UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM CÉLULAS IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO

PATRÍCIA TAVARES CORDEIRO

Uberlândia
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM CÉLULAS IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO

Patrícia Tavares Cordeiro

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro
Luís Cláudio Oliveira Lopes

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

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C794e Cordeiro, Patrícia Tavares, 1983-
Estudo cinético da fermentação alcoólica com células imobilizadas em alginato de cálcio / Patrícia Tavares Cordeiro. - 2009.
96 f. : il.

Orientadores: Eloízio Júlio Ribeiro e Luís Cláudio Oliveira Lopes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Álcool - Teses. 2. Cinética química - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Júlio. II. Lopes, Luís Cláudio Oliveira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 663.52

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

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 TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 30 DE ABRIL DE 2008.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Luís Cláudio Oliveira Lopes
Co-Orientador (PPGEQ/UFU)

Prof. Drª. Mírian Maria de Resende
PPGEQ/UFU

Prof. Dr. Jonas Contiero
UNESP/RIO CLARO-SP

AGRADECIMENTOS

A vida é constituída de etapas e hoje me vejo completando mais uma delas, mas essa conquista não seria possível se não fosse o apoio, a dedicação, o carinho a presença e a atenção de diversas pessoas. Gostaria de manifestar minha gratidão.

Agradeço a **Deus** o fundamento fundante do meu ser, pela sua força, sua presença, enfim o ser que tanto edifica o meu eu.

Ao meu marido **Igor** por seu carinho, compreensão, dedicação, paciência, enfim seu amor, sou grata por cada dia a meu lado, dando-me forças e sendo meu colo nos dias de cansaço, me ensinando que a vida é feita de pequenos momentos. Obrigado por tudo, te amo muito.

Aos meus pais **Cido** e **Cida** por todo amor, empenho e dedicação, pois esse mestrado é fruto do árduo trabalho de meu pai e minha mãe, que sempre me proporcionaram a oportunidade de estudar, não deixando faltar nada em minha vida escolar. Pais brilhantes que me doaram além de tudo seu próprio ser.

As minhas irmãs **Paula** e **Pámela** alegria do meu viver, sorriso nos meus dias tristes, felicidade em minhas lágrimas, graça e risadas que me ajudaram a enfrentar todas as dificuldades e dores da vida.

Ao prof. Dr. Eloízio por seu carinho, empenho dedicação e paciência, no desenvolvimento dos trabalhos, me ensinando cada passo no laboratório, cada detalhe, um mestre inesquecível.

Ao prof. Dr. Luis Cláudio, que com paciência me ensinou a arte dos modelos matemáticos, obrigado pelo carinho e atenção.

A prof. Dra. Miriam pelo socorro nos momentos de confusão, sendo o auxílio em todos os momentos de caos.

À Doutoranda Patrícia Carolina pela companhia, carinho e amizade.

À Graduanda Larissa Nayhara por toda ajuda no laboratório, por toda atenção e dedicação, sendo o auxílio em todos os momentos.

Á todos os alunos da pós-graduação que tanto me auxiliaram, ajudaram e por todo carinho e dedicação.

À empresa Maury do Brasil pela doação das leveduras utilizadas nos ensaios de laboratório.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

"A presença dos sonhos transforma os miseráveis em reis, e a ausência dos sonhos transforma milionários em mendigos. A presença dos sonhos faz idosos, jovens e a ausência de sonhos faz dos jovens, idosos."

Augusto Cury

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS ..... **xi**
LISTA DE TABELAS ..... **xiii**
LISTA DE SÍMBOLOS ..... **xv**
RESUMO ..... **xvii**
ABSTRACT ..... **xix**
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO **1**
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **5**
2.1 – PERFIL DA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL NO BRASIL 5
2.2 – PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA 10
2.2.1 – *Caracterísiticas bioquímicas da fermentação* 10
2.3 – LEVEDURAS 12
2.4 – TIPOS DE FERMENTAÇÕES ALCOOLICAS 12
2.4.1 – Batelada 13
2.4.2 – Batelada Alimentada. 14
2.4.3 –Contínua. 14
2.5 – BIOPROCESSOS COM CÉLULAS IMOBILIZADAS 15
2.5.1 – Imobilização celular 15
2.5.2- Exemplos de processos de fermentação alcoólica utilizando células imobilizadas 21
2.6- CINÉTICA DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS 24
2.6.1- Parâmetros Cinéticos da fermentação 27
CAPÍTULO 3- MATERIAIS E MÉTODOS **29**
3.1- MICRORGANISMO 29
3.2- PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA 29
3.3- MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS 30
3.3.1- Métodos Analíticos 30
3.3.2- Procedimentos Experimentais 31
3.4- REATORES UTILIZADOS 33
3.4.1- Fermentação em erlenmeyers agitados 33
3.4.2- Reator contínuo tipo coluna de escoamento ascendente 33
3.4.3- Reator contínuo tipo coluna de escoamento ascendente com saída para CO2 34
3.4.4- Reator batelada simples 35
3.4.5- Reator batelada modificado 35
3.5- CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE IMOBILIZAÇÃO 37
3.6 – EXPERIMENTOS PARA ESTUDOS CINÉTICOS 38
3.7- MODELAGEM MATEMÁTICA 39
3.7.1- Método da Evolução diferencial 39
CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÕES **43**
4.1- ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO 43
4.2- ESTUDO DOS REATORES 45
4.2.1 – Fermentações em shaker 45

4.2.2- Reator contínuo tipo coluna de escoamento ascendente 46
4.2.3 - Reator contínuo tipo coluna de escoamento ascendente com saída para CO2 47
4.2.4- Reator batelada simples 48
4.2.5- Reator batelada modificado 49
4.3- ESTUDO DA INFLUÊNCIA SIMULTÂNEA DAS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE LEVEDURA E DE GLICOSE NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO 51
4.4- ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO 65
4.5- CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO COM LEVEDURA IMOBILIZADA 67
CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES 79
CAPÍTULO 6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83
APÊNDICE A 89

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 01 – INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 02 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 2.1: Perfil da produção de carros flex e da venda mensal de álcool hidratado de Janeiro 2003 a Outubro de 2007. (Fonte UNICA)..... 7
Figura 2.2: Evolução da produção de Etanol, de 2002 até 2007. (FONTE: PETROBRAS, 2007)..... 9
Figura 2.3: Métodos básicos de imobilização celular. Adaptado de Kourkoutas et al. (2004)..... 18
Figura 2.4: Foto de alga marrom..... 18
Figura 2.5– Estrutura química do alginato – G é o grupo ácido gulurônico e M é o grupo ácido manurônico (LEONARD *et al.*, 2004)..... 19
Figura 2.6- Esquema da formação do gel de alginato de cálcio..... 19
Figura 2.7 – Modelo "egg-box" para o processo de gelação do alginato com íons cálcio (CERF *et al.*, 2004, BAJPAI e SHARMA, 2004)..... 20

CAPÍTULO 03 – MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 3.1: Foto do sistema utilizado para a imobilização de *Saccharomyces cerevisae* em alginato de sódio..... 32
Figura 3.2 - Esquema do processo utilizando um reator tubular de leito fluidizado..... 33
Figura 3.3 - Esquema do processo utilizando um reator tubular de leito fluidizado com saída para CO_2..... 34
Figura 3.4- Esquema do processo utilizando um reator Batelada convencional com agitação mecânica e banho termostático para controle da temperatura..... 35
Figura 3.5- Esquema do processo utilizando um reator Batelada com placa da acrílico desenvolvido durante o presente trabalho..... 36
Figura 3.6: Foto do reator final utilizado nas fermentações..... 37

CAPÍTULO 04 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Figura 4.1- *Pellets Saccharomyces cerevisae* imobilizada em alginato de sódio a 3%..... 43
Figura 4.2- Distribuição do tamanho dos pellets..... 44
Figura 4.3: Fermentação do processo Batelada convencional interrompido devido a flutuação dos pellets..... 49
Figura 4.4- Reator utilizado no processo batelada com placa perfurada..... 50
Figura 4.5: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 1, S_0 = 52,0 g/L e X_0 = 29,0 g/L..... 52
Figura 4.6: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 2, S_0 = 105,0 g/L e X_0 = 29,0 g/L..... 52
Figura 4.7: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 3, S_0 = 52,0 g/L e X_0 = 43,0 g/L..... 53
Figura 4.8: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 4, S_0 = 105,0 g/L e X_0 = 43,0 g/L..... 53
Figura 4.9: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 5, S_0 = 30,5,0 g/L e X_0 = 36,0 g/L..... 54
Figura 4.10: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 6, S_0 = 148,5 g/L e X_0 = 36,0 g/L..... 54
Figura 4.11: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 7, S_0 = 78,5 g/L e X_0 = 17,0 g/L..... 55
Figura 4.12: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 8, S_0 = 78,5 g/L e X_0 = 60,8 g/L..... 55
Figura 4.13: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 9, S_0 = 78,5 g/L e X_0 = 36,0 g/L..... 56
Figura 4.14: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 10, S_0 = 78,5 g/L e X_0 = 36,0 g/L..... 56
Figura 4.15: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 11, S_0 = 78,5 g/L e X_0 = 36,0 g/L..... 57
Figura 4.16: Superfície de resposta para X_{meio} (g/L)..... 59

Figura 4.17: Superfície de resposta obtida para o X_{pellet} (g/L)..... 60
Figura 4.18: Superfície de resposta a produtividade(g/L*h)..... 62
Figura 4.19: Superfície de resposta obtida para o PCC tendo como resposta o rendimento da fermentação no tempo de 7 horas..... 63
Figura 4.20: Perfis de S e P em fermentação com células imobilizadas com S_0= 110 g/L e X_0= 36 g/L..... 63
Figura 4.21: Perfis de S e P em fermentação com células imobilizadas, com S_0= 65,0 g/L e X_0= 8,1 g/L, desenvolvida por Batista (2005) 63
Figura 4.22: Perfil de células livres em fermentação com células imobilizadas com S_0= 110 g/L e X_0= 36 g/L..... 64
Figura 4.23: Perfil de células livres em fermentação com células imobilizadas, com S_0= 65,0 g/L e X_0= 8,1 g/L, desenvolvida por Batista (2005)..... 64
Figura 4.24: Perfil de X_{pellet} em fermentação com células imobilizadas com S_0= 110 g/L e X_0= 36 g/L..... 64
Figura 4.25: Perfil de X_{pellet} em fermentação com células imobilizadas, com S_0= 65,0 g/L e X_0= 8,1 g/L, desenvolvida por Batista (2005)..... 64
Figura 4.26: Perfil da produtividade em fermentação com células imobilizadas com S_0= 110 g/L e X_0= 36 g/L..... 64
Figura 4.27: Fermentação com células imobilizadas, com S_0= 65,0 g/L e X_0= 8,1 g/L, desenvolvida por Batista (2005)..... 64
Figura 4.28 – Análise da eficiência de imobilização dada pela razão existente entre células livres no meio e células imobilizadas..... 66
Figura 4.29 : Acompanhamento do processo de fermentação alcoólica de t=0 a t=7 horas, S_0= 52g/L; Xo= 29 g/L..... 67
Figura 4.30: Perfil da concentração de substrato em função do tempo, para concentração de células X_0= 36g/L..... 68
Figura 4.31: Perfil da concentração de produto em função do tempo, para concentração de substrato variável e concentração de células X_0=36 g/L..... 68
Figura 4.32: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=30,5g/L..... 69
Figura 4.33: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=78,5g/L..... 69
Figura 4.34 : Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=110g/L..... 69
Figura 4.35: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=148,5g/L..... 69
Figura 4.36: Comportamento dos perfis do modelo de Monod com dados de validação para S_0=55 g/L. 70
Figura 4.37: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=30,5g/L..... 71
Figura 4.38: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=78,5g/L..... 71
Figura 4.39: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=110g/L..... 71
Figura 4.40: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=148,5g/L..... 71
Figura 4.41: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=30,5g/L , levando em consideração o volume total do reator..... 72
Figura 4.42: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=78,5g/L, levando em consideração o volume total do reator. 72
Figura 4.43: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=110g/L, levando em consideração o volume total do reator. 73
Figura 4.44: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=148,5g/L, levando em consideração o volume total do reator. 73
Figura 4.45: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=30,5g/L , levando em consideração o volume total do reator..... 74
Figura 4.46: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=78,5g/L, levando em consideração o volume total do reator..... 74
Figura 4.47: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=110g/L, levando em consideração o volume total do reator..... 74
Figura 4.48: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=148,5g/L, levando em consideração o volume total do reator..... 74
Figura 4.49: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Levenspiel para S_0=30,5 g/L. 75
Figura 4.50: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Levenspiel para S_0=148,5g/L..... 75
Figura 4.51: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Levenspiel para S_0=78,5 g/L. 76
Figura 4.52: Comparação de perfis para S_0=148,5g/L com modelo de Levenspiel ajustado com todos experimentos..... 76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01 – INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 02 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2.1 – Propriedades físicas e aparência dos pellets imobilizados de *Saccharomyces Cerevisae* 23
Tabela 2.2: Modelos cinéticos segundo BIROL (1998)..... 25

CAPÍTULO 03 – MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 3.1 – Meio de cultura (FERREIRA 2003)..... 29
Tabela 3.2 – Níveis escolhidos para o planejamento composto central..... 37
Tabela 3.3 - Matriz experimental do planejamento composto central (PCC)..... 38
Tabela 3.4 - Dados utilizados no estudo cinético da fermentação alcoólica..... 39

CAPÍTULO 04 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tabela 4.1 – Análise das amostras de pellets..... 44
Tabela 4.2: Ensaios e respostas utilizados para o estudo do planejamento composto central..... 51
Tabela 4.4: Valores dos parâmetros ajustados para Modelo proposto por Monod..... 70
Tabela 4.5: Valores dos parâmetros ajustados para Modelo proposto por Hinshelwood 71
Tabela 4.6: Valores dos parâmetros ajustados para o modelo de Monod, levando-se em consideração o volume total do reator..... 72
Tabela 4.7: Valores dos parâmetros ajustados para o modelo proposto por Hinshelwood levando em consideração o volume total do reator..... 73
Tabela 4.8: Valores dos parâmetros ajustados para o modelo proposto por Levenspiel com inibição pela células..... 76

LISTA DE SÍMBOLOS

X_0	CONCENTRAÇÃO INICIAL DE CÉLULAS NA IMOBILIZAÇÃO (G/L)
S_0	CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO (G/L)
μ_{MAX}	VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA (H^{-1})
Q_{MAX}	
S	CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO (G/L)
X	CONCENTRAÇÃO CELULAR (G/L)
K_S	PARÂMETRO DA EQUAÇÃO DE MONOD (G/L)
V_R	VOLUME DO REATOR (L)
K_{SX}, K_{SP}, N, K_{IP}, $K_{IS,}$ K_{IPX}	PARÂMETROS CINÉTICOS
$Y_{X/S}$	RENDIMENTO DE SUBSTRATO EM BIOMASSA (G SUBSTRATO/G CÉLULAS)
$Y_{X/P}$	RENDIMENTO DO PRODUTO EM BIOMASSA(G PRODUTO/G CÉLULAS)
$Y_{P/S}$	RENDIMENTO DE SUBSTRATO EM PRODUTO (G SUBSTRATO/G PRODUTO)
PR	PRODUTIVIDADE (G/L*H)
V_{PELLET}	VOLUME DE *PELLET* NO INTERIOR DO REATOR (ML)
REND	RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO
$X_{DPELLET}$	CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS DILUÍDA, LEVANDO EM CONTA O VOLUME TOTAL DO REATOR (G/L)
RPM	ROTAÇÃO POR MINUTO

RESUMO

O estudo dos processos de fermentação alcoólica tem ganhado destaque nos últimos anos e a cada dia tem crescido a necessidade de otimizar o processo, produzindo cada vez mais e melhor, de forma a garantir um aumento na produção. Os processos tradicionais de fermentação alcoólica que utilizam as células de levedura livres no meio de fermentação, tanto batelada, batelada alimentada quanto contínuo, possuem algumas desvantagens, tais como a necessidade de se inocular um número elevado de células e de um processo para separação das mesmas após a fermentação. Já a técnica utilizando células imobilizadas possibilita a operação sem a necessidade da etapa de separação de células após a fermentação, possibilita a obtenção de elevadas concentrações celulares por unidade de volume de reator, facilita a reutilização dos biocatalisadores, minimiza os tempos mortos além de conferir maior estabilidade às células. O presente trabalho teve como objetivo estudar a cinética da produção de álcool a partir de células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de sódio. Foram realizados testes a fim de verificar a estabilidade dos *pellets* obtidos utilizando alginato de sódio na concentração de 3% e 2%, sendo que aqueles na maior concentração foram mais estáveis. O tratamento dos *pellets* com $Al(NO_3)_3$ aumentou a estabilidade dos mesmos em relação à ruptura. Foi proposta uma nova configuração de reator que consistiu de um reator de mistura operado em batelada, dotado de uma placa perfurada localizada no centro do reator, cuja finalidade foi impedir a flutuação dos *pellets* de células imobilizadas durante o processo fermentativo. Para o estudo cinético foram testados diversos modelos visando descrever os perfis das concentrações de substrato e produto no reator e de células no interior dos *pellet* e no meio líquido. Os modelos cinéticos de Monod, Hinshelwood e Levenspiel foram os mais apropriados para a descrição do processo de produção de etanol utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato, sendo que os parâmetros cinéticos determinados para os três modelos se mostraram adequados para simular os resultados de todos os experimentos realizados

Palavras Chaves: *Saccharomyces cerevisiae,* fermentação alcoólica, imobilização de microrganismos, cinética da fermentação alcoólica.

ABSTRACT

The study of alcoholic fermentation processes has gained prominence in recent years and at each day has increased the need to optimize the fermentation process, producing more and better to ensure an increase in alcohol production. Traditional processes of alcoholic fermentation using free yeast cells in the fermentation medium in a batch, fed-batch or continuous operation have drawbacks, such as the need to inoculate a large number of cells and to include a process for cells separation after the fermentation. On the other hand, processes using immobilized cells allow the operation without the need of a cell separation step after the fermentation, make possible to obtain high cell concentration per unit volume of the reactor, facilitate the biocatalysts reuse, and minimize the dead time besides giving a larger stability of cells. This study aimed to investigate the kinetics of the alcohol production using cells of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in sodium alginate. Tests were conducted to verify the stability of pellets obtained by using sodium alginate at concentrations of 3% and 2%. Pellets at the highest used concentration were found more stable to collapse. The treatment of the pellets with $Al(NO_3)_3$ increased further their stability against collapse. It was proposed a new bioreactor configuration that consisted of a batch stirred reactor with a perforated plate located in the center of the reactor, whose purpose was to prevent pellets fluctuation during the fermentation process. Several kinetic models were tested aiming at describing the substrate, product, and free cell concentration profiles in the bioreactor bulk and immobilized cells concentration profile into the pellets. The kinetic models of Monod, Hinshelwood, and Levenspiel were the most appropriate to describe the process of producing ethanol using cells of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in sodium alginate, and the kinetics parameters determined for the three models were suitable to represent the results for all conducted experiments.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae,* alcoholic fermentation, cells immobilization, kinetics.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O álcool é um dos biocombustiveis que merece especial atenção e tem ganho posição estratégica na economia. Ele é um produto renovável e limpo que contribui para a redução do efeito estufa e diminui substancialmente a poluição do ar, minimizando os seus impactos na saúde pública. No Brasil, o uso intenso do álcool restringe a emissão de poluentes da crescente frota de veículos, principalmente de monóxido de carbono, óxidos de enxofre, compostos orgânicos tóxicos como o benzeno e compostos de chumbo (UNICA,2006).

No Brasil a matéria prima principal para a produção do etanol é a cana-de-açúcar e os processos para a produção de etanol a partir de cana são bem documentados e discutidos na literatura. Já nos Estados Unidos e Europa, o etanol é obtido a partir de milho e fontes que podem servir de matéria-prima barata e renovável (LIMA, 2002), mas do ponto de vista econômico, este produto custa até o triplo do preço do etanol brasileiro, embora seja beneficiado pelo governo americano pelos subsídios para se tornar competitivo.

O processo básico utilizado na produção de etanol é a fermentação, uma técnica de produção dominada pelo Brasil. Recentemente, a fermentação tem emergido como uma tecnologia fundamental e vital, como uma força integrante da biotecnologia moderna (PANTOJA, 2006)

Em geral o processo de fermentação alcoólica é conduzido por leveduras, que fermentam açúcares, objetivando a produção de energia que será empregada em suas atividades fisiológicas, no seu crescimento e na sua reprodução, sendo portanto o etanol um subproduto resultante do processo fermentativo.

Existem diversas maneiras de se conduzir a fermentação alcoólica, podendo ser operada de forma descontínua, com um inóculo por tanque ou por sistema de cortes, semi-contínua, descontínua alimentada ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação de células (SHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001). No Brasil, a produção de etanol em grandes volumes, para uso como combustível é realizada por processo operado em batelada alimentada ou por processo contínuo, com reciclo de creme de levedura separado por centrífugas do vinho fermentado.

Diante dos processos já conhecidos surge também o processo de fermentação alcoólica com células imobilizadas. Segundo Freeman e Lily (1998), citados por Carvalho (2000), a imobilização de células viáveis possui grande potencial para aplicações em conversões ou sínteses que envolvam sistemas multienzimáticos complexos, nos quais a presença de passos que requerem provisão de energia ou uso de cofatores seja comum, uma vez que a regeneração desses compostos ocorre de forma natural.

A tecnologia de imobilização microbiológica de células representa uma tendência nova em processos bioquímicos, e seu grande potencial está sendo reconhecido. Esta tecnologia é usada para produção de antibióticos, enzimas, álcool, produção ácida, no tratamento de água, sensores biológicos, entre outros.

Na fermentação alcoólica, o uso de leveduras imobilizadas permite o uso de altas concentrações celulares por unidade de volume do reator, dispensa o uso de centrífugas no final do processo de fermentação e permite operação contínua do reator. Pesquisas têm sido realizadas, tanto com leveduras floculantes ou autoimobilizáveis, como com leveduras imobilizadas.

As técnicas de imobilização de células tem sido aprimoradas e diversos suportes são utilizados, como polímeros sintéticos, gel de poliacrilamida, polipropileno, resinas epóxi, polissacarídeos naturais (alginato de sódio, k-carragena, pectina cítrica, agar), minerais (crisotila, alumina, terra diatomácea, rocha vulcânica, sílica porosa), vegetais (madeira, fibras de algodão, bagaço de cana), metais (aço inoxidável).

O aprisionamento de células em gel de alginato de sódio é a técnica mais amplamente utilizada para a imobilização de células viáveis. A gelificação do alginato ocorre rapidamente na presença de íons de cálcio sem alterações drásticas na temperatura, pH e pressão osmótica, o que permite preservar a atividade e a viabilidade dos microrganismos imobilizados. Além disso, o alginato é um material barato e facilmente encontrado (BATISTA *et al*. 1999).

Estudos envolvendo a cinética do processo de fermentação alcoólica por levedura imobilizada são escassos na literatura, especialmente no que se refere aos *pellets* de célula imobilizada.

Assim, este trabalho apresentou como objetivo principal estudar a cinética da fermentação alcoólica por células de levedura imobilizadas em *pellets* de gel de alginato de cálcio. Como objetivos específicos deste trabalho podem ser citados:

- Analisar a influência das concentrações iniciais de células de levedura no processo de imobilização e a influência da concentração inicial de glicose no desempenho das células imobilizadas.

- Analisar diferentes configurações de reatores na estabilidade dos *pellets* de células imobilizadas.
- Testar a resistência dos pellets de alginato de cálcio utilizando uma levedura com alto desempenho na produção de etanol.
- Testar diferentes modelos cinéticos no processo de fermentação alcoólica por levedura imobilizada e determinar aquele que melhor descreve o processo.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Perfil da produção de álcool no Brasil

Um novo paradigma mundial tem sido criado, o domínio energético do petróleo está acabando e uma nova era vem surgindo, a dos combustíveis renováveis. Reservas que antigamente eram tidas como eternas, vem sendo exploradas, e diminuindo seu potencial a cada dia. Diante desse cenário, diversos combustíveis vem se destacando, como lenha, carvão vegetal, bio-etanol, óleo de dendê e o biodiesel (URQUIAGA *et al*., 2005).

Um dos biocombustiveis que merece especial atenção nessa nova tendência e tem ganhado posição estratégica na economia, é o etanol. Ele é um produto renovável e limpo que contribui para a redução do efeito estufa e diminui substancialmente a poluição do ar, minimizando os seus impactos na saúde pública. (UNICA,2006).

O principal processo utilizado para a fabricação industrial de álcool é chamado de fermentação. Desde o descobrimento do Brasil, as indústrias de açúcar e de álcool estão intimamente ligadas. No último quarto do século passado iniciou-se a produção de etanol no Brasil, com as sobras de melaço da indústria de açúcar, que ampliava sua capacidade produtiva (LIMA, *et al.,* 2001).

Em 1929 uma grande crise internacional colocou em xeque as economias de todos os países e, no Brasil, a indústria açucareira não ficou a salvo. Sobrava açúcar e cana e faltavam divisas para a aquisição de combustível líquido. Em 1931, momento em que a destilaria de álcool anidro já estava instalada, o governo federal estabeleceu a obrigatoriedade da mistura de 5% de etanol à gasolina (Decreto 19.171) como medida de economia na importação de combustível e para amparar a lavoura canavieira. Por muitos anos não houve álcool suficiente para misturar a todo o combustível consumido. Durante a guerra de 1939 a 1945, faltou gasolina e fez-se necessário substituí-la por gasogênio ou álcool. Terminada a guerra, voltou a importação de gasolina e o combustível alternativo perdeu sua importância. Entretanto, continuou-se a misturar o etanol à gasolina em larga escala (LIMA, *et al.,* 2001).

Devido à guerra do oriente médio na década de 70, o preço do barril de petróleo elevou-se causando uma crise energética mundial. A partir daí, como alternativa, o governo brasileiro

implantou o Pró Álcool (Programa Nacional de Álcool), ou seja, um programa de substituição em larga escala dos combustíveis veiculares derivados de petróleo por álcool. O programa era dirigido por uma política energética clara e com objetivos definidos, que possibilitou ao país, uma evolução técnica deste setor, no qual todos os estágios da tecnologia e da produção industrial são dominados.

O Brasil tornou-se, a partir deste momento, o primeiro país do mundo a desenvolver um programa de substituição da gasolina como combustível em larga escala. A utilização do etanol demonstrou ser uma opção viável para países carentes em reservas petrolíferas e com grandes extensões territoriais diminuindo assim a dependência dos mesmos de paises do Oriente Médio, e também economizar divisas, reduzir a disparidade de renda, promover o crescimento da renda interna e expandir a produção de bens de capital.

A partir da implantação do Pró Álcool o Brasil aumentou a capacidade dos equipamentos e dos rendimentos, possibilitou maior aproveitamento de produtos e subprodutos da cana-de-açúcar, além do fato da usina de açúcar e álcool ganhar a definição de uma unidade produtora de energia e alimentos, sendo que existem usinas que já oferecem produtos como: grãos, sementes de soja, açúcar, açúcar líquido, álcool hidratado, álcool anidro, óleo fúsel, bagaço, metano, eletricidade.

Estudos realizados por Ferreira (2003) mostram que a produção de etanol por via biotecnológica tem respondido positivamente a estímulos externos, tanto governamentais, agora escassos, como os provenientes do mercado de combustíveis. O custo de produção tem diminuído, fato marcante no mercado de energia, no qual quase todos os custos são crescentes. Estudos mostram que há bastante espaço para o crescimento, tanto da produtividade da lavoura quanto da indústria, com a diminuição do custo de produção.

Um fato também marcante no desenvolvimento da indústria é que desde março de 2003, as cidades brasileiras estão recebendo novos automóveis. Sua originalidade não está nos modelos das montadoras e sim nos motores que os movem, funcionando com alto desempenho tanto com etanol hidratado, com gasolina ou com qualquer mistura desses combustíveis (UNICA, 2006).

No Brasil, a existência do carro a álcool inibiu por muito tempo a prática desse novo conceito de carros bicombustíveis. Mas o definitivo ingresso do setor sucroalcooleiro no regime de livre mercado selou o destino da nova tecnologia, incorporando a evidência de que o álcool, *commodity* agrícola de produção sazonal, está sujeita à volatilidades na oferta e no preço. Além disso, em tempos de permanente e acirrada competitividade internacional entre os fabricantes de veículos automotores, o Brasil destaca-se como único país do planeta em

que o "flex fuel" pode ser testado e comercializado em larga escala para qualquer perfil econômico de uso dos dois combustíveis (UNICA, 2006).

A frota brasileira de veículos leves e automóveis de passeio é estimada em 21,28 milhões de unidades em 2006. Já a frota de veículos leves e automóveis movidos a álcool e bicombustíveis, no acumulado de 2000 a 2005, atingiu o volume de 2,91 milhões de unidades, o que representa 13,7% do total. A produção de veículos bicombustível alcançou o total de 659.167 unidades no período de janeiro a junho de 2006. Este volume, somado ao acumulado de 2000-2005, resulta no total de 3,579 milhões de unidades ou 15,9% do total. Em 2006, de janeiro a setembro, foram licenciados 994,36 mil carros flex, ou seja, 76,8% do total comercializado no período (IEA, 2006).

Em setembro de 2007, foram licenciados 120.298 carros flex, representando 79,6% do total de veículos leves, de acordo com levantamento da Anfavea – Associação Nacional dos Fabricantes dos Veículos Automotores.

Pode-se observar na Figura 2.1 a evolução na produção de automóveis flex desde janeiro de 2003 a outubro de 2007.

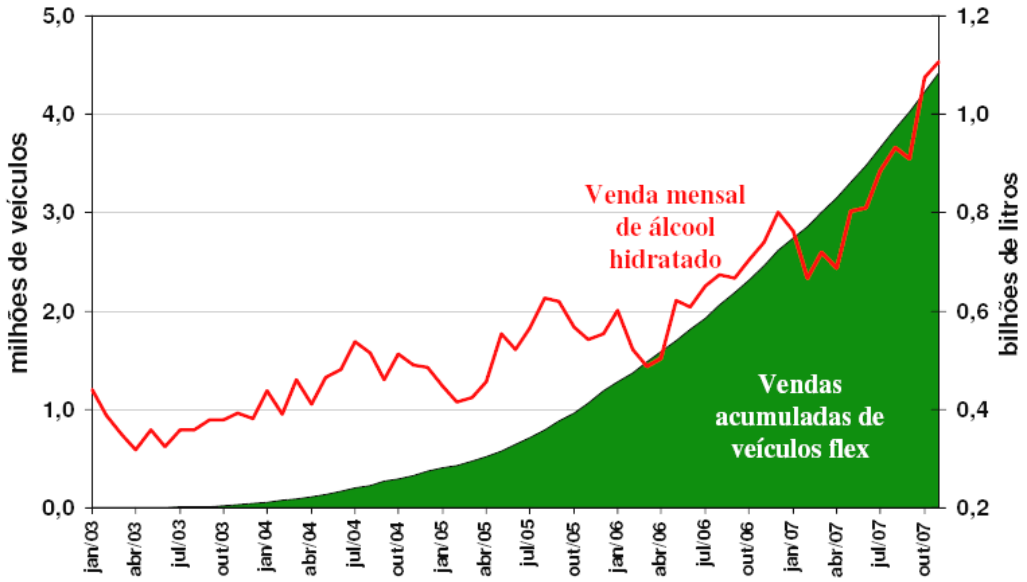


Figura 2.1: Perfil da produção de carros flex e da venda mensal de álcool hidratado de Janeiro 2003 a Outubro de 2007. (Fonte UNICA 2006)

A Anfavea estima que três milhões de veículos bicombustíveis já estejam rodando no Brasil e prevê que até 2013 esse número deva saltar para 15 milhões, o equivalente a 52% do total da frota nacional, calculada em 29 milhões

Outra alternativa criada pelos órgãos governamentais e pelas conferências realizadas nos últimos anos, como a Conferência da Terra do Rio de Janeiro – Rio 92, para a diminuição do uso do combustível fóssil é substituí-lo por fontes renováveis de energia (UNICA 2006).

Aí se concentra uma perspectiva histórica para a utilização do etanol combustível. E a exemplo do que ocorreu no Brasil, o indicador do caminho é a mistura a gasolina, que já promove uma redução significativa dos índices de poluição causados por automóveis (UNICA 2006).

Atualmente, há determinação legal no sentido de que toda gasolina brasileira contenha de 20 a 24% de álcool, com variação de mais ou menos 1%. A definição pontual cabe ao CIMA – Conselho Interministerial de Açúcar e Álcool e é feita de modo a equilibrar a relação entre oferta e consumo (UNICA, 2006). Esta mistura aumenta a octanagem do combustível e substitui o chumbo tetraetila, causador de severos danos sobre o meio ambiente (MAUGERI FILHO *et al*., 2001).

O álcool é um combustível com grande potencial a ser explorado tanto pelo Brasil, como por outros países. Precisa apenas ser melhor administrado nesta fase de transição, até que se consolidem novas tecnologias de uso de energia, como células a combustíveis, híbridos e solar, entre outros. Assim, o álcool continua importante nesse momento da história, por ser uma tecnologia amadurecida, com viabilidade econômica reconhecida. A expectativa é de demanda crescente por álcool em torno de 25 a 30 anos, até que sejam introduzidas novas tecnologias em energias limpas e viáveis do ponto de vista econômico (UNICA, 2006).

O processo industrial de produção de álcool no Brasil apresentou grande avanço de 1977 até 2005, conforme pode ser verificado pelos parâmetros apresentados a seguir (DEDINI, 2006):

- Rendimento da extração da sacarose da cana - aumentou de cerca de 80% para 98%;
- Rendimento agrícola, em termos de litros de álcool produzido por hectare de área de cana plantada - aumentou de 4620 L/ha para 7650 L/ha;
- Rendimento da fermentação - aumentou de 75 – 85% até 90 – 92%;
- Rendimento da destilação - aumentou de 95% para mais de 99%;
- Tempo de fermentação - diminuiu de cerca de 20 – 22 horas para 6 – 10horas.

Durante alguns anos a produção de álcool foi relegada a segundo plano pelo setor sucroalcooleiro, mas atualmente vive momento de grande euforia. A evolução da produção de etanol pelos maiores produtores mundiais é apresentada na Figura 2.2 (UNICA, 2008).

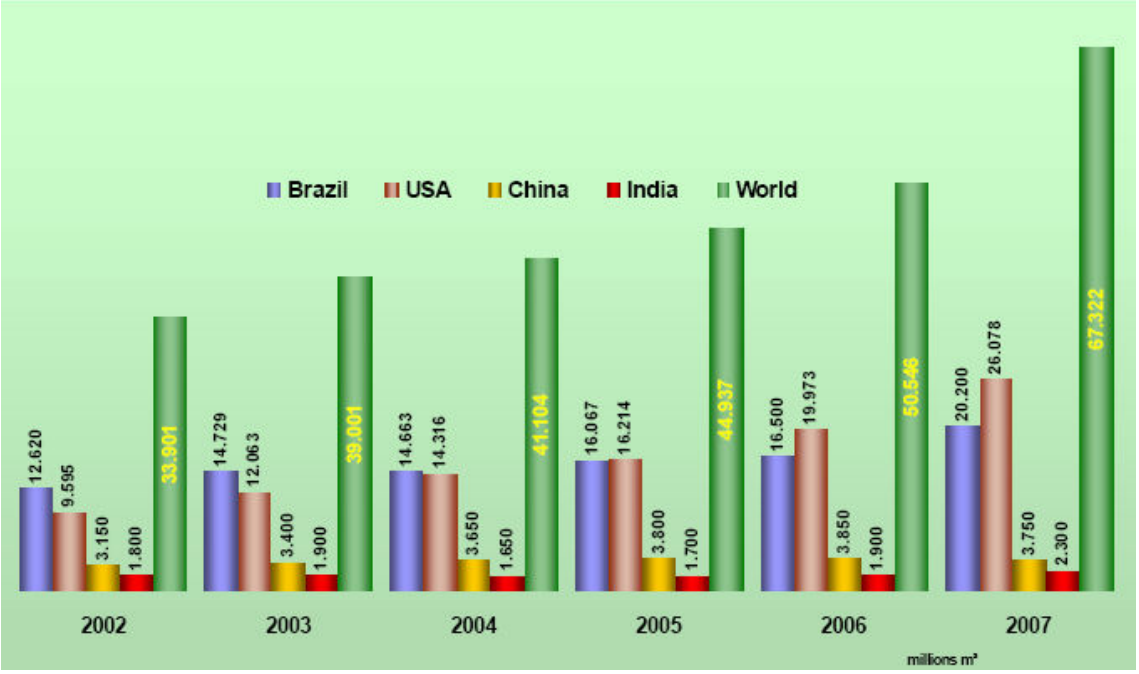


Figura 2.2: Evolução da produção de Etanol, de 2002 até 2007. (FONTE: PETROBRAS, 2007)

Pesquisas acadêmicas e industriais tem aprimorado e descoberto novas tecnologias de produção, de maior aproveitamento energético para a indústria de etanol, como o aproveitamento de materiais antes descartados como bagaço e palhas. Hoje tem se descoberto tecnologias como a de hidrólise ácida ou enzimática do bagaço que leva à quebra das moléculas de açúcares não fermentescíveis em açúcares fermentescíveis pelas leveduras.

O Brasil tem exportado etanol para vários países, tais como Estados Unidos, Índia, Japão e Suécia, e este mercado tende a aumentar, para uso em mistura à gasolina e para a fabricação de produtos petroquímicos, e como alternativa de substituição dos combustíveis não renováveis (Química e Derivados, 2006).

Processos para a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar são bem documentados e discutidos na literatura. Nos Estados Unidos e Europa, o etanol é obtido a partir de milho e outros amiláceos que podem servir como fonte de matéria-prima barata e renovável (LIMA, 2002), mas do ponto de vista econômico, este produto custa até o triplo do preço do etanol brasileiro, embora seja beneficiado pelo governo americano por meio de subsídios para se tornar competitivo.

2.2– Processos de fermentação alcoólica

O termo fermentação vem do latim "fervere", que significa ferver. A fermentação tem sido realizada como uma arte por muitos séculos, alguns historiadores afirmam que desde 1000 anos a.C, já se utilizava a técnica para a produção de vinho.

Por muitos anos a fermentação foi sinônimo de preservação de alimentos e bebidas, mas com pesquisas realizadas por Pasteur, há pouco mais de um século, foi demonstrado que a fermentação alcoólica era realizada por microorganismos na ausência de oxigênio. Somente em 1850 Pasteur concluiu que a transformação do açúcar a etanol dependia da existência de células vivas, as leveduras (PEREIRA Jr. e BU'LOCK, 1994).

Entende-se por fermentação alcoólica um conjunto de reações bioquímicas catalisadas por microorganismos, tais como as leveduras.

Com o decorrer do tempo, em função dos avanços das pesquisas na área de fermentações, houve a necessidade de se buscar novas tecnologias para obtenção de produtos de valor econômico. Recentemente, a fermentação tem emergido como uma tecnologia fundamental e vital, como uma força integrante da biotecnologia moderna (PANTOJA, 2006)

2.2.1- Características Bioquímicas da Fermentação

Na literatura a fermentação alcoólica já é um processo amplamente conhecido. Sabe-se que é um processo anaeróbico no qual ocorre a transformação de açúcares em etanol e CO_2 e outros subprodutos, pela utilização de catalisadores biológicos, ou seja, enzimas.

Em geral o processo é conduzido por leveduras, que fermentam a glicose objetivando a produção de energia, que será empregada em suas atividades fisiológicas, no seu crescimento e na sua reprodução. Portanto, o etanol é somente um subproduto resultante do processo fermentativo.

A fermentação pode ser representada pela equação de Gay-Lussac, na qual verifica-se que 1 mol de glicose; é capaz de produzir 2 moles de etanol e 2 moles de CO_2, e também 57 kcal de energia (LEHNINGER, 1995). Isso equivale a um rendimento teórico ($Y_{P/S}$) de glicose em etanol de 0,511 gramas de etanol por grama de glicose consumida (MAIORELLA, 1994).

Na prática, o rendimento teórico não é atingido devido a utilização de uma parte da glicose para a produção de glicerol e álcoois superiores, aldeídos, ésteres e acetatos_entre outros produtos, conhecidos como subprodutos da fermentação (OURA,1974; LURTON *et al.*, 1995).

Segundo Mamede & Pastore (2004) os álcoois superiores são oriundos do metabolismo de aminoácidos ou açúcares durante a fermentação alcoólica. Já o glicerol, um dos mais importantes subprodutos secundários da fermentação alcoólica é formado pela redução do fosfato dihidroxicetona. Este composto durante a fermentação tem como papel equilibrar o potencial de oxi-redução endocelular da levedura e ainda, atua como osmoregulador em resposta a altas pressões osmóticas da solução de açúcar na fermentação (BALLI et al., 2004).

Outro subproduto é o acetaldeído, um produto intermediário da fermentação, no entanto, em sua maior parte, é reduzido a etanol durante o processo fermentativo (ZOECHLEIN, *et al.*, 2001).

Outros subprodutos presentes na fermentação, segundo Mamede & Pastore (2004) são os ésteres, compostos formados a partir da reação de álcoois e acetil-CoA e etanol. Os ésteres também podem ser formados por simples reações químicas catalisadas por íons de hidrogênio, em que tal interação favorece o equilíbrio para ácido e álcool (ZOECKLEIN *et al.*, 2001).

Como existem diversas reações envolvidas no processo de fermentação, e envolvidas no metabolismo celular, alguns fatores interferem diretamente nos parâmetros cinéticos que definem as taxas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol, tais como pH, temperatura, pressão, concentração de reagentes e produtos da fermentação.

2.3- Leveduras

Leveduras são microorganismos que formam uma das classes mais importantes dos fungos, são organismos eucarióticos, formados por células pequenas, ovais, em geral com dois a oito micrômetros de diâmetro, que se reproduzem por brotamento ou gemulação. Essas gêmulas crescem até atingirem quase o tamanho da célula mãe, nesse momento ocorre a divisão celular, aparecendo então uma parede divisória ocasionando a separação celular.

A maior parte das leveduras tem a capacidade de se adaptar a ambientes com alto teor de açúcar, como néctar de flores e superfície de frutas. Sendo um organismo vivo independente, elas realizam a fermentação desses açúcares com o objetivo de conseguirem energia para a sua sobrevivência.

As leveduras mais utilizadas no processo de fermentação alcóolica são espécies originárias do gênero *Saccharomyces* sendo uma das principais a *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação alcóolica ocorre devido ao fato de que as células de levedura produzem a energia que lhes é necessária para sobreviver, por meio de dois fenômenos de degradação da

matéria orgânica: a respiração que necessita do oxigênio do ar ou a fermentação que ocorre na ausência de oxigênio do ar. A fermentação alcóolica corresponde a uma má utilização de energia. Assim, a levedura necessita transformar muito açúcar em álcool, para assegurar suas necessidades energéticas. Nessas condições a multiplicação da levedura é pequena; ao contrário, o rendimento da transformação do açúcar em álcool é grande, em relação ao peso da levedura. A composição exata do açúcar foi determinada por Gay-Lussac. É ainda de sua autoria a equação que descreve a fermentação alcoólica.

As leveduras foram os primeiros organismos descobertos capazes de crescer na ausência de oxigênio e segundo Takahashi (2002), a levedura Saccharomyces cerevisiae é o microrganismo mais freqüentemente utilizado na produção de etanol, embora não seja capaz de fermentar pentoses.

2.4- Tipos de processos de fermentação alcoólica

Existem diversas maneiras de se conduzir a fermentação alcoólica, podendo ser operada de forma descontínua, com um inóculo por tanque ou por sistema de cortes, semi-contínua, descontínua alimentada ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação de células (SHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

2.4.1- Batelada

Esse processo também é conhecido como processo descontínuo. Sua principal característica é a de que o mosto é misturado de uma só vez com o inóculo. Ou seja, prepara-se um certo volume de meio de cultura que seja adequado à nutrição e desenvolvimento do microrganismo, bem como o acúmulo do produto desejado; coloca-se este meio de cultura em um fermentador (ou dorna), adiciona-se o inóculo e aguarda que o processo ocorra. Após um determinado tempo de fermentação, retira-se o caldo fermentado do reator e executam-se as operações unitárias para a recuperação do produto e efetua-se a limpeza da dorna (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001)

Este processo é o mais seguro quando se tem problema de manutenção das condições de assepsia, pois ao final de cada batelada o reator pode ser esterilizado juntamente com o novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo, o qual poderá sofrer todos os controles necessários, a fim de assegurar a presença única do microorganismo responsável pelo

processo (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Além de menores riscos de contaminação, a operação em batelada apresenta grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para a fabricação de diversos produtos, a possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do microrganismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (CARVALHO; SATO, 2001b).

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

Na fermentação alcoólica utilizando grandes fermentadores este processo normalmente não é utilizado, uma vez que o tempo de enchimento do reator com mosto deve ser considerado.

2.4.2- Batelada alimentada

Os processos em batelada alimentada, também conhecidos como *Melle-Boinot*, têm se mostrado eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive nos de fermentação alcoólica. Além de menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, por permitir a utilização dos fermentadores para a fabricação de diferentes produtos, pela possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, pelo controle mais estreito da estabilidade genética do microrganismo e pela capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (CARVALHO e SATO, 2001a).

Basicamente, o processo descontinuo alimentado é uma técnica em processos microbianos onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos ali permanecem até o final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variável com o tempo, e a adição de mosto pode ser contínua ou intermitente. (CARVALHO; SATO, 2001b). É possível controlar a concentração de substrato no fermentador, devido a flexibilidade de utilização de diversas vazões de enchimento dos reatores.

2.4.3- Contínua

O processo de fermentação contínua caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante pela retirada contínua de caldo fermentado (FACCIOTTI, 2001).

As principais vantagens desse processo sobre o descontínuo são:

- menores equipamentos;
- maior capacidade de fermentação com os mesmos equipamentos;
- rendimento médio alto;
- tempo de paradas e fermentação minimizados;
- obtenção de caldo uniforme;
- menores gastos com mão de obra;
- maior facilidade no emprego de controles avançados.

Em contrapartida, o processo contínuo também apresenta algumas desvantagens:

- maior dificuldade de prevenção de infecção;
- possibilidade de ocorrência de mutações espontâneas;
- dificuldade de operações em estado estacionário

Para que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, condição onde as variáveis de estado (concentração de células, de substrato limitante e de produto) permanecem constante ao longo do tempo de operação do sistema, é necessário que o volume de líquido no reator seja mantido constante. Entretanto, para a manutenção do volume constante do reator a vazão de entrada (alimentação) e saída (retirada de meio) devem ser idênticas, o que na prática é quase impossível (FACCIOTTI, 2001).

A utilização de fermentação contínua implica numa redução de 57% no investimento de capital fixo nas destilarias quando comparado ao daquelas que usam batelada. (PORTO, 2006)

2.5 -Bioprocessos com células imobilizadas

2.5.1- Imobilização celular

Tem-se registrado na literatura inúmeros modelos de bioreatores para a produção biotecnológica de etanol e o mais empregado atualmente é o com células livres em batelada alimentada.

Segundo Freeman e Lily (1998), citados por Carvalho (2000), a imobilização de células viáveis possui grande potencial para aplicações em conversões ou sínteses que envolvam sistemas multienzimáticos complexos, nos quais a presença de passos que requerem provisão de energia ou uso de cofatores seja comum, uma vez que a regeneração desses compostos ocorre de forma natural.

A tecnologia de imobilização microbiológica de células representa uma tendência nova em processos bioquímicos, e seu grande potencial está sendo reconhecido. Está sendo usado para produção de antibióticos, enzimas, álcool, produção ácida, no tratamento de água, sensores biológicos, entre outros.

Os processos tradicionais possuem alguns incovenientes, um deles é a necessidade de se inocular um número elevado de células, com isso a imobilização se mostra uma alternativa eficiente, quando se trata deste problema. *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em crisotila (resíduo da indústria cerâmica) mostrou ser um excelente biocatalisador no processo de produção de etanol, aumentando o rendimento do processo em cerca de 26% em relação ao sistema com células livres, afirma Cassiola(2001). Brodelius e Vandamme (1987), citados por Carvalho (2000), afirmam que o uso de células imobilizadas em bioprocessos tem vantagens se comparado aos processos fermentativos tradicionais, tais como a utilização de densidades celulares mais altas por unidade de volume de reator, resultando num melhor rendimento e maior produtividade.

A tecnologia de imobilização ja é conhecida por mais de 25 anos. A imobilização celular é definida como um procedimento que confina fisicamente células íntegras e cataliticamente ativas num sistema reacional e impede que elas passem à fase móvel que contém substrato e produto (NUNEZ & LEMA, 1987)

A utilização dessa técnica tem sido recomendada, uma vez que possibilita a obtenção de elevadas concentrações celulares por unidade de volume do reator, maximiza a fração de meio fermentativo descarregada ao final de cada batelada, facilita a reutilização dos biocatalisadores, minimiza tempos “mortos” e custos de separação e confere maior estabilidade às células (CARVALHO, 2000).

Na propria natureza podemos identificar casos de imobilização, por exemplo, quando os microorganismos aderem a diferentes tipos de superfícies na natureza de maneira que fiquem próximos aos nutrientes que garantirão sua sobrevivência. Já industrialmente falando,

essas técnicas foram aprimoradas e diversos suportes são utilizados, como polímeros sintéticos, gel de poliacrilamida, polipropileno, resinas epóxi, polissacarídeos naturais (alginato de cálcio, k-carragena, pectina cítrica, agar) minerais (crisotila, alumina, terra diatomácea, rocha vulcânica, sílica porosa), vegetais (madeira, fibras de algodão, bagaço de cana), metais (aço inoxidável).

O aprisionamento em gel de alginato de sódio é a técnica mais amplamente utilizada para a imobilização de células viáveis. O alginato é um polissacarídeo presente em todas as "algas marrons", embora poucas espécies sejam comercialmente importantes (CARVALHO, 2000). A gelificação do alginato ocorre rapidamente na presença de íons de cálcio sem alterações drásticas na temperatura, pH e pressão osmótica, o que permite preservar a atividade e a viabilidade dos microrganismos imobilizados. Além disso, o alginato é um material barato e facilmente encontrado (BATISTA *et al*, 1999)

O método de aprisionamento em géis de alginato é extremamente econômico, sendo que somente 10 gramas de gel são requeridas para imobilizar 200 gramas de células em peso-seco (CORCORAN, 1985).

De acordo com Freeman e Lilly (1998) citado por Carvalho (2000), quando as células viáveis imobilizadas são expostas a um meio rico, o crescimento dependerá, inicialmente, das limitações difusionais impostas pela porosidade da matriz e, posteriormente, do impacto determinado pelo acúmulo da biomassa.

Orive *et al.* (2002) afirmam que a pureza do alginato também é um fator de biocompatibilidade de microesferas e tem uma influência direta no processo fermentativo. Outro fator importante que viabiliza a utilização da técnica de imobilização em alginato é a possibilidade do preparo de grandes quantidades de *pellets* de maneira fácil e relativamente rápida.

Quando as células são imobilizadas, o seu crescimento é afetado por fatores como o stress físico, limitação de nutrientes e acumulo de metabólitos tóxicos devido a limitação de transferência de massa.

Kourkoutas *et al.* (2004) citado por Pantoja (2006) mencionam que as técnicas de imobilização podem ser divididas em quatro grupos, levando em consideração os mecanismos físicos presentes no processo:

a-) **Junção ou absorção em superfície sólida:** é realizada por força eletrostática ou por ligação covalente entre a membrana da células e o carreador.

b-) **Aprisionamento em matriz porosa:** é baseado na inclusão de células dentro de um retículo rígido prevenindo a difusão celular para o meio.

c-) **Auto-agreação por floculação ou com agente de ligação:** consiste em um agregado celular que forma uma unidade maior de células com propriedades de sedimentar rapidamente.

d-) **Retenção por barreiras:** consiste no uso de membranas microporosas, no aprisionamento de células em uma microcápsula ou ainda, na imobilização de células por uma interação superficial de dois líquidos imiscíveis.

Na Figura 2.3, são apresentados exemplos das diferentes técnicas utilizadas para a imobilização celular.

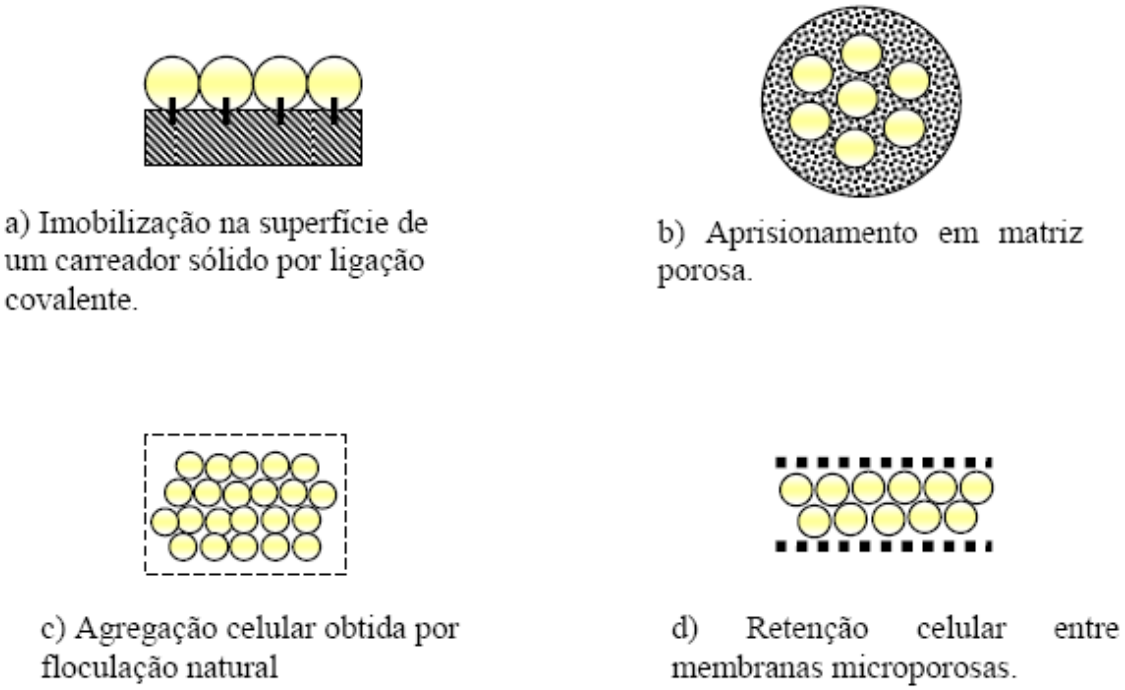


Figura 2.3: Métodos básicos de imobilização celular. Adaptado de Kourkoutas *et al*. (2004) citado por Pantoja (2006)

O alginato é um co-polimero natural formado por ácido manurônico e gulurônico, unidos por ligações glicosídicas, em várias proporções e arranjos. Ele é encontrado na natureza como constituinte de algumas algas marrons como *Laminaria hyperborea e L. Digitata* (SANCHEZ, 1995).

A Figura 2.4, é um exemplo de algas marrons, de onde são extraidos o alginato.

Figura 2.4: Foto de alga marrom.

O alginato de sódio é um hidrogel vastamente utilizado na indústria de alimentos como um espessador e em aplicações biotecnológicas, incluindo encapsulamento de células e proteínas. É um dos materiais mais utilizados para a imobilização de células e de enzimas. O alginato consiste dos resíduos de ligação 1,4- de β-D-manuronato (M) e α-L-guluronato (G). Um dos principais benefícios do seu uso é a sua não toxidade tanto para as células quanto para o meio o qual é empregado, ou seja, devido a essa característica é vastamente utilizada na industria de alimentos.

Sua estrutura molecular pode ser representada de acordo com a Figura 2.5.

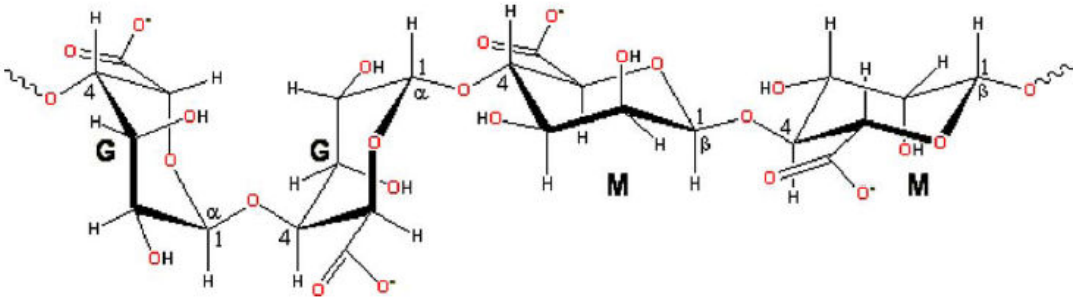


Figura 2.5– Estrutura química do alginato – G é o grupo ácido gulurônico e M é o grupo ácido manurônico (LEONARD *et al.*, 2004).

A gelificação do alginato é obtida principalmente pela troca dos íons de sódio presentes em sua estrutura por cátions divalentes como por exemplo o Ca^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} ou Mn^{2+}. Johansen & Flink (1986) e Martinsen *et al.* (1989), descrevem que a formação do gel se

dá por quelação de íons de Ca^{+} intercadeias, entre blocos de ácido gulurônico, como ilustra a Figura 2.6.

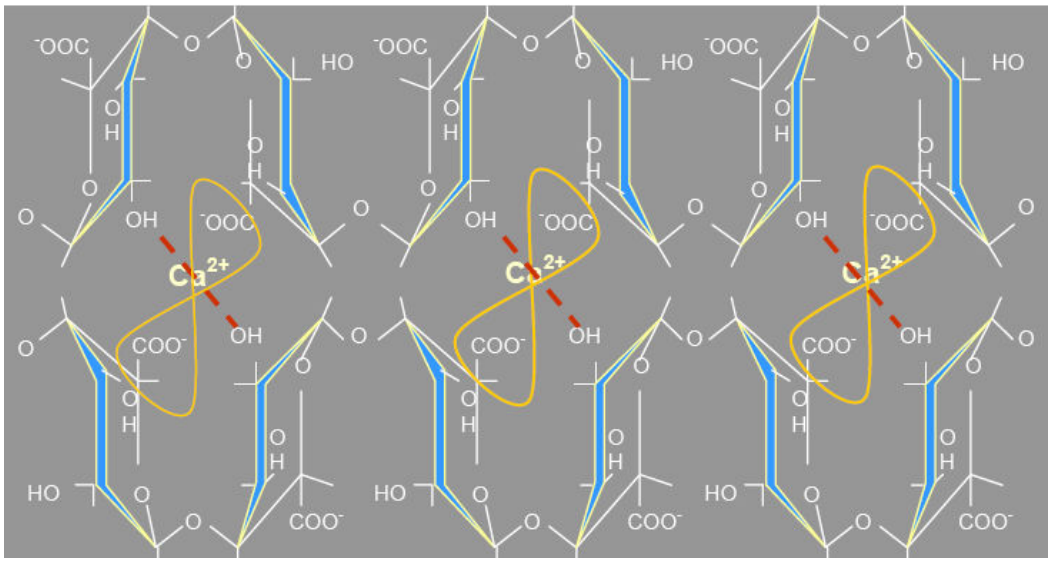


Figura 2.6- Esquema da formação do gel de alginato de cálcio

Cerf *et al.*, (2004) afirmam que há a formação de junções estáveis (uma rede tridimensional) dos principais dímeros, formando assim o modelo conhecido como "egg-box", conforme Figura 2.7.

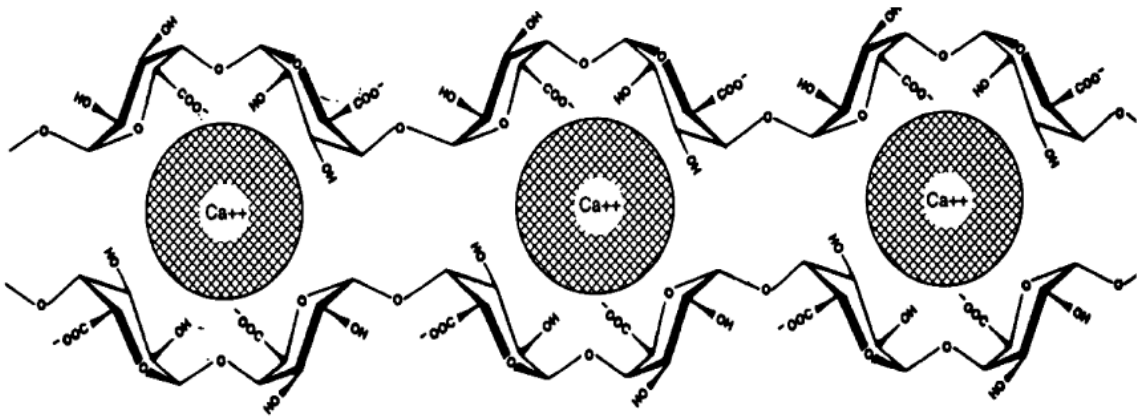


Figura 2.7 – Modelo "egg-box" para o processo de gelação do alginato com íons cálcio (CERF *et al.*, 2004, BAJPAI e SHARMA, 2004)

As propriedades mecânicas dos géis de alginato de cálcio são fortemente influenciadas pela distribuição dos ácidos manurônico e gulurônico no polímero, assim como pelo peso

molecular e pelo grau de polidispersibilidade (CARVALHO, 2000; BRODELIUS e VANDAMME, 1987; MARTISEN *et al.,* 1986).

As características do gel podem ser resumidas em sua porosidade e resistência mecânica necessárias ao processo. A porosidade está intimamente ligada à capacidade do gel reter a enzima desejada e de alterar a difusividade efetiva do substrato (CABRAL, 1989).

As principais vantagens do uso de células imobilizadas tanto em alginato como em outros suportes são:

- Favorecer o uso de maior densidade celular por volume de reator;
- Existir uma maior facilidade da separação das células imobilizadas do meio reacional, do que quando se trabalha com células livres;
- Operar em sistema contínuo com maior controle sobre a permanência das células dentro do reator;
- A facilidade de operação em altas taxas de diluição;
- Reduzir a fase de adaptação do microrganismo (fase *lag*);
- Possuir uma maior conversão se comparado ao sistema com células livres;
- Ter uma menor inibição pelos produtos;
- Trabalhar com um menor tempo reacional;
- Maior controle do crescimento da biomassa;
- Evitar o *washout* de células durante operações com altas vazões de alimentação;
- Possibilitar a reutilização das células tanto em sistemas batelada como contínuo;

Algumas desvantagens também são notadas no sistema utilizando células imobilizadas em alginato de cálcio, por exemplo:

- Quando a imobilização é feita em alginato, existe uma rápida solubilização do mesmo na presença de agentes quelantes do íon cálcio, como fosfato, citrato e EDTA, portanto a adição de íons cálcio no meio de fermentação ou tratamentos após a gelificação são necessários visando preservar a integridade dos pellets durante operações por tempos prolongados (BIROL *et al.,* 1998).

- Não existe padronização das condições de imobilização, ou seja, a imobilização depende de diversos parâmetros, tais como a concentração de alginato, a concentração de cloreto de cálcio (solução utilizada durante a imobilização celular), a concentração inicial de células a serem confinadas na matriz, o diâmetro dos *pellets,* a altura do gotejamento durante a imobilização entre outros.

2.5.2- Exemplos de processos de fermentação alcoólica utilizando células imobilizadas

Roukas (1996) citado por Cassini (2004) utilizou *Saccharomyces cerevisae* na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio para a fermentação de melaço de beterraba. Como processo fermentativo utilizou a batelada e a batelada alimentada, verificando que a maior concentração de etanol foi obtida no processo de batelada alimentada com células imobilizadas, e que habilidade de produção de etanol se manteve constante por oito dias.

Estudos realizados por Riordan *et al.(*1996) utilizando uma linhagem termotolerante de *Klyveromyces marxianus* para a produçãod etanol, a partir da sacarose, determinou que após 22 dias usando células livres o rendimento foi reduzio para 59% do rendimento teórico, enquanto que com o uso das mesmas células imobilizadas em alginato de cálcio o rendimento ficou em 98% do teórico.

Monisha *et al*. (1995) realizou fermentações de xilose e palha de arroz hidrolisada com células de *Candida shehatae*, livres e imobilizadas em alginato de cálcio, utilizando batelada, batelada alimentada e contínuo em um reator de leito empacotado. Verificaram que as maiores produtividades de etanol, para os dois substratos foram alcançadas com a utilização de células imobilizadas e processos contínuos e batelada alimentada.

Vasconcelos (1998) propôs o uso de reatores batelada simples e reator contínuo para a fermentação alcóolica com leveduras imobilizadas em colmos de cana-de-açúcar e obteve eficiência fermentativa de 86,40% no processo contínuo e Fregonesi (1998) destaca que a utilização de sistemas contínuos, empregando-se reatores tubulares com células imobilzadas, pode reduzir seu custo de produção, com um rendimento superior em relação ao sistema de células livres.

Wendhausen (1998), utilizando sistemas em regime batelada e contínuo, conduzidos com células imobilizadas em crisotila, afirmou que obteve um aumento de (25 a 30)% de produção de etanol em relação ao sistema de células livres e o sistema operacional mostrou estabilidade em relação à produtividade e estrutura do recheio.

Smogrovicová & Domény (1999) afirmam que o sistema de células imobilizadas além de aumentar a produtividade e melhorar a economia do bioprocesso, influencia no metabolismo da levedura, além de facilitar a separação de células do meio e favorecer a possibilidade de recíclo celular e menor custo.

Rigo (2001) obteve um aumento de até 27% na velocidade inicial de conversão de açúcares a etanol utilizando células imobilizadas em criotila, e em fermentações contínuas houve aumento da produção de etanol em diversas taxas de diluição.

No Japão, pelo menos um processo que utiliza levedura imobilizada em gel alginato de cálcio em reatores de leito fluidizado, foi desenvolvido em escala piloto pela Kyowa Hakko kogyo Co. (BORZANI *et al.,* 2001) e (FERREIRA, 1986). Os autores dizem que a planta produziu $12m^3$/dia operou por 6 meses sem perder estabilidade. A produtividade do sistema foi de 20 g de etanol/L.h, com concentração de etanol no caldo fermentado de 68g/L e rendimento de aproximadamente 95% do valor teórico. Isso indica que os valores obtidos de produtividade e rendimento são superiores aos de processos de produção de etanol operando em batelada (Melle-Boinot).

Najafpour et al. (2004) trabalhando com células imobilizadas em alginato, fez um estudo utilizando as concentrações de 1,5%, 2%, 3% e 6% de alginato e uma faixa de concentração de substrato variando de 50 a 150 g/L, verificou que em processos utilizando a fermentação batelada com células livres aparecia a inibição pelo substrato tanto na concentração de 50 g/L, quanto na concentração de 150 g/L, quando foi analisado o processo com células imobilizadas em alginato, essa inibição não foi observada em nenhum dos sistemas. Najafpour et al. (2004) também verificou que a sua produção dobrava quando ele aumentava a concentração de substrato de 25 para 50 g/L, trabalhando com células imobilizadas.

Outro aspecto relevante do trabalho realizado por Najafpour et al. (2004), foi o estudo feito com pellets de alginato. Após a imobilização os pellets foram testados apertando manualmente, a fim de verificar a rigidez e dureza dos mesmos. Os resultados obtidos são descritos na Tabela1.1.

Tabela 2.1 – Propriedades físicas e aparência dos pellets imobilizados de Saccharomyces Cerevisae

Alginato (%)	1,5	2	3	6
Diâmetro dos pellets	5	4,9 – 5	4,8 – 4,9	4,5
Crescimento (Expansão do diâmetro depois de 72 horas)	50 - 60%	25 – 30%	20 – 25%	Não há expansão
Problemas difusivos	Nada	Nada	Nada	Pode existir
Atividade Celular	Ativa	Completamente ativa	Completamente ativa	Parcialmente ativa
Aparência Física	Quebrado facilmente	Flexível, duro o suficiente para permanecer intacta	Flexível e dura	Muito dura
Estabilidade	Não estável	Boa estabilidade	Estável e rídida	Muito rígida

A concentração de alginato satisfatória baseado na estabilidade do pellet e sua atividade para a produção de etanol segundo Najafpour et al. (2004) foi de 2%. O autor observou que *pellets* com concentrações abaixo de 1,5% eram macios e, quebradiços e seriam inadequados para o uso em reatores, em especial em processos contínuos. Outro problema observado nas baixas concentrações de alginato foi o crescimento e expansão de diâmetro dos *pellets* no meio de fermentação, o que levava ao rompimento dos mesmos. Utilizando concentrações de 6% de alginato, os *pellets* eram duros e quase irrompíveis quando apertados manualmente, e também eram rígidos e interferiam na difusão, tornando um problema para produção de etanol.

Melzoch *et al.* (1994) trabalhando com pellets de *Saccharomyces cerevisae* imobilizada em alginato de cálcio, armazenadas em água a 4°C verificou que os pellets podem ser empregados por um período de até um ano, sem perda da atividade glicolitica e da viabilidade celular.

2.6- Cinética dos processos Fermentativos

Na literatura são encontrados poucos trabalhos utilizando modelagem matemática para descrever o comportamento de um processo utilizando células imobilizadas, a fim de prever a variação das concentrações de substrato e de produtos (CARVALHO, 2000).

O estudo da cinética de processos fermentativos tem como propósitos, medir a velocidade de transformação que ocorre durante a fermentação, estudar a influência dos fatores nestas velocidades (como pH, temperatura), correlacionar por meio de equações empíricas, ou modelos matemáticos, as velocidades com os fatores que nelas influem e aplicar as equações na otimização e controle do processo (TOSETTO, 2002).

Ferreira (2003) afirma que por meio de estudos cinéticos, é possível quantificar vários parâmetros como: taxa de consumo de substrato, taxa de formação de produto, taxa de crescimento celular, entre outros; e ainda permite compreender a influência de fatores externos como pH, temperatura, inibidores, etc.

Bayley & Ollis (1986), descreveram os modelos cinéticos e os classificaram em:

- Modelos não estruturados e não segregados: as células dos microrganismos são considerados como soluto;

- Estruturados e não segregados: as células do microrganismos são tratadas, porém, com composição média semelhante;
- Não-estruturados e segregados: as células de microrganismos são tratadas como seres individuais distintos; porém por um único componente; e
- Estruturados e segregados, onde as células de microorganismos são consideradas como individuios distintos e formados por múltiplos componentes

A complexidade da descrição cinética que é requerida e apropriada depende das situações físicas e da aplicação pretendida. Não é possível ou praticável 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).

O tipo de modelo mais encontrado na literatura que descreve a fermentação alcoólica é o tipo não-estruturado e não-segregado. É pouco aconselhável a utilização de modelos mais complexos que consideram as células como indivíduos distintos constituídos de vários componentes. Utilizando modelos mais simples, a imprecisão que possa ocorrer é compensada pela facilidade de obtenção e diminuição do número de parâmetros cinéticos necessários (ANDRIETTA, 1994).

A equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que assume a presença de substrato como limitante para o crescimento. A cinética de Monod está apresentada na Equação 1.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \qquad (1)$$

Birol *et al.,* (1998) cita 11 modelos cinéticos para descrever o comportamento de sistemas fermentativos, que são representados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Modelos cinéticos segundo BIROL *et al.,* (1998)

Modelo	$\frac{dX}{dt}$	$\frac{dP}{dt}$	$\frac{dS}{dt}$
Monod	$\mu_{\max}\left(\frac{S}{K_{sx}+S}\right).X$	$q_{\max}\left(\frac{S}{K_{sp}+S}\right).X$	$-\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt}\right)-\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt}\right)$

Moser	$\mu_{\max}\left(\frac{S^n}{K_{sx}+S^n}\right).X$	$q_{\max}\left(\frac{S^n}{K_{sp}+S^n}\right).X$	$-\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt}\right)-\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt}\right)$
Andrews e Noack	$\mu_{\max}\left(\frac{S}{1+\frac{K_{sx}}{S}+\frac{S}{K_{sx}}}\right).X$	$q_{\max}\left(\frac{S}{1+\frac{K_{s,p}}{S}+\frac{S}{K_{I,p}}}\right).X$	$-\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt}\right)-\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt}\right)$
Aiba	$\mu_{\max}\left(\frac{S}{K_{sx}+S}\right)\exp\left(-\frac{S}{K_{I,S}}\right)X$	$q_{\max}\left(\frac{S}{K_{S,P}+S}\right)\exp\left(-\frac{S}{K_{I,P}}\right)X$	$-\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt}\right)-\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt}\right)$
Loung	$\mu_{\max}\left(\frac{S}{K_{sx}+S}\right)\exp\left(1-\frac{S}{K_{S,\max}}\right)^n X$	$q_{\max}\left(\frac{S}{K_{S,P}+S}\right)\exp\left(-\frac{S}{S_{P,\max}}\right)X$	$-\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt}\right)-\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt}\right)$
Levenspiel	$\mu_{\max}\left(\frac{S}{K_{sx}+S}\right)\left(1-\frac{P}{P_{x\max}}\right)^n X$	$q_{\max}\left(\frac{S}{K_{SP}+S}\right)\left(1-\frac{P}{P_{P\max}}\right)^n X$	$-\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt}\right)-\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt}\right)$
Aiba	$\mu_{\max}\left(\frac{S}{K_{sx}+S}\right)\exp\left(-K_{PS}P\right)X$	$q_{\max}\left(\frac{S}{K_{SP}+S}\right)\exp\left(-K_{PP}P\right)X$	$-\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt}\right)-\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt}\right)$
Jerusalimsky	$\mu_{\max}\left(\frac{S}{K_{sx}+S}\right)\left(-\frac{K_{I,PX}}{K_{I,PX}+P}\right)X$	$q_{\max}\left(\frac{S}{K_{S,P}+S}\right)\left(-\frac{K_{I,PX}}{K_{I,PP}+P}\right)X$	$-\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt}\right)-\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt}\right)$
Ghose and Tyagi	$\mu_{\max}\left(1-\frac{P}{P_{x,\max}}\right).X$	$q_{\max}\left(1-\frac{P}{P_{P,\max}}\right).X$	$-\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt}\right)-\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt}\right)$
Hinshelwood	$\mu_{\max}\left(\frac{S}{K_{sx}+S}\right)\left(1-K_{PX}P\right)X$	$q_{\max}\left(\frac{S}{K_{S,P}+S}\right)\left(1-K_{P,P}P\right)X$	$-\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt}\right)-\left(\frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt}\right)$

De acordo com Birol *et al.,* (1998) os modelos de Monod e Hishelwood foram os mais adequados para a simulação no sistema batelada com células de *Saccharomyces cerevisae* imobilizadas em alginato, grande parte ocorreu em faixas muito pequenas de concentração do substrato.

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, utilizando modelos cinéticos precisos, possibilitando a obtenção de condições ótimas de operação. Por outro lado, a manutenção destas condições vai

depender 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).

A utilização de modelos matemáticos na otimização de um processo é de grande importância, pois minimiza o custo e o tempo aplicado de estudo (ANDRIETTA, 1991).

O grande número de modelos encontrados na literatura, como já foi descrito na Tabela 1 se deve ao fato de que cada modelo é desenvolvido para uma levedura específica, com condições de operação bem definidas.

Para o estudo cinético dos processos fermentativos, é necessário lançar mão de métodos analíticos seguros que permitam medir, com elevado grau de confiança, as variações de suas concentrações com o tempo (BORZANI *et al.*, 2001).

Durante a fermentação, retira-se periodicamente uma amostra do material fermentado e em seguida determina-se às concentrações da substância que está sendo consumida (S), de um produto (P) e do microorganismo (X), tais valores experimentais, quando representados em função do tempo permitirão os traçados das curvas de ajuste(BORZANI *et al.,* 1975).

2.6.1- Parâmetros Cinéticos da fermentação

Para cálculo do rendimento de substrato em biomassa temos:

$$Y_{x/s} = \frac{dX}{dS} \tag{2.1}$$

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X - X_0}{S - S_0} \tag{2.2}$$

Para o cálculo do rendimento do produto em biomassa:

$$Y_{x/p} = \frac{dX}{dP} \tag{2.3}$$

$$Y_{x/p} = \frac{\Delta X}{\Delta P} = \frac{X - X_0}{P - P_0} \tag{2.4}$$

Rendimento de substrato em produto, temos:

$$Y_{p/s} = \frac{dP}{dS} \tag{2.5}$$

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{S - S_0} \tag{2.6}$$

Para o cálculo da produtividade, definida como a quantidade de etanol produzida por unidade de volume por unidade de tempo:

$$\mathrm{Pr} = \frac{P}{t} \tag{2.7}$$

Para o cálculo do rendimento da fermentação, podemos defini-lo como sendo a quatidade de etanol produzida em relação a quantidade que pode ser convertida em alcool, multiplicando-se pelo valor obtido pela Eq. de Gay-Lussac, ou seja 51,1g de etanol/100 g de glicose, ou seja, 0,511 g/g, temos:

$$\mathrm{Re}nd = \frac{P}{S_0 \cdot 0{,}511} \tag{2.8}$$

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisae,* na forma seca, obtida na empresa Mauri do Brasil. A cepa empregada foi a Y904, levedura esta desenvolvida para a produção de etanol. Para utilizar as leveduras na fermentação, elas foram hidratadas com água destilada, por 1 hora, 1,8 g de levedura foram adicionadas a 10 mL de H_2O destilada, e permaneciam na mesma por um período de 1 hora, e submetidas a agitação manual, em intervalos de 10 minutos, a fim de obter uma solução homogênea de inoculo. Após a hidratação, os inóculos eram adicionados à solução de alginato de sódio de acordo com o planejamento estatístico previamente proposto. Ao preparar a solução de alginato de sódio, eram preparados 50 mL de solução, que quando misturadas a solução de levedura hidratada conferia para cada uma em particular final a concentração de 30 g/L.

3.2- Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram preparados segundo Andrietta (2003) e são apresentados na Tabela 3.1, lembrando que o meio não foi submetido a esterilização e a procedimentos de assepsia. O pH foi ajustado para 4,5.

Tabela 3.1 – Meio de cultura (FERREIRA 2003)

Reagente	Concentração (g/L)
Glicose	Variável de acordo com o planejamento experimental
Extrato de Levedura	6,0
KH_2PO_4	5,0
$MgSO_4.7H_2O$	1,0
NH_4Cl	5
KCl	1,0

De acordo com Birol et *al.,* 1998, foi adicionado ao meio 0,5g/L de $CaCl_2$, para evitar o rompimento dos *pellets*, pois no meio utilizado existe a presença de íons quelantes do alginato.

3.3- Métodos e técnicas utilizadas nos ensaios

3.3.1- Métodos Analíticos

a-) Determinação da concentração Celular

A concentração celular do inóculo foi determinada por meio de análises de absorbância utilizando espectrofotômetro a comprimento de onda de 650 nm a partir da suspensão de células devidamente diluída em água destilada. Uma curva de calibração foi estabelecida para correlacionar o peso seco (g/L) de células livres e imobilizadas com a absorbância. A determinação da concentração celular (células livres) no meio fermentativo, ao longo dos ensaios, foi realizada pela mesma técnica (BATISTA, 2005).

A concentração de células imobilizadas, ou seja, a concentração no interior do *pellet* foi quantificada em intervalos de 1 hora. Recolheu-se uma amostra de 4 *pellets* de alginato do fermentador e estes foram colocados em 10 mL de uma solução de citrato de potássio 4% (p/v), por um período de 2 horas, para que os mesmos fossem dissolvidos. Em seguida a solução foi centrifugada a 12000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material sólido contido no frasco foi suspenso em água destilada e determinada a concentração celular por espectrofotometria a 650 nm

b-) Determinação da concentração de ART

Para determinação da concentração de glicose, foi utilizado o método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (MILLER, 1959).

c) Determinação da concentração de álcool

Para se determinar a concentração de álcool produzida durante o processo fermentativo, 30 mL de amostra em intervalos de 1 hora, foram coletadas e centrifugadas a 20000 rpm por 6 minutos. Do sobrenadante resultante do processo de fermentação eram recolhidas 25mL e acrescentados 50 mL de H_2O em um balão de fundo chato. A solução em seguida foi destilada e coletados aproximadamente 50 mL de amostra foram coletadas a fim de garantir que todo o álcool produzido estivesse no destilado. A seguir coletou-se 2 mL do destilado e colocou-os em balão de 50 mL, fazendo assim uma diluição 1:25. Após a diluição 5 mL da amostra, 2 mL da solução de dicromato previamente preparada e 2 mL de H_2O foram colocados em

tubos de ensaio os quais foram posteriormente submetidas por um período de 30 min à temperatura de 60°C em banho termostático. Para a identificação da concentração de etanol, foi preparada uma curva de calibração, com a utilização do espectofotômetro e de amostras de concentração de etanol conhecidas com leitura de absorbância de 600 nm. Após o banho a solução foi resfriada até a temperatura ambiente e submetida a leitura em espectrofotômetro a 600 nm e comparada com a absorbância obtida a partir da cuva de calibração.

d-) Determinação do diâmetro médio e da variação no diâmetro dos *pellets* de alginato de cálcio

Para avaliar a variação no diâmetro dos *pellets* de alginato de cálcio, foi feito um acompanhamento dos mesmos durante as fermentações. Em intervalos de 1 hora, eram coletadas uma amostra de 4 *pellets* e utilizando um paquímetro foi feito a medida de seus diâmetros. Para calcular os valores dos diâmetros médios de uma amostra recém imobilizada, foram coletadas uma amostra composta de 80 *pellets* escolhidos aleatoriamente.

3.3.2- Procedimentos Experimentais

a-) Imobilização da levedura *Sacchamomyces cerevisiae* em alginato de cálcio

O método utilizado para imobilização das células foi o método de aprisionamento. Para a imobilização, uma massa de levedura, definida para cada experimento segundo um planejamento composto central (PCC), era hidratada com água conforme item 3.5. Após esta etapa, a suspensão de levedura era misturada a um gel de alginato de sódio a 3% m/v previamente preparado. A escolha da concentração da suspensão de alginato de sódio foi baseada no trabalho de Najafpour et al. (2004).

Os *pellets* de gel foram obtidos pelo gotejamento da mistura alginato/células em uma solução de cloreto de cálcio previamente preparada na concentração de 30g/L sob agitação magnética, com um volume de 250 mL, em um béquer de 600 mL.

Para o gotejamento da suspensão celular na solução de cloreto de cálcio utilizou-se uma bomba peristáltica modelo 7553-75, da marca Cole-Parmer Instrument Company e uma ponteira de micropipeta 100 μL, conforme Figura 3.1. A altura da ponteira em relação à superfície da solução de cloreto de cálcio foi 11,5 cm, definida após várias tentativas, de modo a se obter partículas esféricas.

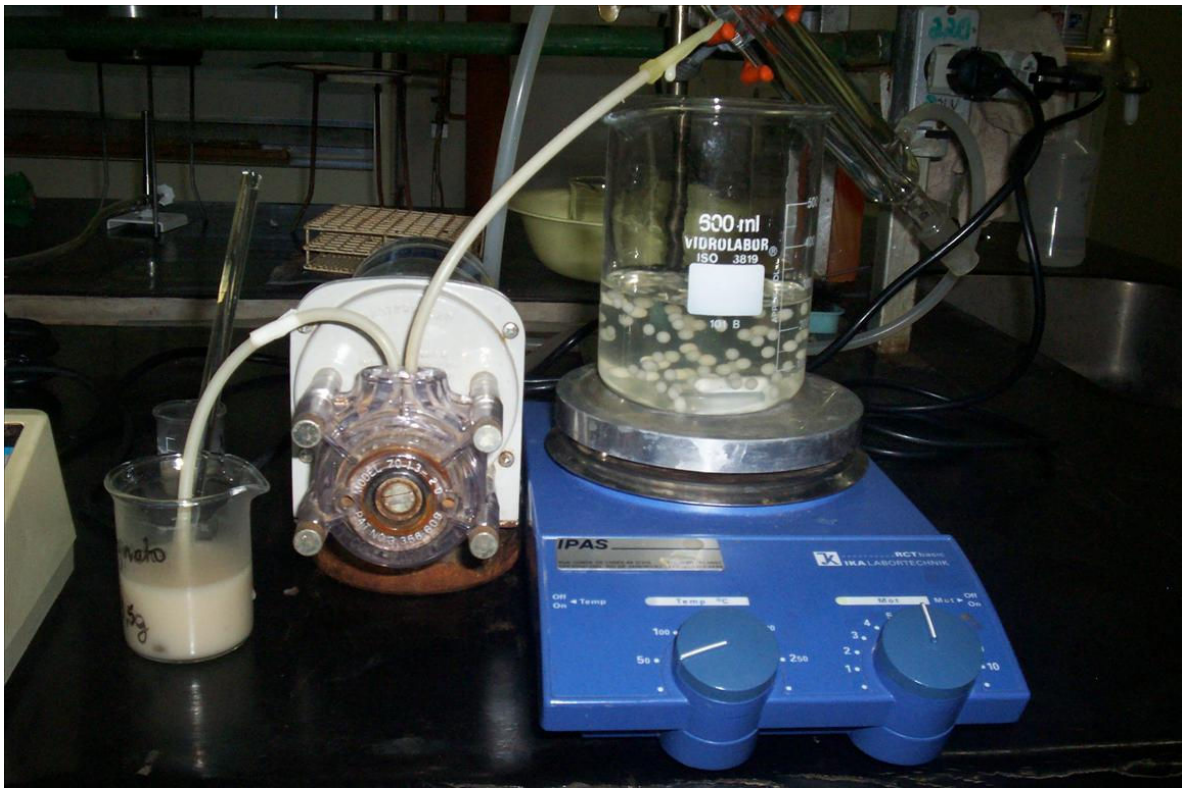


Figura 3.1: Foto do sistema utilizado para a imobilização de *Saccharomyces cerevisae* em alginato de sódio.

Logo após o procedimento de imobilização, as partículas com células imobilizadas foram adicionadas a uma solução de $Al(NO_3)_3$ de concentração 0,3 molar por 5 minutos, conforme procedimento usado por Rocca et *al.,* (1995), a fim de obter *pellets* mais estáveis. A seguir os *pellets* foram mantidos em solução de cloreto de cálcio de concentração de 30g/L a 4°C por um período de 24 horas e após este período, lavados com água destilada e utilizados nos experimentos de fermentação.

Para medir o volume de *pellets* a serem utilizados nos ensaios fermentativos, foi feito a imersão dos mesmos em água destilada e o volume obtido era acompanhando pelo volume de água deslocado quando se adicionava as esferas na água em uma proveta.

3.4- Reatores Utilizados

3.4.1- Fermentação em erlenmeyers agitados

Os ensaios preliminares de fermentação batelada foram realizados em erlenmeyer de volume 250 mL agitados em shaker a 32ºC. Estes ensaios tiveram como objetivo verificar a estabilidade física dos *pellets* com células imobilizadas e também a eficiência da imobilização.

3.4.2- Reator contínuo tipo coluna de escoamento ascendente

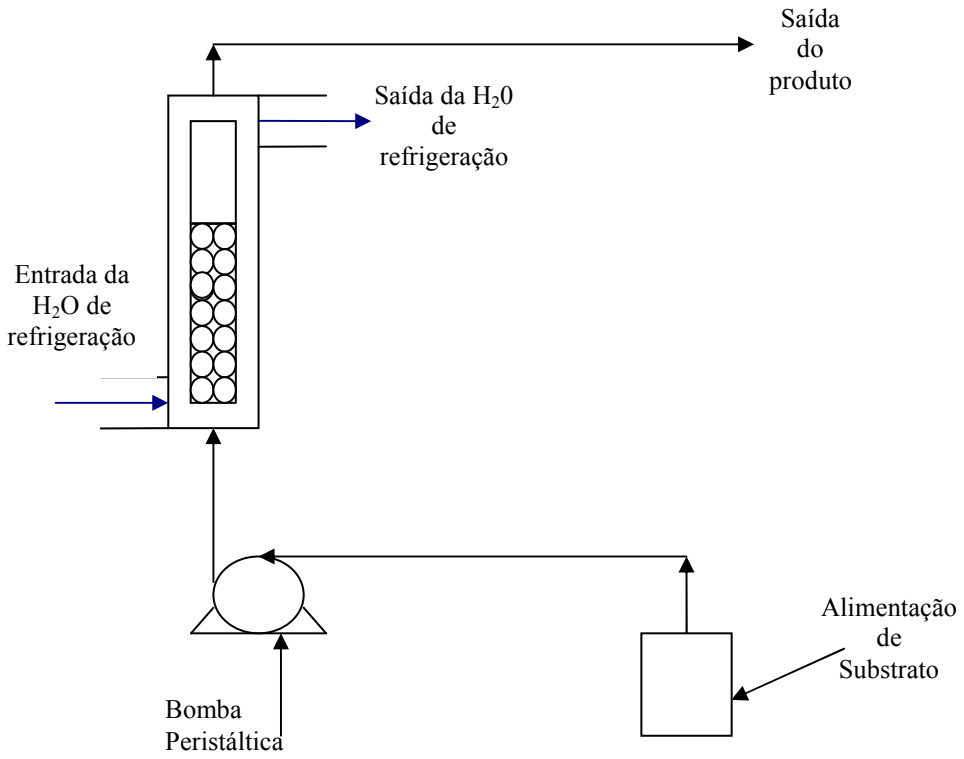


Figura 3.2 - Esquema do processo utilizando um reator tubular de leito fluidizado

Após os testes em frascos agitados, foi montada uma coluna recheada com as partículas de célula imobilizada, conforme esquematizado na Figura 3.2.

Esta coluna apresentava uma altura de 11,25cm, um diâmetro de interno de 2,3 cm, era dotada de camisa externa para recirculação de água proveniente de um banho termostático para controle da temperatura.

O volume de partículas de células imobilizada era igual a 10 mL e a alimentação era efetuada por uma bomba peristáltica, modelo 7553-75, da marca Cole-Parmer Instrument Company. A vazão de alimentação de mosto foi igual a 2,15 mL/min e operou por escoamento ascendente.

3.4.3- Reator contínuo tipo coluna de escoamento ascendente com saída para CO_2

A nova configuração de reator adotada, corresponde ilustrado na Figura.3.3 e foi operada nas mesmas condições da configuração apresentada no item 3.4.2.

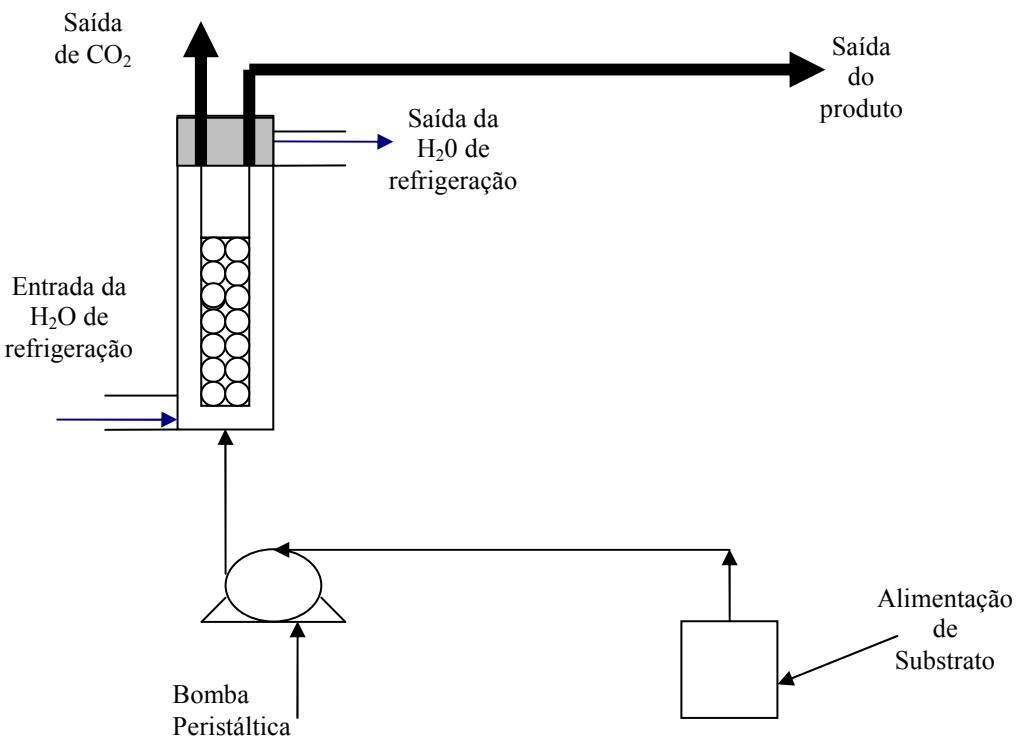


Figura 3.3 - Esquema do processo utilizando um reator tubular de leito fluidizado com saída para CO_2

3.4.4- Reator batelada simples

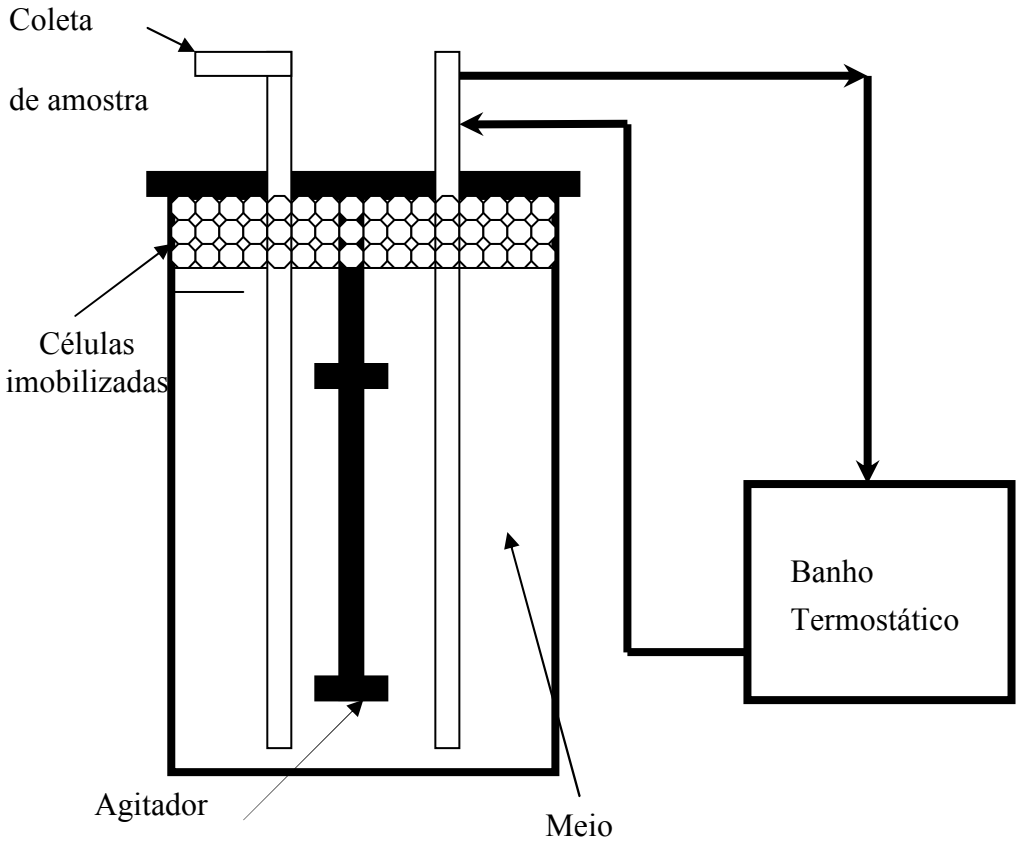


Figura 3.4- Esquema do processo utilizando um reator Batelada convencional com agitação mecânica e banho termostático para controle da temperatura.

Após o uso dos processos contínuos em reator tipo coluna com escoamento ascendente, foi testado o uso do minifermentador New Bruns, Figura 3.4, operado como uma reator de mistura em batelada.

As fermentações foram conduzidas após a mistura de um volume de 90 mL de partículas de células imobilizadas a 1,5 L de meio de cultura com uma concentração inicial de glicose igual a 50g/L, pH=4,5 com agitação de 150rpm e temperatura de 32°C controlada pela circulação de água proveniente de um banho termostático.

3.4.5- Reator batelada modificado

Com o objetivo de melhorar as condições operacionais do reator em batelada do item 3.4.4, foi realizada uma modificação no minifermentador, conforme apresentado na Figura 3.5. A mesma consistiu da adaptação de uma placa de acrílico perfurada, cujos orifícios apresentavam um diâmetro de 2,5mm.

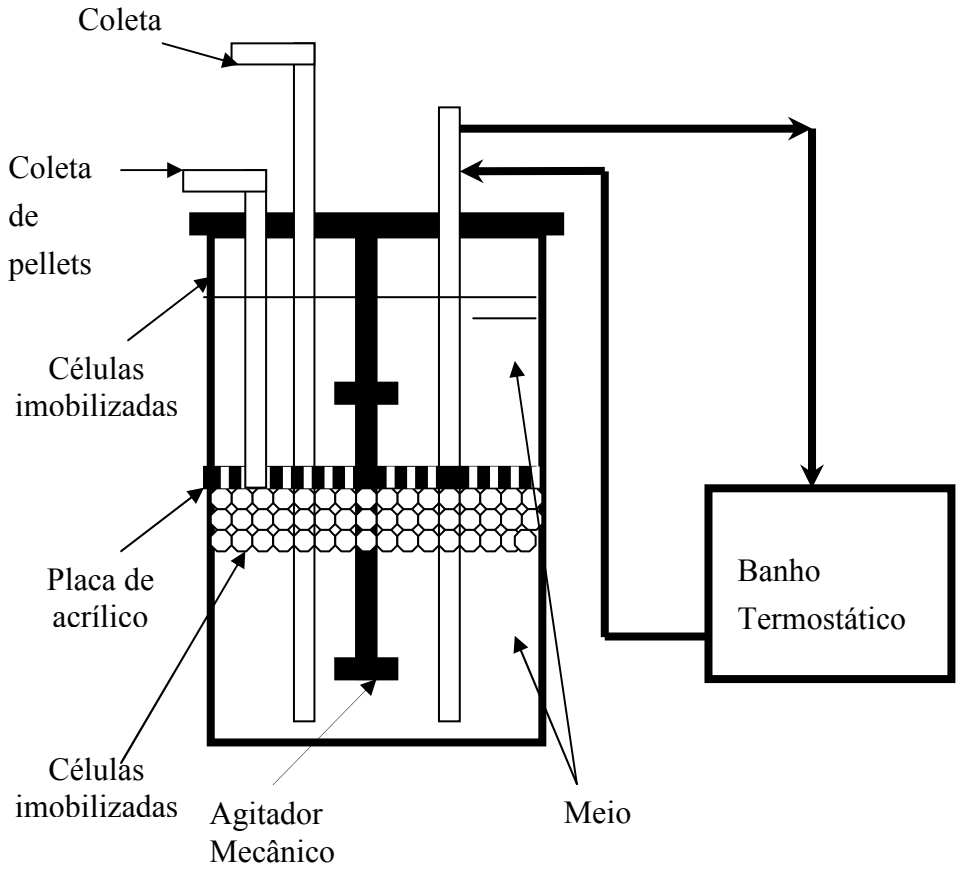


Figura 3.5- Esquema do processo utilizando um reator Batelada com placa da acrílico desenvolvido durante o presente trabalho.

O reator possuía um sistema para retirada de amostra de meio fermentado e um dispositivo para coletar amostras das partículas de células imobilizadas. As amostras foram retiradas em intervalos de 1h.

Este reator foi utilizado na seqüência do trabalho. As fermentações foram realizadas utilizando um volume inicial de meio de cultivo igual a 1,5 L, usando um volume de 90 mL de *pellets*, na temperatura de 32°C e rotação de 1250 rpm.

Figura 3.6: Foto do reator final utilizado nas fermentações.

3.5- Condições de realização dos experimentos de imobilização

Com o objetivo de se estudar a influência conjunta da concentração inicial de levedura no meio de imobilização (meio de gotejamento) e da concentração inicial de glicose nas fermentações, estas duas variáveis foram estudadas simultaneamente por meio de um planejamento composto central (PCC), conforme Tabela 3.1. Os níveis das variáveis foram fixados com base nos trabalhos de Najafpour et al.(2004) e Batista (2005).

Tabela 3.2 – Níveis escolhidos para o planejamento composto central.

VARIÁVEIS	CÓDIGOS	NÍVEIS				
		-1	+1	0	-α	+α
Concentração inicial de células na imobilização (g/L)	X_0	29,0	43,0	36,0	17,0	60,8
Concentração inicial de substrato (g/L)	S_0	52,0	105	78,5	30,5	148,5

Aos 10 ensaios previamente propostos pelo PCC, utilizando o *sofwtare Statistic 5.0* foi adicionada mais uma réplica no ponto central.

As condições dos 11 ensaios realizados são apresentas na Tabela 3.2.

Tabela 3.3 - Matriz experimental do planejamento composto central (PCC).

Ensaio	So(Glicose)	Xo(Células)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	- α	0
6	+α	0
7	0	-α
8	0	α
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Temos que o planejamento realizado possui a adição de pontos axiais, como temos 2 fatores (k=2); Concentração inicial de células na imobilização e Concentração inicial de Substrato.

Logo:

$$\alpha = (2^k)^{1/4}$$

Sendo k=2 tem-se:

$$\alpha = (2^2)^{1/4}$$

$$\alpha = \pm 1{,}4142$$

3.6 – Experimentos para estudos cinéticos

Com o objetivo de se realizar um estudo do processo fermentativo, foram realizados experimentos nos quais variou-se a concentração inicial de substrato, mantendo fixa a concentração inicial de levedura no meio de imobilização. Tais experimentos foram realizados no mesmo reator dotado de placa perfurada, a 32ºC, nas concentrações iniciais de glicose e de células conforme Tabela 3.3.

Tabela 3.4 - Dados utilizados no estudo cinético da fermentação alcoólica

Concentração inicial de substrato no meio de fermentação S_0(g/L)	Concentração inicial de células na solução de imobilização X_0(g/L)
30,5	36
55,0	36
78,5	36
110,0	36
148,5	36

A partir dos dados coletados durante os experimentos, foram feitos ajustes a fim de obter o valor dos parâmetros que descrevessem melhor a fermentação com células imobilizadas, com o auxílio do software *scilab 4.1.2.*

3.7- Modelagem Matemática

Os modelos matemáticos foram desenvolvidos a fim de determinar o acoplamento entre os paramêtros do meio e a cinética celular. Para o estudo da taxa de crescimento de celular, consumo de substrato e formação de produto, podem ser descritas pelas equações:

Para o crescimento celular, temos:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - k_d X \qquad (2.9)$$

Para a produção de etanol temos:

$$\frac{dP}{dt} = qX \qquad (2.10)$$

Para o consumo de substrato temos:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}}\left(\frac{dX}{dt}\right) + \frac{1}{Y_{p/s}}\left(\frac{dP}{dt}\right) + mX \qquad (2.11)$$

3.7.1- Método da Evolução diferencial

Existem muitos métodos de otimização e cada um deles alcança melhor resultado dependendo do tipo de problema a que são aplicados Para se escolher o método a ser aplicado a um problema de otimização, diversas características devem ser levadas em consideração e a principal delas é o comportamento da função que representa o problema. A partir dai o método pode ser classificado em métodos de programação linear e não linear, este ultimo pode ser dividido em métodos determinísticos e métodos naturais. (ARANTES *et al.,* 2006).

Os métodos classificados como determinísticos são aqueles baseados no cálculo da derivada ou em aproximação desses cálculos. Este método é melhor aplicado para funções contínuas, convexas e unimodais, ou seja aquelas funções que apresentam apenas um ponto de mínimo ou de máximo (ARANTES *et al.,* 2006).

Já os métodos ditos como naturais, levam em conta apenas informações da função a ser otimizada. O método tenta encontrar o ótimo através de regras de probabilidade operando de maneira aleatório orientada. Entre essa técnica podemos citar os algoritimos genéticos, as estratégias evolutivas entre outros.

Os algoritmos evolutivos descrevem os princípios da evolução natural, além disso, são baseados em população de indivíduos, onde cada individuo representa um ponto de busca no espaço das soluções candidatas de um dado problema (ARANTES, *et al,* 2006).

O algoritmo evolutivo chamado de Evolução Diferencial foi desenvolvido por Storn e Prince (1997) e tem sido usado com sucesso em vários campos da ciência. O método foi desenvolvido na década de noventa e surgiu para solucionar o problema de ajuste polinomial de Chebychev (STORN e PRINCE, 1995).

Partindo do estudo feito por Arantes *et al.,* (2006), temos que, se tivermos um problema de otimização como, descrever um vetor de *n* variáveis de projeto $X=[x_1, x_2,.... x_n]^T$ que otimize a função objetivo, *f(x)* satisfazendo algumas restrições, temos:

$$\text{minimizar } f(X) \tag{2.12}$$

$$\text{Sujeito a: } \begin{cases} g_j(X) \leq 0, \quad j = 1...J \\ h_l(X) = 0, \quad l = 1....L \\ x_i^{\inf} \leq x_i \leq x_i^{\sup}, \quad i = 1...n \end{cases} \tag{2.13}$$

Para o estudo de problemas com restrições estes são transformados em problemas sem restrições, pois os algoritmos evolutivos foram feitos para solucionar problemas irrestritos,

com isso são adicionados uma função de penalidade P(X) (VANDERPLAATS, 1999). A partir dessa mudança a função objetivo passará a se chamar função pseudo objetivo(Φ), que é dada por:

$$\Phi(X) = f(X) + r_p P(X) \tag{2.14}$$

$$P(X)=\left[\sum_{j=1}^{J}\left\{\max\left[0, g_j(X)\right]\right\}^2 + \sum_{l=1}^{L}\left[h_l(X)\right]^2\right] \tag{2.15}$$

Onde r_p é o multiplicador que quantifica a magnitude de penalidade, P(X) a função de penalidade dada pela Equação (15), $g_j(X)$ e $h_l(X)$ são as funções de restrições de desigualdade e igualdade e f(X) a função objetivo original descrita na Equação (2.12).

Inicialmente deve-se criar uma população inicial escolhida aleatoriamente cobrindo todo o espaço de busca.

A idéia principal do problema de evolução diferencial é gerar novos indivíduos, chamados de vetores modificados ou doadores, pela adição da diferença ponderada entre dois indivíduos aleatórios da população a um terceiro individuo, essa operação é chamada de mutação, descrita pela Equação (2.16). Sejam os vetores X_a, X_b e X_c, escolhidos aleatóriamente e diferentes entre si. Em uma geração qualquer (q) um par de vetores, define a diferença, que é multiplicada por um F>0, chamada de diferença ponderada, que é usada para perturbar um terceiro vetor, resultando em um vetor doador V^{q+1}:

$$V^{(q+1)} = X_a^{(q)} + F(X_b^{(q)} - X_c^{(q)} \tag{2.16}$$

Em seguida as componentes do individuo doador são misturadas com as componentes de um individuo escolhido aleatoriamente, chamado vetor alvo, para resultar o vetor tentativa ou vetor experimental. Este processo de misturar os parâmetros é conhecido como cruzamento é usado para aumentar a diversidade de indivíduos que sofreram mutação.

$$u_i^{(q+1)} = \begin{cases} v_i^{(q+1)}, se \quad r_i \le CR \\ x_{d,i}^{(q)}, se \quad r_i \rangle CR, \quad i = 1...n \end{cases} \tag{2.17}$$

Onde temos que r_i é um número gerado aleatoriamente com resultado entre 0 e 1, $x_{d,i}$ são os componentes do vetor alvo $X_d^{(q)}$, CR é a probabilidade do vetor experimental herdar os valores das variáveis do vetor doador. Caso após o cruzamento alguma componente do vetor estiver fora da região de busca fazem-se algumas correções:

Se $u_i<x_i^L$, faz-se $u_i=x_i^L$

Se $u_i>x_i^U$, faz-se $u_i=x_i^U$

Se o vetor experimental resultar em um valor da função objetivo menor que o alvo, então o vetor experimental substitui o vetor alvo na geração seguinte, esta operação é conhecida como seleção, para finalizar o procedimento é escolhido um critério de parada, estabelecendo por exemplo um número máximo de gerações. Esta seleção tem o objetivo de produzir melhores filhos.

$$\text{Se } \begin{cases} f(U^{(q+1)}) \leq f(X_d^{(q)}), \textit{então } X_d^{(q+1)} = U^{(q+1)} \\ f\left(U^{(q+1)}\right) \rangle\ f\left(X_d^{(q)}\right), \textit{então } X_d^{(q+1)} = X_d^{(q)} \end{cases} \tag{2.18}$$

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1- Estudo da imobilização

Inicialmente foi realizado um estudo qualitativo de fatores que interferiam na qualidade dos *pellets* de células imobilizadas, no que diz respeito à sua resistência ou rigidez física, estabilidade dos mesmos durante o uso nas fermentações e forma geométrica, bem como no desempenho fermentativo. Para isso foram estudadas as concentrações de alginato de sódio a serem usadas no meio de imobilização, tratamentos a serem adotados com os *pellets* produzidos e o processo de produção dos mesmos.

No presente trabalho levando em consideração o estudo realizado por Najafpour et al. (2004) foram escolhidas as concentrações de alginato de sódio de 2 e 3%.

A Figura 4.1 apresenta a imagem de *pellets* obtidos no processo de imobilização, produzidos conforme item 3.3.2, utilizando alginato de sódio a 3%. Pode ser verificado que os mesmos são aproximadamente esféricos e com diâmetros bastante uniformes.

Figura 4.1- *Pellets* com *Saccharomyces cerevisae* imobilizada em alginato de sódio a 3%

Na obtenção de *pellets* esféricos, estudou-se o efeito de diversas variáveis na produção dos *pellets*, tais como altura de gotejamento, velocidade de gotejamento, marca de alginato, e

tamanho da abertura utilizada durante o gotejamento da suspensão de imobilização. Após vários testes, optou-se por uma configuração física que possibilita a formação de partículas com as características desejadas e condições operacionais no processo de imobilização conforme seguem concentração de células a serem imobilizadas, variável de acordo com o planejamento, concentração da solução de cloreto de cálcio igual a 30g/L, concentração da solução de nitrato de alumínio de 0,3 mol/L e concentração de alginato de sódio de 3% m/v.

O diâmetro dos *pellets* obtidos foram medidos segundo a metodologia. Na Tabela 4.1 são apresentados os resultados da média dos diâmetros e o desvio padrão. A Figura 4.2 apresenta a distribuição dos diâmetros das partículas em relação à média.

Tabela 4.1 – Análise das amostras de pellets.

Tamanho da Amostra	**Média (mm)**	**Mínimo** (mm)	**Maximo (mm)**	**Desvio padrão**
80	4,20	3,40 ± 0,05	4,80 ± 0,05	0,20

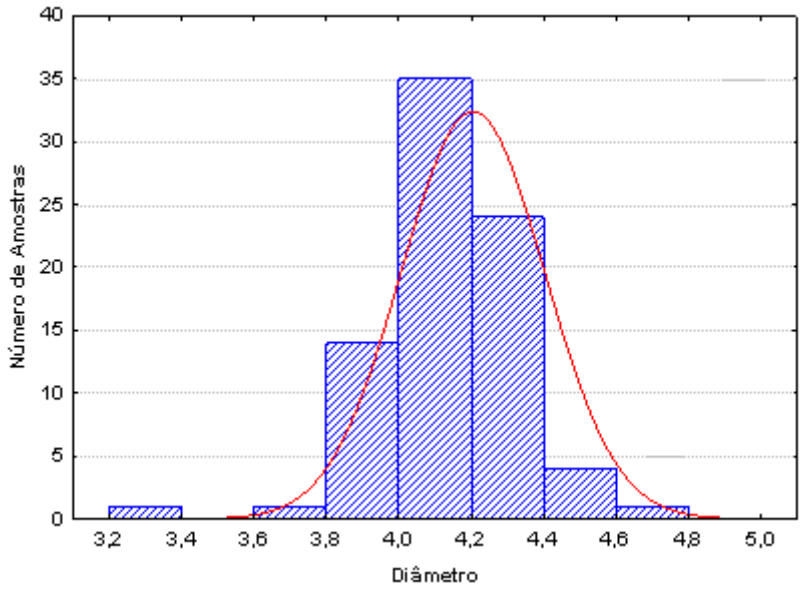


Figura 4.2- Distribuição de tamanhos dos pellets

Foram feitos testes preliminares a fim de verificar a eficiência da imobilização utilizando uma concentração de alginato 2%, e foi observado o rompimento dos *pellets* em meio fermentativo, em *shaker* após 5 horas de fermentação. O meio de fermentação utilizado apresentava uma concentração inicial de glicose de 50 g/L, com uma concentração de células

na suspensão de imobilização de 8,1 g/L. O alginato de sódio $(C_6H_7O_6Na)_n$ utilizado nesse ensaio era da marca ISOFAR.

Foi trocada a marca de alginato de sódio para a marca VETEC, fornecida na forma de grânulos, a fim de verificar a estabilidade, utilizando as mesmas concentrações anteriores. Neste ensaio não houve rompimento dos *pellets* até o consumo total do substrato pela fermentação.

A partir desse momento foram feitos testes visando analisar a estabilidade das partículas de células imobilizadas em diversos meios de fermentação com concentrações maiores que 50 g/L, como 100 g/L e 130 g/L e observou-se uma grande formação de CO_2 durante o processo fermentativo, o que levava a um rompimento do *pellet*, provavelmente não mais devido à instabilidade do alginato de cálcio e sim à grande formação de CO_2 que exercia pressão sobre a parede do *pellet*.

A partir dessas observações optou-se por utilizar uma concentração de alginato de 3¨% visando maior dureza ao *pellet*. Rocca *et al.,* (1995), verificou que um tratamento dos *pellets* com o íon Al^{3+} por 5 minutos após a imobilização, garantia estabilidade e aumentava a resistência dos mesmos, sem interferir na transferência de massa.

Os experimentos seguintes foram realizados utilizando a levedura imobilizada em partículas de gel de alginato de sódio a 3% m/v. Em alguns experimentos, os *pellets* foram tratadas com Al^{3+} a 0,3 M, utilizando como fonte de íons Al^{3+} uma solução de $Al(NO_3)_3$.

4.2- Estudo dos reatores

Após o estudo do processo de confecção dos pellets e desenvolvimento dos processos de melhoria dos mesmos, foram realizados ensaios a fim de se estabelecer a configuração do reator a ser adotada nas fermentações.

Para os itens 4.2.1 até 4.2.4, os meios de cultura utilizados apresentaram uma concentração inicial de glicose variando entre 50 g/L e 130 g/L.

4.2.1 – Fermentações em shaker

A fim de verificar a estabilidade dos *pellets* e o comportamento dos mesmos em um meio de fermentação, foram feitos ensaios qualitativos de fermentação em shaker, a 32°C e

150 rpm utilizando erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio com concentração de glicose igual a 50g/L e 6 mL de *pellets* cuja concentração celular na imobilização foi de 6 g/L.

Verificou-se que no momento em que as esferas eram adicionadas ao meio de cultura as mesmas permaneciam na superfície por alguns minutos, mas em seguida depositavam-se no fundo do frasco, devido à entrada de meio no seu interior. Com o decorrer da fermentação, devido ao desprendimento de CO_2, ocorreu um acúmulo de gás no interior das esferas e como conseqüência deste acúmulo há a flutuação das esferas durante o processo de fermentação, além de ser verificado um aumento significativo no diâmetro dos *pellets*.

A fim de minimizar estes efeitos foram feitos ensaios em uma nova configuração de reator do tipo contínuo, a fim de testar os *pellets* e minimizar os efeitos de transferência de massa nos mesmos.

4.2.2- Reator contínuo tipo coluna de escoamento ascendente

Após verificar que o uso de *shaker* não foi satisfatório no estudo da fermentação com células imobilizadas, foi realizado um estudo qualitativo num microrreator tipo coluna de fluxo ascendente, conforme item 3.4.2.

Inicialmente os testes realizados no reator de leito fixo foram qualitativos e seu objetivo foi verificar o comportamento e estabilidade das partículas de células imobilizadas. O leito foi constituído de *pellets*, de diâmetro variando entre 4,2 e 4,4 mm, previamente preparados segundo a metodologia já descrita, mas sem o uso de tratamento com nitrato de alumínio, utilizando um tempo de cura em cloreto de cálcio de 24 horas. Apenas 70% da coluna foi recheada com *pellets*, deixando o restante da mesma para uma possível expansão do leito.

O meio de cultura na concentração de 50g/L de glicose, foi alimentado à coluna utilizando uma bomba peristáltica e o efluente da coluna, ou seja, o produto da fermentação foi coletado em uma proveta por meio de uma saída na parte superior do reator.

A fermentação foi conduzida apenas por 3 horas, pois após esse tempo houve rompimento dos *pellets,* causado pelo aumento da produção de CO_2 no interior do mesmo, o que levava a uma dificuldade de liberação do gás no interior do reator. A fermentação foi interrompida sem que o sistema entrasse em regime estacionário.

A partir deste estudo verificou-se que uma mudança na estrutura do reator seria necessária a fim de garantir que a maior parte do CO_2 fosse escoada foram do reator e eliminada do sistema.

Foi adaptado uma saída de CO_2 na parte superior do reator, usando um tubo de vidro. A partir daí foi feito um novo estudo para analise do comportamento dos *pellets* utilizando a nova configuração do reator contínuo com células imobilizadas e saída de gases.

4.2.3 - Reator contínuo tipo coluna de escoamento ascendente com saída para CO_2

Visando melhorar as características de funcionamento do reator do item anterior, foi realizada uma modificação no sistema, foi adaptada uma tela de aço inox, de malha fina o suficiente para reter as partículas e adaptado um tubo de vidro além da saída de líquido, cujo objetivo foi retirar o CO_2 produzido, separado da corrente líquida efluente. As demais condições operacionais foram as mesmas do item anterior.

A fim de verificar a estabilidade dos *pellets* e o comportamento dos mesmos na nova configuração de reator com saída de CO_2, foram feitos testes qualitativos, utilizando as mesmas condições de fermentação para o item 4.2.2.

Tal sistema apresentou um desempenho geral melhor que o anterior com relação à saída de líquido e gases, mas as partículas novamente formaram um conjunto junto à tela, ficaram com muitas bolhas de gás internamente e após um intervalo de 5h, apresentavam-se frágeis em relação ao início do processo e após um inchamento das mesmas, começam o processo de rompimento.

Foi observado novamente que o sistema comportou-se como o sistema sem saída de CO_2 somente com uma diferença o tempo de operação antes do rompimento dos *pellets* foi o dobro do observado no reator sem saída de CO_2, ou seja de 6h.

De acordo com as observações realizadas, optou-se por uma nova configuração de reator, e testar a fermentação com reator batelada ao invés dos reatores contínuos.

4.2.4- Reator batelada simples

Como o processo com reatores do tipo coluna não apresentou resultados satisfatórios operando com células imobilizadas em alginato de cálcio, foi testada uma nova configuração de reator, a fim de verificar a estabilidade e o comportamento dos *pellets*. O sistema utilizado foi um reator tipo mistura, operando em batelada de volume igual a 2 litros, com agitação mecânica e controle de temperatura.

O processo foi conduzido por 6 horas e interrompido pois os pellets a partir de 1 hora de fermentação se concentraram na parte superior do reator, devido a grande formação de CO_2 durante o processo de fermentação.

O desempenho do sistema foi melhor no que diz respeito à manutenção das características físicas das partículas de células imobilizadas, uma vez que o rompimento das mesmas foi reduzido, embora continuassem retendo bolhas de gases no seu interior. A maior dificuldade operacional de tal sistema foi que após um certo tempo a partir do início das fermentações, as partículas que inicialmente se apresentavam bem distribuídas no volume do reator devido à agitação mecânica, flotavam, formando um aglomerado na parte superior do reator. Assim, não havia mistura das partículas, e à medida que se retirava amostras para análises durante o processo, as partículas ficavam fora do meio líquido.

A Figura 4.3 demonstra a configuração do reator no momento em que a fermentação do processo batelada foi interrompida devido a flutuação dos *pellets*.

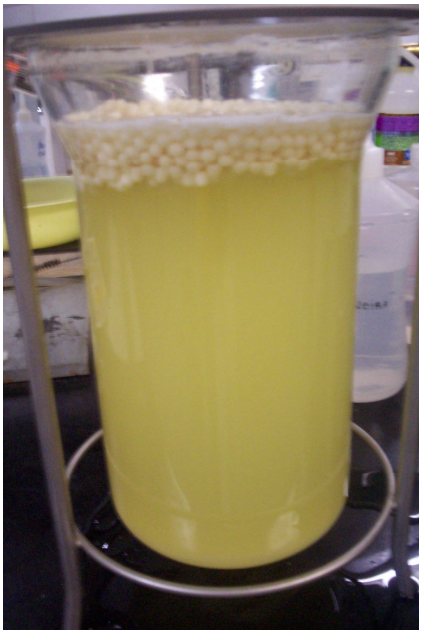


Figura 4.3: Fermentação do processo Batelada convencional interrompido devido a flutuação dos pellets.

O contato dos mesmos com o meio de fermentação era minimizado devido a flutuação dos *pellets* que interferia na transferência de massa, e consequentemente no processo de fermentação. O sistema de mistura se tornou ineficiente e à medida que eram retiradas amostras para o acompanhamento da fermentação, as partículas de levedura imobilizada não mais mantinham contato com a fase líquida.

4.2.5- Reator batelada modificado

Desta forma, fez-se necessário uma quarta configuração de reator a fim de resolver os problemas já apresentados e verificar a eficiência das células imobilizadas no processo fermentativo.

No reator batelada convencional não foi observado o rompimento dos *pellets* durante a fermentação, somente a flutuação destes, portanto, foi proposta uma modificação na configuração do referido reator, visando manter as partículas de levedura imobilizada em suspensão.

Foi desenvolvida uma nova configuração com a utilização de uma placa perfurada colocada no centro do reator a fim de evitar que os *pellets* se concentrassem na região superior, pois a placa seria uma barreira física, fazendo com que os mesmos, ao acumularem CO_2 continuassem em contato com o meio de fermentação

Desta forma, cada uma das duas partes do reator, acima e abaixo da placa perfurada possuíam uma turbina de agitação mecânica. No início do processo, devido à agitação mecânica do reator, os *pellets* apresentavam-se bem distribuídos em todo o compartimento inferior, mas após um certo tempo, variável com a concentração inicial de glicose, os mesmos formaram um aglomerado junto à superfície inferior da placa.

Houve assim, em relação ao reator sem a placa perfurada, uma melhoria sensível, uma vez que nesta conformação as partículas de células imobilizadas ficaram submersas no meio de cultura durante toda a fermentação e o líquido era melhor uniformizado, uma vez que os dois conjuntos de pás do agitador nos dois compartimentos do reator, imprimia uma agitação melhor no líquido. A turbina da parte superior foi montada numa posição tal que, mesmo no final da fermentação, após retirada de todas as amostras, a mesma ainda continuava submersa. A mistura neste reator foi muito mais eficiente do que no reator convencional.

O reator apresentado na Figura 4.4 apresentou a mesma configuração do reator batelada convencional, porém além da placa foi desenvolvido um sistema para coleta dos *pellets* durante o processo de fermentação, permitindo o acompanhamento do crescimento celular tanto no meio de fermentação quanto no interior dos *pellets*, além de verificar o aumento do diâmetro dos mesmos.

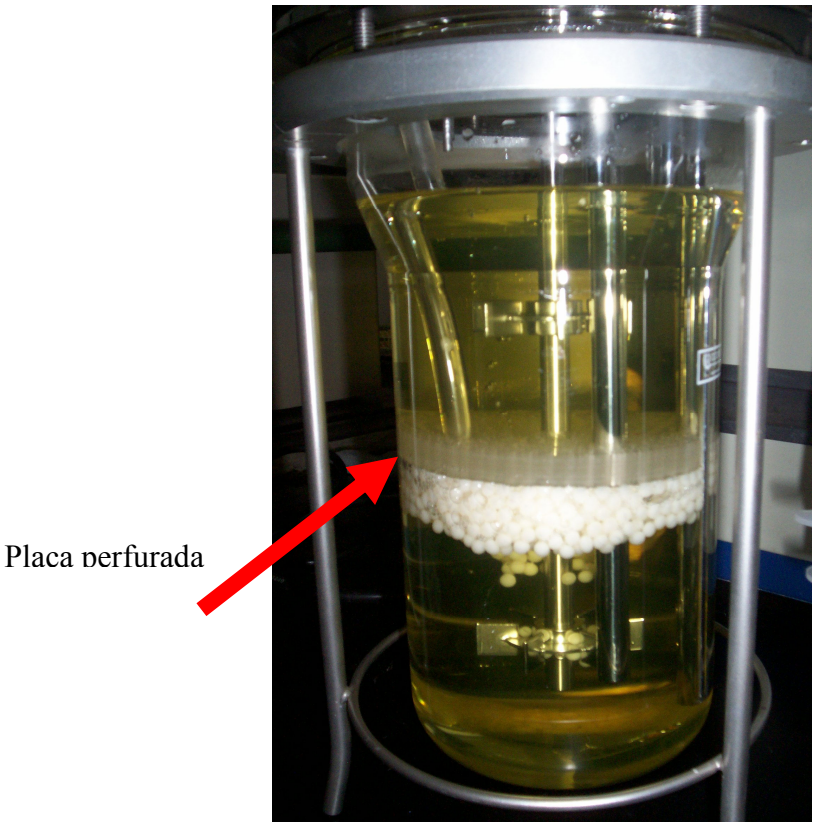


Figura 4.4- Reator utilizado no processo batelada com placa perfurada

Com as alterações realizadas no reator batelada convencional, foi observado que não houve rompimento dos *pellets* apenas a deformação dos mesmos durante todo o processo de fermentação.

Portanto, adotou-se a nova configuração do reator para os demais estudos a serem realizados, uma vez que o mesmo demonstrou bastante eficiência no processo com leveduras imobilizadas.

4.3- Estudo da influência simultânea das concentrações iniciais de levedura e de glicose no processo de imobilização

Uma vez definidas as condições de imobilização e a configuração do reator a serem utilizadas, foi realizado um estudo da influência conjunta das concentrações iniciais de levedura na suspensão de imobilização e da concentração inicial de glicose no desempenho do processo de fermentação. Este estudo foi montado conforme um Planejamento Composto Central (PCC) em que as variáveis X_0 e S_0 foram estudadas, utilizando o sofwtare *Statistic 5.0*, cujos intervalos adotados para as variáveis podem ser vistos na Tabela 4.2.

A ordem de realização dos experimentos foi escolhida aleatoriamente, aos 10 ensaios previamente definidos pelo PCC, foi adicionada mais uma réplica no ponto central. As análises foram realizadas utilizando o sofwtare Statistica® *5.0.*

Tabela 4.2: Ensaios e respostas utilizados para o estudo do planejamento composto central

Os perfis de concentração de substrato, de produto, de células livres e no interior dos *pellets* são apresentadas nas Figuras 4.5 a 4.15.

	So		Xo		Respostas			
Ensaio	**Níveis**	**Glicose(g/L)**	**Níveis**	**Células (g/L)**	**Rendimento fermentação**	**Produtividade (g/L*h)**	**Xpellets (g/L)**	**Xmeio (g/L)**
1	-1	52	-1	29	0,491	2,27	70,598	0,255
2	1	105	-1	29	0,286	2,13	65,234	0,164
3	-1	52	1	43	0,399	3,27	96,962	0,405
4	1	105	1	43	0,282	2,54	75,706	0,321
5	-□	30,5	0	36	0,388	1,65	69,689	0,067
6	+□	148,5	0	36	0,387	3,76	96,128	0,349
7	0	78,5	-□	17	0,388	2,84	53,226	0,267
8	0	78,5	+□	60,8	0,441	3,64	115,368	0,322
9	0	78,5	0	36	0,388	2,70	99,710	0,376
10	0	78,5	0	36	0,334	2,45	100,300	0,335
11	0	78,5	0	36	0,281	2,16	118,897	0,405

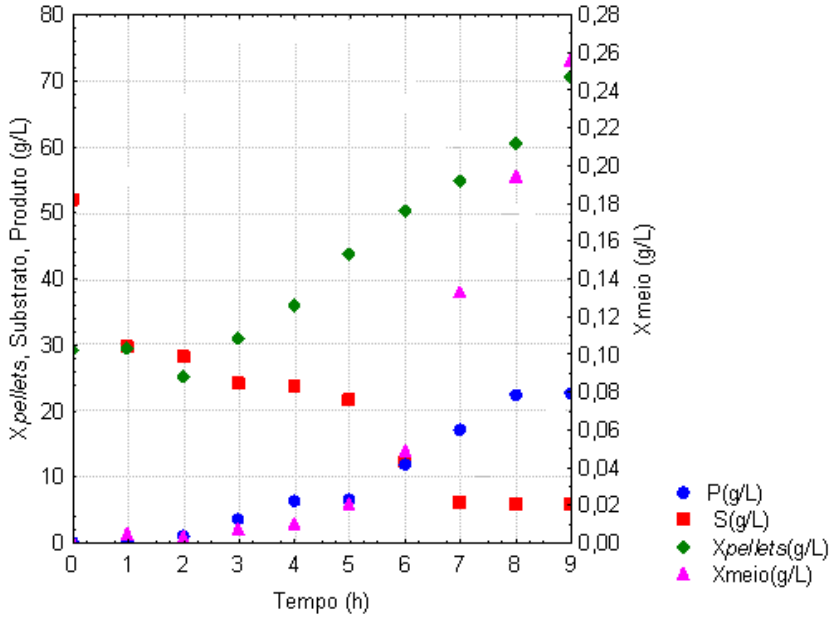


Figura 4.5: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 1, S_0 = 52,0 g/L e X_0 = 29,0 g/L.

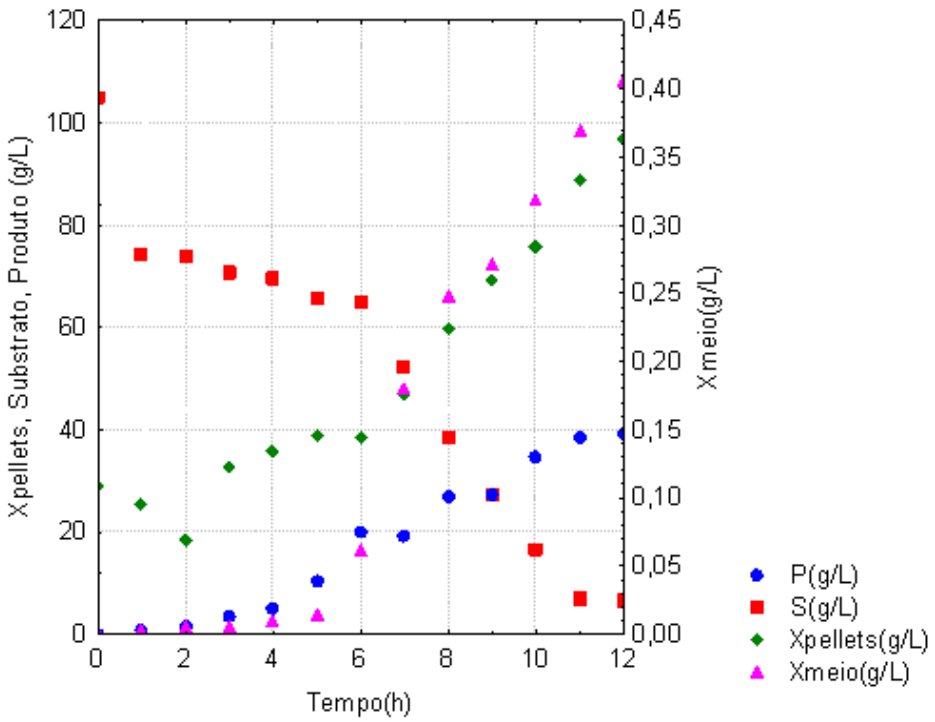


Figura 4.6: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 2, S_0 = 105,0 g/L e X_0 = 29,0 g/L.

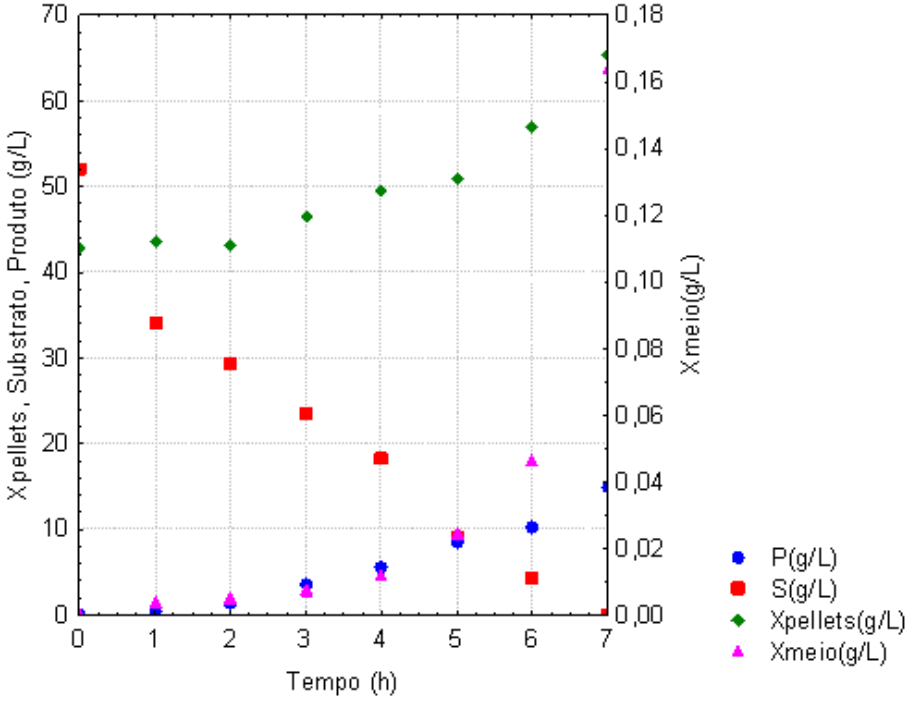


Figura 4.7: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 3, S_0 = 52,0 g/L e X_0 = 43,0 g/L.

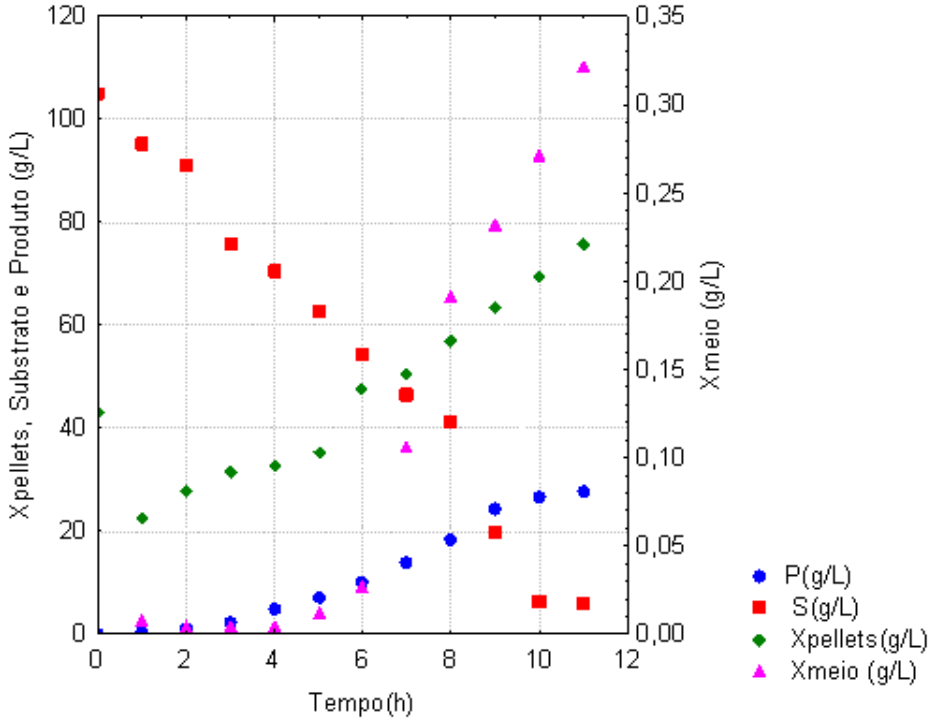


Figura 4.8: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 4, S_0 = 105,0 g/L e X_0 = 43,0 g/L.

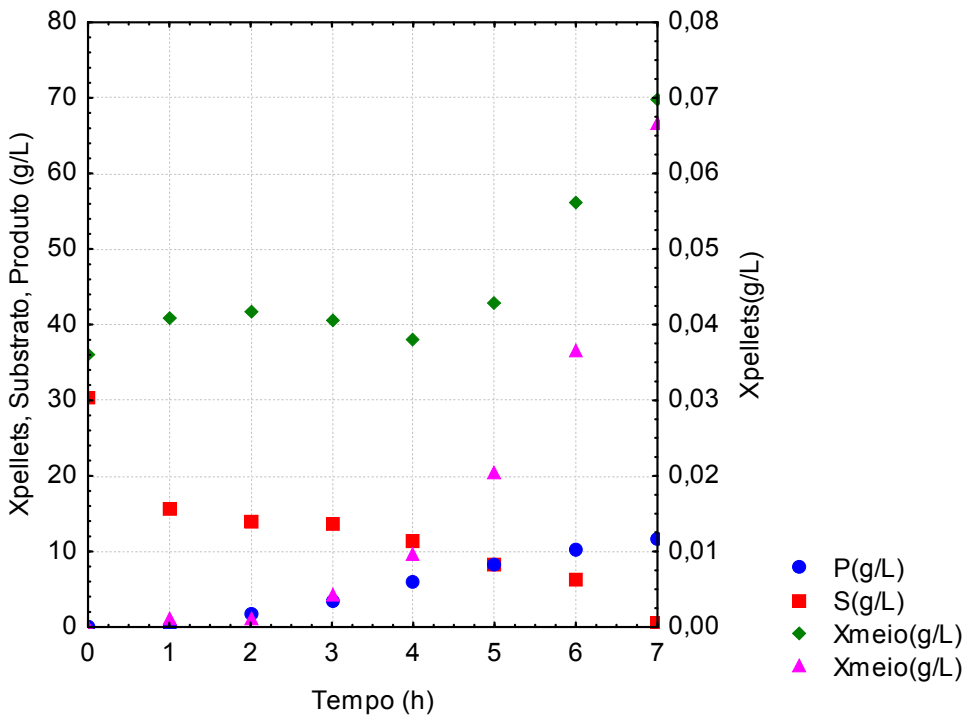


Figura 4.9: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 5, S_0 = 30,5,0 g/L e X_0 = 36,0 g/L.

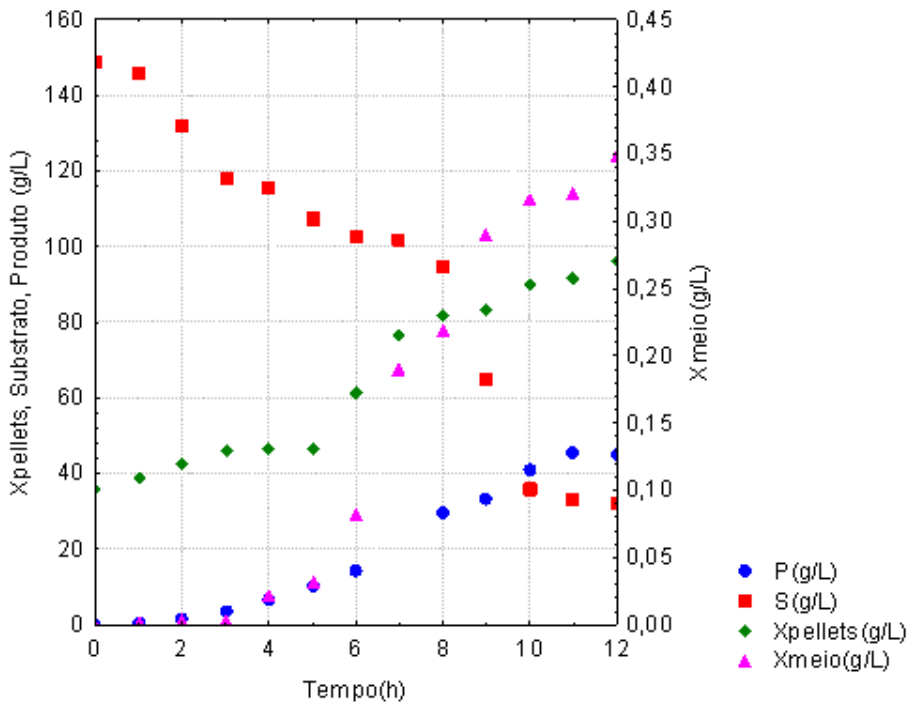


Figura 4.10: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos pellets e de etanol no ensaio 6, S0 = 148,5 g/L e X0 = 36,0 g/L.

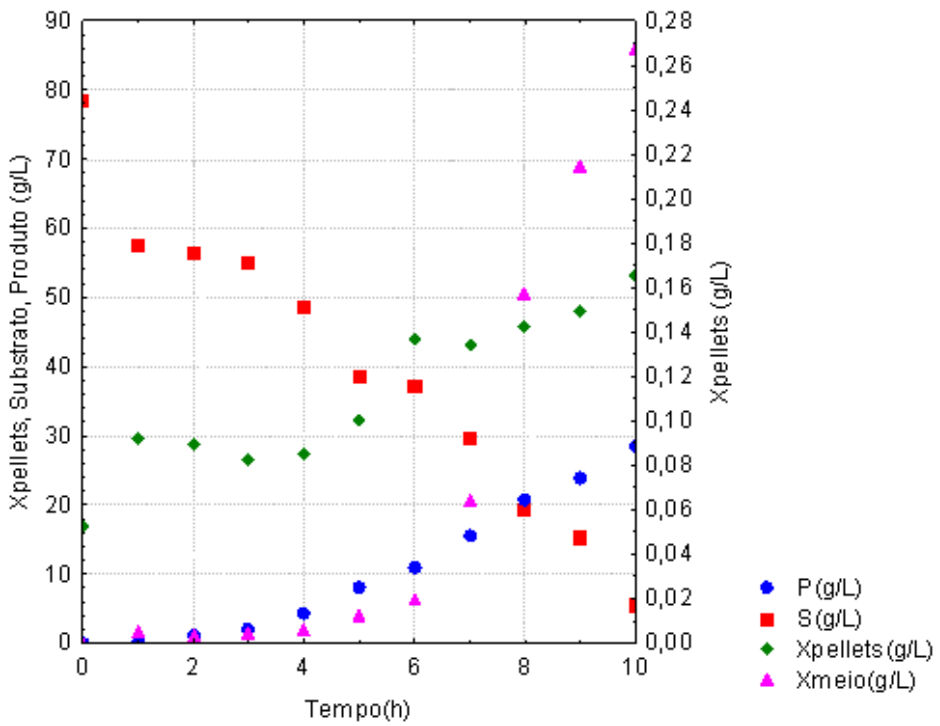


Figura 4.11: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 7, S_0 = 78,5 g/L e X_0 = 17,0 g/L.

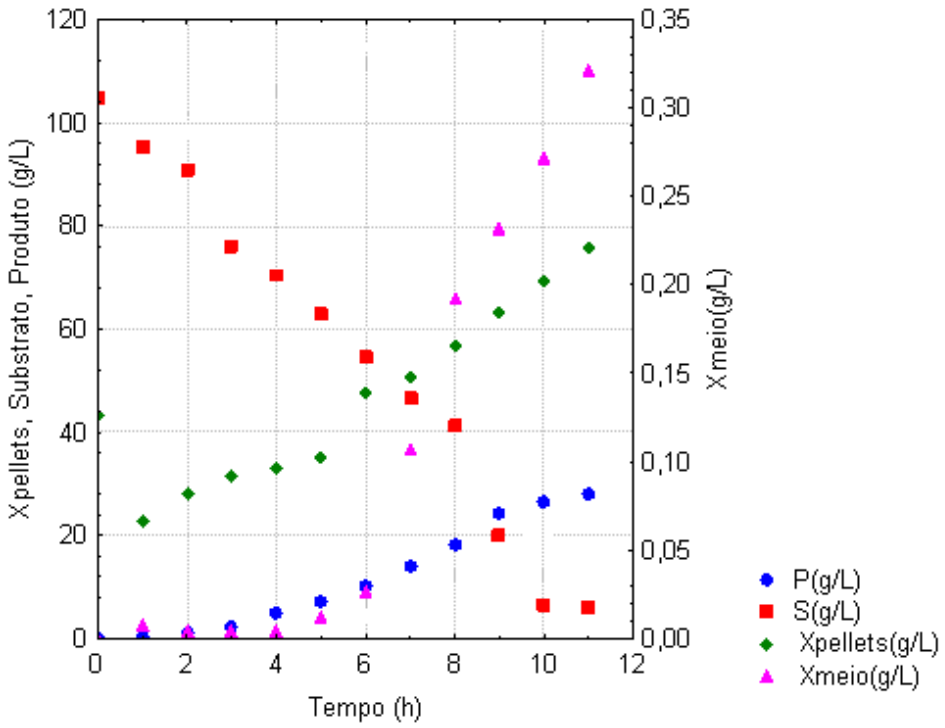


Figura 4.12: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 8, S_0 = 78,5 g/L e X_0 = 60,8 g/L.

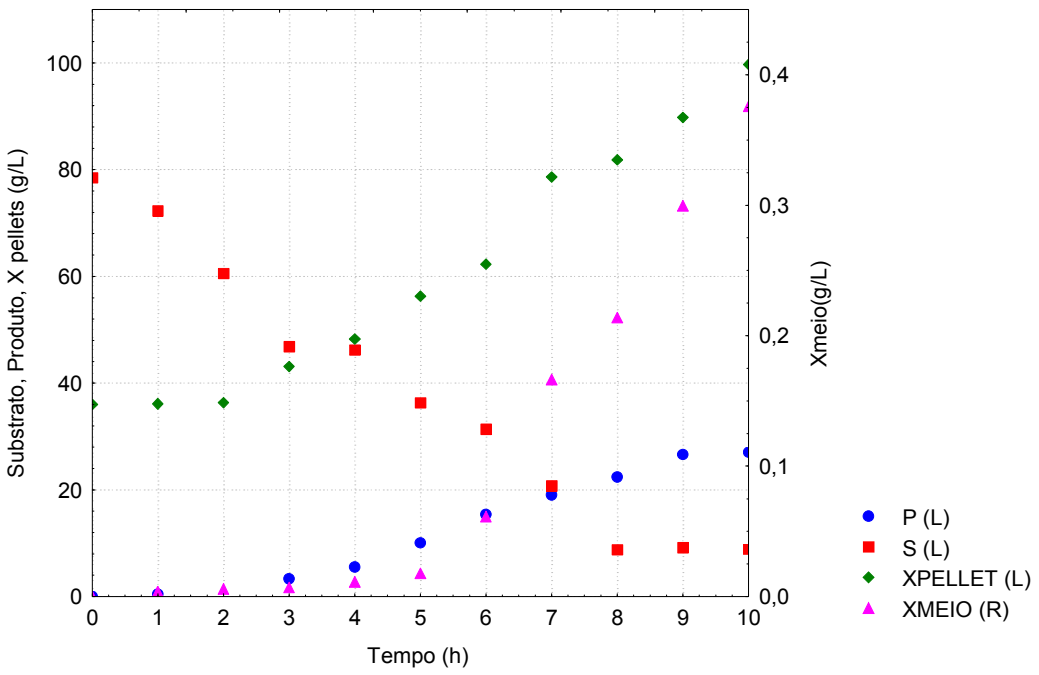


Figura 4.13: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 9, S_0 = 78,5 g/L e X_0 = 36,0 g/L.

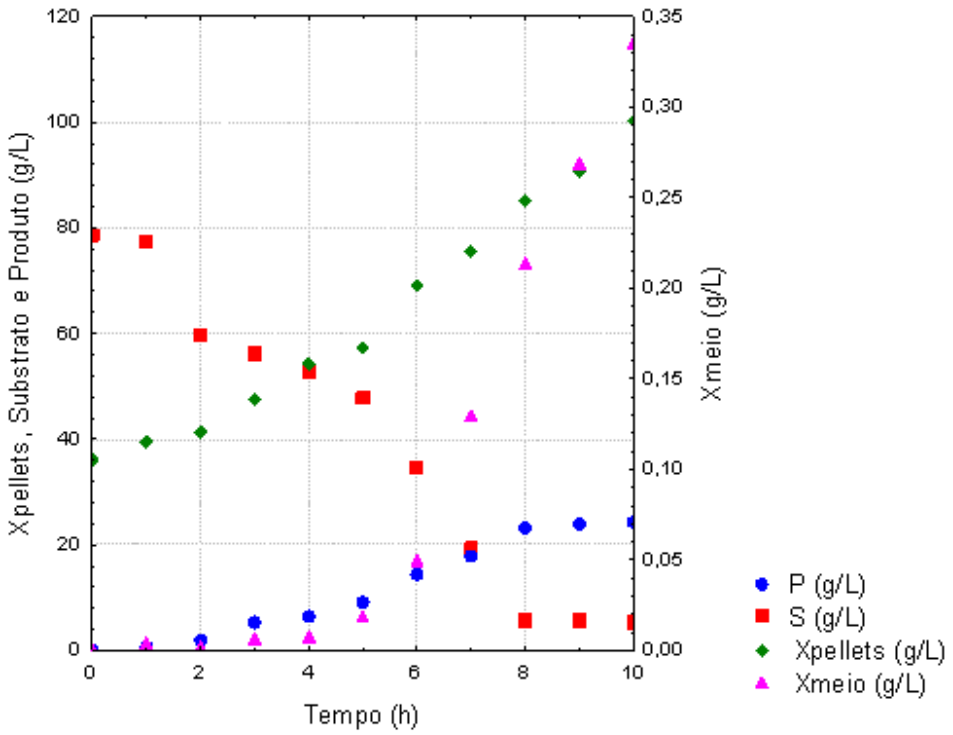


Figura 4.14: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 10, S_0 = 78,5 g/L e X_0 = 36,0 g/L.

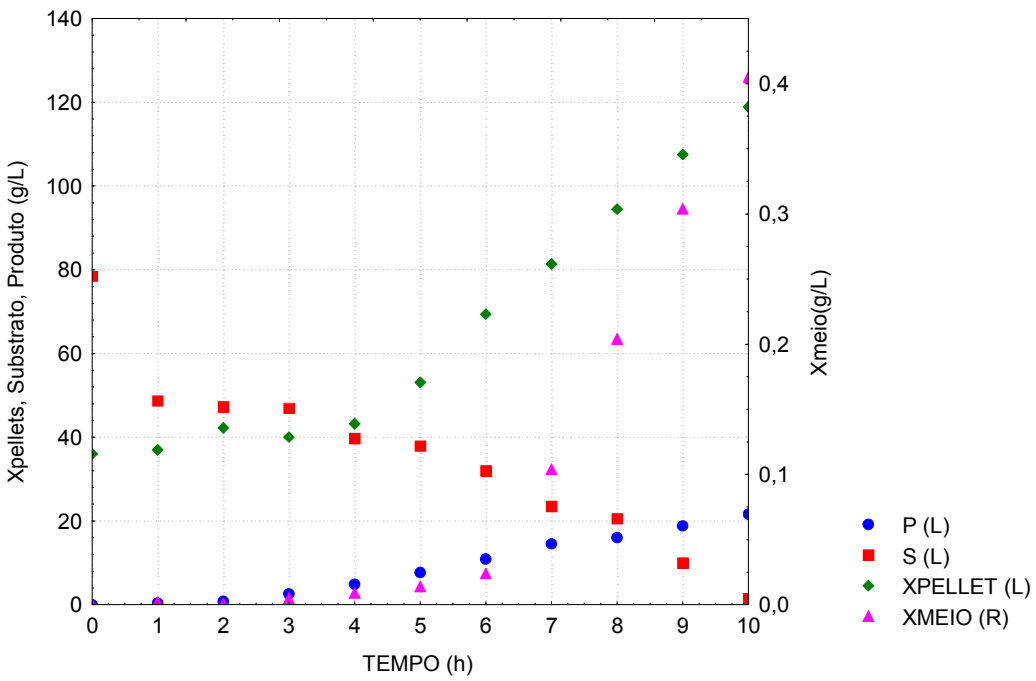


Figura 4.15: Perfis de concentração de substrato, células no meio e no interior dos *pellets* e de etanol no ensaio 11, S_0 = 78,5 g/L e X_0 = 36,0 g/L.

Uma análise dos 11 ensaios revela que nas primeiras horas da fermentação, houve uma queda acentuada do açúcar, especialmente naquelas de mais baixa concentração de glicose, com pequeno crescimento e baixa formação de etanol. Em todos os experimentos, o crescimento celular no meio de fermentação foi muito baixo, especialmente nas primeiras horas da fermentação, o que sugere uma boa retenção das células no interior das partículas.

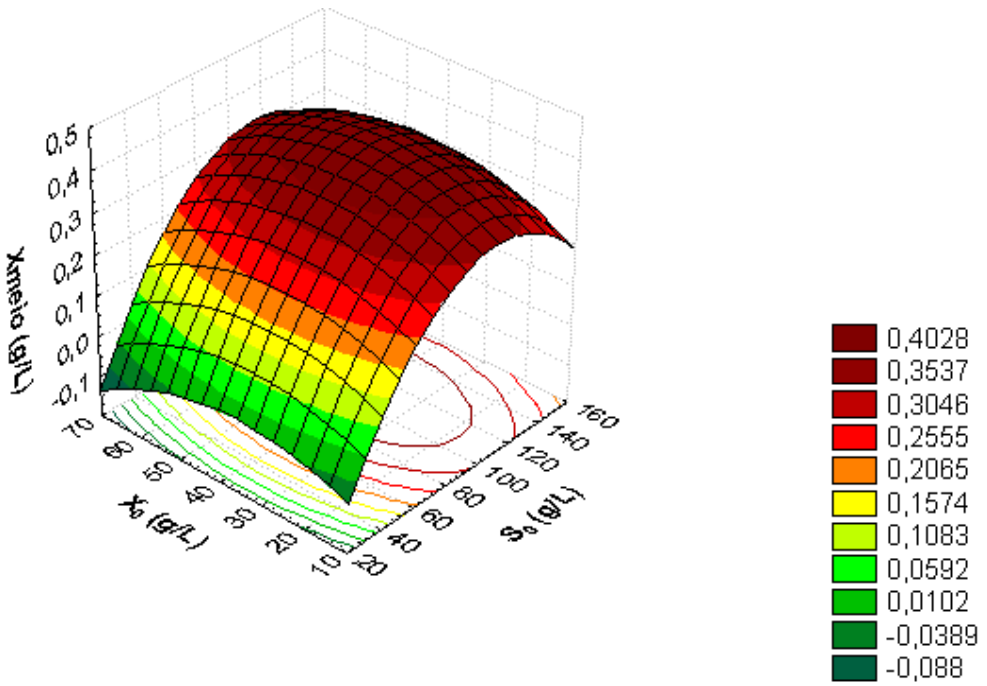
A partir dos resultados dos ensaios realizados tendo como base o PCC, foram traçadas algumas superfícies de resposta e avaliadas, as influências das variáveis estudadas na concentração final de células no meio (Xmeio), na concentração final de células no interior dos *pellets* (X*pellet*), no rendimento ($Y_{P/S}$) da fermentação e por fim na produtividade da fermentaçãoNa

A superfície de resposta e a superfície de contorno representada pela Figura 4.16 apresenta como resposta a concentração de células de levedura no meio externo aos *pellets* em função das concentrações iniciais de substrato e células no meio de imobilização. Uma análise desta figura mostra que uma concentração máxima de células no meio foi encontrada para concentrações iniciais de células imobilizadas em torno de 40 g/L e concentrações iniciais de substrato em torno de 20 g/L.

A análise global da Figura 4.16 sugere que para baixas concentrações de substrato,em todas as concentrações celulares iniciais utilizadas, o crescimento celular no meio externo foi

muito baixo. Isso provavelmente se deve ao fato de que para concentrações de substrato baixas, há pequena formação de CO_2, havendo portanto pequena alteração no diâmetro dos poros dos *pellets* e também pequena deformação dos mesmos, e como conseqüência, ocorre pouco escape de células para o meio externo. Este resultado leva a concluir que o alginato de sódio utilizado nos experimentos não é um material muito adequado para a imobilização de células de leveduras muito ativas na produção de etanol, como é o caso da levedura utilizada no presente trabalho, de alta capacidade fermentativa e grande formação de CO_2.

A partir da Figura 4.16 foi observado que mesmo tendo um ponto de máximo na superfície, a concentração de células no meio alcançou níveis muito inferiores as da concentração no interior do *pellets* o que garante que a fermentação acontece quase que somente no interior dos *pellets* e não com células livres presentes no meio de fermentação, resultantes de crescimento celular de células que possivelmente durante o processo de imobilização ficaram na superfície da partícula, o que garante uma boa eficiência no processo de imobilização.



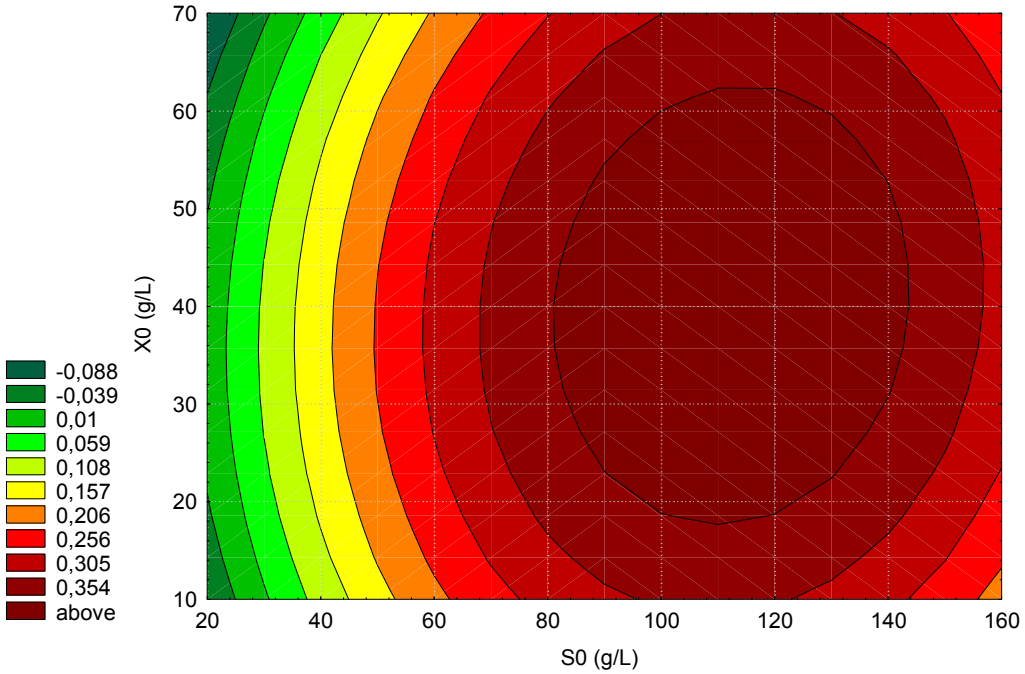


Figura 4.16: Superfícies de resposta e contorno para X_{meio} (g/L)

Roukas (1996) utilizando *Saccharomyces cerevisae* na forma imobilizada em alginato de sódio utilizando como substrato o melaço de beterraba em processo a batelada e batelada alimentada com células imobilizadas afirma que foi mantida por 8 dias a estabilidade de produção de etanol. Por outro lado, as células imobilizadas quando submetidas a uma segunda fermentação, implicava em rompimento dos *pellets* durante o processo.

A influência das concentrações iniciais de substrato e de células no meio de imobilização dos 11 experimentos do PCC também foram correlacionadas à concentração celular dentro das partículas de células imobilizadas. Após a análise de significância das variáveis, foi construída a superfície de resposta e superfície de contorno, apresentando X_{pellet} em função de S_0 e X_0, conforme mostra a Figura 4.17.

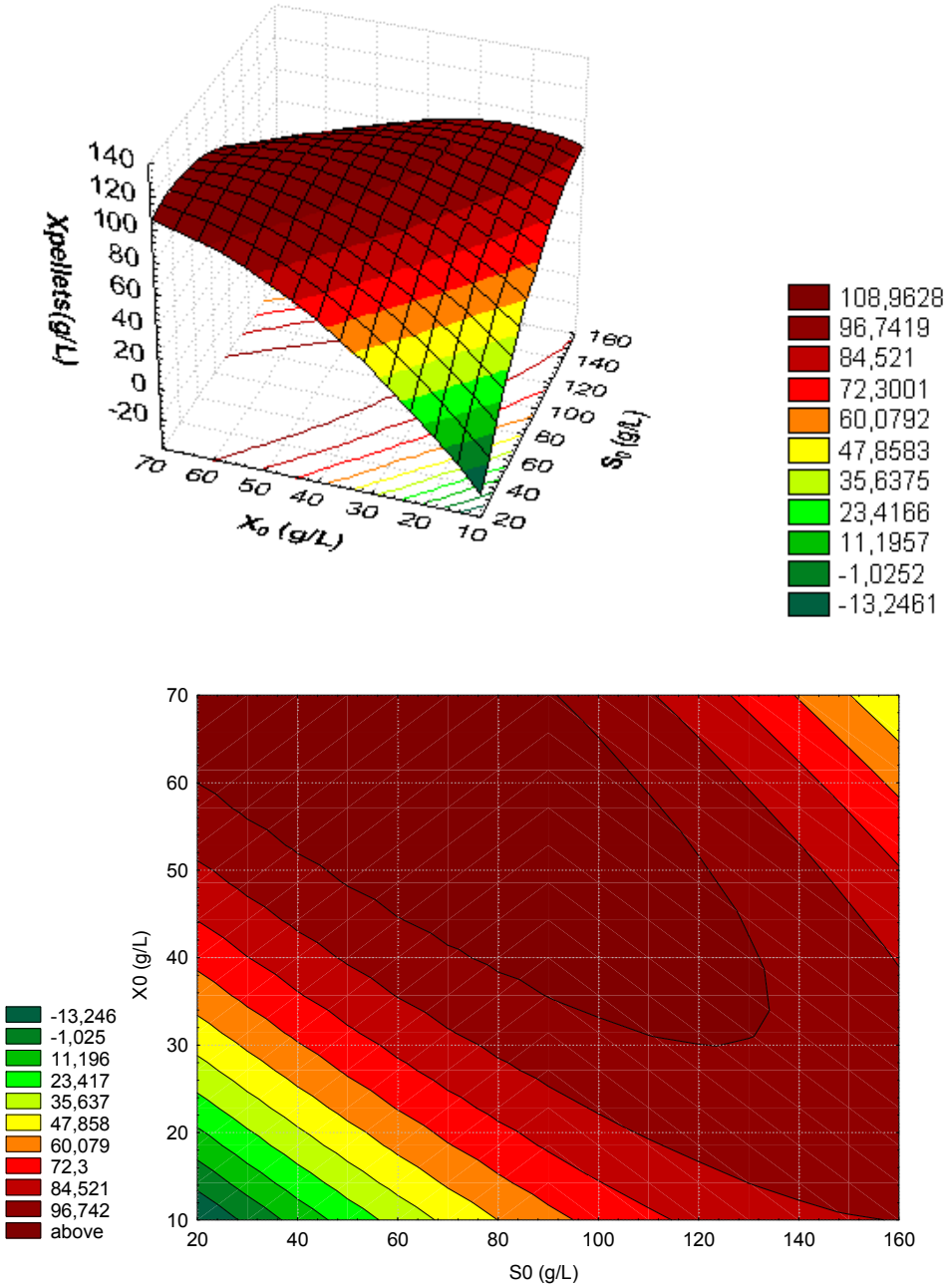


Figura 4.17: Superfícies de resposta e de contorno obtida para o X_{pellet} (g/L)

Analisando-se a superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 4.17, verifica-se a existência de uma região com máxima concentração celular dentro dos *pellets* que se encontra numa faixa de X_0 (30 a 70 g/L) e de valores de S_0 (20 a 130g/L). Para se alcançar altos valores da concentração celular dentro dos *pellets* na imobilização, deve-se utilizar concentrações celulares iniciais superiores a 30 g/L, porém sempre favorecido pelas maiores concentrações iniciais de substrato. Portanto, fica evidenciado que a concentração inicial de substrato no meio de fermentação tem um efeito acentuado na concentração a ser

alcançada dentro do *pellet,* viabilizando a operação numa grande faixa de operação. Isso provavelmente esteja relacionado com a velocidade de transferência de massa do substrato desde o meio líquido até o interior do pellet, que é favorecido pelo maior gradiente de concentração. Isso significa que na imobilização para um processo industrial pode-se começar com um inóculo de mais baixa concentração, pois ocorre grande crescimento dentro das partículas de células imobilizadas.

A produtividade em g/(L.h) é apresentada na Figura 4.18. A partir da análise da Figura 4.18, verifica-se que a maior produtividade é obtida para altos valores de S_0 e para valores altos e baixos de X_0. Portanto numa situação prática seria interessante iniciar o processo com baixas concentrações de levedura, pois essas tem um custo elevado e durante a fermentação haverá o crescimento necessário para atingir alta concentração celular. Durante esse crescimento haverá síntese do etanol, uma vez que a formação desse segue uma cinética associada ao crescimento celular.

O rendimento da fermentação também foi analisado como uma função das variáveis S_0 e X_0 e a superfície de resposta obtida está apresentada na Figura 4.22.

Uma análise da Figura 4.19 indica que os maiores rendimentos na síntese do etanol ocorrem para altos e baixos valores de S_0 e para baixos valores de X_0. Assim numa aplicação prática o interessante seria trabalhar com altas concentrações de glicose e baixas concentrações iniciais de células.

Nas Figuras 4.20 a 4.27 é apresentada uma comparação dos resultados experimentais de um experimento realizado no atual trabalho, cuja concentração inicial de células no meio de imobilização foi igual a 36 g/L e a concentração inicial de glicose na fermentação foi igual a 110 g/L com os resultados obtidos por Batista (2005), numa fermentação na qual a concentração inicial de levedura na imobilização em alginato de sódio foi 8,1 g/L e a concentração inicial de glicose foi 65 g/L.

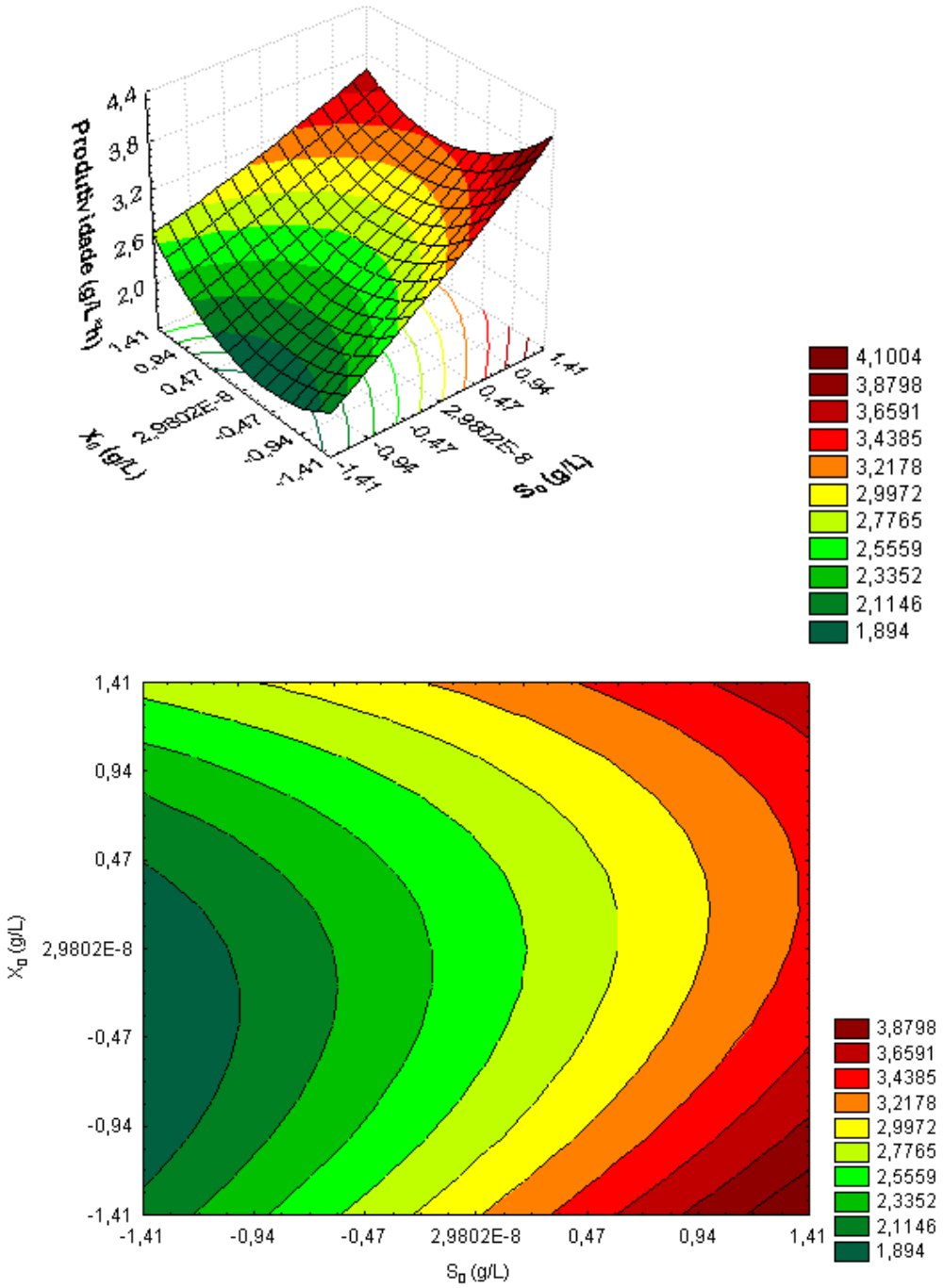


Figura 4.18: Superfícies de resposta e contorno para a produtividade(g/L*h)

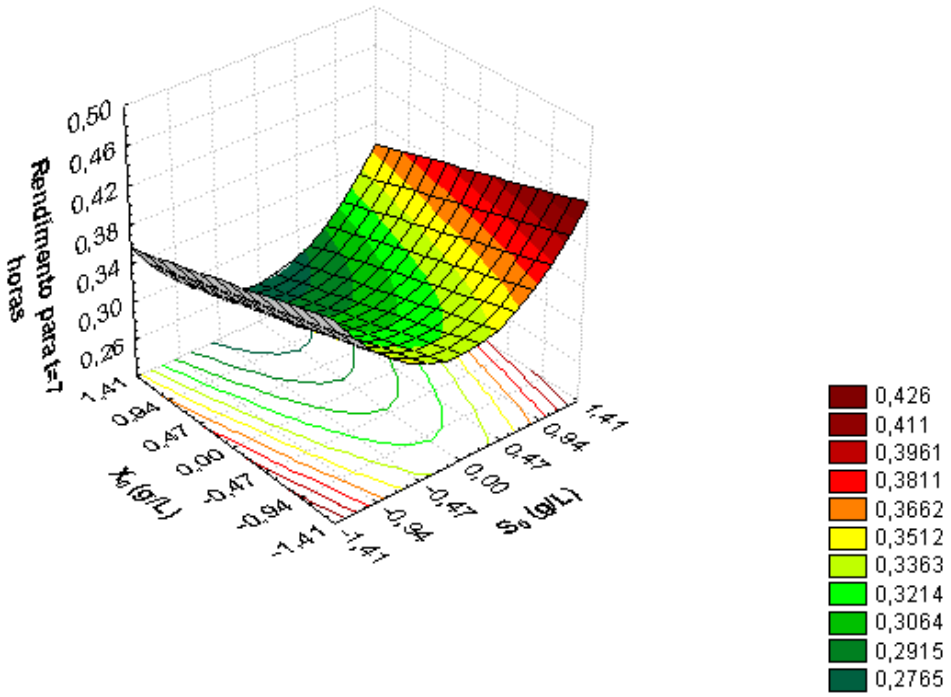


Figura 4.19: Superfície de resposta obtida para o PCC tendo como resposta o rendimento da fermentação no tempo de 7 horas.

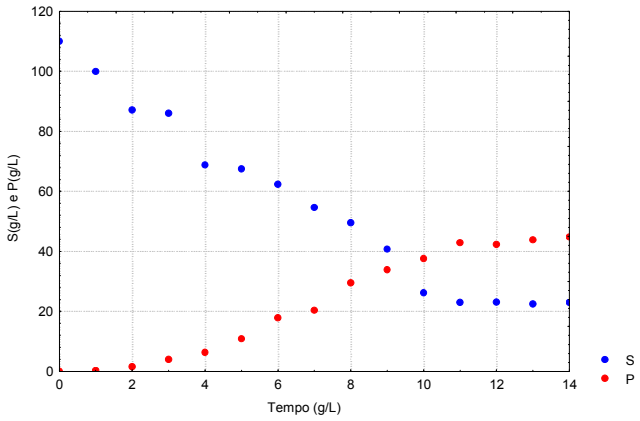


Figura 4.20: Perfis de S e P em fermentação com células imobilizadas com S_0= 110 g/L e X_0= 36 g/L

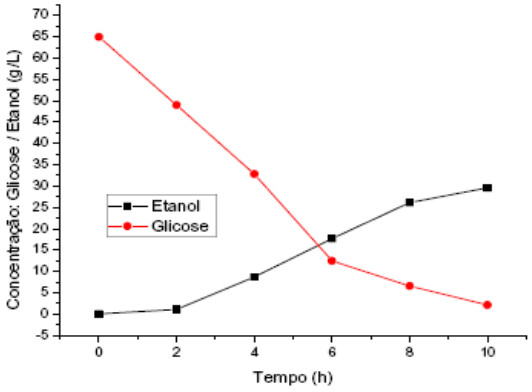


Figura 4.21: Perfis de S e P em fermentação com células imobilizadas, com S_0= 65,0 g/L e X_0= 8,1 g/L, desenvolvida por Batista (2005)

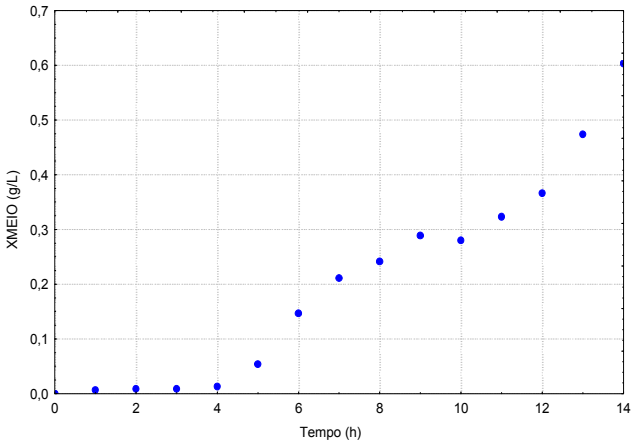


Figura 4.22: Perfil de células livres em fermentação com células imobilizadas com S_0= 110 g/L e X_0= 36 g/L

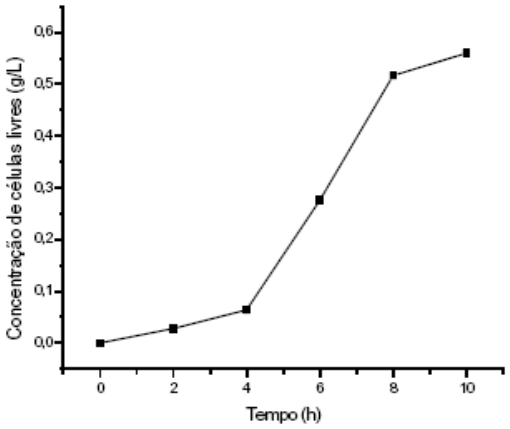


Figura 4.23: Perfil de células livres em fermentação com células imobilizadas, com S_0= 65,0 g/L e X_0= 8,1 g/L, desenvolvida por Batista (2005)

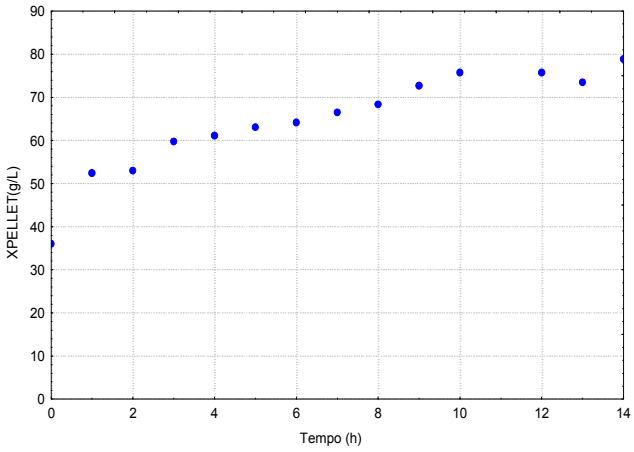


Figura 4.24: Perfil de X_{pellet} em fermentação com células imobilizadas com S_0= 110 g/L e X_0= 36 g/L

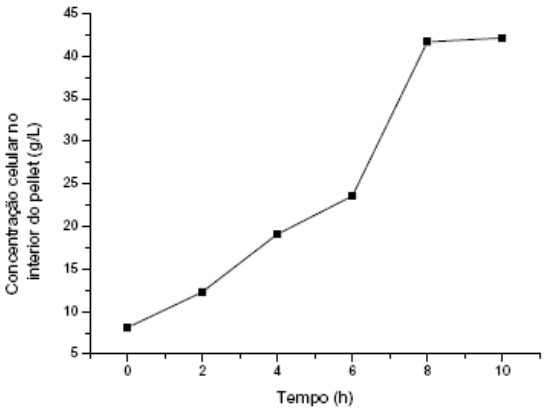


Figura 4.25: Perfil de X_{pellet} em fermentação com células imobilizadas, com S_0= 65,0 g/L e X_0= 8,1 g/L, desenvolvida por Batista (2005)

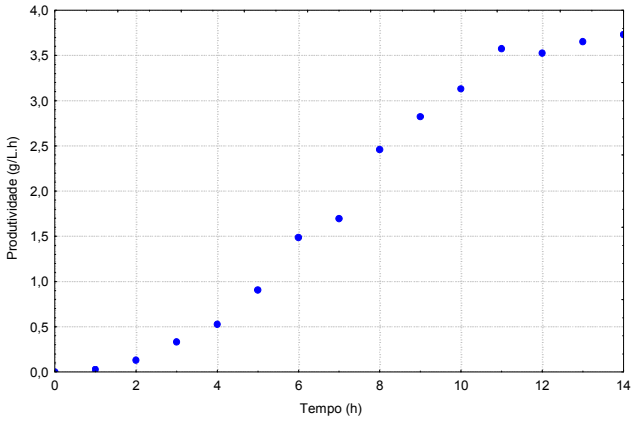


Figura 4.26: Perfil da produtividade em fermentação com células imobilizadas, com S_0= 110 g/L e X_0= 36 g/L

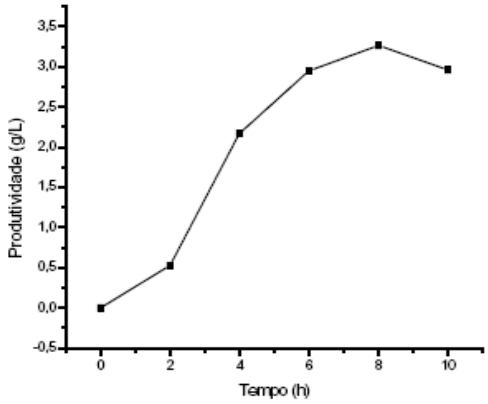


Figura 4.27: Fermentação com células imobilizadas, com S_0= 65,0 g/L e X_0= 8,1 g/L, desenvolvida por Batista (2005).

Uma análise comparativa dos pares de gráficos relativos às Figuras 4.20 a 4.27 revela um comportamento cinético bastante semelhante para os perfis cinéticos relativos à concentração de substrato, produto e células livres no meio. Com relação à concentração celular no interior dos *pellets* verifica-se no atual trabalho, que partiu de um valor maior de X_0, uma tendência de crescimento menor que no trabalho de Batista (2005). A comparação destas duas Figuras ilustra que o valor de X_{pellet} tende a aumentar, qualquer que seja o valor de S_0.

O estudo realizado pelo Planejamento Composto Central (PCC) não foi decisivo no que diz respeito às melhores concentrações de células e de substrato no meio fermentativo com relação às respostas produtividade e rendimento da fermentação. Possivelmente uma ampliação do intervalo analisado possa ser necessária ou a análise de outras variáveis também deva ser incluída num novo estudo, porém o ponto de partida já foi realizado, uma vez que praticamente não são encontrados trabalhos deste formato na literatura consultada.

4.4- Estudo da Eficiência de imobilização

Com os resultados dos experimentos 5, 6 e 11, foi efetuado um estudo da eficiência de imobilização, apresentado na Figura 4.28, sendo a eficiência de imobilização definida pela razão entre a concentração de células livres no meio e a concentração de células imobilizadas. Assim, quanto menor for essa razão, melhor será o processo de imobilização.

Batista (2005) usando S_0=65g/L e X_0=8,1g/L após 10 horas de fermentação obteve uma razão entre as células livres e células imobilizadas igual a 1,4%, no presente trabalho com concentrações variáveis de S_0 e X_0=36g/L para 10 horas de fermentação o máximo valor obtido para a mesma razão foi de 0,35%, o processo de imobilização foi bastante satisfatório no que diz respeito à retenção das células dentro dos *pellets* antes do seu rompimento.

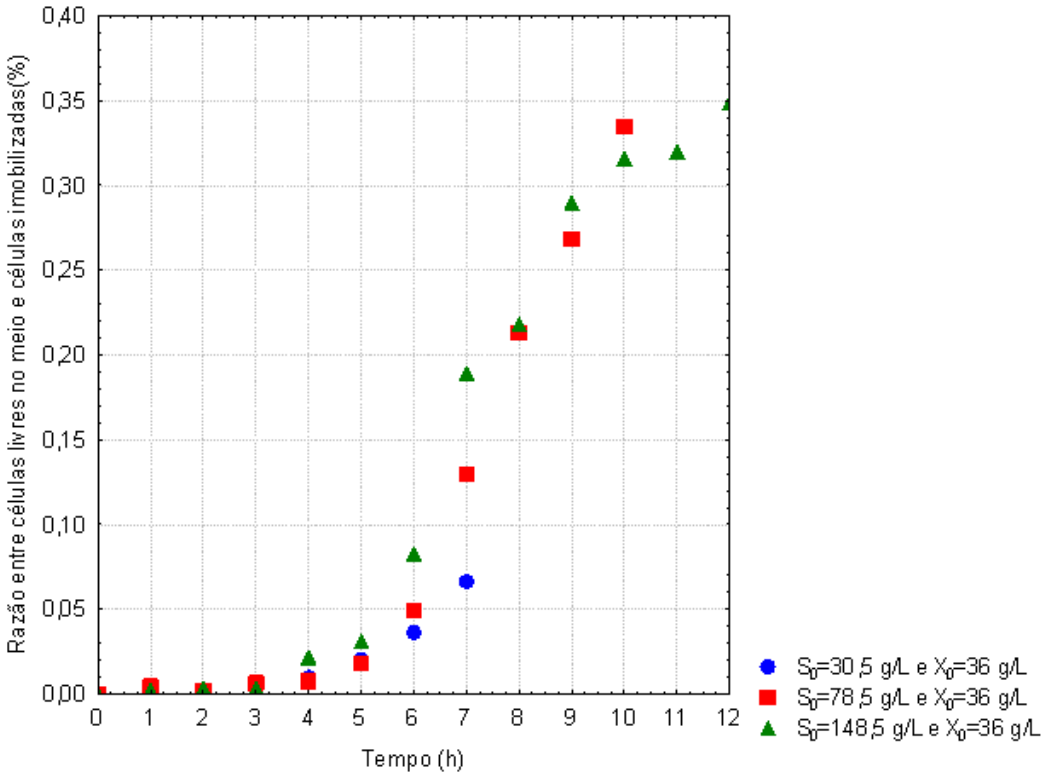


Figura 4.28 – Análise da eficiência de imobilização dada pela razão existente entre células livres no meio e células imobilizadas

Este fato também pode ser comprovado a partir da observação visual do desenvolvimento do processo fermentativo, utilizando S_0= 52g/L; X_0= 29 g/L , apresentado na pela Figura 4.31, na qual verifica-se um aumento de turbidez do meio apenas no final da fermentação. A seqüência de fotos apresentada na Figura 4.29 foi tirada em intervalos de tempo de 1 em 1 hora.

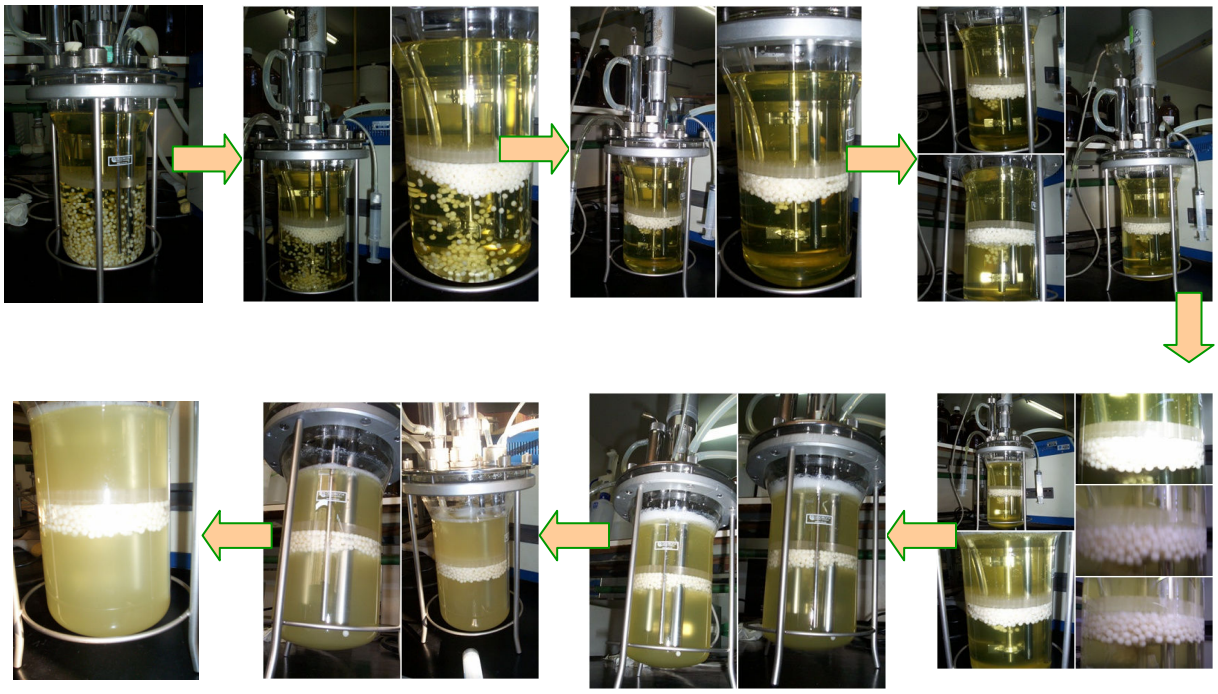


Figura 4.29 : Acompanhamento do processo de fermentação alcoólica de t=0 a t=7 horas, So= 52g/L; Xo= 29 g/L

4.5- Cinética da fermentação com levedura imobilizada

A representação conceitual de processos por meio de modelagem consititui uma ferramenta básica para o projeto de processos, a otimização de operação, treniamento de operadores e controle de processos utilizando estratégias baseadas em modelos. Entretanto, para processos de produção de etanol por fermentação, a aplicabilidade dessas ferramentas dá-se em grande parte, ainda hoje, com a utilização de informações qualitativas oriundas do conhecimento industrial adquirido nas últimas décadas.

Essa seção busca o desenvolvimento de representações de modelos cinéticos para a descrição de sistemas de fermentação na produção de etanol com células imobilizadas. Vários fatores são considerados importantes para essa investigação. A presença ou não de inibição causada pelo etanol, substrato e pela concentração de células. Para o desenvolvimento desse estudo cinético foram feitos 5 ensaios fermentativos com concentração inicial do meio imobilizado constantes de 36g/L e uma faixa da concentração de substrato variável, a fim de se ajustar os parâmetros dos modelos conhecidos na literatura. As Figuras 4.30 e 4.31, representam os resultados dos ensaios obtidos dos experimentos para o estudo dos parâmetros cinéticos.

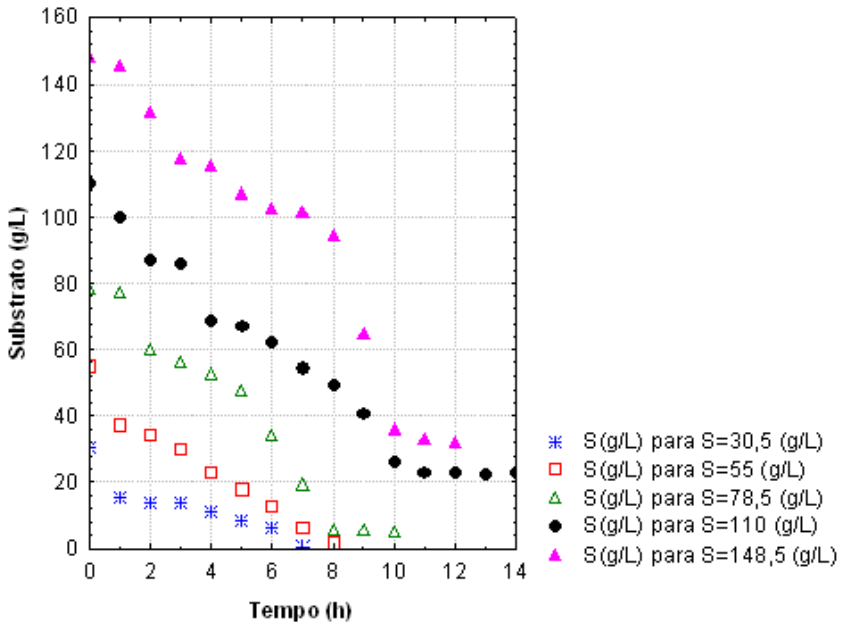


Figura 4.30: Perfil da concentração de substrato em função do tempo, para concentração de células X_0= 36g/L.

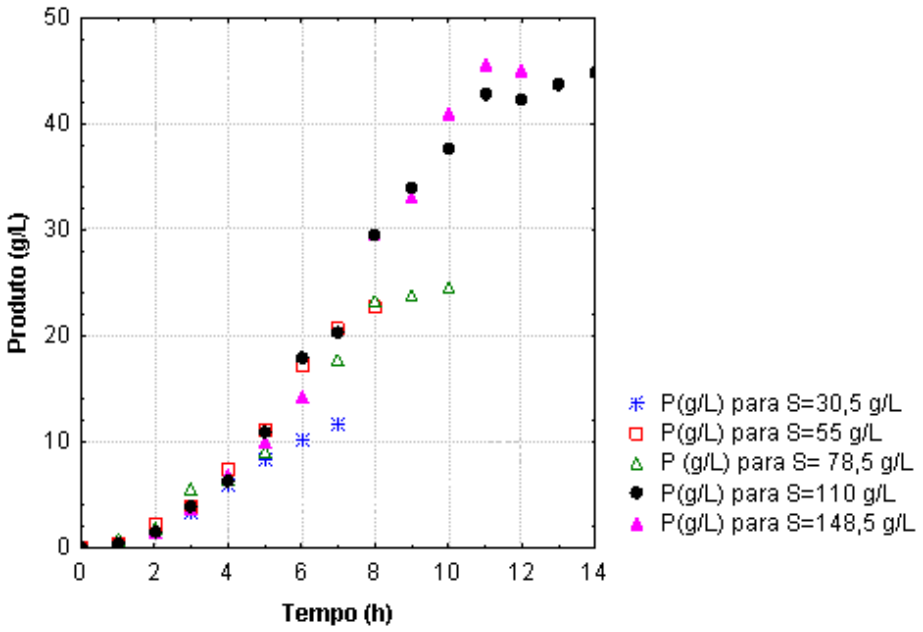


Figura 4.31: Perfil da concentração de produto em função do tempo, para concentração de substrato variável e concentração de células X_0=36 g/L.

Utilizando o *software scilab*, todos os 11 modelos propostos por Birol (1998), foram avaliados com o objetivo de verificar a adequadabilidade dos mesmos para representar os ensaios realizados neste trabalho.

A grande lacuna do trabalho de Birol *et al.,* (1998) dá-se pelo fato de que aquele autor não expressou o comportamento do sistema por parâmetros gerais, assim cada experimento determinado era capaz de descrever somente o conjunto de dados utilizados para a sua avaliação. Essa é uma falha importante no processo de sintonia do modelo. No presente trabalho busca-se parâmetros comuns que descreverão todas as condições avaliadas e se utilizará de um conjunto de validação não utilizado na sintonia do modelo para a avaliação da qualidade do modelo cinético determinado.

Após a investigação dos 11 modelos, apresentados na Tabela 2.2, constatou-se que os modelos que melhor descreveram o sistema com células imobilizadas em alginato de sódio foram aqueles conhecidos como modelo cinético de Monod e de Hinshelwood.

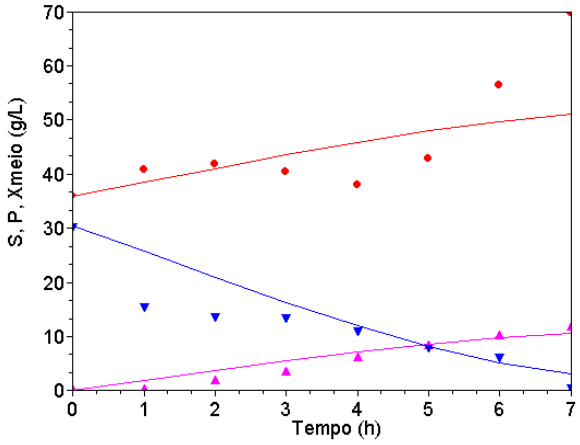


Figura 4.32: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=30,5g/L

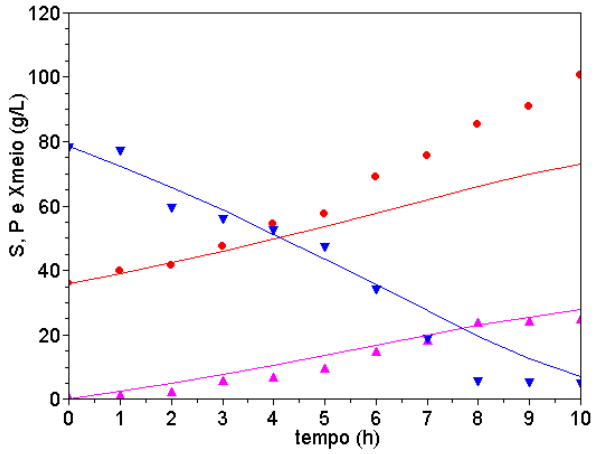


Figura 4.33: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=78,5g/L

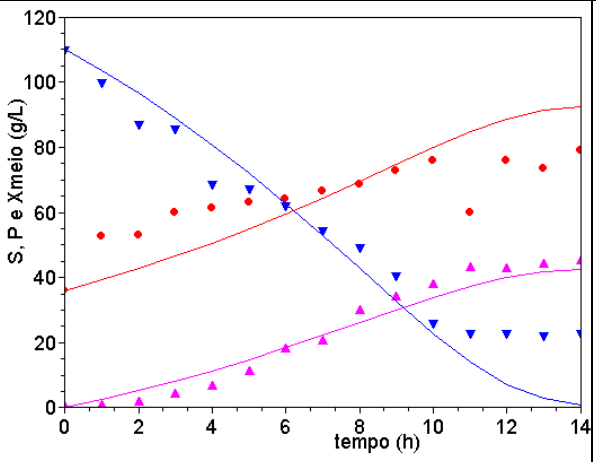


Figura 4.34 : Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=110g/L

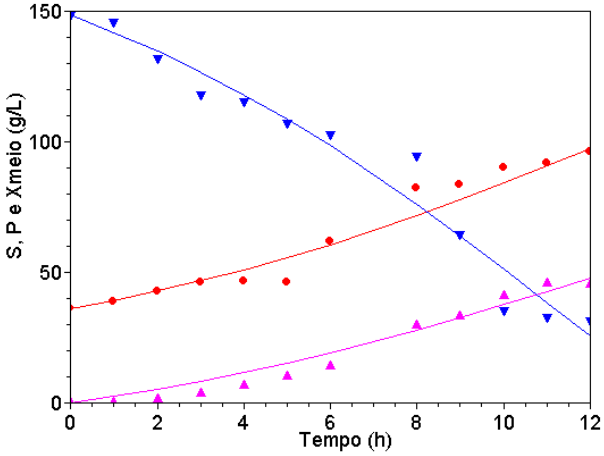


Figura 4.35: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=148,5g/L

Os parâmetros obtidos para a descrição dos ensaios segundo cinética de Monod são representados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Valores dos parâmetros ajustados para Modelo proposto por Monod

Parâmetros	Valores ajustados para o modelo de Monod
mi_max	0,095
q_max	0,077
Ksx	11,152
Ksp	15,000
Yxs	9,864
Yps	0,410

Com os dados obtidos pelo experimento, foi feito o estudo de validação do modelo sintonizado, para um experimento com a mesma condição inicial para a concentração de células no interior do *pellet* de 36g/L e concentração inicial de substrato não considerada na sintonia do modelo.

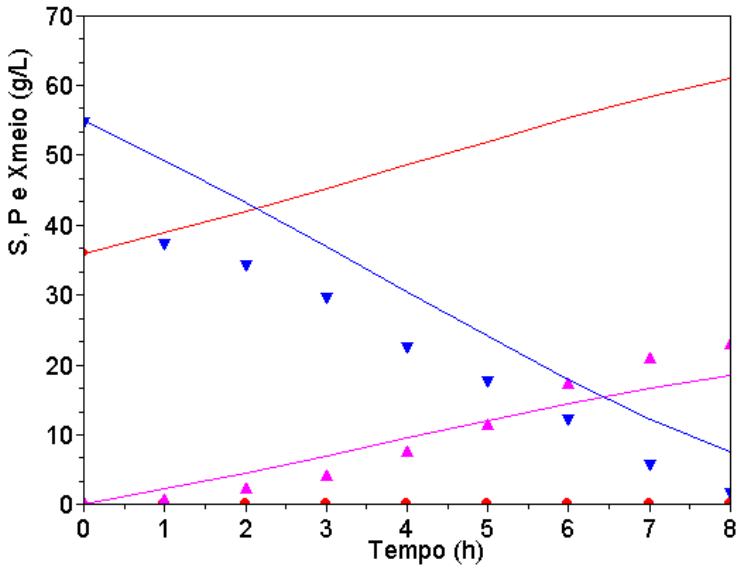


Figura 4.36: Comportamento dos perfis do modelo de Monod com dados de validação para S_0=55 g/L. colocar gráfico novo

Os valores obtidos para os ensaios segundo Hinshelwood são representados pela Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Valores dos parâmetros ajustados para o modelo de Hinshelwood

Parâmetros	Valores ajustados para o modelo de Hinshelwood
mi_max	0,086
q_max	0,082
Ksx	5,000
Ksp	17,449
Kpp	0,001
Kpx	0,001
Yxs	10,000
Yps	0,410

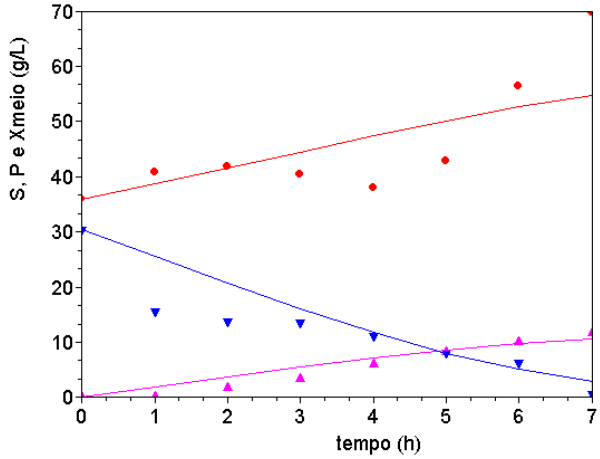


Figura 4.37: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=30,5g/L

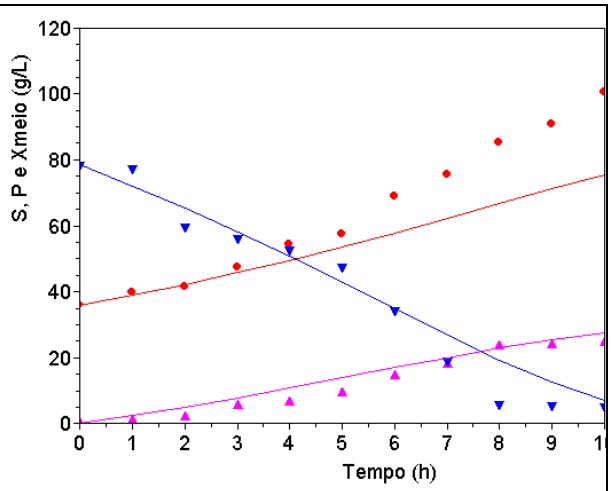


Figura 4.38: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=78,5g/L

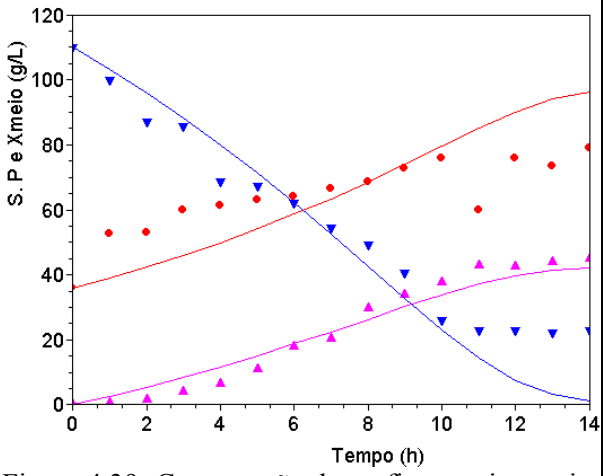


Figura 4.39: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=110g/L

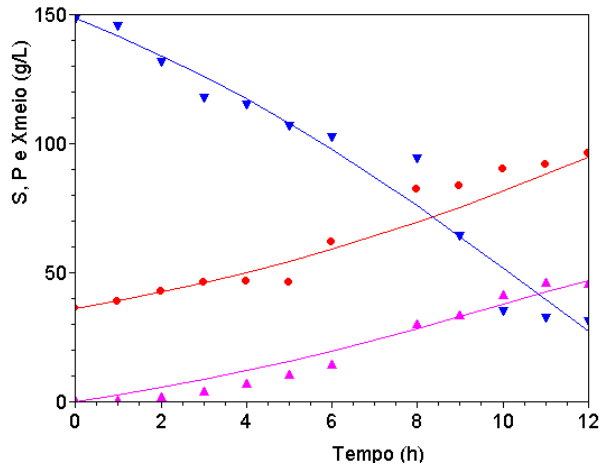


Figura 4.40: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=148,5g/L

Uma outra análise foi avaliada, a fim de verificar também o comportamento dos perfis de substrato, produto e células imobilizadas, considerando-se os valores da concentração de

células nos *pellets* para o volume total de reator. Com essa abordagem, corrige-se o volume para a determinação de concentração de células para o volume total, ou seja, não somente no interior dos *pellets* mas o que representa esse volume se levado em consideração o volume total de meio a ser imobilizado. Os resultados estão apresentados nas Figuras 4.41 a 4.47.

As conversões das concentrações no interior do *pellet* levando em conta o volume total de reator foram realizadas de acordo com as seguintes equações:

$$X_d pellet = Xpellet \cdot \frac{V_{Pellet}}{V_R} \qquad ()$$

$$X_d pellet = Xpellet \cdot \frac{90}{1500}$$

$$X_d pellet = 0,06 \cdot Xpellet$$

Os valores dos parâmetros para o modelo de Monod com essas considerações estão apresentados na Tabela 4.6:

Tabela 4.6: Valores dos parâmetros ajustados para o modelo de Monod, levando-se em consideração o volume total do reator.

Parâmetros para o modelo de Monod	
mi_max	0,0827
q_max	1,4806
Ksx	39,8901
Ksp	16,4253
Yxs	0,1501
Yps	0,4501

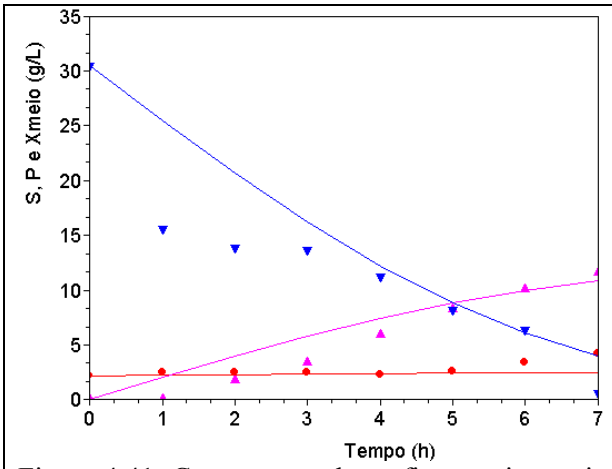


Figura 4.41: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=30,5g/L, levando em consideração o volume total do reator.

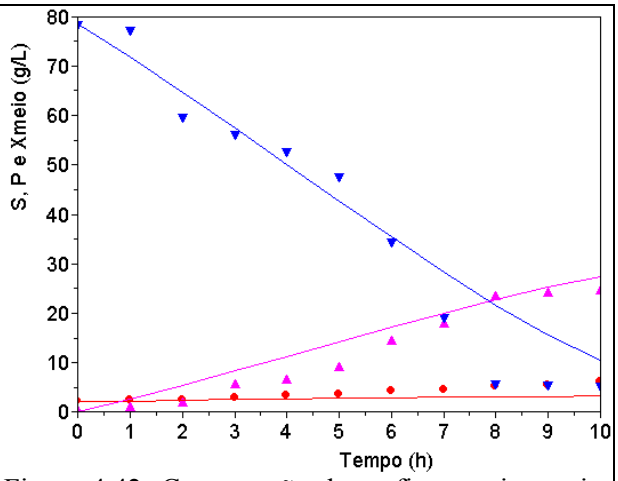


Figura 4.42: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=78,5g/L, levando em consideração o volume total do reator.

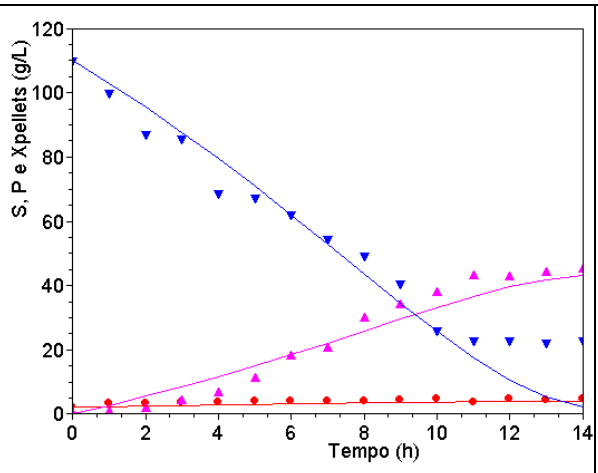


Figura 4.43: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=110g/L, levando em consideração o volume total do reator.

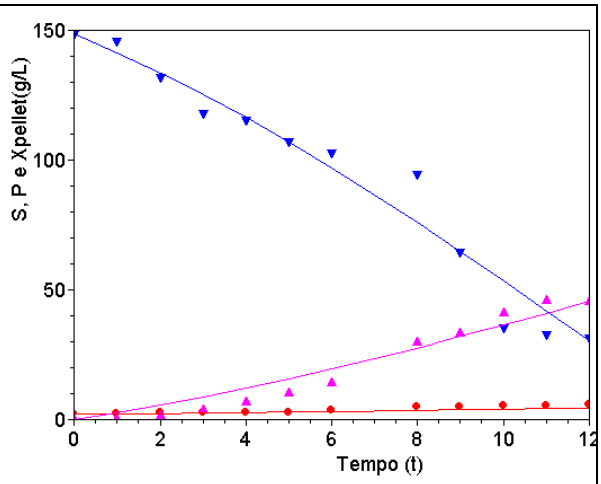


Figura 4.44: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Monod para S_0=148,5g/L, levando em consideração o volume total do reator.

Os valores dos parâmetros para o modelo de Hinshelwood são reportados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Valores dos parâmetros ajustados para o modelo proposto por Hinshelwood levando em consideração o volume total do reator.

Parâmetros para o modelo de Hinsheoood	
mi_max	0,0001
q_max	1,9998
Ksx	0,0001
Ksp	19,6155
Kpp	0,0001
Kpx	0,0001
Yxs	0,5200
Yps	0,3995

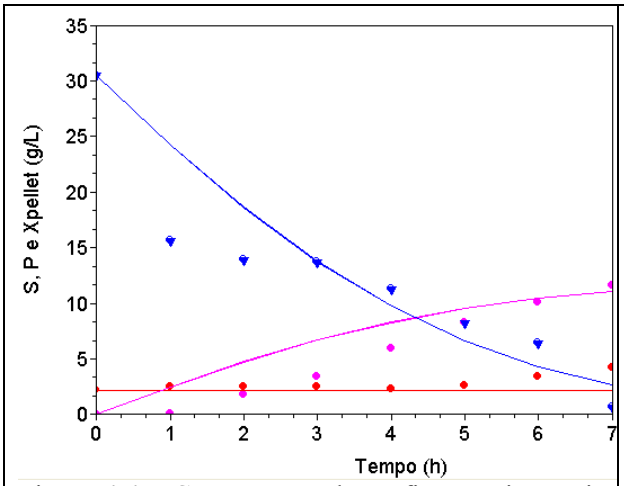


Figura 4.45: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=30,5g/L , levando em consideração o volume total do reator

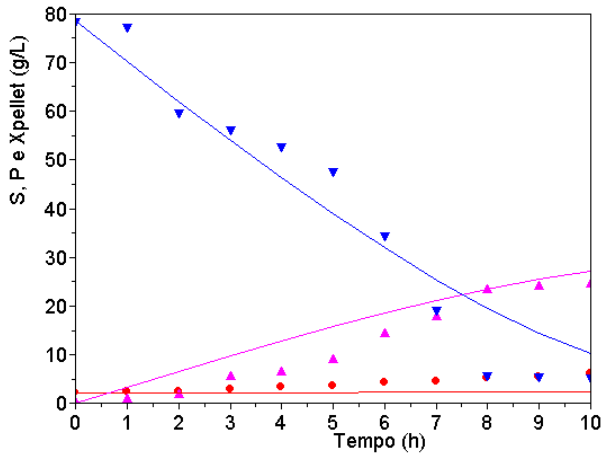


Figura 4.46: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=78,5g/L, levando em consideração o volume total do reator

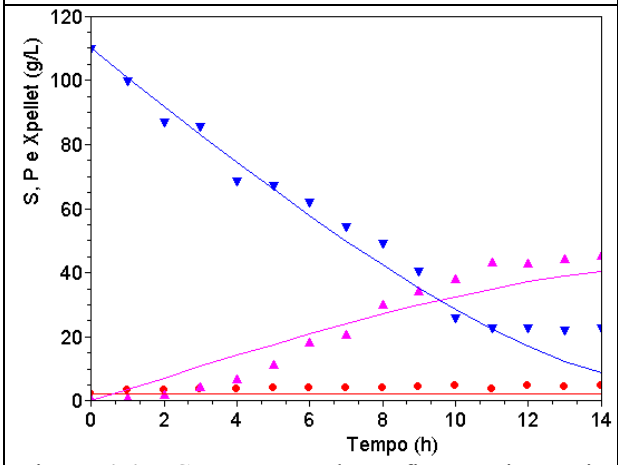


Figura 4.47: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=110g/L, levando em consideração o volume total do reator

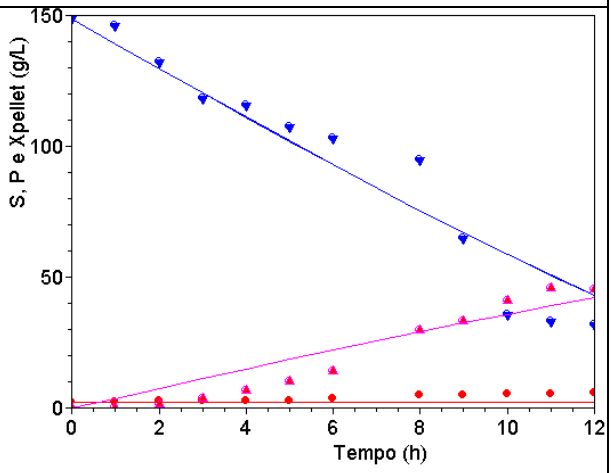


Figura 4.48: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Hinshelwood para S_0=148,5g/L, levando em consideração o volume total do reator

Após a avaliação dos modelos investigados, constatou-se que o comportamento do produto podia ser descrito de forma satisfatória pelos modelos investigados. Entretanto, a descrição da concentração de células e de glicose no final do experimento possui maior discrepância. Assim, verificou-se a adequadabilidade de se incluir no modelo de Monod de uma correção referente ao efeito inibitório pela concentração de células como proposto por Levenpiel (ANDRIETTA e STUPIELLO, 1990).

A preocupação de se investigar efeitos inibitórios deve-se ao fato de que se sabe que células imobilizadas possuem maior apelo de utilização quando o processo trata de produção de metabólitos secundários, visto que a produção de metabólitos primários (como o caso do etanol na fermentação com a levedura *S. cerevisiae*) está diretamente relacionada com o crescimento celular. Entretanto, quando as células são imobilizadas, tem-se que o seu

crescimento é afetado por uma série de aspectos, dentre os quais destacam-se: (i) restrição física; (ii) carência de nutrientes e (iii) acúmulo de metabólitos tóxicos devido a possibilidade de resistência à transferência de massa.

Na fermentação para produção de etanol com *S. cerevisiae* tem-se que o acúmulo de ATP (Trifosfato de adenosina) inibe a atividade da enzima fosfofrutocinase na rota metabólica necessário para a produção de etanol. Assim, a imobilização de células em alginato parece possuir características importantes que diferem do processo de fermentação em células livres e dos modelos investigados nas seções anteriores. Desta forma, inibições em células imobilizadas podem ocorrer e será avaliado pela observação dos resultados com a investigação do modelo de Levenspiel com um fator de correção dado por $\left(1-\frac{X}{Xm}\right)^n$. Os resultados a seguir avaliam a adequadabilidade do modelo de Levenspiel considerando inibição pela células para a descrição cinética do sistema investigado.

A Figura (4.49) apresenta a descrição da avaliação considerando o experimento de menor concentração inicial de glicose (S_0=30,5 g/L) e menor concentração final da células no *pellet* X_{final}= 70 g/L, a Figura (4.50) apresenta o resultado para a maior concentração de S_0=148,5 g/L utilizada e a concentração final de células de X_{final}= 96 g/L e a Figura (4.51) apresenta o resultado para a concentração de S_0=78,5 g/L utilizada e a maior concentração final de células X_{final}= 100,3 g/L.

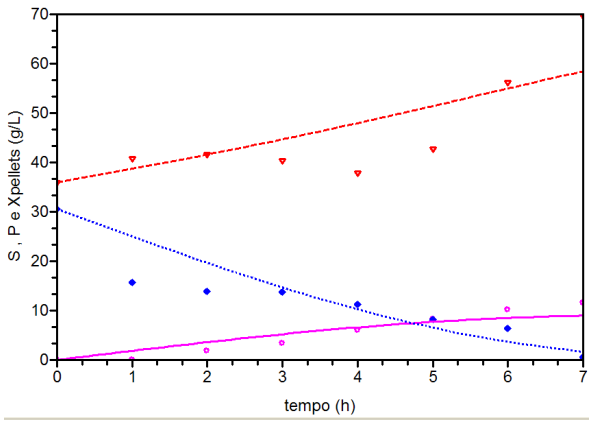


Figura 4.49: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Levenspiel para S_0=30,5 g/L.

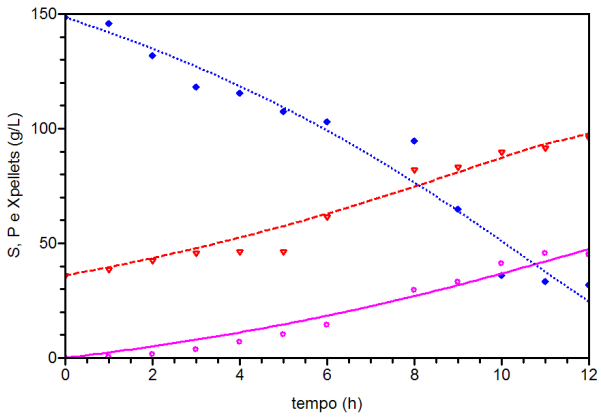


Figura 4.50: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Levenspiel para S_0=148,5g/L.

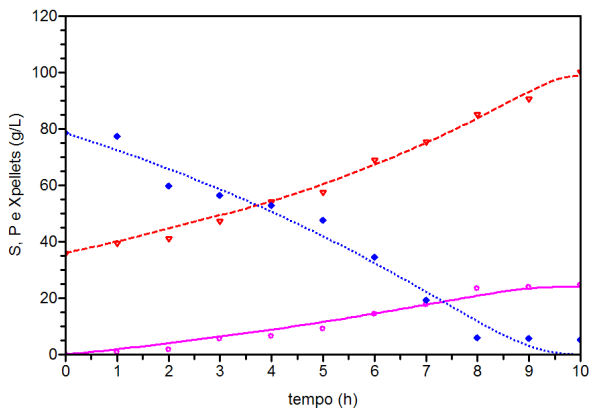


Figura 4.51: Comparação de perfis experimentais e obtidos com o modelo de Levenspiel para S_0=78,5 g/L.

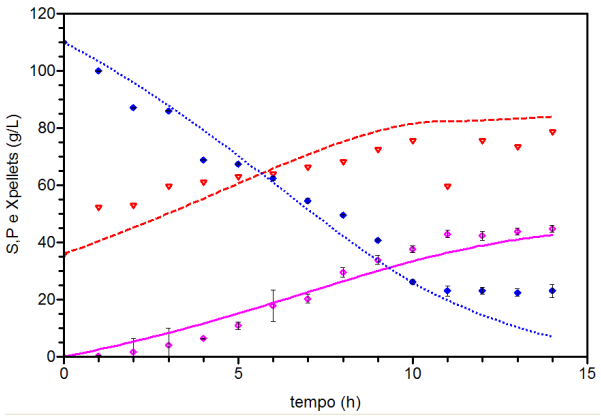


Figura 4.52: Comparação de perfis para experimentais e obtidos com o modelo de Levenspiel para S_0=148,5g/L.

A Figura (4.52) apresenta a comparação do comportamento do experimento com maior concentração inicial de glicose, S_0=148,5g/L, para o modelo de Levenspiel sintonizado com todos os experimentos. Os parâmetros sintonizados estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Valores dos parâmetros ajustados para o modelo proposto por Levenspiel com inibição pela células.

Parâmetros para o modelo de Levenspiel	
mi_max	0,151
q_max	0,084
Ksx	3,415
Ksp	29,696
Xm	82,230
Yxs	2,415
Ysp	0,510
n	0,381

A comparação dos parâmetros permite concluir que o modelo de Levenspiel é capaz de descrever o comportamento do sistema, a um preço de elevação de parâmetro. Vê-se que a importância do fator de correção eleva-se para experimentos com maiores concentrações finais de células, que no caso específico coincide com experimentos para maiores concentrações iniciais de glicose.

Notou-se que para o experimento com menor concentração inicial de glicose o termo de inibição pela concentração de células teve pouca importância, enquanto para a situação com alta concentração de glicose, esse termo apresentou maior importância na descrição cinética

do processo. Entretanto, devido ao número de parâmetros para a sua descrição, os resultados não se afastam muito daqueles com o modelo mais simples devido a Monod.

Em geral a produção de etanol é favorecida em condições de moderadas concentrações de substrato, altas concentrações de células e baixas concentrações de produto quando a inibição pelo produto está presente. Para avaliar essas características existem vários sistemas de operação de fermentadores com células imobilizadas em pellets. O esquema utilizado nesse trabalho buscou a utilização de um biorreator com células imobilizadas dispersas igualmente no fermentador, entretanto com o curso da fermentação os *pellets* tenderam a flutuar e por isso foi utilizado um reator com anteparo para as partículas.

Um modelo para descrever o comportamento desse sistema pode ser dado conforme segue com as hipóteses centrais: (a) células livres são negligenciadas no modelo; (b) os *pellets* são esféricos, não sofrem rompimento e nem alteração de volume durante o processo e possui distribuição uniforme no biorreator (essa hipótese é aproximada e de fato não é exata para fases finais do experimento); (c) O substrato difunde-se no *pellet* onde todo o processo de fermentação ocorre; (d) os perfis de concentração no interior das partículas são simétricos e (e) a agitação do sistema faz com que a concentração na superfície do *pellet* seja igual a concentração do seio da fase líquida no biorreator.

O modelo é dado por:

$$
\begin{aligned}
&\frac{\partial S_p}{\partial t} = D_s\left[\frac{\partial^2 S_p}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial S_p}{\partial r}\right] - \left[m + \frac{\mu}{Y_{xs}}\right]X_p \\
&\frac{\partial P_p}{\partial t} = D_p\left[\frac{\partial^2 P_p}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial P_p}{\partial r}\right] + Y_{ps}\left[m + \frac{\mu}{Y_{xs}}\right]X_p \\
&\frac{\partial X_p}{\partial t} = \mu X_p; \quad \mu = \frac{\mu_{\max} S_p}{K_s + S_p} \\
&\frac{dS}{dt} = \frac{3V_p}{R_p^2 V}\left\{\int_0^{R_p} r^2\left[-\frac{\partial S_p}{\partial t} - \left(m + \frac{\mu}{Y_{xs}}\right)X_p\right]dr\right\} \\
&\frac{dP}{dt} = \frac{3V_p}{R_p^2 V}\left\{\int_0^{R_p} r^2\left[-\frac{\partial P_p}{\partial t} + Y_{ps}\left(m + \frac{\mu}{Y_{xs}}\right)X_p\right]dr\right\}
\end{aligned}
\tag{4.1}
$$

Que pode ser resolvido com condições iniciais e de contorno apropriadas.

$$
\begin{aligned}
&S_p(t=0,r)=0;\ P_p(t=0,r)=0;\ X_p(t=0,r)=X_{p0};\\
&S(t=0)=S_0;\ P(t=0)=0;\\
&S_p(t,r=R_p)=S(t);\ \ P_p(t,r=R_p)=P(t);\\
&\left.\frac{\partial S_p}{\partial r}\right|_{r=0}=0;\ \ \left.\frac{\partial P_p}{\partial r}\right|_{r=0}=0;
\end{aligned}
\tag{4.2}
$$

O modelo descrito nas Equações (4.1)-(4.2) pode ser resolvido através da utilização de uma técnica de discretização, por exemplo o método de colocação ortogonal acoplado a uma técnica de quadratura e um método de integração do sistema de equações diferenciais ordinárias. As maiores dificuldades estão associadas à determinação de parâmetros representativos do sistema em estudo para o modelo.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, observamos que diversas variáveis interferem no processo de fermentação quando são utilizadas células imobilizadas em alginato de cálcio, desde a marca de alginato até a configuração do reator.

A técnica de imobilização utilizada, mostrou-se eficaz no processo de imobilização, sendo que o estudo da eficiência da mesma, demonstrou que há um ligeiro crescimento no meio, que não interfere no crescimento do *pellet* e na produção de etanol no interior do mesmo, garantindo assim que quase todo o processo fermentativo acontece no interior do *pellet.*

Após os testes desenvolvidos com os *pellets* obtidos utilizando o alginato de sódio na concentração de 3% foram mais estáveis do que os obtidos com 2%. O tratamento dos *pellets* com $Al(NO_3)_3$ aumentou a estabilidade dos mesmos em relação a ruptura.

A adição de $CaCl_2$ ao meio de cultura, contribuiu consideravelmente para melhoria da estabilidade dos *pellets* durante as fermentações.

Um dos principais causadores de rompimento no *pellet,* é o grande acúmulo de CO_2 no interior do mesmo.

Foi desenvolvida uma nova configuração de reator, a fim de minimizar os efeitos do acúmulo do CO_2, das forças de cisalhamento e outros efeitos externos e melhorar a eficiência de fermentação, com o auxílio de uma placa perfurada acoplada a um reator de fermentação batelada convencional, as fermentações foram conduzidas sem a observação de rompimento significativo dos *pellets*.

O estudo cinético desenvolveu um ajuste bastante robusto dos pontos experimentais, e os modelos que mais se ajustaram ao processo conduzido foi o modelo de Monod, o modelo de Hinshelwood e o modelo de Levenspiel.

Os parâmetros cinéticos determinados para os dois modelos se mostraram adequados para modelar os resultados de todos os experimentos realizados

Os ajustes dos modelos de Monod e Hinshelwood aplicados ao volume de *pellet* foi melhor do que o ajuste considerando o volume total do reator.

Os parâmetros cinéticos considerando como volume reacional o volume de *pellets* apresentaram significados físicos para o processo de fermentação alcóolica, tanto o modelo de Monod quanto o modelo de Hinshelwood, exceto o parâmetro Yx/s.

Os parâmetros cinéticos Kpx e Kpp obtidos pelo modelo levando de Hinshelwood, considerando o volume total do reator foram muito baixos, o que faz com que o modelo se comporte como o modelo de Monod.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ampliar a faixa de estudo, para concentrações de substrato mais altas que 148,5 g/L e verificar o comportamento do processo.

Otimizar as condições de operação da nova configuração de reator estudada no presente trabalho.

Modelar a nova configuração de reator obtida no presente trabalho. Validar o modelo apresentado nas Equações (4.1)-(4.2).

Estudar as influências do pH, agitação e outras variáveis no processo de fermentação e no comportamento dos pellets.

Estudar novos tipos de suporte, a fim de comparar a eficiência de imobilização e de fermentação com a desenvolvida com alginato de sódio.

Verificar a viabilidade dos *pellets* durante o processo fermentativo, estudando os efeitos de morte e crescimento celular no interior do *pellet.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIETTA, S.R. **Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala Industrial.** Campinas. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1994.

ANDRIETTA, S.R., FERREIRA, E., ANDRIETTA, M.G.S, **Avaliação da Influência da Velocidade de Alimentação sobre o Rendimento e Produtividade dos Processos de Produção de Etanol Operando em Batelada Alimentada,** SINAFERM 2003. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 7p, 2003.

ANDRIETTA, S. R. ; STUPIELLO, J. P. **Simulação e Modelagem para Processos de Fermentação Alcoólica (I) - Batelada Alimentada**. STAB - Açúcar Alcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 8, n. 5/6, p. 36-40, 1991.

ARANTES, M. B. ; OLIVEIRA, G. T. S. ; SARAMAGO, S. F. P. .**Evolução Diferencial Aplicada à Solução de Alguns Problemas de Engenharia de Produção.** FAMAT em Revista, UFU, v. 6, p. 48-61, 2006.

BALLI, D.; FLARI, V.; SAKELLARAKI, E.; SCHOINA, V.; ICONOMOPOULOU, M; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M. **Effect of Yeast Cell Immobilization and Temperature on Glycerol Content in Alcoholic Fermentation with Respect to Wine Making.** Elsevier Science Ltd. Process Biochemistry. v. 39, 499-506, 2004.

BATISTA, M.A., CARVALHO, W., SILVA, S.S. **Imobilização de Células de *Cândida guilliermondii* em Gel de Alginato de Cálcio: Efeito do Tempo de Cura na Viabilidade Celular.** In: Simpósio de Iniciação Científica, 3, 1999, Marília, Brasil. *Anais de Congresso.* Marília: UNIMAR – Universidade de Marília, p.150, 1999.

BATISTA, M.A., **Estudo da Imobilização de Células de *Saccharomyces cerevisiae* em Gel de Alginato de Cálcio no Processo de Fermentação Alcoólica.** Uberlândia 2005. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

BAYLEY, E.J., OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals.** 2.ed. Singapore: Mc Graw-Hill International Edition, 984p., 1986.

BIROL, G., DORUKER, P., KIDAR, B., ONSAN, Z.L., ULGEN, K. **Mathematical Description of Ethanol Fermentation by Immobilized *Saccharomyces cerevisae.*** Process Biochemistry, v.33, n.7, p.763-771, 1998.

BORZANI, W., AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; SHMIDELL, W. **Bioteconologia Industrial.** São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

CARVALHO, C. **Estudo da Imobilização de *Cândida guillermondii* FTI 20037 para Obtenção de Xilitol em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana de Açúcar.** Lorena, 2000. 108p. Disseração (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Departamento de Biotecnologia Industrial, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. 2000.

CARVALHO, J. C. M., SATO, S. **Fermentação Descontínua**. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, p. 193-204. (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001a.

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), 2001b.

CASSINI, C.E.B. **Produção de Aguardente de Cana de Açúcar por Células Imobilizadas**, 2004. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP, 2004.

CASSIOLA, F.M. **Crisotila como Suporte para *Saccharomyces cerevisae:* Origem Físico-química da Preservação da Vitalidade.** Campinas, Setembro de 2001. 102p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

CORCORAN, E. **The Production and Use of Immobilized Living Microbial Cells.** In: WISEMAN, A. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. England: Ellis Horwood. v.10, p.12-50, 1985.

FERREIRA, R. S. **Coeficiente de Partição de Solutos em Gel Contendo Microrganismos Imobilizados,** São Carlos, 69p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 1986.

FERREIRA, R. M. **Modelagem e Simulação de Biorreatores Tipo Torre Operando com Leveduras Auto-imobilizáveis para Produção de Etanol,** 2003. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 2003.

FREGONESI, A. A. **Adesão de Células de *Saccharomyces sp.* em Materiais Inorgânicos para Produção de Etanol.** Ourinhos, 69 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas,1998.

GHOSE, T.K., TYAGI, R.D. **Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate. II Product and Substrate Inhibition and Optimization of Fermentor Design**. *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 1401-1420, 1979.

IEA, 2006. **Instituto de Estudos Avançados da Universidade São Paulo**. Disponível em http://www.iea.usp.br/iea/. Acesso em 29/11/06.

JOHN E. M., GRANT ST. J., ROBERT W. D.,. **Continuous and Static Fermentation of Glucose to Ethanol by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells of Different Ages.** Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, 1982

KOURKOUTAS, Y; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.; **Immobilization Technologies and Support Material Suitable in Alcohol Beverages Production: a Review**. Food Microbiology. V. 21, p. 377-397, 2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principios de Bioquímica**. Traduzido por SIMÕES, A.A.; LODE, W.R.N. São Paulo: Ed. SARVIER, 2ª ed., 839p. traduação de: Principles of biochemistry, 1995.

LIMA, URGEL de Almeida, et. al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos (vol.3)**. São Paulo – SP. Editora Edgard Blucher. 1º edição, 2001.

LIMA, K.G.C. **Produção de Etanol por *Escherichia coli* KO11**, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento,* n.27, p.24-27, 2002.

LURTON, L.; SNAKKERS, G.; ROULLAND, C.; GALY, B. **Influence of Fermentation Yeast Strains on the Composition of Wine Spirits.** Journal Science Food Agriculture. Great Britain. V.67, p.485-491,1995.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. **Avaliação da Produção dos Compostos Majoritários da Fermentação de Mosto de Uva por Leveduras Isoladas da Região da "Serra Gaúcha" (RS).** Ciência Tecnologia Alimentos. Campinas-SP. V.24, p. 453-458, Jun-set, 2004.

MARIORELLA, B.L., BLANCH, W.H., WILKE, C.R., **Economic Evaluation of Alternative Ethanol Fermentation Processes**, *Biotechnology Report,* v.26, p. 1003-1025,1984.

MARTISEN, A. SKJAK-BRAEK, G., SMIDSROD, O. **Alginate as Immobilization Material: Correlation Between Chemical and a Physical Properties of Alginate Gel Beads.** Biotechnology and Bioengineering, v.33, p.79-89, 1989.

MELZOCH, K., RYCHTERA, M., HABOVA, V., **Effect of Immobilization Upon the Properties and Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* Cells**. J. Biotechnol. 32, 59–65, 1994.

MONISHA, A.; KUAD, R.C., SINGH, A. **Bioconversion of Pentose Sugars to Ethanol by Free and Immobilized Cells of *Candida shehatae* (NCL-3501): fermentation behavior.** Process Biochemistry, vol. 31, n.6, p.555-560, 1996.

NAJAFPOUR G., YOUNESI H., SYAHIDAH K. **Ethanol Fermentation in an Immobilized Cell Reactor Using *Saccharomyces cerevisiae*.** Bioresource Technology 92, 251–260, 2004.

NUNEZ, M. J.; LEMA, J.M. **Cell Immobilization: Application to Alcohol Production**. Enzyme Microb. Technol. V.9, p.642-651, 1987.

ORIVE, G., PONCE, S., HERNÁNDEZ, R.M., GASCON, A.R., IGARTUA, M., PEDRAZ, J.L. **Biocompatibility of Microcapsules for Cell Immobilization Elaborated with Different Type of Alginates,** *Biomaterials,* v.23, p.3825-3831,2002.

OURA, E. **Effect of Aeration Intensity on the Biochemical Composition of Baker's Yeast. I Factors Affecting the Type of Metabolism.** Biotechnology and Bioengineering, v.26, n.6, p.1197-1212, 1944.

PANTOJA, L. **Seleção e Aproveitamento Biotecnológico de Frutos Encontrados na Amazônia para Elaboração de Bebida Alcoólica Fermentada Utilizando Levedura Imobilizada.** Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2006.

PEREIRA JR, N. BU'LOCK, J.D. **The Ionic Character of the Environment in the Flocculation of *Pichia stipitis*.** Rev. Microbiol., v.25, n.1, p. 51-56, 1994.

PORTO, L.M. **Modelagem de Processo Industrial de Fermentação Alcoólica Contínua com Reatores de Mistura Ligados em Série.** Campinas, Dezembro. 122p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

RIGO, M. **Estudo de Fermentação Alcoólica por Células de *Saccharomyces cerevisae* Imobilizadas em Crisotila.** Campinas, Março. 88p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

RIORDAN, C.; LOVE, G.; BARRON N.; NIGAN, P.; MARCHANT, R.; MCHALE A.P. **Production of Ethanol from Sucrose at 45°C by Alginate Immobilized Preparations of Termotolerant Yeast Strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3** – Bioresource Techonology, 55, p. 171-173,1996.

ROCCA, E., CAMESELLE. C., NUNEZ, M.J., LEMAS, J.M. **Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilised in Ca-Alginate Beads Hardened with Al^{3+},** Biotechnology techniques, v.9, p815-820,1995.

ROUKAS, T. **Ethanol Production from Non-sterilized Beet Molasses by Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisae* Cells Using Fed-batch Culture**. Journal of Food engineering, 27, p.87-96, 1996.

SANCHEZ, E.N. **Desempenho de um Biorreator com Levedura Imobilizada na Fermentação Alcoólica Continua de Meio Melaço-vinhoto.** 1995. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

SMOGROVICOVÁ, D.; DOMÉNY, Z. **Beer Volatile by Product Formation at Different Fermentation Temperature Using Immobilizes Yeast**. Process Biochemistry. V. 34, p. 785-794, 1999.

STORN, R., PRICE, K. **Differential Evolution – A Simple and Efficient Heuristic for Global Optimization over Continuous Spaces**, Journal of Global Optimization vol.11, pp. 341–359, 1997.

PRINCE, K., STORN, R e LAMPINEN, J.: **Differential Evolution – A Practical Approach to Global Optimization**, Springer, 2005.

STREMEL, Dile Pontarolo. **Desenvolvimento de Modelos Estruturados Alternativos para o Processo de Produção de Etanol.** P.283 Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2001.

SUZUKI, S.; KARUBE, I. **Production of Antibiotics and Enzymes by Immobilized Whole Cells**. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 106, 59-72, 1979.

TAKAHASHI, C.M. **Produção de Etanol por *Escherichia Coli KO11.*** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n.27, p.24-27,2002.

TOSETTO, G. M. **Influência da Matéria-prima no Comportamento Cinético de Levedura na Produção de Etanol**. 82p Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2002.

UNICA, **União da Agroindústria Canavieira de São Paulo**, Disponível em http://www.portalunica.com.br, Acesso em 29/11/06, 2006.

URQUIAGA; ALVES, B. J. R.; BOODEY, R. M.; **Produção de Biocombustíveis. A Questão do Balanço Energético.** 2005.

VANDERPLAATS, G. N., **Numerical Optimization Techniques for Engineering Design**, Vanderplaats Research & Development, Inc., Colorado Springs, CO, 3rd ed, 1999.

VASCONCELOS, J.N. **Fermentação Alcoólica com Levedura Imobilizada em Colmos de Cana-de-açúcar.** Maceió, Abril. 110p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998.

WENDHAUSEN JÚNIOR, R. **Estudo sobre Utilização de Crisotila como Suporte de Células de *Saccharomyces cerevisae* para o Uso em Processo Contínuo de Fermentações,** Blumenau, Fevereiro 80p. Tese (Doutorado em Química) instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

YAMADA, T., FATIGATI, M.A., ZHANG, M., 2002. **Performance of Immobilized *Zymomonas mobilis* 31821 (pZB5) on Actual Hydrolysates Produced by Arkenol Technology.** Appl. Biochem. Biotechnol. 98, 899–907.

ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H. NURY, F.S. **Analisis e Produccion de Vino**. Ed. Acribia S.A., 613 p., 2001.

APÊNDICE A

Os 11 ensaios propostos pelo PCC encontram-se a seguir:

Ensaio 1

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Média do Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
1	52	4,44	3	29

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	52,000	0,000	29,000
1	0,200	29,620	0,004848	29,450
2	1,010	28,020	0,002693	25,220
3	3,600	24,050	0,007003	30,810
4	6,210	23,690	0,009696	35,830
5	6,490	21,660	0,020469	43,600
6	11,690	12,380	0,048480	50,200
7	17,170	5,920	0,132512	54,680
8	22,300	5,830	0,193920	60,358
9	22,700	5,750	0,255328	70,598

Ensaio 2

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Média do Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
2	105	4,92	3	29

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	105,000	0,000000	29,000
1	0,840	74,259	0,003	25,467
2	1,400	73,745	0,005	18,295
3	3,390	70,829	0,006	32,659
4	5,100	69,629	0,010	35,728
5	10,240	65,856	0,001	38,838
6	20,080	64,998	0,061	38,461
7	19,240	52,369	0,181	46,980
8	26,930	38,587	0,248	59,680
9	27,440	27,354	0,271	69,300
10	34,770	16,464	0,319	75,692
11	38,390	6,946	0,370	88,956
12	39,230	6,723	0,405	96,962

Ensaio 3

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Média do Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
3	52	4,61	3	43

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	52,000	0,000	0,000
1	0,470	29,260	0,004	0,470
2	1,440	34,040	0,005	1,440
3	3,660	23,520	0,007	3,660
4	5,490	18,210	0,012	5,490
5	8,500	9,190	0,025	8,500
6	10,130	4,330	0,046	10,130
7	14,880	-	0,164	14,880

Ensaio 4

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Média do Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
4	105	4,92	3	43

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	105,000	0,000	43,000
1	0,200	95,430	0,007	22,660
2	1,000	90,970	0,004	27,960
3	2,110	75,940	0,004	31,510
4	4,770	70,460	0,012	32,780
5	7,030	62,770	0,043	35,320
6	10,250	54,540	0,027	47,820
7	14,050	46,670	0,107	50,710
8	18,220	41,110	0,192	56,960
9	24,270	19,890	0,232	63,210
10	26,570	6,320	0,272	69,460
11	27,890	6,200	0,321	75,710

Ensaio 5

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
5	30,5	4,67	3	36

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	30,500	0,000	36,000
1	0,070	15,650	0,000	40,830
2	1,770	13,880	0,000	41,690
3	3,360	13,700	0,000	40,450
4	5,930	11,230	0,010	37,930
5	8,240	8,220	0,020	42,830
6	10,090	6,370	0,040	56,290
7	11,580	0,620	0,070	69,690

Ensaio 6

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Média do Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
6	148,5	4,58	3	36

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	148,500	0,000	36,000
1	0,358	145,801	0,002	38,652
2	1,554	131,867	0,003	42,653
3	3,617	118,059	0,003	45,952
4	6,808	115,571	0,022	46,569
5	10,010	107,360	0,031	46,284
6	14,137	102,882	0,082	61,566
7	-	101,637	0,190	76,847
8	29,591	94,671	0,219	81,997
9	33,015	64,814	0,290	83,277
10	40,957	35,953	0,316	89,899
11	45,508	33,216	0,320	91,531
12	45,086	31,972	0,349	96,128

Ensaio 7

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Média do Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
7	78,5	4,18	3	17

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	78,500	0,000	17,000
1	0,220	57,620	0,005	29,590
2	1,090	56,250	0,003	28,820
3	2,020	54,970	0,004	26,410
4	4,180	48,710	0,006	27,220
5	8,190	38,420	0,013	32,340
6	10,810	37,040	0,019	43,990
7	15,480	29,500	0,065	43,140
8	20,750	19,380	0,157	-
9	23,990	15,180	0,214	48,020
10	28,370	5,400	0,267	53,230

Ensaio 8

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Média do Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
8	78,5	5	3	61

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	78,500	0,000	61,000
1	0,640	69,040	0,002	47,885
2	2,170	52,250	0,002	50,485
3	4,110	45,260	0,007	55,243
4	7,640	40,750	0,009	58,561
5	10,030	47,210	0,024	70,604
6	14,100	33,500	0,097	81,187
7	19,190	19,890	0,201	92,743
8	25,840	11,050	0,245	104,055
9	32,740	4,240	0,322	115,368

Ensaio 9

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Média do Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
9	78,5	4,59	3	36

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	78,500	0,000	36,000
1	0,460	72,310	0,000	36,120
2	-	60,560	0,010	36,320
3	3,310	46,850	0,010	43,110
4	5,530	46,230	0,010	48,270
5	10,050	36,330	0,020	56,300
6	15,390	31,380	0,060	62,270
7	19,040	20,770	0,170	78,620
8	22,410	8,800	0,210	81,850
9	26,620	9,150	0,300	89,760

Ensaio 10

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
10	78,5	4,59	3	36

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	78,500	0,000	36,000
1	0,097	77,440	0,004	39,600
2	0,224	59,760	0,002	41,310
3	0,694	56,310	0,006	47,450
4	0,806	52,860	0,008	54,320
5	1,138	47,740	0,018	57,510
6	1,807	34,480	0,050	68,990
7	2,24	19,360	0,129	75,430
8	2,951	5,880	0,213	85,260
9	3,025	5,640	0,269	90,824
10	3,099	2,300	0,335	100,300

Ensaio 11

Ensaio	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Diâmetro do Pellet (mm)*	*Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)*	*Concentração de X_0 imobililizada (g/L)*
11	78,5	4,6	3	36

Cinética

Tempo (h)	*Concentração de Etanol (g/L)*	*Concentração de Glicose (g/L)*	*Concentração de Células Livres (g/L)*	*Concentração de Células Imobilizadas (g/L)*
0	0,000	78,500	0,000	36,000
1	0,370	48,710	0,002	36,969
2	0,810	47,300	0,001	42,225
3	2,600	46,940	0,005	40,035
4	4,870	39,690	0,009	43,227
5	7,660	37,930	0,014	53,088
6	10,910	32,000	0,024	69,381
7	14,530	23,520	0,104	81,387
8	16,010	20,550	0,204	94,464
9	18,820	9,990	0,304	107,541
10	21,630	1,569	0,405	118,897