, células e de consumo de substrato, assim como o desempenho da cepa em cada matéria-prima com relação à produtividade e rendimento em etanol. Para a avaliação cinética, foram utilizados seis modelos do tipo não estruturado. Os que mais se adequaram aos dados experimentais foram os modelos de Ghose e Thyagi (1979), representado pela Equação 2.6 e o de Jin *et al.* (1981), dado pela Equação 2.7, citados em Tosetto (2002).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{S + K_s + S^2/K_i} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}} \right) \quad (2.6)$$

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \exp(-K_1P - K_2S) \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (2.7)$$

Esse modelo descrito por Jin *et al.* (1981) leva em consideração o efeito do substrato limitante (K_s), inibição pelo substrato (K_i) e inibição pelo produto exponencial ($P_{m\acute{a}x}$).

O modelo de Tosetto e Andrietta (2002) é semelhante ao de Ghose e Thyagi (1979), porém o valor do expoente do termo de inibição pelo produto pode assumir valores diferentes de 1.

Levenspiel (1980) generalizou uma equação matemática para o crescimento celular contendo um termo para inibição pelo produto, além de levar em consideração o efeito do substrato limitante (Ks), dada pela Equação 2.8.

$$r_x = \mu X = \mu_{m\acute{a}x} \left[1 - \frac{P}{P_m} \right]^n \left[\frac{S}{K_s + S} \right] X \quad (2.8)$$

Em que P_m é a concentração limite do produto inibidor. Para uma concentração de P bem menor que o valor de P_m , a Equação 2.8 se reduz à Equação 2.9, que é equivalente à cinética de Monod (LEVENSPIEL, 1980).

$$r_x = \mu X = \left[\frac{S}{K_s + S} \right] X \quad (2.9)$$

A multiplicidade de modelos cinéticos que descrevem o crescimento microbiano se deve ao fato de que eles são construídos para uma levedura específica, em condições experimentais pré-definidas (DOURADO *et al.*, 1987).

Vasconcelos, Pinto e Silva (1992) realizaram vários ensaios e observou que a velocidade específica de produção de etanol esteve vinculada à velocidade específica de crescimento microbiano até determinada fase da fermentação. Após esta fase, a diminuição da velocidade de crescimento microbiano não causou a diminuição da velocidade específica de produção de etanol, mostrando que as mesmas não estão mais associadas. Estes autores testaram dez modelos cinéticos para o processo de fermentação alcoólica industrial em batelada alimentada e concluíram que o modelo de Ghose e Thyagi (1979) foi o que apresentou os melhores ajustes dos dados experimentais.

Apesar dos vários trabalhos que tratam da cinética de fermentação, pouca influência estes tiveram sobre o arranjo das plantas industriais instaladas no Brasil. No entanto, o projeto rigoroso de uma planta de fermentação tem que passar, obrigatoriamente, por uma modelagem detalhada do processo, pelo uso de modelos cinéticos precisos que possibilitam a obtenção de condições ótimas de operação. Por outro lado, a manutenção destas condições dependerá da escolha de uma estratégia de controle adequada que só é possível conhecendo-se o comportamento do processo. Isto pode ser adequadamente realizado pelo estudo prévio de modelagem da planta e simulação em computador (ANDRIETTA, 1994).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O meio em que foram realizadas as fermentações foi preparado de forma a ter características próximas das condições industriais.

Utilizou-se uma cepa de leveduras com características floclantes doada pela Usina Noroeste Paulista. Essa unidade industrial de fermentação alcoólica opera com levedura floclante, usando mosto a base de caldo e melaço.

A cultura proveniente da Usina foi mantida em laboratório nos estados líquido e sólido. Ambas as culturas foram mantidas em refrigerador, a $7 \pm 1^\circ\text{C}$, e eram mensalmente repicadas.

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico, com exceção do açúcar, que foi sacarose comercial (açúcar cristal).

Diferentemente das condições industriais, em que a fermentação alcoólica é realizada com mosto de caldo de cana-de-açúcar e melaço, preparou-se um meio fermentativo com sacarose comercial. A composição do meio para cultivo das leveduras consistiu-se de sacarose (em concentração variável de acordo com o planejamento experimental), KH_2PO_4 (5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L).

Os experimentos foram realizados em um reator tubular de bancada, do tipo torre, de escoamento ascendente, em batelada, sem agitação, com capacidade para 2,5 L e dotado de camisa para controle de temperatura, na qual se manteve temperatura constante de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ao longo de todos os ensaios. A alimentação do meio fermentativo foi feita por recirculação externa por meio de bomba peristáltica. O meio fermentativo foi alimentado pelo fundo do reator, retirado pela parte superior, e encaminhado novamente ao fundo do reator. Esse fermentador possui ainda, na parte superior, uma saída para exaustão de CO_2 e dez diferentes pontos ao longo da altura para retirada de amostras. Destes pontos, apenas três foram utilizados, nas posições inferior, central e superior, conforme representação esquemática dessa unidade de trabalho mostrada na Figura 3.1.

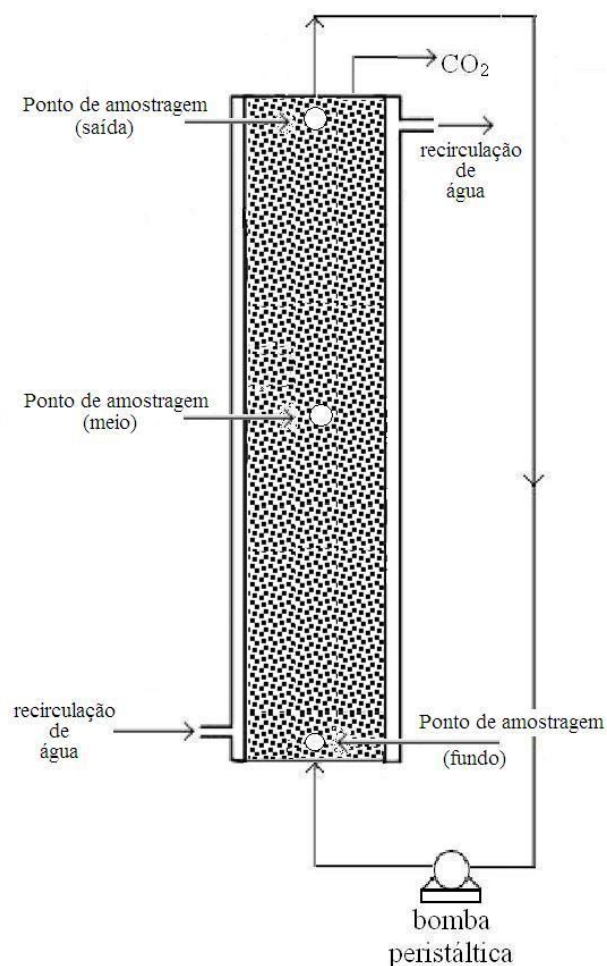


Figura 3.1 - Representação esquemática da unidade de trabalho

3.2. Métodos

3.2.1. Metodologia Experimental

O micro-organismo utilizado nos ensaios foi obtido por meio de repiques da cultura estoque do micro-organismo advindo da usina, e foi reaproveitado e reutilizado em sucessivas fermentações.

Os ensaios experimentais foram realizados de acordo com o planejamento experimental utilizado, sem ajuste de pH e sem suplementação de fontes minerais. O pH inicial do meio era de 5,4. As variáveis independentes foram a concentração de células no

inóculo, na faixa de 4,7% a 45,3%, a concentração de sacarose no meio, de 100 a 220 g/L, e a vazão de recirculação, variando entre 2,6 e 17,1 mL/s.

Os experimentos foram conduzidos em batelada com recirculação em um reator com volume útil de 2,5 L. O volume do inóculo correspondeu, em todos os experimentos, a 30% do volume total do meio. O volume total de cada fermentação foi 3 L, sendo 0,9 L de inóculo e 2,1 L de meio fermentativo, para que se pudesse manter a recirculação até que toda a sacarose do meio fosse consumida.

Após cada experimento, os micro-organismos foram recuperados por centrifugação e mantidos sob refrigeração a $7\pm1^{\circ}\text{C}$, suspensos em água. O inóculo, com concentração variável de células, definida pelo planejamento experimental, foi preparado diluindo-se esta suspensão de micro-organismos. Para o preparo do inóculo da fermentação seguinte, efetuava-se a centrifugação dessa suspensão de leveduras em tubo graduado, sendo possível então conhecer a concentração volume/volume de micro-organismos na suspensão. Conhecida essa concentração, utilizava-se a regra de diluição ($C_1.V_1 = C_2.V_2$), em que o volume e concentração finais eram conhecidos, e determinava-se o volume de suspensão de leveduras necessário para que fosse produzido um inóculo na concentração celular desejável.

A concentração celular no inóculo (v/v) variou de 4,7% a 45,3%. Esta concentração celular no inóculo de 4,7% corresponde à concentração celular no reator de 1,41% (v/v), que, utilizando uma curva padrão que relaciona absorbância com concentração celular em termos de massa seca (Apêndice A.3), corresponde a uma concentração de 4,7 g/L. Procedimento análogo para determinação das concentrações celulares em g/L foi feito para as demais concentrações celulares no inóculo, e está indicado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Relação entre concentrações celulares no inóculo e no reator

Conc. de Leveduras no Inóculo	Conc. Inicial no Reator	
% (v/v)	% (v/v)	(g/L)
4,7	1,41	4,50
10	3,00	9,50
25	7,50	23,75
33	9,90	31,35
40	12,00	38,10
45	13,50	42,75
45,3	13,59	43,04

A Figura 3.2 mostra a foto da unidade de trabalho utilizada nos experimentos, constituída de reator, bomba peristáltica, recipiente para armazenamento do meio para

recirculação, e banho termostático, que não é mostrado nesta Figura. As dimensões mais importantes do reator são: altura de 75 cm, diâmetro interno de 8 cm e diâmetro externo de 10,2 cm.

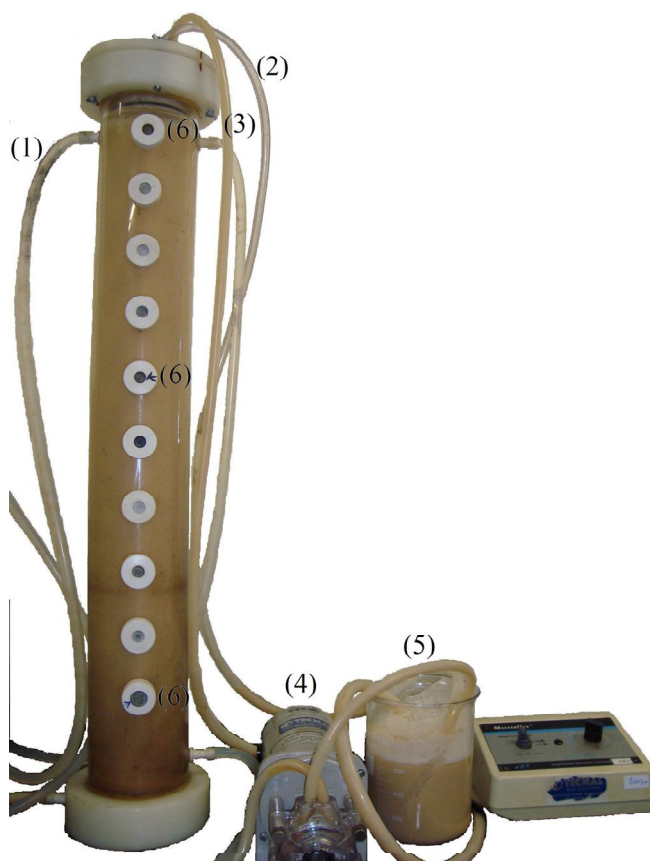


Figura 3.2 – Unidade de trabalho utilizada nos experimentos (1) controle de temperatura, (2) exaustão de CO₂, (3) duto de recirculação, (4) bomba peristáltica, (5) recipiente para recirculação, (6) pontos de amostragem

3.2.2. Metodologia Analítica

Cada fermentação foi monitorada por amostragens periódicas do meio fermentativo, para acompanhamento das concentrações de sacarose, etanol e células. Inicialmente, as amostras foram retiradas na parte inferior, no meio e na saída do reator, sendo possível desta forma obter os perfis de concentração celular, de etanol e de açúcares redutores totais (ART) ao longo do reator. Porém, devido à baixa variabilidade da concentração de ART, optou-se por fazer a análise de concentração de sacarose apenas na saída do reator. O perfil de concentração celular foi avaliado nos três pontos do fermentador em todos os experimentos.

A concentração celular e de substrato ditava a periodicidade com que foram retiradas amostras. Esta retirada aconteceu em intervalos de 45 minutos ou uma hora.

Amostras de 35 mL foram retiradas do reator e centrifugadas por 3 minutos a 12500 rpm (9800 G). Do sobrenadante foram feitas as análises de concentração de sacarose e etanol. Para avaliar a concentração celular apenas retirava-se a amostra de 10 mL do reator, não sendo necessária a etapa de centrifugação.

A partir dos resultados experimentais traçou-se o perfil de consumo de substrato e produção de etanol em função do tempo, e o perfil de concentração celular em função da altura do fermentador e do tempo.

Dosagem de Sacarose

A concentração de sacarose presente no meio fermentativo foi determinada por meio da análise de glicose, feita por um teste enzimático colorimétrico da marca *Laborlab*, no qual a glicose obtida pela hidrólise da sacarose é oxidada pela glicose-oxidase produzindo peróxido de hidrogênio, que em presença da peroxidase reage com a 4-aminoantipirina e fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose.

A hidrólise da sacarose foi realizada misturando-se de 1 mL da solução sobrenadante centrifugada, com 1 mL de HCl 2N, a 67°C por 12 minutos. Decorrido este tempo, a mistura era neutralizada com 3 mL de NaOH 1N. Em um tubo de ensaio, a 20 µL da amostra já hidrolizada e devidamente diluída, adicionava-se 2 mL do reativo enzimático preparado seguindo as especificações do fabricante. Após 10 minutos em banho-maria a 37°C, efetuava-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 505 nm e comparava-se com uma curva padrão (Apêndice A.1). Para essa leitura, utilizava-se somente o reativo enzimático como branco. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Dosagem de Etanol

A dosagem de etanol foi feita pelo método espectrofotométrico do dicromato de potássio. Esse método se baseia na oxidação de uma mistura hidroalcoólica a ácido acético, pela reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional à concentração de álcool na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro (STECKELBERG, 2001).

Para a utilização deste método, é necessário que o álcool produzido esteja destilado. Para isto, colocava-se 25 mL do sobrenadante e 50 mL de água destilada em um balão volumétrico para destilação, que era interrompida quando fossem recolhidos aproximadamente 50 mL de destilado em um erlenmeyer. Este era então diluído na proporção de 1:25. Transferia-se 5 mL do destilado diluído para um tubo de ensaio e adicionava-se 2 mL de água destilada e 2 mL do reagente de cor. O tubo era tampado e colocado por 30 minutos em banho-maria a $60 \pm 1^\circ\text{C}$, resfriado à temperatura ambiente, e, em seguida, o valor de absorbância era lido em espectrofotômetro a 600 nm. Os valores obtidos eram comparados com uma curva padrão (Apêndice A.2). Utilizou-se água destilada ao invés da solução destilada diluída para confecção do branco. Estas análises também foram feitas em triplicata.

Dosagem de células

Para acompanhar o crescimento celular ao longo da fermentação, foi utilizado o método espectrofotométrico. Diluiu-se na proporção 1:100 o meio fermentativo e leu-se a absorbância em espectrofotômetro a 650 nm. Esse valor lido era comparado com uma curva padrão que relaciona absorbância com concentração celular em termos de massa seca em gramas por litro, previamente determinada (Apêndice A.3). O branco utilizado para leitura foi meio fermentativo adequadamente diluído, sem células.

3.3. Testes Preliminares

Foram realizados testes preliminares para completa definição dos métodos analíticos a serem utilizados, para eliminação de possíveis causas de erros sistemáticos, definição do tempo do ciclo fermentativo a ser considerado e das condições ótimas que promovessem a floculação das leveduras.

Foram realizadas fermentações em reator de mistura, reator tipo torre e no *shaker*, variando as condições fermentativas e concentração de nutrientes no meio para avaliar a capacidade floculante da cepa utilizada. As diferentes condições testadas foram:

- Fermentação com ajuste de pH em 4,5 e 4;
- Fermentação com e sem controle de temperatura;
- Utilização de antibióticos eficazes contra espécies Gram-positivas, Gram-negativas ou contra ambas simultaneamente em concentrações variáveis;

- Fermentação em reator de mistura variando a velocidade de agitação;
 - Fermentação em reator tipo torre variando a vazão de recirculação de 2,6 a 17,1 mL/s;
 - Variação da faixa de concentração celular no inóculo, acompanhada por contagem em câmara de Neubauer, variando da ordem de 10^6 a 10^{11} leveduras/cm³, ou por método espectrofotométrico;
 - Adição, em concentração variável, de bactérias indutoras da floculação, cultivadas em tubo;
 - Fermentação utilizando caldo de cana concentrado e diluído, testado com e sem o uso de antibióticos;
 - Adição, no meio, de CaCl₂ em concentrações de 0,1 a 2 g/L;
 - Preparo do meio com adição de CaSO₄, em diferentes concentrações (0,1 a 3 g/L)
 - Adição de (NH)₄Cl em concentrações que variam de 0,1 a 2 g/L;
 - Adição de KCl ao meio fermentativo, em concentrações que variam de 0,1 a 2 g/L;
- Foram testadas, também, a influência conjunta de fatores citados acima.

Para as fermentações dos testes preliminares foram acompanhados o consumo de sacarose, a produção de etanol, concentração e viabilidade celular até que todo o substrato fosse consumido.

3.4. Planejamento Experimental

Para análise da interação entre as variáveis de entrada e o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas obtidas utiliza-se a técnica do planejamento experimental, com o qual se faz a otimização por análise da superfície de resposta.

Para se fazer a análise da superfície de resposta, é necessário primeiramente programar ensaios por meio de um planejamento experimental, em que se seleciona um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada. Então foi possível executar experimentos com todas as possíveis combinações.

Foi realizado um Delineamento Composto Central (DCC) com dois níveis originais, utilizando-se o software *Statistica 7.0*, tendo-se 2³ pontos fatoriais, 2 x 3 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos.

A porcentagem de células no inóculo variou de 4,7% a 45,3%, a concentração de sacarose no meio, de 100 a 220 g/L, e a vazão de recirculação, esteve entre 2,6 e 17,1 mL/s. O

alfa de ortogonalidade utilizado neste planejamento experimental foi de 1,35313 e as equações de codificação para a porcentagem de células no inóculo (X_0), a concentração de sacarose (S_0) e a vazão de recirculação (F) são mostradas, respectivamente, nas Equações 3.1, 3.2 e 3.3.

$$X_1 = \frac{(X_0 - 25)}{15} \quad (3.1)$$

$$X_2 = \frac{(S_0 - 160)}{44,4} \quad (3.2)$$

$$X_3 = \frac{(V - 9,9)}{5,3} \quad (3.3)$$

Na Tabela 3.2 podem ser vistos os valores utilizados no Planejamento Experimental para as três variáveis independentes analisadas.

Tabela 3.2 – Valores utilizados no planejamento para as três variáveis independentes

	-α	-1	0	+1	+α
X_0 (% no inóculo)	4,7	10	25	40	45,3
S_0 (g/L)	100	115,7	160	204,4	220
F (mL/s)	2,6	4,5	9,9	15,2	17,1

A faixa de concentração celular no inóculo foi determinada com base em dados industriais e da literatura. Amorim (2005) afirma que a concentração de levedo varia de destilaria para destilaria, mas, por meio de análise estatística, determinou-se que o nível ótimo de fermento nas dornas está em torno de 12% (v/v). Finguerut (2006) recomenda que a quantidade de fermento na dorna não se ultrapasse 13% (v/v) no final do processo fermentativo. Neste planejamento experimental a concentração inicial de levedo no reator variou de 1,41% (v/v), (quando a concentração celular no inóculo era 4,7% (v/v)) a 13,59% (em que a concentração celular no inóculo era de 45,3% (v/v)).

A faixa de concentração inicial de substrato foi atribuída com base em dados práticos de indústrias sucroalcooleiras. Essa faixa foi proposta em torno da situação média industrial, que é de 180 g/L, testando ainda concentrações de substrato acima de 200 g/L, a fim de avaliar o comportamento do sistema sob ação de efeitos inibitórios.

A faixa vazão de recirculação, variando de 2,6 a 17,1 mL/s, foi atribuída por restrições da bomba peristáltica utilizada na recirculação.

A Tabela 3.3 mostra a Matriz do Delineamento Composto Central com valores codificados e originais das variáveis em estudo. Os ensaios foram realizados de forma aleatória, a fim de evitar tendenciosidade dos resultados.

Tabela 3.3 - Matriz do DCC com valores codificados e originais das variáveis

Experimento	X ₁ (X ₀) (% no inóculo)	X ₂ (S ₀) (g/L)	X ₃ (F) (mL/s)
1	-1 (10)	-1 (115,7)	-1 (4,5)
2	-1 (10)	-1 (115,7)	+1 (15,2)
3	-1 (10)	+1 (204,4)	-1 (4,5)
4	-1 (10)	+1 (204,4)	+1 (15,2)
5	+1 (40)	-1 (115,7)	-1 (4,5)
6	+1 (40)	-1 (115,7)	+1 (15,2)
7	+1 (40)	+1 (204,4)	-1 (4,5)
8	+1 (40)	+1 (204,4)	+1 (15,2)
9	- α (4,7)	0 (160)	0 (9,9)
10	+ α (45,3)	0 (160)	0 (9,9)
11	0 (25)	- α (100)	0 (9,9)
12	0 (25)	+ α (220)	0 (9,9)
13	0 (25)	0 (160)	- α (2,6)
14	0 (25)	0 (160)	+ α (17,1)
15 (C)	0 (25)	0 (160)	0 (9,9)
16 (C)	0 (25)	0 (160)	0 (9,9)
17 (C)	0 (25)	0 (160)	0 (9,9)

Realizado o planejamento experimental e análise dos resultados, para um tempo de fermentação de sete horas, efetuou-se experimentos nos pontos estacionários obtidos pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno e por uma rotina implementada no software *Maple Release 9.5*, para verificação dos pontos ótimos, com o objetivo de testar a reprodutibilidade dos modelos obtidos.

3.5. Cálculos das Respostas das Fermentações

3.5.1. Rendimento

O rendimento em grama de etanol por grama de açúcares redutores totais (ART), ao final de 7 horas de fermentação, foi determinado pela Equação 3.4.

$$Y_{P/ART} = \frac{C_{e\text{tan}ol_7}}{1,053 \cdot (C_{sac_0} - C_{sac_7})} \quad (3.4)$$

Para expressar o rendimento em porcentagem, utilizou-se a Equação 3.5, que considera o rendimento teórico de 0,511 g_{etanol}/g_{ART} como 100%.

$$Re\text{nd}(\%) = \frac{Y_{P/ART} \cdot 100\%}{0,511} \quad (3.5)$$

Em que:

$Y_{P/ART}$ = rendimento de etanol formado em relação aos açúcares redutores totais consumidos (g_{etanol}/g_{ART});

$C_{e\text{tan}ol_7}$ = concentração de etanol (g/L) ao final de 7 horas de fermentação;

C_{sac_0} = concentração de sacarose inicial (g/L);

C_{sac_7} = concentração de sacarose (g/L) ao final de 7 horas de fermentação.

3.5.2. Produtividade

O cálculo da produtividade, em relação ao etanol produzido, é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção. Ao final de 7 horas de fermentação, a produtividade foi calculada pela Equação 3.6.

$$P_{e\text{tan}ol} = \frac{C_{e\text{tan}ol_7}}{t} \quad (3.6)$$

Em que:

$P_{e\text{tan}ol}$ = produtividade do etanol (g/ L.h);

$C_{e\text{tan}ol_7}$ = concentração de etanol (g/L) ao final de 7 horas de fermentação;

t = tempo de fermentação (h) = 7h

3.6. Modelagem Matemática

A modelagem matemática de reatores tem sido utilizada por diversos autores com diferentes objetivos. Neste trabalho, um modelo matemático foi desenvolvido para um reator

do tipo torre operando em *loop* com o objetivo de descrever o comportamento dinâmico deste para fins de estudos de aumento de escala do mesmo.

A modelagem matemática e simulação de dados experimentais pelos métodos computacionais são ferramentas de extrema importância para se entender o comportamento dos biorreatores. Procurou-se então desenvolver um modelo capaz de representar o comportamento das respostas biomassa, concentração de substrato e de produto com relação às mudanças nas condições operacionais.

A modelagem de biorreatores tipo torre que operam com células de levedura floculantes é bastante complexa e de extrema importância para o estudo de aumento de escala, principalmente pelo efeito de desestabilização do leito que pode ocorrer pela velocidade de geração de dióxido de carbono durante o processo fermentativo. O desenvolvimento de um modelo que possibilite a representação real do comportamento deste reator é fundamental para que se possam determinar as condições de operação dos reatores industrialmente para que este efeito não ocorra, pois seria uma situação inaceitável em um biorreator industrial, devido aos custos que esse fenômeno causaria.

A modelagem do reator permite desenvolver ferramentas computacionais para verificar o comportamento de todos os fatores que possam interferir na estabilidade do biorreator em diferentes condições de operação, sem que novos ensaios em escala de bancada sejam realizados.

Neste trabalho o modelo matemático foi desenvolvido considerando o sistema em *loop* como um modelo de reator em batelada para descrever o processo de fermentação alcoólica no reator do tipo torre com recirculação. Foram consideradas as equações do balanço de massa para um reator descontínuo e o modelo cinético proposto por Ghose e Thyagi (1979) em que o valor do expoente do termo de inibição pelo produto pode assumir valores diferentes de 1, conforme Tosetto e Andrietta (2002). Este modelo cinético considera os efeitos da biomassa, bem como das inibições pelo substrato e produto. O esquema do processo do reator com recirculação em *loop* foi apresentado na Figura 3.2. Neste sistema o frasco (béquer) que permaneceu com as entradas e saídas foi considerado como uma simples unidade de mistura, com volume de reação desprezível

Para um reator em batelada, assume-se que a temperatura e a composição são espacialmente uniformes, ou seja, não variam com a posição ao longo do reator. Entretanto, a composição varia com o tempo e, considera-se que não ha fluxo de massa entrando ou saindo, os reagentes são introduzidos no sistema antes do inicio do processo reacional. Esta

consideração de não variação espacial das grandezas de estado pode ser utilizada uma vez que os resultados obtidos experimentalmente praticamente não tiveram variação com a posição.

Outras considerações do modelo matemático foram:

- O sistema em *loop* foi considerado como uma mistura quase perfeita;
- Reator de volume constante;
- Volume de bolhas desprezível;
- Densidade constante.

As equações do modelo foram obtidas pelos balanços no volume total do reator e as formas adimensionais das mesmas estão apresentadas nas Equações 3.6, 3.7, 3.8 e 3.9.

Balanço de substrato:

$$-\frac{dS}{d\tau} = \alpha_A \frac{dX}{d\tau} + \beta_A X \quad (3.6)$$

Balanço de produto:

$$\frac{dP}{d\tau} = \lambda_A \frac{dX}{d\tau} + \delta_A X \quad (3.7)$$

Balanço de células:

$$\frac{dX}{d\tau} = \mu X \quad (3.8)$$

Com:

$$\mu = \mu_{mA} \frac{S}{K_{SA} + S + S^2/K_{IA}} \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n \quad (3.9)$$

Sendo:

$$X = \frac{x}{x_m}; \quad S = \frac{s}{s_0}; \quad P = \frac{p}{p_m}; \quad \tau = \frac{t}{t_m}; \quad \alpha_A = \alpha \frac{x_f}{s_0}; \quad \beta_A = \beta \frac{x_f t_m}{s_0}; \quad \lambda_A = \lambda \frac{x_f}{p_f}; \quad \mu_{mA} = \mu_m t_m;$$

$$K_{SA} = \frac{K_s}{s_0}; \quad K_{IA} = \frac{K_I}{s_0}; \quad \delta_A = \delta \frac{x_f t_m}{p_m};$$

Os parâmetros do modelo foram determinados utilizando uma técnica de regressão multirresposta aplicada as Equações 3.6 a 3.9 para o conjunto de dados experimentais definidos pelos experimentos de validação nas condições definidas pelas superfícies de resposta e curvas de contorno.

3.6.1. Ajuste dos parâmetros cinéticos

Os valores dos parâmetros foram identificados pelos resultados gerados pela técnica de regressão não linear aplicada aos dados experimentais obtidos pela validação nas condições definidas pelas superfícies de resposta e curvas de contorno ($X_0 = 45 \text{ \% (v/v)}$ de células no inoculo, $F = 15 \text{ mL/s}$ e $S_0 = 200 \text{ g/L}$) utilizando um algoritmo multirresposta (MARQUARDT, 1963). A integração do conjunto de equações diferenciais do modelo foi realizada utilizando o algoritmo de quarta-ordem de Runge-Kutta (GILL, 1951). Os resíduos entre os valores experimentais e calculados pelo modelo foram obtidos pela minimização da soma dos quadrados dos resíduos como definido pela Equação 3.10.

$$SRS = \sum_{i=1}^N (y_{exp} - y_{theor})^2 \quad (3.10)$$

3.6.2. Validação do Modelo

O modelo obtido após o ajuste dos parâmetros cinéticos foi validado em duas condições diferentes. Uma para o experimento do ponto central (Experimento 16) e a outra para a condição de validação do ponto ótimo obtido para a maximização do rendimento.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Testes Preliminares

Os testes preliminares foram realizados para se confirmar os métodos analíticos a serem utilizados, eliminar possíveis causas de erros sistemáticos e definir um tempo ideal de análise das respostas para as fermentações. O tempo de 7 horas foi escolhido baseado no tempo de consumo completo do substrato nas fermentações que apresentavam altas concentrações celulares.

Durante a fase de testes preliminares avaliou-se, também, a capacidade floculativa da cepa que seria utilizada nas fermentações. Foram realizadas fermentações no reator e *shaker*, variando-se pH, temperatura, velocidade de agitação, vazão de recirculação e concentração de nutrientes no meio fermentativo. A levedura não apresentou, sob nenhuma condição testada, capacidade de se agregar e formar flocos bem definidos, apesar de se sedimentar facilmente quando não submetida à agitação. Optou-se, então, por trabalhar com o meio de cultura pré-estabelecido, a temperatura constante, sem ajuste de pH e sem adição de antibióticos.

Na Figura 4.1 pode-se observar a aparência das leveduras utilizadas quando toda a sacarose do meio foi consumida.



Figura 4.1 – Aparência das leveduras utilizadas quando consumida toda a sacarose do meio

Na Figura 4.1, não ocorreu a formação de flocos, mas pode-se notar que estas se agregaram e se sedimentaram, fazendo com que a concentração no fundo do reator fosse maior que na saída. Tal efeito foi ainda mais pronunciado quando se utilizou baixas vazões de recirculação.

Um exemplo de perfil de concentração celular, de substrato e produto ao longo do tempo pode ser visto na Figura 4.2, em que se observa a tendência à sedimentação das leveduras ao longo do processo fermentativo. Pode-se observar que a concentração celular na saída do reator (na parte superior), é menor que no fundo do mesmo. Esse experimento foi realizado com concentração de inóculo, concentração inicial de substrato e vazão de recirculação, 40%, 204,4 g/L e 4,5 mL/s, respectivamente.

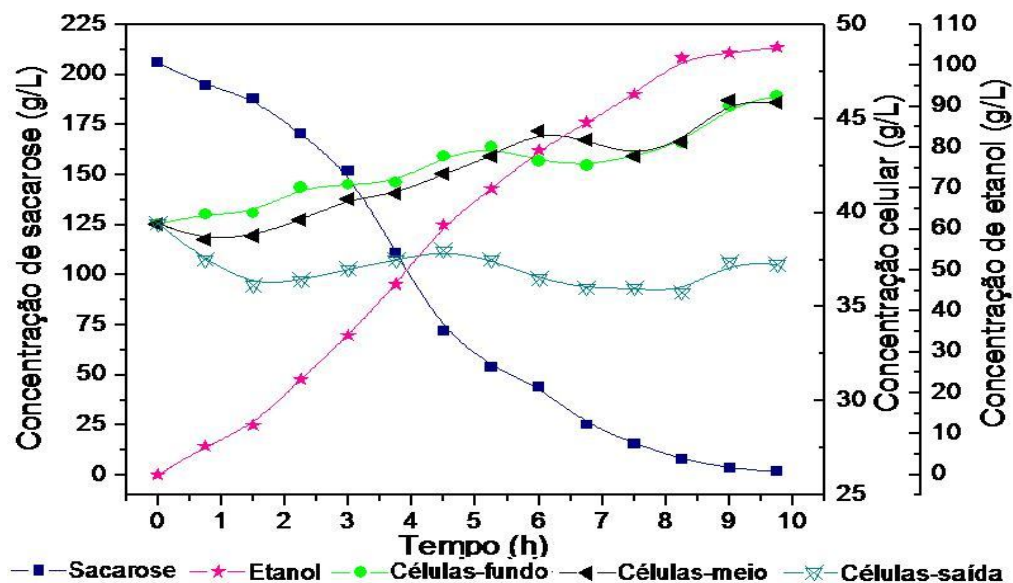


Figura 4.2 - Perfis de concentração celular, substrato e inóculo em função do tempo

Na condição experimental mostrada na Figura 4.2, iniciou-se o processo fermentativo com alta concentração celular no inóculo e, por esta razão, não ocorreu crescimento pronunciado das células. Pode-se observar também que praticamente não ocorreu fase lag. A sacarose, assim que se iniciou a fermentação, foi consumida em favor da produção de etanol.

Em outros experimentos, que foram realizados com menor concentração de células no inóculo, pôde-se observar maior taxa de crescimento destas, além de um período de fase adaptativa até que se iniciou a produção de etanol.

Na Figura 4.2 pode-se observar, também, que decorridas sete horas de processo fermentativo, já havia sido formado 94% do etanol total produzido nessa condição

experimental e mais de 90% da sacarose presente inicialmente no meio já havia sido consumida. Tal fato justifica o tempo de análise determinado em sete horas, já que esse experimento trabalhou com alta concentração inicial de substrato.

4.2. Planejamento Experimental

Neste planejamento experimental estudou-se como o rendimento $g_{\text{etanol}}/g_{\text{sacarose}}$, a produtividade de etanol e a quantidade residual de sacarose são afetados pela concentração inicial de substrato, concentração celular no inóculo e pela vazão de recirculação do reator. Estas três variáveis independentes que afetam fortemente o desempenho da fermentação alcoólica foram avaliadas nas faixas: concentração inicial de sacarose (100 a 220 g/L), concentração celular no inóculo (4,7 a 45,3%), e vazão de recirculação do reator (2,6 a 17,1 mL/s), todas estas variáveis foram analisadas durante 7 horas de processo fermentativo. No entanto, todos os experimentos foram conduzidos até o completo consumo de sacarose. A partir desses resultados experimentais pôde-se traçar o perfil de consumo de substrato e produção de etanol em função do tempo, bem como o perfil de concentração celular em função da altura do fermentador e do tempo para cada experimento.

A Tabela 4.1 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas rendimento percentual $g_{\text{etanol}}/g_{\text{sacarose}}$, produtividade de etanol e quantidade residual de sacarose.

Observa-se na Tabela 4.1 que o rendimento variou de 52,4% (experimento 9) a 100% (experimento 10) e a produtividade de etanol esteve entre $4,42 g_{\text{etanol}}/L.h$ (experimento 3) e $13,32 g_{\text{etanol}}/L.h$ (experimento 8). Já a quantidade de sacarose residual variou de zero, nos experimentos 10 e 11, em que a sacarose foi consumida totalmente em tempo menor que as 7 horas propostas, a 125,1 g/L (experimento 3). Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas indicando uma boa repetibilidade do processo.

Pode-se observar que a maior produtividade de etanol não ocorreu para a maior concentração de substrato presente no meio, e que o menor valor de rendimento ocorreu para o menor nível de concentração celular presente no inóculo, e o maior rendimento foi observado no maior valor de concentração celular inicial. Sabe-se que o raciocínio cartesiano linear não deve ser aplicado para processos fermentativos complexos, pois uma série de

fatores interligados determinam o comportamento do sistema. Este fato justifica a análise conjunta das variáveis propostas.

Tabela 4.1 – Variáveis utilizadas no DCC e suas respostas em 7 horas de fermentação

Experimento	X ₁ (X ₀) (% no inóculo)	X ₂ (S ₀) (g/L)	X ₃ (F) (mL/s)	Rendimento (%)	Produtividade (g _{etanol} /L.h)	Sac. Residual (g/L)
1	-1 (10)	-1 (115,7)	-1 (4,5)	67,9	6,02	0,32
2	-1 (10)	-1 (115,7)	+1 (15,2)	72,7	6,46	0,15
3	-1 (10)	+1 (204,4)	-1 (4,5)	72,5	4,42	125,1
4	-1 (10)	+1 (204,4)	+1 (15,2)	78,2	5,84	107,3
5	+1 (40)	-1 (115,7)	-1 (4,5)	82,2	7,32	0,2
6	+1 (40)	-1 (115,7)	+1 (15,2)	89,1	7,92	0,07
7	+1 (40)	+1 (204,4)	-1 (4,5)	92,3	12,72	25,2
8	+1 (40)	+1 (204,4)	+1 (15,2)	91,3	13,32	14,7
9	-α (4,7)	0 (160)	0 (9,9)	52,4	6,22	25,7
10	+ α (45,3)	0 (160)	0 (9,9)	100	12,31	0
11	0 (25)	- α (100)	0 (9,9)	72,1	5,54	0
12	0 (25)	+ α (220)	0 (9,9)	99,8	11,72	67,2
13	0 (25)	0 (160)	- α (2,6)	89,4	10,12	12,7
14	0 (25)	0 (160)	+ α (17,1)	96,5	11,87	0,05
15 (C)	0 (25)	0 (160)	0 (9,9)	98,8	12,14	0,07
16 (C)	0 (25)	0 (160)	0 (9,9)	98,2	12,07	0,11
17 (C)	0 (25)	0 (160)	0 (9,9)	98,9	12,16	0,05

Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos, foi considerado um nível de significância de 90%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que $p < 0,1$.

Com os resultados apresentados na Tabela 4.1, foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*.

4.2.1. Rendimento

A Tabela 4.2 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta rendimento, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

A partir desta análise foi obtida a Equação 4.1:

$$\text{Rendimento}(\%) = 97,30 + 10,98.X_1 - 10,59.X_1^2 + 5,13.X_2 - 5,27.X_2^2 + 2,23.X_3 - 1,45.X_3^2 + 0,28.X_1.X_2 - 0,58.X_1.X_3 - 0,88.X_2.X_3 \quad (4.1)$$

Tabela 4.2 – Regressão múltipla para a resposta rendimento

Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Desvio	t(7)	p
Termo Independente	97,3038	3,975628	24,47507	0,000000
(X ₁)%inóculo(L)	10,9767	2,243021	4,89370	0,001766
%inóculo(Q)	-10,5943	2,958184	-3,58136	0,008960
(X ₂)Sacarose(L)	5,1348	2,243021	2,28924	0,055870
Sacarose(Q)	-5,2692	2,958184	-1,78124	0,118081
(X ₃)Vazão (L)	2,2301	2,243021	0,99424	0,353225
Vazão (Q)	-1,4461	2,958184	-0,48885	0,639891
X ₁ .X ₂	0,2750	2,708155	0,10155	0,921965
X ₁ .X ₃	-0,5750	2,708155	-0,21232	0,837906
X ₂ .X ₃	-0,8750	2,708155	-0,32310	0,756058
R ² =0,86				

A Tabela 4.3 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 10% para a resposta rendimento, após a eliminação de parâmetros não significativos.

Tabela 4.3 – Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento

Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Desvio	t(12)	p
Termo Independente	96,3117	2,858119	33,69759	0,000000
(X ₁)%inóculo(L)	10,9767	1,875224	5,85352	0,000078
%inóculo(Q)	-10,5943	2,473118	-4,28378	0,001062
Sacarose(Q)	-5,2692	2,473118	-2,13060	0,054496
(X ₂)Sacarose(L)	5,1348	1,875224	2,73824	0,017990
R ² =0,84				

Os parâmetros não significativos, que puderam ser desprezados para o nível de significância adotado, foram: todas as interações entre as variáveis e os termos relacionados à vazão (linear e quadrático).

A Equação 4.2 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para a resposta rendimento.

$$\text{Rendimento}(\%) = 96,31 + 10,98.X_1 - 10,59.X_1^2 - 5,27.X_2^2 + 5,13.X_2 \quad (4.2)$$

O coeficiente de correlação (R²) obtido após o ajuste foi de 0,84, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 84% da variabilidade dos dados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.3.

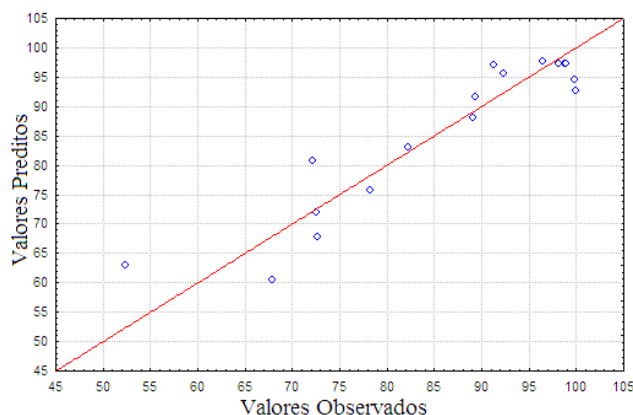


Figura 4.3 - Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para o rendimento

Analisando-se a Equação 4.2 pode-se verificar que a vazão de recirculação (X_3) não exerceu influência significativa sobre o rendimento, quer seja de forma linear, quadrática ou por interações com outras variáveis.

Pela análise dos coeficientes das variáveis isoladas na Equação 4.2, pode-se observar que a concentração celular no inóculo (X_1) contribui consideravelmente para o aumento da resposta rendimento, desde que assuma valores codificados superiores ao nível central (0,0). Um aumento na concentração inicial de sacarose (X_2) também contribui para o aumento do rendimento de etanol.

O sinal positivo dos coeficientes X_1 e X_2 indica que maiores concentrações de células e de sacarose contribuem para um aumento do rendimento na produção de etanol. A Tabela 4.1 confirma a interpretação dada ao modelo, deixando evidente que maiores concentrações celulares no inóculo (X_1) e maiores concentrações de sacarose (X_2) produzem maiores rendimentos. É claro também que há um limite para esse aumento, determinado pelo custo/benefício.

Pela Figura 4.4 pode-se observar que os erros de ajustamento se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta rendimento.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 4.5 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 e X_2 para o rendimento. Por se tratar de um planejamento que visa otimizar três variáveis de processo, elas serão apresentadas graficamente duas a duas junto à resposta avaliada. Sendo assim, a Figura 4.6 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 e X_3 , e a Figura 4.7 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_2 e X_3 .

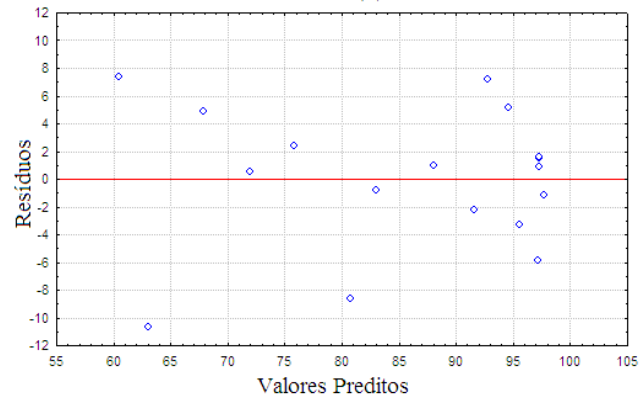


Figura 4.4 – Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento

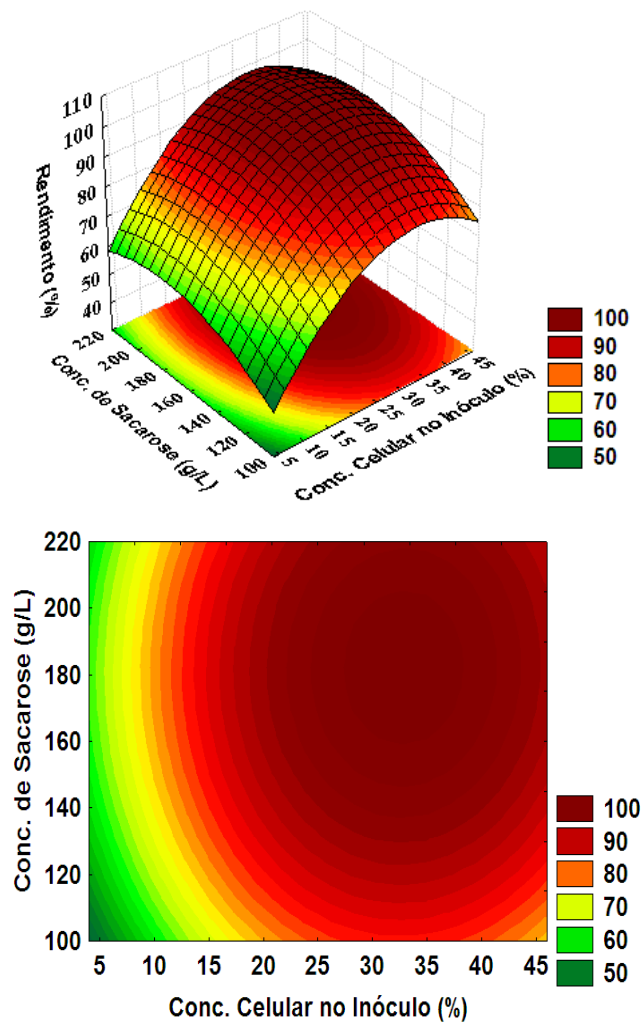


Figura 4.5 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose

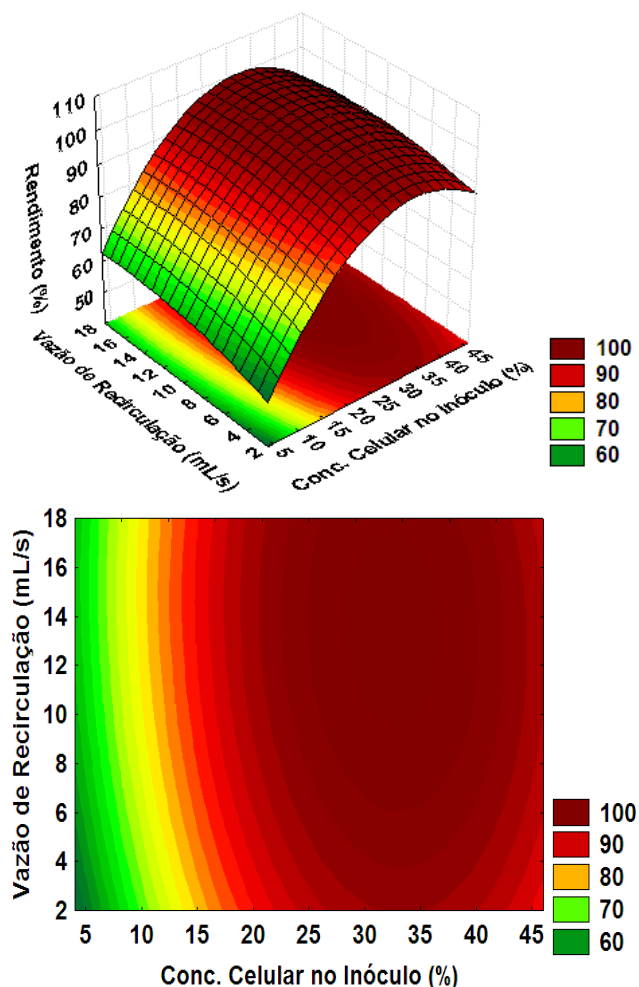


Figura 4.6 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular no inóculo e da vazão de recirculação

Analisando as curvas de contorno das Figuras 4.5 e 4.6 definiu-se a faixa de concentração celular no inóculo que maximiza o rendimento.

A curva de contorno que representa o efeito da concentração celular no inóculo em sinergismo com a concentração inicial de substrato (Figura 4.5) indica uma faixa aproximada de 26 a 40% para a maximização da resposta em questão. O efeito combinado da concentração celular no inóculo e da vazão de recirculação (Figura 4.6) indica uma faixa também de 26 a 40%. Portanto, esta é a faixa que satisfaz ambos os efeitos combinados, ou seja, pode-se afirmar que para maximização do rendimento na produção de etanol, dentro da região experimental trabalhada, a concentração celular de inóculo deve estar entre 26 e 40%.

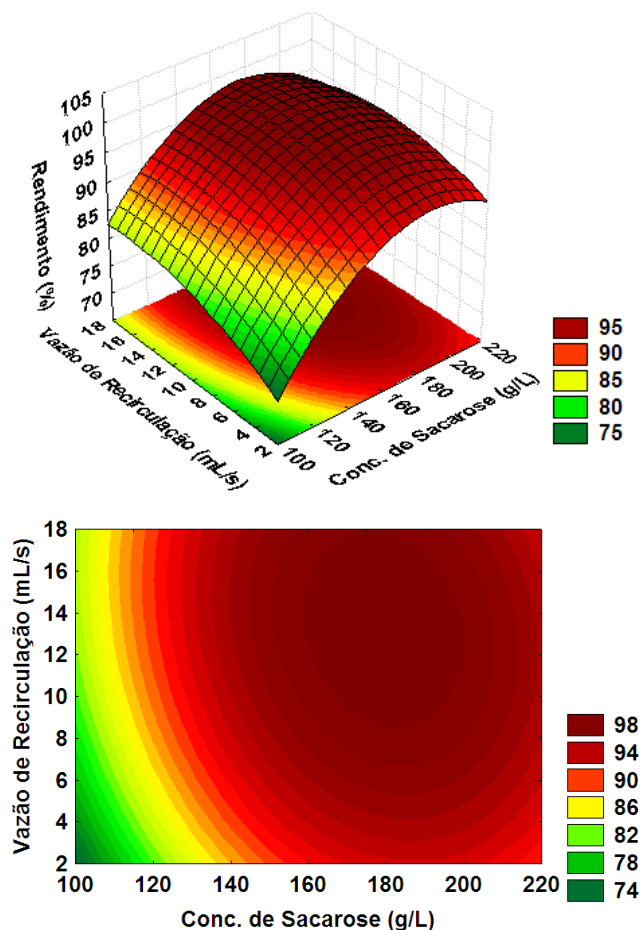


Figura 4.7 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração inicial de sacarose e da vazão de recirculação

Da mesma forma que para a concentração de leveduras, a partir das curvas de contorno das Figuras 4.5 e 4.7, definiu-se a faixa de concentração inicial de sacarose que maximiza o rendimento na região experimental trabalhada. A faixa aproximada de sacarose inicial correspondente ao máximo rendimento está entre 160 e 200 g/L.

Para a definição da vazão de recirculação que maximiza o rendimento na produção de etanol foi realizada a análise das curvas de contorno das Figuras 4.6 e 4.7. De acordo com esta análise, seguindo o procedimento descrito para obtenção da concentração celular que maximiza o rendimento, e visando também nesse caso um maior rendimento é interessante que a vazão de recirculação seja maior que 9 mL/s.

Com o objetivo de encontrar o ponto estacionário para o rendimento, ou seja, o ponto correspondente à maximização da resposta rendimento dentro da região de otimização, realizou-se uma análise canônica utilizando o modelo completo representado pelos coeficientes de regressão mostrados na Tabela 4.2. Utilizou-se um algoritmo implementado

no software *Maple Release 9.5* e definiram-se as condições que maximizaram a resposta rendimento: concentração celular no inóculo em 33%, concentração inicial de sacarose em aproximadamente 180 g/L e vazão de recirculação em 12,7 mL/s. Tal resultado mostra-se em concordância à análise anterior já que todas as variáveis determinadas se encontram dentro da faixa definida.

A partir da Equação 4.2, obteve-se um rendimento de 99,8% quando da substituição do ponto ótimo.

Lima e Marcondes (2002) encontraram para fermentações alcoólicas rendimentos médios de 90%, devido à geração de subprodutos, observada especialmente na presença de corpos estranhos no meio.

Viegas (2003) obteve rendimento em torno de 87% em uma unidade de fermentação contínua convencional, ou seja, que utiliza separadoras centrífugas e células de leveduras não floculantes, em reatores de mistura, utilizando melaço como matéria-prima.

Harshbarger *et al.* (1995) utilizando-se de um biorreator de leito fluidizado operando continuamente com 30% de catalisador v/v e uma concentração de glicose na alimentação de 150 g/L encontrou um rendimento em etanol de 98%. Viegas, Andrietta e Andrietta (2002) conseguiram um rendimento de 93% operando continuamente com dois reatores do tipo torre conectados em série, sistema de recirculação de células e leveduras floculantes.

Segundo Paiva *et al.* (1996) um sistema de reatores tipo torre de leito fluidizado com reciclo e separação de células por decantação, resultou em um rendimento de 88,3%.

Comparando-se os valores de rendimentos obtidos nos experimentos e nos trabalhos citados, nota-se que no presente trabalho foram obtidos resultados superiores aos apresentados na literatura com a utilização do reator de escoamento ascendente aliado à utilização de uma cepa com características floculantes.

4.2.2. Produtividade

A Tabela 4.4 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos, além dos níveis de significância, desvio e valor do teste de *t de student* associado a cada um.

A Equação do modelo, considerando parâmetros significativos e não significativos é dada pela Equação 4.3.

$$\text{Produtividade (g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}) = 12,13 + 2,30.X_1 - 1,57.X_1^2 + 1,45.X_2 - 1,92.X_2^2 + 0,47.X_3 - 0,63.X_3^2 + 1,63.X_1.X_2 - 0,08.X_1.X_3 - 0,12.X_2.X_3 \quad (4.3)$$

Tabela 4.4 - Regressão múltipla para a resposta produtividade

Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Desvio	t(7)	p
Termo Independente	12,13401	0,392221	30,93670	0,000000
(X ₁)%inóculo(L)	2,29641	0,221288	10,37747	0,000017
%inóculo(Q)	-1,57443	0,291843	-5,39477	0,001014
(X ₂)Sacarose(L)	1,45279	0,221288	6,56516	0,000314
Sacarose(Q)	-1,92124	0,291843	-6,58312	0,000309
(X ₃)Vazão (L)	0,46544	0,221288	2,10334	0,073508
Vazão (Q)	-0,62957	0,291843	-2,15722	0,067886
X ₁ .X ₂	1,62750	0,267176	6,09148	0,000495
X ₁ .X ₃	-0,08250	0,267176	-0,30878	0,766473
X ₂ .X ₃	0,12250	0,267176	0,45850	0,660490
R ² =0,97				

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, com $p > 0,10$, foi obtida as seguintes relações apresentadas na Tabela 4.5. A equação resultante deste ajuste é apresentada pela Equação 4.4.

Tabela 4.5 - Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta produtividade

Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Desvio	t(9)	p
Termo Independente	12,13401	0,353375	34,33747	0,000000
(X ₁)%inóculo(L)	2,29641	0,199372	11,51823	0,000001
Sacarose(Q)	-1,92124	0,262939	-7,30678	0,000045
X ₁ .X ₂	1,62750	0,240715	6,76109	0,000083
%inóculo(Q)	-1,57443	0,262939	-5,98780	0,000206
(X ₂)Sacarose(L)	1,45279	0,199372	7,28684	0,000046
Vazão (Q)	-0,62957	0,262939	-2,39435	0,040269
(X ₃)Vazão (L)	0,46544	0,199372	2,33455	0,044415
R ² =0,97				

$$\text{Produtividade(g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}) = 12,13 + 2,30.X_1 - 1,92.X_2^2 + 1,63.X_1.X_2 - 1,57.X_1^2 + 1,45.X_2 - 0,63.X_3^2 + 0,47.X_3 \quad (4.4)$$

O coeficiente de regressão (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,97, indicando que a equação empírica proposta reproduz com fidelidade os resultados obtidos experimentalmente. Esses resultados indicam excelente concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, como mostra a Figura 4.8.

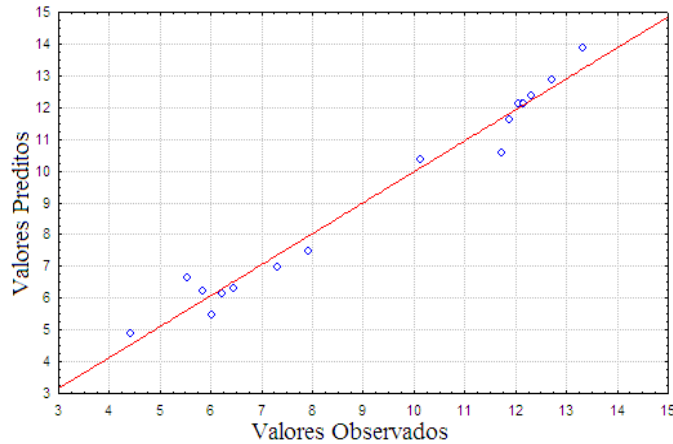


Figura 4.8 - Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para a produtividade

Os parâmetros não significativos eliminados nesse caso foram as interações entre as variáveis $X_1.X_3$ e $X_2.X_3$, que apresentaram $p > 0,1$. Pode-se perceber, pela análise da Equação 4.4, que o efeito da vazão de recirculação se mostrou significativo nesse caso, ao contrário do que se observava na resposta rendimento, porém atua de forma pouco expressiva na produtividade.

A concentração celular no inóculo e a concentração inicial de sacarose no meio apresentam efeito aproximado em relação à resposta analisada, sendo mais expressivo o efeito da concentração de leveduras presente no inóculo, seguido da concentração de substrato, e finalmente da vazão de recirculação, nesta ordem.

A variável X_1 , relacionada à concentração celular, contribui consideravelmente para o aumento desta resposta, desde que assuma valores codificados superiores ao nível central (0,0). O sinal também positivo atribuído ao coeficiente da variável X_2 , concentração inicial de substrato, contribui com o aumento da produtividade, porém com menos intensidade, desde que assuma valores codificados superiores ao nível central (0,0). Para X_3 , vazão de recirculação, valores inferiores ao nível central, diminuem a produtividade de etanol e valores superiores ao nível central, aumentam essa resposta. É claro que, como no caso da resposta rendimento, há um limite para o aumento das variáveis, determinado pela relação custo/benefício.

Observando a Figura 4.9, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando qualquer tendência quanto à distribuição.

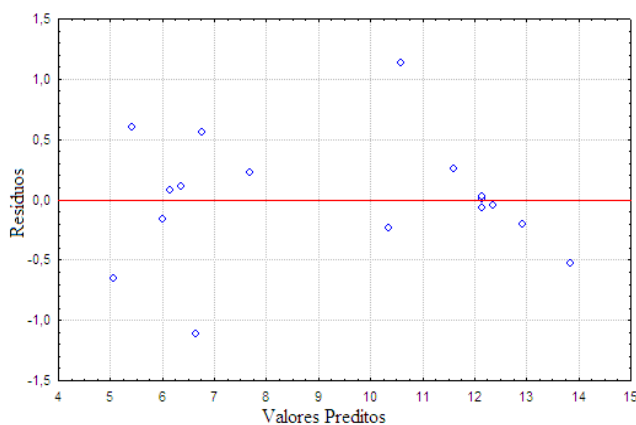


Figura 4.9 - Distribuição dos resíduos para a resposta produtividade

Nesse caso, foi possível, construir as superfícies de resposta e definir a região de interesse. A Figura 4.10 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função da concentração celular no inóculo (X_1) e da concentração inicial de sacarose (X_2) para a produtividade.

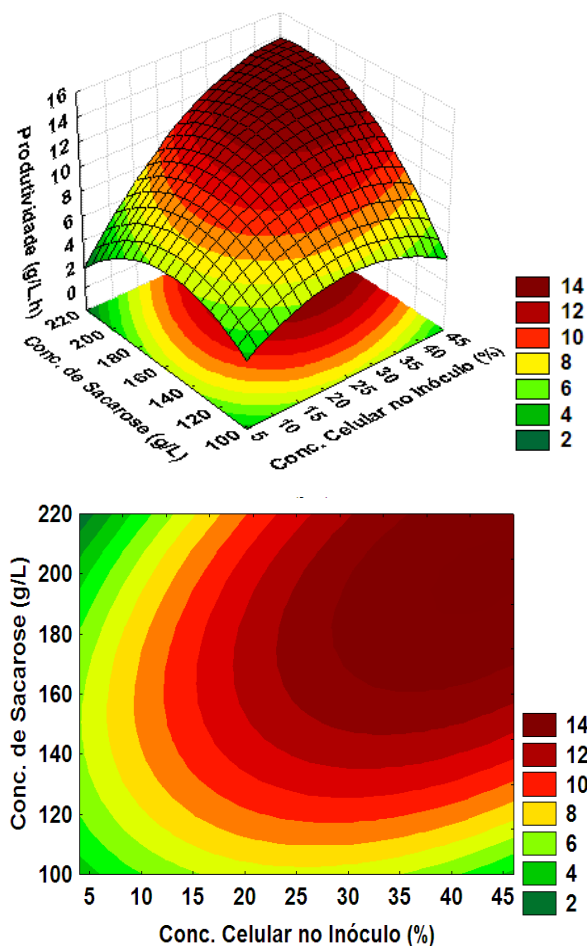


Figura 4.10 - Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose

A Figura 4.11 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função da concentração celular no inóculo (X_1) e da vazão de recirculação (X_3) para a resposta produtividade.

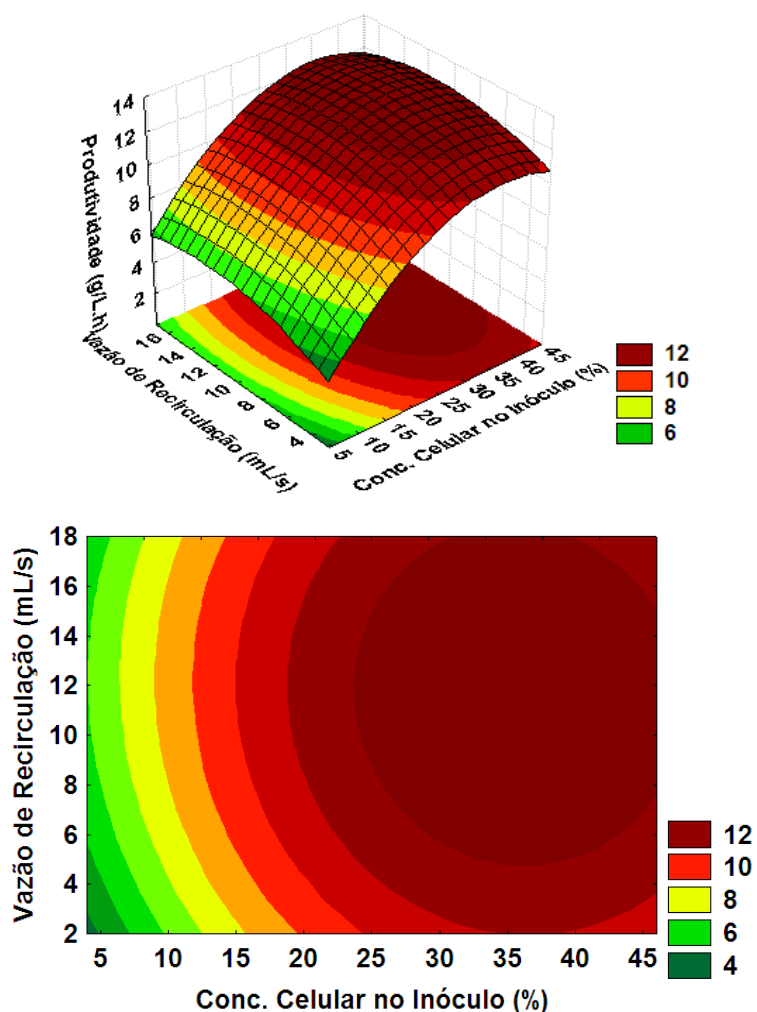


Figura 4.11 - Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração celular no inóculo e vazão de recirculação

A Figura 4.12 mostra a superfície de resposta e a curva de contorno em função da concentração inicial de sacarose (X_2) e da vazão de recirculação (X_3) para a resposta produtividade.

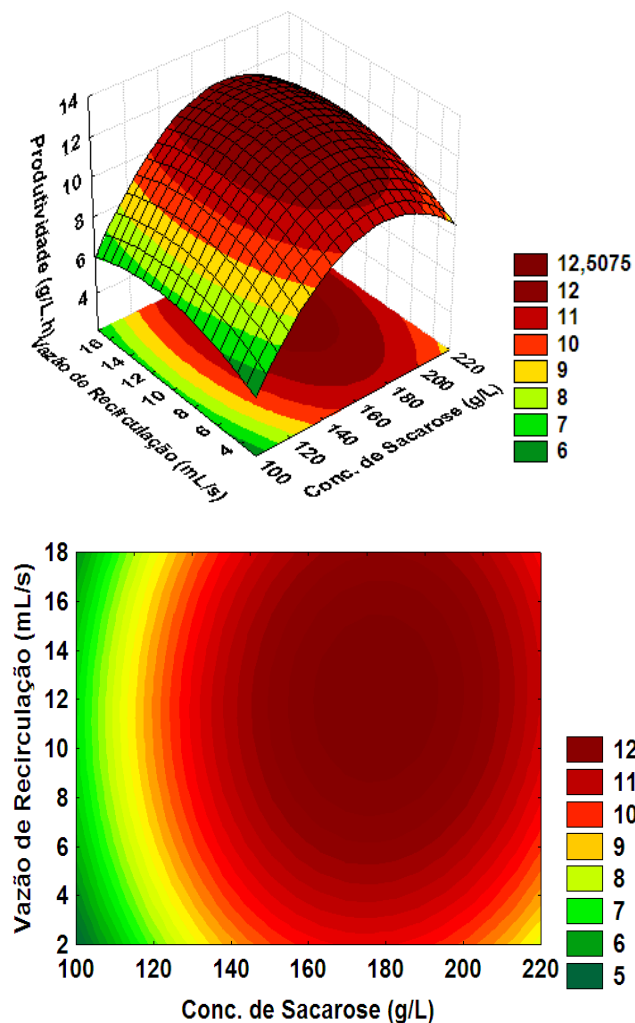


Figura 4.12 - Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração inicial de sacarose e da vazão de recirculação

Analisando as curvas de contorno das Figuras 4.10 e 4.11 definiu-se a faixa de concentração celular no inóculo que maximiza a produtividade de etanol ao final do ciclo fermentativo. A curva de contorno da Figura 4.10, que representa o efeito da concentração celular no inóculo em sinergismo com a concentração inicial de sacarose no meio indica que para a maximização da resposta em questão, deve-se utilizar uma concentração celular no inóculo maior que 30%. O efeito combinado da concentração celular e da vazão de recirculação (Figura 4.11) indica que a faixa de concentração celular deve ser maior que 27%. Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que, para maximização da produtividade de etanol, na região experimental adotada, a concentração de células no inóculo deve ser superior a 30%.

Da mesma forma que para variável relacionada ao inóculo, a partir das curvas de contorno das Figuras 4.10 e 4.12 definiu-se a faixa de concentração inicial de sacarose que maximiza a produtividade na região experimental trabalhada. O efeito combinado da concentração celular e da sacarose inicial indica que a faixa de concentração de substrato no início do processo fermentativo deve ser maior que 160 g/L. O efeito da concentração de substrato em sinergismo com a vazão de recirculação indica que, para a maximização da produtividade de etanol seja, deve-se iniciar a fermentação com uma concentração de sacarose entre 160 e 200 g/L. Portanto, para que ambos os efeitos sejam satisfeitos, é ideal que se utilize uma concentração inicial de sacarose entre 160 e 200 g/L.

Com o objetivo de se definir a vazão de recirculação que maximiza a produtividade de etanol foi realizada a análise das curvas de contorno das Figuras 4.11 e 4.12. De acordo com a Figura 4.11, a produtividade é maximizada se a vazão de recirculação estiver entre 7 e 16 mL/s. Pela Figura 4.12, que avalia a vazão de recirculação em sinergismo com a concentração inicial de sacarose, conclui-se que esta variável deve estar entre 9 e 15 mL/s. Nesse caso, para que a produtividade de etanol seja maximizada, deve-se operar com vazões de recirculação compreendidas entre 9 e 15 mL/s.

Com o objetivo de encontrar o ponto estacionário para a produtividade de etanol, ou seja, o ponto correspondente de maximização da resposta produtividade dentro da região de otimização foi realizada a implementação de um algoritmo no programa *Maple Release 9.5*. Este procedimento foi adotado com intuito de definir a condição operacional dentro da região de otimização. Os valores codificados deste ponto foram os seguintes: $X_1 = 1,19$; $X_2 = 0,89$ e $X_3 = 0,38$.

Utilizando as Equações de codificação 3.1, 3.2 e 3.3, foi possível calcular os valores das variáveis em sua forma real, resultando em: $X_0 = 42,8\%$ de células no inóculo, $S_0 = 199,7$ g/L de sacarose e $V = 11,9$ mL/s.

A produtividade obtida a partir da equação do modelo (Equação 4.4) foi 14,23 g_{etanol}/L.h, quando substituído as condições do ponto ótimo calculado.

Tal resultado mostra-se em concordância à análise das superfícies de resposta e curvas de contorno anteriores, uma vez as variáveis determinadas se encontram dentro da faixa definida.

Nota-se, com base nas análises em relação ao rendimento e à produtividade dentro da faixa experimental trabalhada, que maiores concentrações celulares no inóculo, maiores concentrações iniciais de sacarose e altas vazões resultam em melhores resultados decorridas sete horas de processo fermentativo.

Comparando-se os valores de produtividade obtidos no presente trabalho com outros estudos, observa-se uma melhora considerável da produtividade da fermentação alcoólica quando se utilizam leveduras com características floculantes e reatores do tipo torre. Enquanto o modelo obtido sugere uma produtividade de 14,23 g_{etanol}/L.h, de acordo com Viegas (2003), uma fermentação contínua convencional, usual de um processo industrial, em que se utilizam separadoras centrífugas, reatores de mistura e células de leveduras não floculantes, geralmente opera com produtividade de 7,9 g_{etanol}/L.h quando melaço é utilizado como matéria-prima. Este mesmo autor constatou que sistemas de reatores de leito fluidizado com células de leveduras floculantes apresentam alta estabilidade e produtividade de até 20 g_{etanol}/L.h, enquanto que os processos contínuos otimizados com centrifugação de células atingem 9,6 g_{etanol}/L.h.

Utilizando leveduras com características floculantes, Souza *et al.* (1994) referem-se a uma produtividade máxima em etanol de 12,9 g/L.h na fermentação de meio contendo glicose usando um reator tipo *airlift* de circulação interna.

Operando com dois reatores do tipo torre conectados em série consegue-se uma produtividade de 15,4 g_{etanol}/L.h, quando se opera com leveduras com características floculantes em um sistema contínuo com recirculação de células, com estabilidade por um longo período de tempo (VIEGAS, ANDRIETTA e ANDRIETTA, 2002).

Viegas (2003) estudou o desempenho de leveduras com características floculantes em um sistema de três reatores em série, obtendo um elevado rendimento, 27,5 g/L.h, atribuído à cepa de leveduras utilizada.

Paiva *et al.* (1996) operou continuamente um reator tipo torre, utilizando decantadores, com alta concentração de células e produtividade aproximada de 18 g etanol/L.h. A fermentação contínua de melaços com uma estirpe floculante de *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliada utilizando um reator de leito fluidizado obtendo-se produtividades entre 15 e 20 g/L.h (WIECZOREK e MICHALSKI, 1994).

O modelo obtido no presente trabalho ainda indica que a produtividade pode ser aumentada se a faixa de concentração celular no inóculo utilizada no planejamento experimental for ampliada. Produtividades ainda maiores também poderiam ter sido obtidas se o sistema fosse operado de forma contínua, ou com reatores associados em série, como apontam os estudos citados.

4.2.3. Sacarose Residual

Outra variável resposta analisada foi a sacarose residual, ou seja, a concentração de sacarose presente no meio após sete horas de fermentação. É interessante que essa variável seja minimizada, afinal não se deseja que cessado o processo ainda haja matéria-prima a ser consumida, pois tal fato resultaria em prejuízo para a indústria, e esse açúcar pode acabar sendo agregado ao efluente do processo, provocando problemas ambientais.

Na Tabela 4.6 podem ser vistos os coeficientes de regressão das variáveis e interações, incluindo os parâmetros significativos e não significativos para a resposta sacarose residual. Nesta tabela podem ser vistos, também, os valores dos níveis de significância relacionados aos parâmetros, o desvio padrão com relação a cada um, e o valor do teste de *t de student* associado.

Tabela 4.6– Regressão múltipla para a resposta sacarose residual

Variáveis e interações	Coeficiente de Regressão	Desvio	t(7)	p
Termo Independente	-1,5242	5,524832	-0,27588	0,790604
(X ₁)%inóculo(L)	-19,5058	3,117071	-6,25774	0,000421
%inóculo(Q)	8,9725	4,110916	2,18261	0,065389
(X ₂)Sacarose(L)	31,0832	3,117071	9,97194	0,000022
Sacarose(Q)	20,3054	4,110916	4,93937	0,001676
(X ₃)Vazão (L)	-3,9202	3,117071	-1,25766	0,248847
Vazão (Q)	5,4361	4,110916	1,32236	0,227615
X ₁ .X ₂	-24,0375	3,763456	-6,38708	0,000372
X ₁ .X ₃	0,9175	3,763456	0,24379	0,814383
X ₂ .X ₃	-3,5000	3,763456	-0,93000	0,383324
R ² =0,96				

Por esta análise, obtém-se a Equação 4.5.

$$\text{Sacarose Residual (g/L)} = -1,52 - 19,51.X_1 + 8,97.X_1^2 + 31,08.X_2 - 20,31.X_2^2 - 3,92.X_3 + 5,44.X_3^2 - 24,04.X_1.X_2 + 0,9175.X_1.X_3 - 3,50.X_2.X_3 \quad (4.5)$$

Porém, como nem todas as variáveis e interações se mostraram significativas, construiu-se uma nova Tabela 4.7, que mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 10% para a resposta sacarose residual, após a eliminação de parâmetros não significativos.

A equação do modelo, considerando apenas os parâmetros significativos é dada pela Equação 4.6.

$$\text{Sacarose Residual (g/L)} = 2,20 + 31,08.X_2 - 24,04.X_1.X_2 + 20,31.X_2^2 - 19,51.X_1 + 8,97.X_1^2 \quad (4.6)$$

Tabela 4.7 – Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta sacarose residual

Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Desvio	t(11)	p
Termo Independente	2,2050	4,805559	0,45884	0,655285
(X ₂)Sacarose(L)	31,0832	3,152947	9,85847	0,000001
X ₁ .X ₂	-24,0375	3,806770	-6,31441	0,000057
Sacarose(Q)	20,3053	4,158229	4,88317	0,000484
(X ₁)%inóculo(L)	-19,5058	3,152947	-6,18654	0,000068
%inóculo(Q)	8,9725	4,158229	2,15777	0,053914
R ² =0,94				

Pode-se perceber que, assim como na resposta rendimento, a vazão não exerceu influência sobre a resposta sacarose residual para o nível de significância adotado, nem sob sua forma linear, quadrática ou interações com as demais variáveis.

Obteve-se, após a retirada dos parâmetros não significativos, um coeficiente de correlação (R^2) de 0,94, indicando que os resultados são explicados pela equação empírica proposta com 94% da variabilidade dos dados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.13.

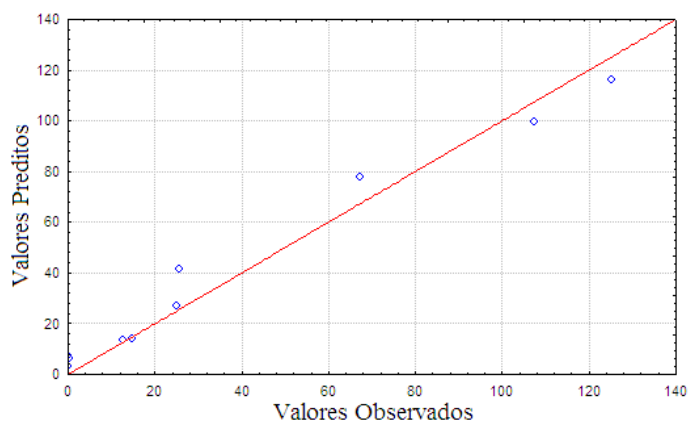


Figura 4.13 - Valores preditos pelo modelo por valores experimentais para a resposta sacarose residual

Pela análise da Equação 4.6 pode-se verificar que a concentração inicial de sacarose no meio exerce forte influência sobre a quantidade residual de sacarose, devido à magnitude deste parâmetro. Se essa variável assume valores codificados superiores ao nível central (0,0), tem-se uma alta concentração de sacarose residual. Para valores codificados inferiores ao nível central têm-se uma redução da quantidade de sacarose residual à medida que o valor

absoluto da variável aumenta. Tal observação é perfeitamente condizente com o comportamento esperado. É natural que, para um tempo fixo de fermentação, quanto mais sacarose estiver presente no meio no início da fermentação, para uma concentração fixa de leveduras, maior será seu nível residual cessado o tempo proposto.

Já a concentração celular no inóculo tem um comportamento oposto ao da concentração inicial de sacarose. Para valores codificados superiores ao ponto central, à medida que este aumenta, tem-se um menor valor de sacarose residual. Se a variável assumir valores inferiores ao nível central, ocorre um aumento na concentração residual de substrato no meio. Esse comportamento é também esperado, pois quanto maior a concentração de leveduras no meio, mais rápido acontecerá o consumo da sacarose.

A vazão de recirculação (X_3) não exerceu influência significativa sobre o rendimento, quer seja de forma linear, quadrática ou por interações com outras variáveis.

Na Figura 4.14 observa-se que os erros de ajustamento se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta sacarose residual.

Para ilustrar os efeitos das variáveis na concentração de sacarose presente no meio decorridas as 7 horas de fermentação, estão apresentadas nas Figuras 4.15, 4.16 e 4.17 as superfícies de resposta e as curvas de contorno para associação, duas a duas, das variáveis do planejamento.

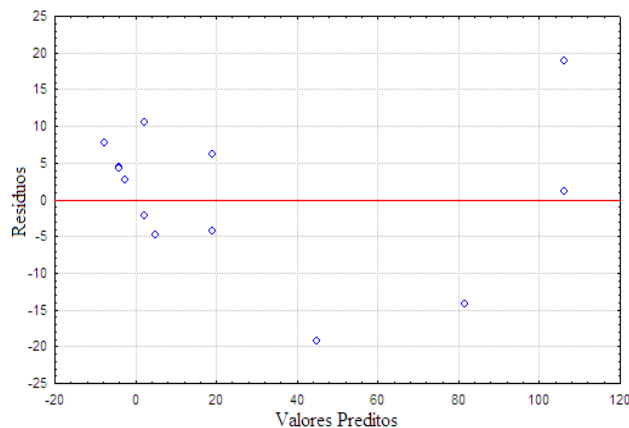


Figura 4.14 - Distribuição dos resíduos para a resposta sacarose residual

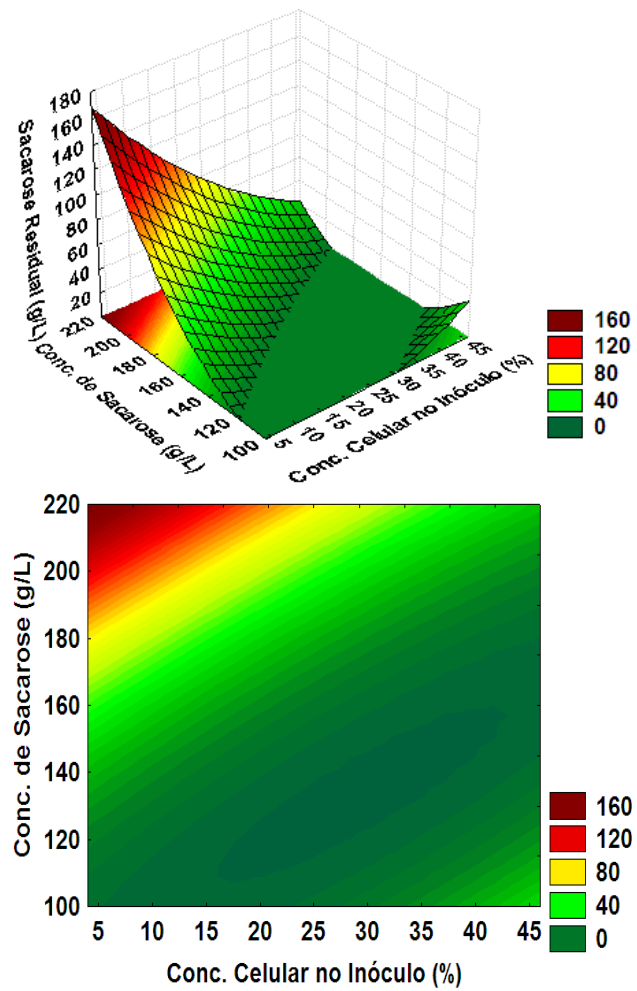


Figura 4.15 - Superfície de resposta e curva de contorno para a concentração residual de sacarose em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose

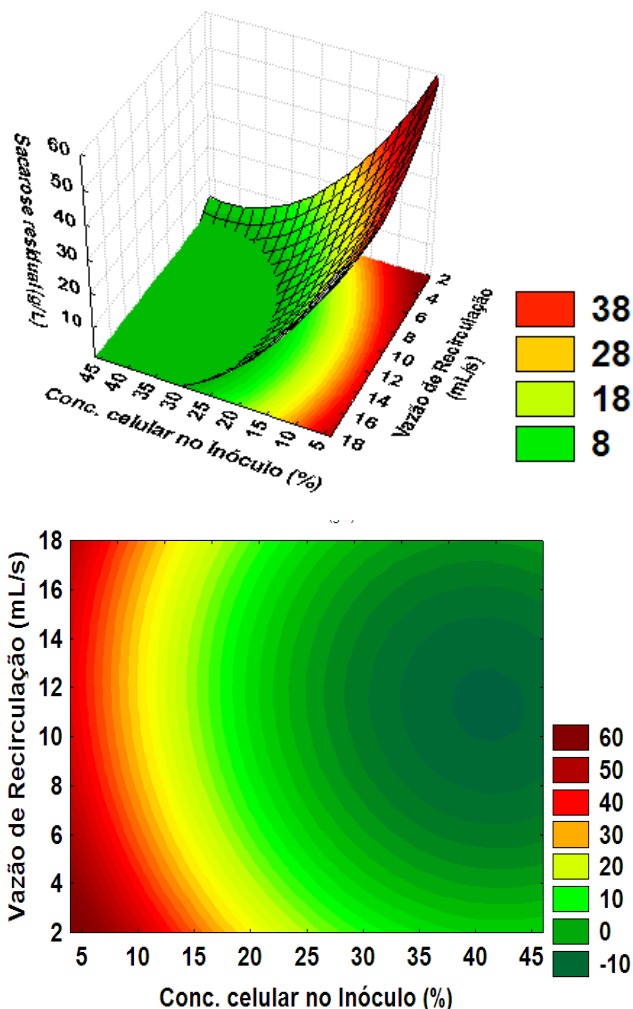


Figura 4.16 - Superfície de resposta e curva de contorno para a concentração residual de sacarose em função da concentração celular no inóculo e vazão de recirculação

Analisando as curvas de contorno das Figuras 4.15 e 4.16 definiu-se a faixa de concentração celular no inóculo que minimiza a concentração residual de sacarose decorridas 7 horas de fermentação.

A curva de contorno da Figura 4.15, que representa o efeito da concentração celular no inóculo em combinação com a concentração inicial de sacarose no meio indica que para a minimização da resposta em questão, deve-se utilizar uma concentração celular no inóculo maior que 25%, até o limite superior da faixa trabalhada. O efeito da concentração celular em sinergismo com a vazão de recirculação (Figura 4.16) indica que a faixa de concentração celular deve ser maior que 33%. Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que, para maximização da produtividade de etanol, na região experimental adotada, a concentração de células no inóculo deve ser superior a 33%.

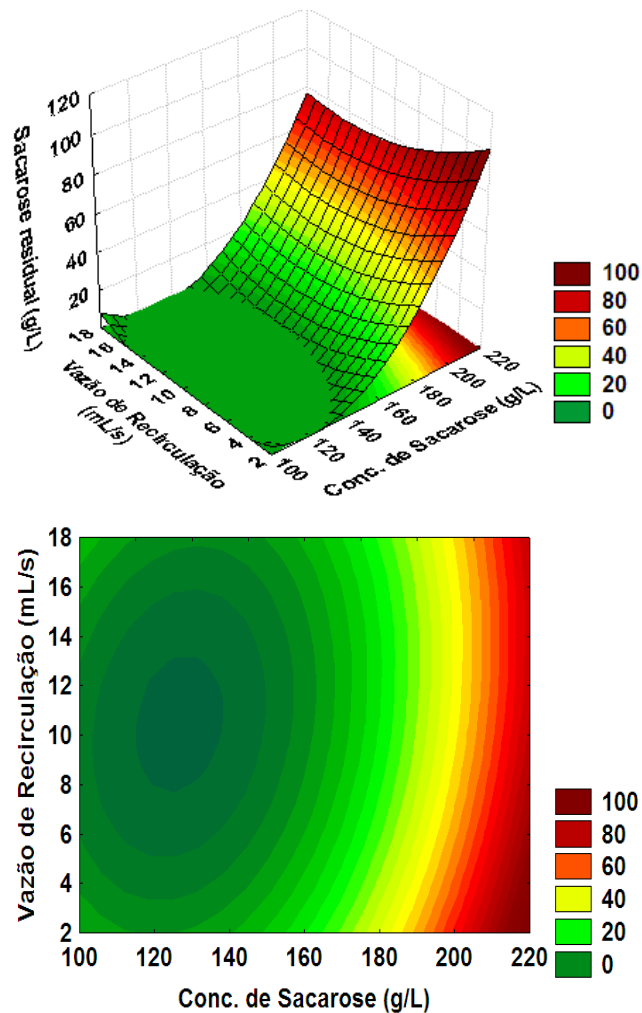


Figura 4.17 - Superfície de resposta e curva de contorno para a concentração residual de sacarose em função da concentração inicial de sacarose e da vazão de recirculação

A partir das curvas de contorno das Figuras 4.15 e 4.17, e seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, definiu-se a faixa de concentração inicial de sacarose que minimiza a concentração final de sacarose residual na região experimental trabalhada. O efeito combinado da concentração celular e da sacarose inicial indica que a faixa de concentração de substrato no início do processo fermentativo deve estar entre 110 e 140 g/L para que a quantidade residual de sacarose seja mínima. O efeito da concentração de substrato em sinergismo com a vazão de recirculação indica que, para que a concentração de substrato residual no meio seja minimizada, deve-se iniciar a fermentação com uma concentração de sacarose entre 120 e 135 g/L. Portanto, para que ambos os efeitos sejam satisfeitos, é ideal que se utilize uma concentração inicial de sacarose entre 120 e 135 g/L.

Da mesma forma que para a concentração celular no inóculo e para a concentração inicial de sacarose, a partir das Figuras 4.16 e 4.17 definiu-se a faixa de vazão de recirculação que minimiza a concentração residual de sacarose no meio decorrido o tempo total definido para a fermentação. De acordo com esta análise, seguindo o mesmo procedimento dos casos anteriores, conclui-se que a vazão de recirculação deve estar entre 6 e 15 mL/s.

Com o objetivo de encontrar o ponto estacionário para a sacarose residual, ou seja, o ponto correspondente à minimização da resposta concentração residual de sacarose dentro da região de otimização, realizou-se uma análise canônica utilizando o modelo completo representado pelos coeficientes de regressão mostrados na Tabela 4.6. Foi possível definir as condições que minimizaram a concentração de sacarose ao final do processo fermentativo pela utilização de um algoritmo implementado no software *Maple Release 9.5*. Os valores codificados deste ponto foi: $X_1 = 0,35$; $X_2 = -0,55$ e $X_3 = 0,16$. Utilizando as Equações de codificação 3.1, 3.2 e 3.3, calculou-se os valores das variáveis em sua forma real, resultando em: $X_0 = 30,2\%$ de células no inóculo, $S_0 = 135,8$ g/L de sacarose e $V = 10,7$ mL/s.

Este resultado mostrou-se em concordância com a análise das superfícies de resposta e curvas de contorno com exceção do valor obtido para concentração celular no inóculo, na qual esta análise das superfícies de resposta indica a utilização de uma concentração celular maior que 33%, e o ponto estacionário mostrou que a mínima sacarose residual seria obtida em uma fermentação que utilizasse aproximadamente 30% de células no inóculo. Porém essa discrepância é pequena e será checada na validação dos pontos ótimos.

A concentração residual de sacarose obtida a partir do modelo dado pela Equação 4.6 forneceu um valor negativo de aproximadamente -10 g/L de sacarose. Tal valor indica que, utilizando as variáveis nos níveis dados pelo ponto ótimo, a sacarose já teria sido totalmente consumida cessado o tempo fixo de fermentação de 7 horas, ou seja, a completa fermentação do meio nessas condições acontece em um tempo menor que sete horas.

As fermentações experimentais realizadas apresentaram conversão de substrato comparável a processos industriais e a estudos de processos fermentativos. Quando se opera com leveduras floculantes num sistema contínuo com recirculação de células, o reator de leito fluidizado fornece uma conversão de substrato maior que 95% (VIEGAS, ANDRIETTA e ANDRIETTA, 2002). Viegas (2003) obteve conversão de substrato maior que 98% trabalhando com diferentes concentrações de substrato (125 a 181 g/L) e diferentes condições de aeração num sistema estável por 80 dias operando continuamente, em um sistema de fermentação contínua com reciclo de células formado por dois fermentadores tipo torre e um

decantador. Segundo Harshbarger *et al.* (1995), com um biorreator de leito fluidizado operando continuamente obtém-se conversão de substrato de 99,5%.

4.3. Reprodutibilidade do Ponto Otimizado

O principal objetivo desta etapa foi verificar se ocorreria reprodutibilidade dos resultados apontados pelos modelos, quando empregadas as condições experimentais indicadas pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno e pelos pontos estacionários determinados pela utilização de rotina implementada no software *Maple Release 9.5*.

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, concluiu-se que a concentração celular no inóculo deve estar entre 26 e 40% para a resposta rendimento, deve ser maior que 30% para maximizar a produtividade e deve ser estar em um nível superior a 33% para que a concentração residual de sacarose ao final do processo fermentativo seja mínima. Como a concentração celular não é um entrave econômico para uma fermentação alcoólica, optou-se por trabalhar com altos níveis celulares no inóculo na tentativa de otimizar as respostas.

A concentração inicial de sacarose que otimiza a resposta rendimento deve estar entre 160 e 200 g/L, mesma faixa que garante uma produtividade máxima. No entanto, para a minimização da concentração de sacarose residual, a análise das superfícies e curvas de contorno sugerem concentração de substrato entre 120 e 135 g/L. Esta mesma análise conclui-se a vazão de recirculação deve ser maior que 9 mL/s para maximização do rendimento, estar entre 9 e 15 mL/s para otimização da produtividade e estar compreendida entre 6 e 15 mL/s para que a sacarose residual seja mínima ao final de sete horas de fermentação.

Pela análise dos pontos estacionários, nota-se que a concentração celular no inóculo que favorece o rendimento é 33%, para maximização da produtividade é ideal que se aproxime de 43%, e para que a concentração residual de sacarose seja mínima deve-se preparar um inóculo com aproximadamente 30% de células em volume. Esta mesma análise afirma que, para que o rendimento seja maximizado, deve-se iniciar a fermentação com 180 g/L de sacarose. Para que a produtividade de etanol atinja seu máximo valor, a concentração inicial de sacarose deve ser de 200 g/L e para que se tenha uma mínima quantidade residual de sacarose, deve-se operar o processo fermentativo com 136 g/L de sacarose inicial.

A vazão de recirculação que otimiza o rendimento é de aproximadamente 13 mL/s, de 12 mL/s para maximizar a produtividade e está em torno de 11 mL/s para beneficiar a minimização da sacarose residual, segundo a análise dos pontos estacionários feita no algoritmo implementado no software *Maple Release 9.5*.

Se a fermentação fosse realizada no ponto estacionário do rendimento, utilizando as equações dos modelos para produtividade e sacarose residual (Equações 4.4 e 4.6, respectivamente), obter-se-ia uma produtividade de 13,5 g_{etanol}/L.h e 7,4 g/L de sacarose residual no meio decorridas as sete horas de reação, para um rendimento de praticamente 100%. Se a fermentação fosse conduzida no ponto máximo de produtividade, e substituindo esse ponto nos modelos de rendimento e concentração residual de sacarose (Equações 4.2 e 4.6, respectivamente), ter-se-ia um rendimento de aproximadamente 84% e uma concentração de sacarose ao final do tempo estipulado de 10,2 g/L, para uma produtividade de 14,23 g_{etanol}/L.h. Se a fermentação fosse conduzida no ponto estacionário da resposta sacarose residual, conseguir-se-ia, utilizando os modelos para rendimento (Equação 4.2) e produtividade (Equação 4.4), respectivamente 86,83% e 11,13 g_{etanol}/L.h, sem que haja concentração residual de sacarose ao término do processo fermentativo.

Nessa etapa, optou-se por eleger e avaliar duas situações distintas consideradas ser as melhores para a fermentação alcoólica em questão: um ponto ótimo a partir das superfícies de resposta e curvas de contorno e outro pela análise dos pontos estacionários feita por rotina implementada no software *Maple Release 9.5*.

Portanto, baseando-se nas faixas de interesse para as respostas avaliadas na literatura, e considerando-se critérios técnicos e econômicos definiu-se as condições para realização dos experimentos para validação.

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, definiu-se a condição ótima a ser reproduzida experimentalmente: utilizou-se alta concentração celular no inóculo, 45%, concentração inicial de sacarose de 200 g/L e vazão de recirculação de 15 mL/s.

Pode-se perceber que, trabalhando no ponto máximo do rendimento, a produtividade não é consideravelmente prejudicada, e a concentração residual de sacarose decorridas sete horas de fermentação é baixa. Esta é a situação, dentre as sugeridas pela análise dos pontos estacionários, mais favorável, e foi selecionada para testar a reprodutibilidade do modelo segundo este método. Portanto, a outra condição reproduzida foi: concentração celular no inóculo de 33%, concentração inicial de sacarose de 180 g/L e vazão de recirculação de 13 mL/s.

Ambas as escolhas atendem plenamente o domínio de validade da região de otimização e a alternativa de aumentar a concentração celular no inóculo e concentração inicial de substrato no ponto ótimo indicado pelas superfícies de resposta representa um ganho vinculado à economia do processo.

Na Figura 4.18 pode-se observar os perfis de consumo de sacarose e de produção de etanol em função do tempo, bem como o crescimento celular em função do tempo e da altura do reator para a condição máxima obtida pela análise das superfícies de resposta (45% de células no inóculo, concentração inicial de sacarose de 200 g/L e vazão de recirculação de 15 mL/s). Obteve-se um rendimento de 89,1% e uma produtividade de 13,5 g_{etanol}/L.h, com concentração residual de sacarose de 3,1 g/L.

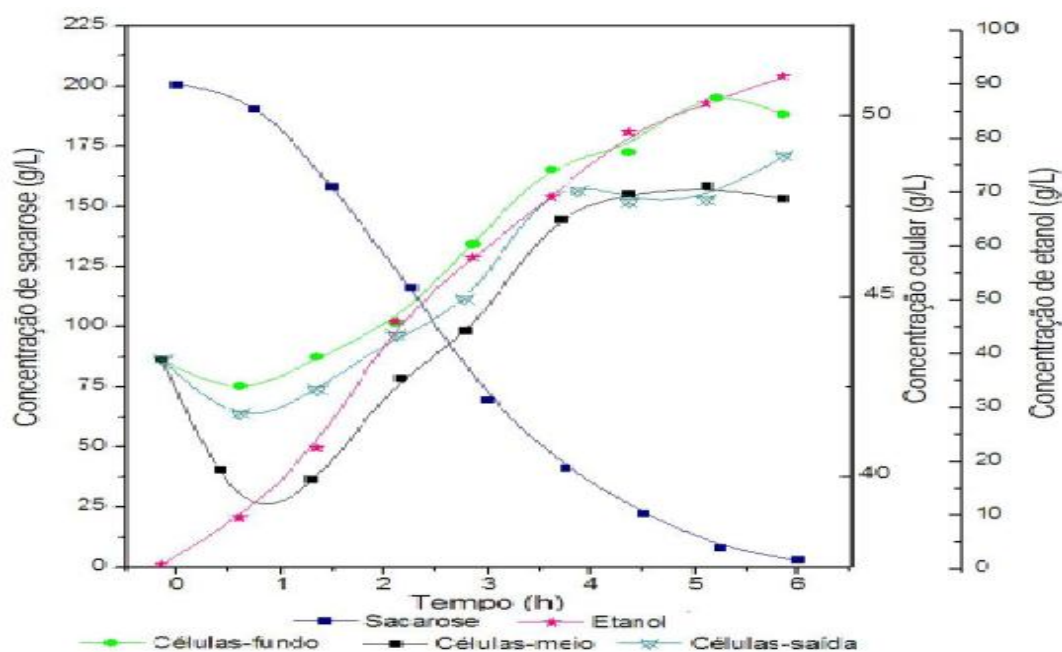


Figura 4.18 - Perfis de concentração celular, substrato e inóculo em função do tempo para a condição máxima das superfícies de resposta

Os perfis de concentração celular, de sacarose e etanol obtidos no ponto máximo do rendimento (33% de células no inóculo, concentração inicial de sacarose de 180 g/L e vazão de recirculação de 12,7 mL/s) são mostrados na Figura 4.19. Conduzindo a fermentação alcoólica nessas condições obteve-se um rendimento de aproximadamente 98% e uma produtividade de 13,4 g_{etanol}/L.h, com concentração residual de sacarose de 2,3 g/L ao final do tempo pré-determinado.

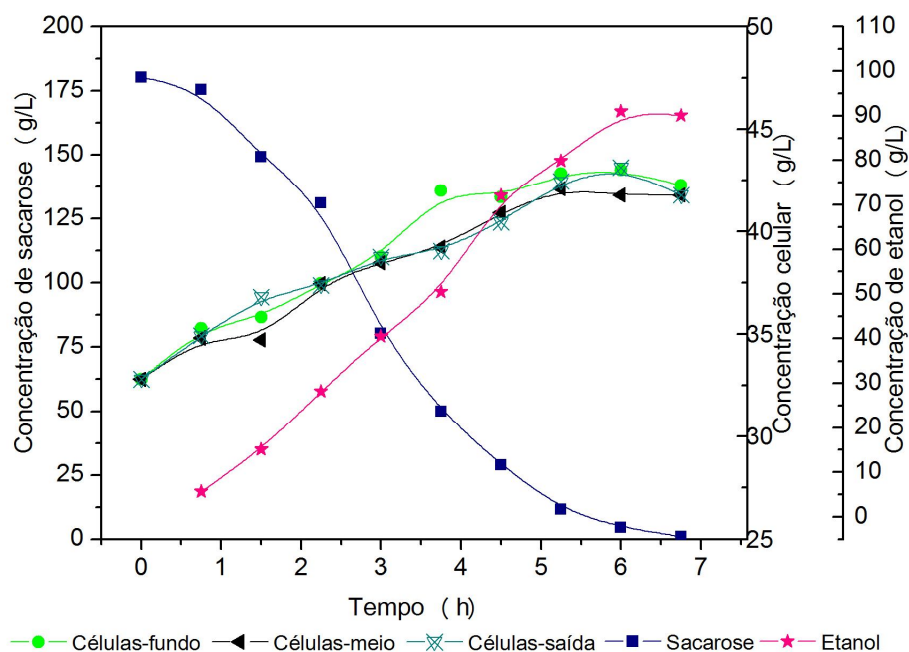


Figura 4.19 - Perfis de concentração celular, substrato e inóculo em função do tempo para a condição máxima do rendimento

A produtividade e o rendimento obtidos na prática foram bastante próximos aos valores previstos pelos modelos (Equações 4.4 e 4.2, respectivamente), podendo-se atribuir essa pequena diferença a erros experimentais. O rendimento se mostrou ligeiramente inferior quando comparado com o valor previsto pela equação do modelo, enquanto a equação previa um rendimento de 99,8%, obteve-se, na prática, 98% de rendimento, enquanto a produtividade prevista e obtida são coincidentes em aproximadamente 13,5 g_{etanol}/L.h. A concentração residual de sacarose no experimento que visava a reprodutibilidade pode ser negligenciado, embora o modelo presumisse uma concentração de 7,4 g/L de sacarose ao término do processo fermentativo.

Comparando os resultados obtidos nos experimentos que visavam a reprodutibilidade, percebe-se que conduzir a fermentação alcoólica na condição do máximo do rendimento é mais vantajosa em termos das respostas analisadas, pois conseguiu-se uma mesma produtividade, com um maior rendimento, e utilizando-se uma menor concentração de substrato.

O menor rendimento obtido no experimento que reproduziu a condição ótima fornecida pelas superfícies de resposta pode ser associado à inibição pelo substrato, que

ocorre quando se inicia a fermentação alcoólica com altas concentrações de sacarose, 200 g/L no caso.

Os valores obtidos pelo experimento e o modelo estão bastante próximos, o que indica que houve reprodutibilidade dos resultados tanto em termos de rendimento quanto de produtividade de etanol e concentração residual de sacarose.

4.5. Modelagem Matemática

Pode-se observar, na Figura 4.20, o perfil de concentração celular e de substrato ao longo do tempo e da altura do reator para o experimento 16, ponto central, que se inicia com 25% de células no inóculo, 160 g/L de sacarose e tem vazão de recirculação de 9,9 mL/s. Existe uma pequena variação da concentração de substrato e de leveduras ao longo da posição, que justifica a utilização de um modelo batelada, que não considera variação espacial das grandezas de estado com a posição.

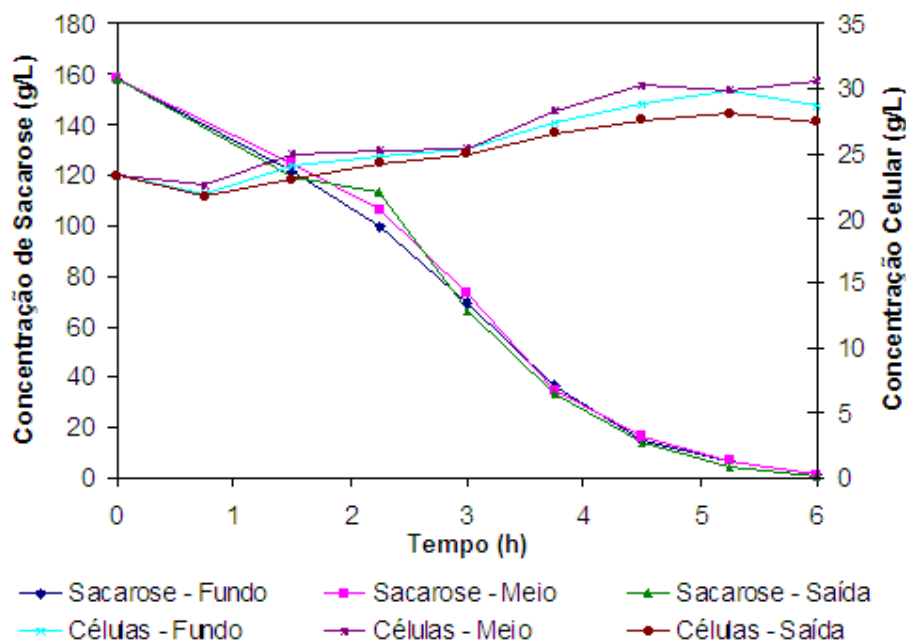


Figura 4.20 – Perfil de concentração celular e de substrato ao longo do tempo e da posição do reator para o experimento 16

O algoritmo de quarta-ordem de Runge-Kutta foi acoplado com o método de regressão não linear para a solução das equações (3.6 a 3.9). Os parâmetros foram obtidos para o conjunto de dados adimensionalizados (Tabela 4.8). Os parâmetros μ_{mA} , α_A , e λ_A foram

calculados a partir dos dados experimentais, enquanto os demais foram determinados pelo ajuste do modelo aos dados experimentais.

Tabela 4.8 – Parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do modelo

PARÂMETROS	ADIMENSIONAIS	PARÂMETROS	DIMENSIONAIS
Calculados pelos dados experimentais			
μ_{mA} [-]	0,39	μ_m [h ⁻¹]	0,065
α_A [-]	6,75	α [gS.(gX) ⁻¹]	26,638
λ_A [-]	6,85	λ [gP.(gX) ⁻¹]	12,244
Ajustados pelo modelo			
p_{mA} [-]	$1,350 \pm 6,148 \times 10^{-1}$	p_m [g.L ⁻¹]	122,30
n [-]	$0,120 \pm 1,252 \times 10^{-2}$	n [-]	0,12
β_A [-]	$0,905 \times 10^{-1} \pm 0,174 \times 10^{-1}$	β [gS.(gX.h) ⁻¹]	0,0599
δ_A [-]	$0,645 \times 10^{-1} \pm 0,172 \times 10^{-1}$	δ [gP.(gX.h) ⁻¹]	0,0192
K_{SA} [-]	$0,171 \pm 0,766 \times 10^{-1}$	K_S [gS.L ⁻¹]	34,2
K_{IA} [-]	$0,908 \pm 0,267$	K_I [gS.L ⁻¹]	181,6
SRS	$3,650 \times 10^{-2}$	-	-

O somatório dos quadrados dos resíduos calculados foi relativamente baixo sugerindo o bom ajuste do modelo como indicado na Tabela 4.8 e Figuras 4.21 e 4.22. Outro indicativo de bom ajuste foi o desvio padrão obtido para os parâmetros calculados.

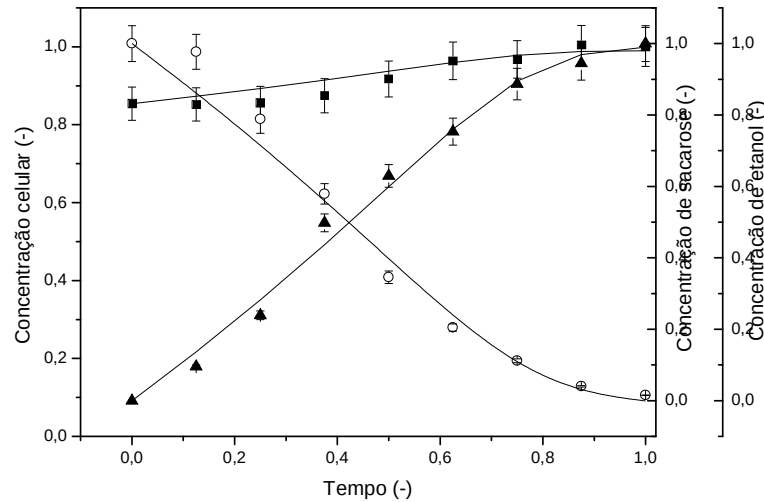


Figura 4.21 - Variação na concentração de biomassa (■), sacarose (○), etanol (▲) para o experimento de validação das condições de otimização obtido pela superfície de resposta e curvas de contorno. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas representam o ajuste do modelo proposto para os dados adimensionalizados

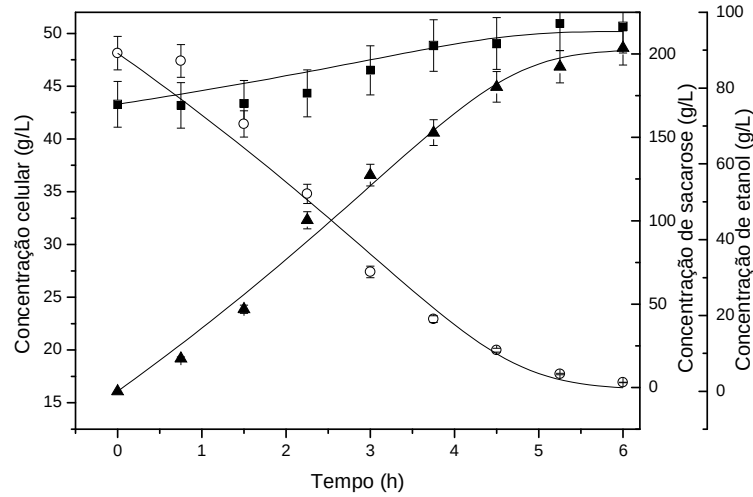


Figura 4.22 - Variação na concentração de biomassa (■), sacarose (○), etanol (▲) para o experimento de validação das condições de otimização obtido pela superfície de resposta e curvas de contorno. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas representam o ajuste do modelo proposto para os dados dimensionais

Substituindo-se os valores dos parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do modelo nas equações de balanço de substrato e produto, em sua forma dimensional, tem-se, respectivamente, as Equações 4.7 e 4.8.

$$\frac{-dS}{dt} = 26,638 \frac{dX}{dt} + 0,0599X \quad (4.7)$$

$$\frac{dP}{dt} = 12,244 \frac{dX}{dt} + 0,0192X \quad (4.8)$$

Pode-se observar, pela magnitude dos parâmetros, que tanto o consumo de substrato quanto a formação de produto se mostraram fortemente associados ao crescimento celular e fracamente associados à concentração celular do meio. Entretanto, como os experimentos em questão foram conduzidos com altas concentrações celulares no inóculo e apresentaram baixa taxa de crescimento celular, ambos os termos de cada equação se mostraram importantes, pois apresentam ordem de grandeza semelhante.

4.5.1. Validação do Modelo

É sempre desejável a verificação da coerência entre os experimentos e o modelo, antes que o mesmo possa ser considerado válido. O modelo foi validado pela simulação do modelo

em duas condições experimentais diferentes e pela comparação dos resultados da simulação com os obtidos experimentalmente.

A Tabela 4.9 apresenta os parâmetros calculados e utilizados para as duas condições utilizadas na validação.

Tabela 4.9 - Parâmetros calculados para as duas condições de validação

PARÂMETROS	Exp.(16) ponto central	Ponto ótimo rendimento
Calculados pelos dados experimentais		
μ_m [h ⁻¹]	0,065	0,090
α [gS.(gX) ⁻¹]	37,142	19,981
λ [gP.(gX) ⁻¹]	18,317	10,050
Dados do modelo		
p_m [g.L ⁻¹]	122,30	122,30
n [-]	0,12	0,12
β [gS.(gX.h) ⁻¹]	0,0599	0,0599
δ [gP.(gX.h) ⁻¹]	0,0192	0,0192
K_S [gS.L ⁻¹]	34,2	34,2
K_I [gS.L ⁻¹]	181,6	181,6

A boa correlação entre os valores experimentais e os valores obtidos pelo modelo podem ser observados nas Figuras 4.23 e 4.24 validando o modelo.

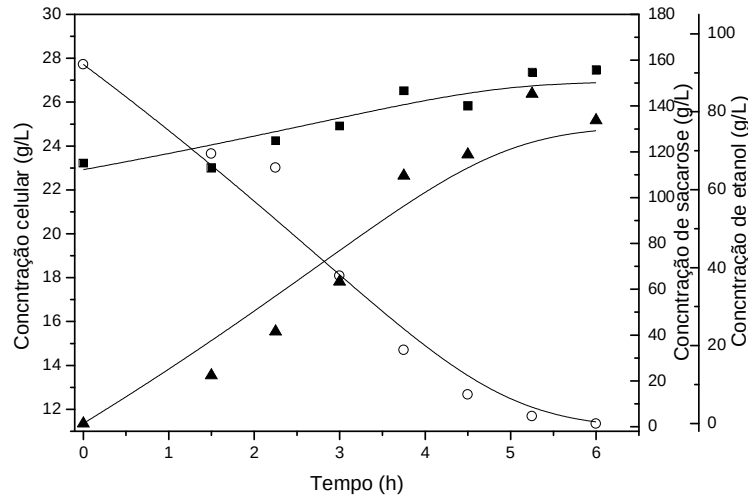


Figura 4.23 - Variação na concentração de biomassa (■), sacarose (o), etanol (▲) para o experimento (16) do ponto central. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas representam a aplicação do modelo aos dados experimentais

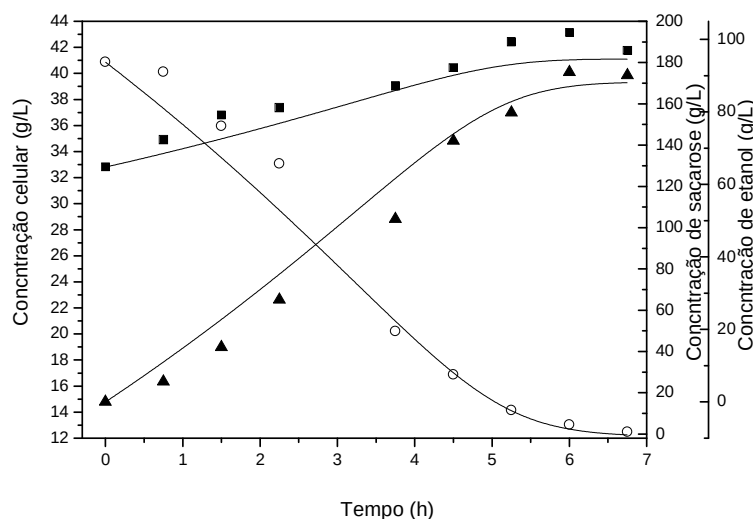


Figura 4.24 - Variação na concentração de biomassa (■), sacarose (○) e etanol (▲) para o experimento de validação das condições do experimento de validação do ponto ótimo do rendimento. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas representam a aplicação do modelo proposto aos dados experimentais

Vasconcelos, Pinto e Silva (1992) testaram dez modelos cinéticos para o processo de fermentação alcoólica industrial e concluíram que o modelo de Ghose e Thyagi (1979) foi o que apresentou os melhores ajustes dos dados experimentais. Amaral (2009) também chegou aos melhores resultados com tal modelo para as condições experimentais adotadas.

Ferreira (2003) modelou matematicamente um biorreator tipo torre de leito pseudo-expandido. Diferentes modelos cinéticos foram testados para descrever o comportamento deste biorreator em diferentes condições de operação. O modelo proposto por Tosetto e Andrietta (2002) foi o que apresentou menor oscilação nos valores dos parâmetros cinéticos e mais se aproximou do comportamento de um biorreator de leito pseudo-expandido.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

- A utilização de um reator tipo torre com escoamento ascendente e recirculação externa se mostrou uma alternativa promissora para fermentações alcoólicas, por ter apresentado elevados rendimentos percentuais e produtividades.
- A utilização de uma cepa de leveduras com características floculantes se mostrou bastante eficaz, pelos altos níveis de produtividade obtidos, diminuição do tempo de fermentação e economia de processamento e instalação estimados para plantas sucroalcooleiras.
- A concentração celular no inóculo foi a variável que mais afetou as respostas analisadas. Como era esperado, um aumento na concentração celular no inóculo provocam um aumento no rendimento e na produtividade, e diminui os níveis residuais de sacarose.
- A concentração inicial de substrato também exerceu forte influência sobre as variáveis analisadas, porém um aumento na concentração inicial de substrato não aumenta, linearmente, o rendimento e produtividade ou diminui os níveis residuais de sacarose. As melhores respostas foram obtidas para uma concentração inicial de sacarose em torno de 180 g/L.
- A vazão de recirculação afetou de maneira significativa apenas a resposta produtividade. As demais respostas não sofreram influência significativa dessa variável.
- Os modelos obtidos foram satisfatórios na reprodutibilidade dos dados experimentais.
- Foram avaliadas duas condições de máximo: uma fornecida pela análise das superfícies de resposta (45% de células no inóculo, concentração inicial de sacarose de 200 g/L e vazão de recirculação de 15 mL/s) e outra pelo ponto estacionário do rendimento (33% de células no inóculo, concentração inicial de sacarose de 180 g/L e vazão de recirculação de 12,7 mL/s). Comparando-se estas duas condições, conclui-se que é mais vantajoso conduzir o processo fermentativo no ponto estacionário do rendimento, que forneceu uma mesma produtividade e um maior rendimento, utilizando-se uma menor concentração inicial de substrato. Obteve-se, nesse experimento, um rendimento de 98%, produtividade de 13,4 g_{etanol}/L.h e concentração residual de sacarose de 3,1 g/L.

- Os valores das respostas preditas pelos modelos e as obtidas experimentalmente estão próximas, o que indica a validade dos modelos ajustados.
- O modelo cinético de Tosetto e Andrietta (2002) se ajustou bem aos dados experimentais. Houve uma boa correlação entre os valores experimentais e os valores obtidos pelo modelo indicando que este foi validado.
- Os valores de produtividade e rendimento obtidos nos experimentos que operam nas condições ótimas analisadas apresentam níveis mais elevados que processos industriais usuais de produção de etanol.
- Fica evidente que a levedura floculante aliada ao uso de reatores tipo torre se mostra uma alternativa promissora para melhorar o desempenho e reduzir os custos do processo.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar diferentes meios nutricionais e condições fermentativas para que se obtenha uma eficiente floculação da cepa;
- Operar os experimentos de forma contínua, na tentativa de elevar os índices de produtividade e rendimento obtidos pelo processo batelada;
- Trabalhar com uma faixa maior para a concentração celular no inóculo, visto que esta exerce influência decisiva sobre as respostas em questão, e não se trata de uma restrição econômica para o processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABARCA, C. D. G.; **Inovações tecnológicas na agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil**. COPPE/Universidade Federal do Rio de Janeiro, DEPRO/Universidade Federal de Ouro Preto, 2005.
2. ALCOOLBRÁS, 2006. **Revista Alcoolbrás**. Edição nº 101. Abril 2006.
3. ALTINTAS, M. M.; ÜLGEN, K. Ö; KIRDAR, B.; ÖNSAN, Z. I.; OLIVER, S. G. Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 640 - 647, 2002.
4. AMARAL, F. S. Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, 95 p., 2009.
5. AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**. Piracicaba. São Paulo, 2005. Fermentec, 448p.
6. ANDRIETA, S. R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 178p, 1994.
7. ANDRIETTA, S. R. **Processos de fermentação alcoólica utilizando leveduras floculantes**, 2005. Disponível em: < http://www.stab.org.br/agenda/eventos/palestra_downloads/11_silvio_roberto_adrietta.pps#285,30,Nível de desenvolvimento> Acesso em: 21/outubro/2009.
8. ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**, Universidade de Campinas, 2006.
9. ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3002 – 3008, 2008.
10. Agência Nacional do Petróleo. **Estatísticas**. Disponível em < <http://www.anp.gov.br/?id=548>> Acesso em: 07/maio/2009.
11. ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, R. e MAUGERI FILHO, F.; Fermentação Alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de

- parâmetros; Livro de Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000.
12. BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, 26, p. 89-105, 2008.
 13. BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2ª Ed. N. York, McGraw-Hill, 1986.
 14. BAPTISTA, C. M. S. G.; CÓIAS, J. M. A.; OLIVEIRA, A. C. M.; OLIVEIRA, N. M. C.; ROCHA, J. M. S.; DEMPSEY, M. J.; LANNIGAN, K. C.; BENSON, P. S. Natural immobilisation of microorganisms for continuous ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 127 – 131, 2006.
 15. BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; ASSO, L. C., **Fisiologia e ecologia microbiana**, I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.
 16. BASSETO, N. Z. **Sistema especialista para planta de produção de álcool**. (Dissertação Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
 17. BASSO, L.C. 1991. In: ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. (Tese Doutorado). ESALQ. Piracicaba, 1994, 199 p.
 18. BASSO, L. C. **Fisiologia e ecologia microbiana**, I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.
 19. BELTER, P. A., CUSSTER, E. L., HU, W. S.; **Bioseparations: downstream processing for biotechnologies**. United States of America: John Wiley & Sons, 1988. 368 p.
 20. BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 162 – 342; 578 – 686.
 21. BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia – Engenharia Bioquímica**, v. 3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 1975. 301 p.
 22. CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua Alimentada**. In: Schmidell, Willibaldo *et al.* (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, p. 205-222 (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.
 23. COUTINHO FILHO, U. **Engenharia Bioquímica**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2007. Apostila.
 24. CUNHA, A. F.; MISSAWA, S. K.; GOMES, L. H.; REIS, S. F.; PEREIRA, G. A. G. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol

- production. **Blackwell Publishing, Federation of European Microbiological Societies**, v.6, p. 280-287, 2006.
25. CYSEWSKI, G. R.; WILKIE, C. W. Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 20, p.1421-1430, 1978.
26. DEDINI S/A Indústrias de Base. Apresentação, 2008.
27. DOMINGUES, L. M. A. R. **Estirpes floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para utilização da lactose: construção e aplicação biotecnológica**. (Tese Doutorado), Universidade do Minho, Escola de Engenharia, 2001.
28. DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; SEVELY, Y.; Modeling and Statistic Optimization of the Ethanol Production in a Cascade Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 29, n.2, p. 187-194, 1987.
29. DUARTE, J. C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B. **Continuous culture of flocculent yeast for ethanol production**. Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Biotechnology Department, Portugal, 2006.
30. Ethanol Brasil Blog. **Brasil deve dobrar consumo de etanol**. Disponível em <<http://ethanolbrasil.blogspot.com/2008/09/brasil-deve-dobrar-consumo-de-etanol.html>> Acesso em: 07/maio/2009.
31. FACCIOITI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: Schmidell *et al.* (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 223-246, 2001.
32. FERREIRA, R. M. **Modelagem e simulação de biorreatores tipo torre operando com leveduras auto-imobilizáveis para produção de etanol**. (Dissertação Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Engenharia Química, 135 p., 2003.
33. FINGUERUT, J. I Workshop Brasileiro sobre Obtenção de Etanol. Projeto PPPP Etanol. Centro de Tecnologia Canavieira, 2006.
34. FURTADO, T. A.; SCANDIFFIO, M. G. **Álcool no Brasil - Uma longa história**. *Scientific American Brasil*, p. 66-71, Outubro, 2006.
35. GALASSI, G. R. **Estudo do processo fermentativo contínuo para produção de etanol utilizando células auto-imobilizadas em reatores tipo torre**. (Dissertação, Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
36. GE, X. M.; ZHANG, L.; BAI, F. W. Impacts of yeast floc size distributions on their observed rates for substrate uptake and product formation. **Enzyme and Microbial Tehnology**, 39, p. 289-295, 2006.

37. GHOSE, T. K.; THYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysis I. Batch versus continuous systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v.21, n.8, p. 1387-1400, 1979.
38. GILL, S. A process for the step-by-step integration of differential equations in an automatic digital computing machine. **Proc. Cambridge Philos. Soc.**, 47, p. 96-108, 1951.
39. GINOVART, M.; LÓPEZ, D.; GIRÓ, A.; SILBERT, M. Flocculation in brewing yeasts: a computer simulation study. **Biosystems**, 83, p. 51-55, 2006.
40. GÒDIA, F.; SOLÁ, C. Fluidized bed bioreactors. **Biotechnology Progress**, Barcelona, v. 11, n. 5, 25, p. 479-497, 1995.
41. GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Technology for biofuels**, 1:6, 2008.
42. HARRISON, J., S. Yeast production. Progress in industrial microbiology. London, Colchester and Beccles, Cap. 4, p. 129-178, 1971.
43. HARSHBARGER, D.; BAUTZ, M.; DAVISON, B. H.; SCOTT, T. C.; SCOTT, C. D. Economic assessment of ethanol production comparing traditional and fluidized bed bioreactors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 51, n. 52. p. 593-604, 1995.
44. IMPE VAN, J. F., NICOLAY, B. M. VANROLLEGHEM, P. A., SPRIET, J. A., MOOR, B. D., VANDEWALLE, J. Optimal control of the penicillin G. fed-batch fermentation: an analysis of the model of Heijnen *et al.* **Optimal Control Appl. & Methods**, 15, p. 13-34, 1994.
45. Jin, C. K, Chiang, H. L., Wang, S. S. Steady-state of the enhancement in ethanol productivity of a continuous fermentation process employing a protein-phospholipid complex as a protecting agent. **Enzyme and Microbial Technology**, 3 (3), p. 249-257, 1981.
46. JOEKES, I.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; WENDHAUSEN, R.; TONELLA, E.; CASSIOLA, F.; Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized onto crysotile for ethanol production. J. Chem. Technol. Biotech. 73, 45 58, 1998.
47. LEVENSPIEL, O. Monod equation: a revised and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnol. Bioeng.**, v.22, n.8, p. 1671-1687, 1980.
48. LIMA, W. J. N.; **Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular**; Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas; 2004.
49. LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. **Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira**. Curitiba: Editora UFPR, 248p., 2002.

50. LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.1-43. (Biotecnologia Industrial; v.3)
51. LIU, C. Z.; WANG, F.; OU-YANG, F. Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. **Bioresource Technology**, 100, p. 878-882, 2009.
52. LUO, L.; VOET, E. V. D.; HUPPES, G. Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. **Renewable and sustainable energy reviews**, 615, p. 1-7, 2008.
53. LUONG, J. H. T. Kinetics of Ethanol inhibition in Alcohol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 280-285, 1985.
54. MARQUARDT, D. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. **SIAM Journal on Applied Mathematics** 11: 431-441, 1963.
55. McNEIL, B.; HARVEY, L. M. **Fermentation: A Practical Approach**. 1 ed. IRL PRESS at Oxford University Press, 1990.
56. MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 141 – 178, 1980.
57. MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. **Biotechnol. Bioeng.**; v. 22, n.11, p. 2375-2381, 1980.
58. NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; ISMAIL, K. S. K. Ethanol fermentation in a immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biores. Technol.* 92, 251 260, 2004.
59. PAIVA, T. C. B.; SATO, S.; VISCONTI, A. E. S.; CASTRO, L. A. B. Continuous alcoholic fermentation process in a tower with recycling of flocculating yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 58, p. 535–541, 1996.
60. PARAZZI, C. **Floculação da levedura na fermentação etanólica**. Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias, 2007.
61. PRINCE, I. G.; BARFORD, J. P. Continous tower fermentation for power ethanol production. **Ethanol Production Letters**, vol. 4, n. 4, p. 263-268, 1982.
62. RODRIGUES, C. A. **Petroquímica: Perspectivas de Reestruturação**. Disponível em <http://www.soeconomia.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=118&Itemid=113>. Acesso em: 13/dezembro/2008.

63. SCHMIDELL, W., FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e Processos Fermentativos**. In: Schmidell, Willibaldo *et al.* (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, p. 179-192. (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.
64. SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENTE, A. M.; MORAIS, J. O. F.; MORAIS JR, M. A.; SIMÕES D. A.. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting, p. 13-23, 2005.
65. SIPSAS, V.; KOLOKYTHAS, G.; KOURKOUTAS, Y.; PLESSAS, S.; NEDOVIC, V. A.; KANELLAKE, M. Comparative study of batch and continuous multi-stage fixed-bed tower (MFBT) bioreactor during wine-making using freeze-dried immobilized cells. **Journal of food engineering**, 90, p. 495-503, 2009.
66. SIQUEIRA, M. A. **Proposta de Otimização para Destilarias Autônomas**. Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos, p 33-38, maio/junho, 1993.
67. SOUZA, M. L. **Estudo e desenvolvimento de biorreatores de floculação**. (Tese Doutorado), Universidade do Porto, Porto, 1994.
68. SOUZA, M. A. C.; MUTTON, M. J. R. Floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciênc. Agrotec.**, v.28, n.4, p.893-898, 2004.
69. STAN, S.; DESPA, F. On the doublet formation in the flocculation process of the yeast cells. **Biosystems**, 57, p. 139-145, 2000.
70. STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. 215p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
71. STRATFORD, M. Yeast Flocculation: restructuring the theories in line with recent research. **Cerevisia**, 21, p. 38-45, 1996.
72. STREMEL, D. P. Desenvolvimento de Modelos Estruturados Alternativos para o Processo de Produção de Etanol. 283p., 2001.
73. STROPPA, C. T.; ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S. Caracterização das Leveduras Floculantes Seleccionadas em Reator Tipo Torre em uma Unidade de Fermentação Alcoólica. In: SINAIFERM, 2003, Florianópolis. XIV SINAIFERM, 2003.
74. TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; SOUSA, M.; SIL, C. Cell wall surface properties and flocculence of a *Kluyveromyces marxianus* strain. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, 5, p. 197-203, 1995.

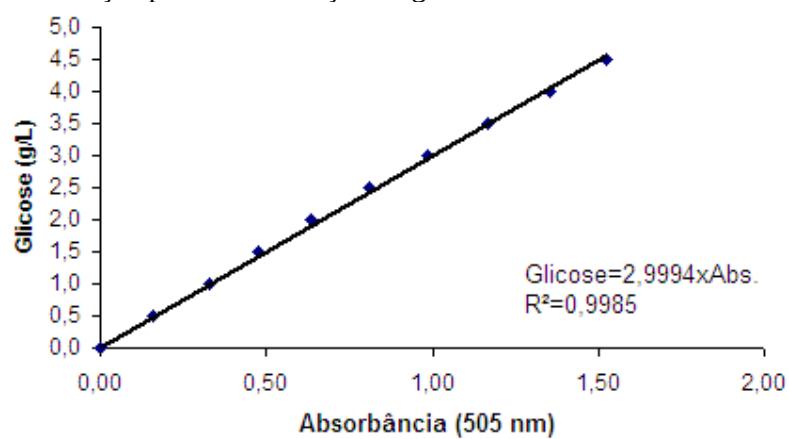
75. THATIPAMALA, R.; ROHAI, S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibition on the kinetics in biomass and products yields during ethanol batch fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**; v. 40, n.2, p. 289-297, 1992.
76. TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Dissertação (Mestrado), 147 p., 2002.
77. TOSETTO, G. M.; ANDRIETTA, S. R. Influência da matéria prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. Apresentado no VII Seminar on Enzymatic Hydrolysis of Biomass – SHEB, Maringá, 2002.
78. UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar RODRIGUES. **O etanol e os desafios do mercado interno**. Disponível em <
<http://www.unica.com.br/opiniao/show.asp?msgCode=%7B653FC86C-D21E455A-BFFF-5299131A1680%7D>>. Acesso em 06/maio/2009.
79. VASCONCELOS, J. N., PINTO, V. C., SILVA, R. A. Fermentação Alcoólica Industrial: **Modelagem e simulação do Processo Descontínuo Alimentado**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 1992, Salvador-BA. Anais do IX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. São Paulo: ABEQ, 2, p. 403-410, 1992.
80. VIEGAS, M. C. **Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 150p., 2003.
81. VIEGAS, M. C.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R. Use of tower reactors for continuous ethanol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2, 167–173, 2002.
82. VILLEN, R. A. Mauá: Biotecnologia – Histórico e Tendências. Escola de Engenharia de Mauá. Apostila, 2009.
83. WANG, B.; GE, X. M.; LI, N.; BAI, F. W. Continuous ethanol fermentation coupled with recycling of yeast flocs. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 816-820, 2006.
84. WENDHAUSEN, R.; FREGONESI, A.; MORAN, P. J. S.; JOEKES, I.; RODRIGUES, J. A. R.; TONELLA, E.; ALTHOFF, K. Continuous fermentation of sugar cane syrup using immobilized yeast cells. **J. Biosc. Bioeng.** 91 (1), 48-52, 2001.
85. WIECZOREK, A.; MICHALSKI, H. Continuous ethanol production by flocculating yeast in a fluidized bed bioreactor. **FEMS Microbiol Rev.** 14: p. 69-74, 1994.

86. XU, T. J.; ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 634 – 640, 2005.
87. ZARPELLON, F.; ANDRIETTA, S. R. **Fermentação Contínua para Produção de Álcool**. STAB Açúcar e Álcool e Subprodutos, p. 23-28, 1992.

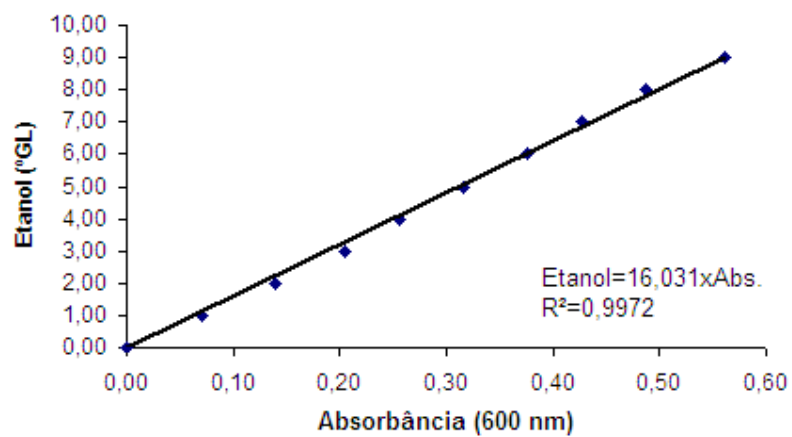
APÊNDICE A

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

A.1 - Curva de calibração para concentração de glicose



A.2 - Curva de calibração para concentração de etanol



A.3 – Curva de calibração para concentração celular

