

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DE COEFICIENTES DE RENDIMENTO E MODELAGEM  
DO PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DE ETANOL**

**Raul Marcel Daré**

**SÃO CARLOS – SP  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DE COEFICIENTES DE RENDIMENTO E MODELAGEM  
DO PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DE ETANOL**

**Raul Marcel Daré**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.**

**Orientador:  
Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior**

**SÃO CARLOS – SP  
2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

D213ac

Daré, Raul Marcel.

Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol / Raul Marcel Daré. -- São Carlos : UFSCar, 2009.  
67 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Fermentação. 2. Produção de álcool. 3. Balanço de massa. 4. Cinética de fermentação. 5. Eficiência de fermentação. I. Título.

CDD: 660.28449 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
**RAUL MARCEL DARÉ** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM  
31 DE OUTUBRO DE 2008.

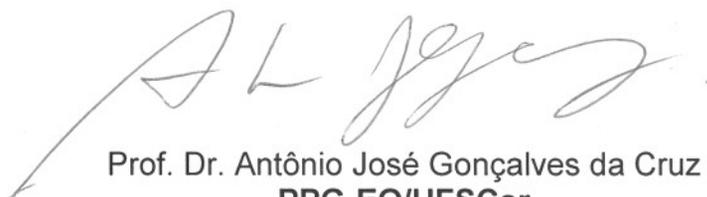
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior  
**Orientador, PPG-EQ/UFSCar**



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo  
**IQ/UNESP**



Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz  
**PPG-EQ/UFSCar**

*Dedico este trabalho ao meu filho Matheus  
e a minha família pelo incentivo  
e compreensão que tiveram  
comigo durante estes anos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior, pelo incentivo, paciência e presteza no auxílio às atividades e discussões durante o desenvolvimento desta dissertação de mestrado.

Ao Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz, pela atenção, cooperação e importante participação no desenvolvimento da modelagem do processo, entre outros assuntos.

Às Empresas Zilor pela oportunidade, incentivo e contribuição, que proporcionou a idealização e conclusão deste trabalho.

Particularmente ao Prof. Dr. Paulo Ignácio, que incentivou e acreditou no tema inicialmente proposto, possibilitando o meu início no curso de mestrado e também pelo grande interesse sobre a área estudada.

À amiga Geisa Aparecida Lopes Gonçalves pelo apoio na realização dos experimentos e organização das informações.

Ao Prof. Dr. Charles Dayan Farias de Jesus pelas sugestões sobre o trabalho que estava sendo desenvolvido e pela atenção ao longo destes anos.

Aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram durante este período.

E, finalmente, a Deus, pela saúde, coragem e a vontade de superar os desafios, sempre ao lado de pessoas admiráveis.

*“A persistência é o caminho do êxito!”*

*(Charles Chaplin)*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO IBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Produção de Etanol no Brasil.....	4
2.2 Fermentação Alcoólica.....	5
2.3 Fatores que influenciam na Fermentação Alcoólica.....	7
2.4. Processos Industriais de Fermentação Alcoólica.....	10
2.4.1 Classificação dos processos fermentativos.....	10
2.4.2 Processo fermentativo industrial.....	11
2.5 Cinética da Fermentação.....	12
2.5.1 Modelos sem inibição.....	15
2.5.2 Modelos com inibição.....	16
2.6 Eficiência de fermentação alcoólica.....	20
2.6.1 Eficiência de fermentação por subprodutos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Ensaio de Fermentação.....	27
3.1.1 Escala Industrial.....	27
3.1.2 Escala Piloto.....	28
3.1.3 Metodologia Experimental.....	29
3.2 Metodologia Analítica.....	30
3.2.1 Medida de pH.....	30
3.2.2 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART).....	30
3.2.3 Determinação da concentração celular (Cx).....	30
3.2.4 Determinação da Acidez Total.....	30
3.2.5 Determinação da Concentração de Etanol.....	31
3.2.6 Determinação da Concentração de Glicerol.....	31
3.2.7 Análise Viabilidade Celular.....	31
3.3 Determinação dos Coeficientes de Rendimento.....	32

3.3.1 Cálculos do coeficiente do rendimento de substrato a etanol ( $Y_{P/S}$ ) da eficiência em etanol ( $\eta_P$ ).....	32
3.3.2 Cálculo do coeficiente do rendimento de substrato a CO <sub>2</sub> ( $Y_{CO_2/S}$ ).....	35
3.3.3 Cálculo do coeficiente do rendimento de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ).....	36
3.3.4 Cálculo do coeficiente do rendimento de substrato a glicerol $Y_{G/S}$ ).....	36
3.3.5 Cálculo do coeficiente do rendimento de substrato a acidez ( $Y_{AC/S}$ ).....	36
3.4 Modelagem Matemática do Processo Fermentativo.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
4.1 Cultivos em escala industrial.....	42
4.2 Cultivos em escala piloto.....	46
4.3 Coeficientes de rendimento e de eficiência de fermentação.....	53
4.3.1 Escala piloto.....	53
4.3.2 Escala industrial.....	54
4.3.3 Eficiência de fermentação por subprodutos.....	57
4.4 Modelagem Cinética.....	60
5. CONCLUSÕES.....	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 2.1</b>	Proporção de álcool anidro misturado à gasolina.....	4
<b>TABELA 2.2</b>	Demanda de carros a álcool e carros flex fuel no Brasil (milhares de veículos).....	5
<b>TABELA 3.1</b>	Condições de alimentação empregadas nos cultivos.....	29
<b>TABELA 4.1</b>	Condições iniciais, de alimentação e finais e principais parâmetros nos cultivos em escala industrial .....	45
<b>TABELA 4.2</b>	Condições experimentais e resultados obtidos nos cultivos em escala piloto.....	52
<b>TABELA 4.3</b>	Condições experimentais e resultados de eficiência de fermentação alcoólica em escala industrial.....	57
<b>TABELA 4.4</b>	Parâmetros cinéticos estimados para os cultivos em escala piloto.....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 2.1</b>	Ligação floculina–manose em cepas de leveduras floculantes (adaptada de Verstrepen et al., 2003).....	8
<b>FIGURA 2.2</b>	Variação de S, X e P, com o tempo em um processo descontínuo.....	13
<b>FIGURA 2.3</b>	Três possíveis rotas catabólicas do piruvato formado na glicólise.....	24
<b>FIGURA 2.4</b>	Formação do Glicerol e de ácidos orgânicos.....	25
<b>FIGURA 3.1</b>	Ilustração do sistema de fermentação em escala industrial.....	28
<b>FIGURA 3.2</b>	Ilustração do sistema experimental em escala piloto.....	28
<b>FIGURA 4.1</b>	Perfis de concentração de células (CX), substrato (CS) e de etanol (CP) ao longo do cultivo I-40-60.....	42
<b>FIGURA 4.2</b>	Perfis de concentração de células (CX), substrato (CS) e de etanol (CP) ao longo do cultivo I-45-55.....	43
<b>FIGURA 4.3</b>	Perfis de concentração de células (CX), substrato (CS) e de etanol (CP) ao longo do cultivo I-50-50.....	43
<b>FIGURA 4.4</b>	Perfis de concentração de células (CX), substrato (CS) e de etanol (CP) ao longo do cultivo I-55-45.....	44
<b>FIGURA 4.5</b>	Perfis de concentração de células (CX), substrato (CS) e de etanol (CP) ao longo do cultivo I-60-40.....	44
<b>FIGURA 4.6</b>	Valores experimentais e simulados de Cs, Cx e Cp relativos ao cultivo P-5-5A.....	47
<b>FIGURA 4.7</b>	Valores experimentais e simulados de Cs, Cx e Cp relativos ao cultivo P-5-5B.....	48
<b>FIGURA 4.8</b>	Valores experimentais e simulados de Cs, Cx e Cp relativos ao cultivo P-7.5-7.5A.....	49
<b>FIGURA 4.9</b>	Valores experimentais e simulados de Cs, Cx e Cp relativos ao cultivo P-7.5-7.5B.....	50
<b>FIGURA 4.10</b>	Valores experimentais e simulados de Cs, Cx e Cp relativos ao cultivo P-15-15.....	51
<b>FIGURA 4.11</b>	Distribuição das perdas totais em ART em uma Usina.....	59

<b>FIGURA 4.12</b>	Distribuição das perdas determinadas em ART em usinas.....	59
<b>FIGURA 4.13</b>	Variações dos parâmetros cinéticos obtidos dos ajustes.....	61

## RESUMO

O rendimento em etanol ( $\eta_P$ ) é um dos parâmetros mais importantes a ser avaliado no processo industrial de fermentação alcoólica. Devido ao fato da maioria das usinas não apresentar um nível de automação razoável, nem realizar medidas analíticas freqüentes durante as bateladas, o  $\eta_P$  é atualmente calculado por metodologia baseada nos subprodutos formados no processo, cálculo questionado quanto a sua precisão, pois gera quase sempre altos valores de  $\eta_P$ . Ainda, no que diz respeito ao processo de fermentação alcoólica, a modelagem cinética do processo fermentativo tem sido estudada extensivamente. No entanto, os modelos propostos não têm representado adequadamente o processo industrial no qual a dorna inicialmente contendo o inóculo (“pé de cuba”) é alimentada com uma vazão de mosto até seu enchimento, seguindo a fermentação, em batelada, até o término do substrato. O presente trabalho teve como objetivo principal a proposta de uma nova metodologia de cálculo do rendimento em etanol ( $\eta_P$ ) com base nos princípios de balanço material. Os resultados de  $\eta_P$  obtidos na planta piloto (80,5 a 87,9%) e na industrial (84,2 e 92,1%) pela nova metodologia apresentaram faixas próximas de valores. No entanto, estes valores obtidos de  $\eta_P$  foram inferiores àqueles obtidos pela metodologia tradicional por subprodutos, utilizada atualmente pela quase totalidade das usinas de açúcar e álcool. Ainda, foi proposto um modelo cinético para descrever o processo convencional de fermentação alcoólica considerando a existência de dois comportamentos celulares ao longo do processo, no que diz respeito ao consumo de substrato e à produção de etanol. O modelo descreveu adequadamente os comportamentos das concentrações de células ( $C_X$ ), substrato ( $C_S$ ) e de etanol ( $C_P$ ) ao longo de todos os cultivos, mostrando que as hipóteses consideradas na elaboração do modelo foram pertinentes quanto à realidade do fenômeno observado. Por fim, os coeficientes cinéticos estimados do modelo proposto apresentaram uma pequena variação nos diferentes cultivos, bem como valores dentro de uma faixa de literatura.

**Palavras-chave:** produção de etanol, rendimento em etanol, balanços de massa, modelagem cinética.

## ABSTRACT

The yield ethanol ( $\eta_P$ ) is one of the most important parameters to be evaluated in the industrial process of alcohol fermentation. Because most plants neither present a reasonable level of automation, nor perform frequent analytical measures during the batch, the  $\eta_P$  is currently calculated by methodology based on by-products formed in the process. Such calculation is questioned as to its accuracy because it almost always presents high values of  $\eta_P$ . Still, with regard to the process of alcohol fermentation, the kinetic modeling of the fermentation process has been studied extensively. However, the proposed models have not properly represented the industrial process in which the fermenter initially containing the inoculum (“preculture”) is fed with a flow of wort (feeding culture medium) until its filling, following the fermentation, in batch, until the substrate exhaustion. The aim of the present study is propose a new methodology for calculating the yield ethanol ( $\eta_P$ ) based on material balances. The  $\eta_P$  results obtained in the pilot plant (80.5 to 87.9%) and industrial plant (84.2 and 92.1%) presented by the new method tracks near values. However, values of  $\eta_P$  obtained by the present methodology were lower than those obtained by the traditional by-products method, currently used by almost all sugar and alcohol mills. Still, a kinetic model was proposed to describe the conventional process of fermentation considering the existence of two cellular performances during the process, with regard to the consumption of substrate and to the production of ethanol. The model properly described the performance of the concentration of cells ( $C_X$ ), substrate ( $C_S$ ) and ethanol ( $C_P$ ) over all cultures, showing that the assumptions considered when preparing the model were concerned about the reality of the phenomenon observed. Finally, estimated values of kinetic parameters of the proposed model showed little variation in different cultures as well as values within a range of literature.

**Keywords: ethanol production, yield ethanol, mass balance, kinetic modeling.**

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de etanol do mundo e o segundo maior produtor, atrás dos EUA. O país espera atingir produção recorde de 20,2 bilhões de litros de etanol na safra 2008/09, de acordo com estimativas do Ministério da Agricultura (Unica, 2008).

De acordo com Finguerut (2007), o setor canavieiro encontra-se em ascensão devido ao “boom” mundial do etanol, sendo registrado nos últimos sete anos um aumento de 1% ao ano na quantidade de açúcar produzido por hectare e nos últimos 15 anos de 1% ao ano no aumento de conversão industrial.

Para exemplificar a ascensão do setor, segundo os dados apresentados pela Sindaúcar – AL (2008), a moagem do setor no estado de Alagoas deve crescer 18,9% em relação ao último ciclo. Com o aumento, a produção deve atingir 29,3 milhões de toneladas de cana, 4,7 milhões de toneladas a mais que a quantidade colhida na safra 2006/2007. A produção de açúcar terá um aumento de 11,3% em comparação com a safra anterior, e a de álcool terá um aumento de 23,7%.

O processo fermentativo atualmente utilizado pela maioria das usinas é um processo industrial integrado, devido à produção concomitante do açúcar. Além disto, parte da matéria prima, o bagaço, é utilizada para geração de energia elétrica necessária para o próprio processamento e em muitas plantas há excedente de energia que é comercializado com as distribuidoras locais. O aproveitamento da palha da cana para geração de energia também já é uma realidade.

É sabido que o rendimento teórico da fermentação alcoólica corresponde a 0,511 gramas de etanol/ gramas de ART consumido, sendo que, o grande desafio para as destilarias atualmente está em aumentar a eficiência da fermentação, que na média atual está em torno de 91% (Finguerut, 2007).

Entre outros fatores que dificultam o alcance de rendimentos fermentativos próximos ao teórico, pode-se citar a contaminação bacteriológica, floculação, variação da qualidade da matéria-prima, falta de controle das variáveis de processo, produção de subprodutos e a perda de viabilidade da levedura.

Embora o processo de fermentação alcoólica seja um processo desenvolvido, diante das limitações citadas, há ainda a necessidade de melhoria em diversos pontos do mesmo. Por esta razão depara-se com um montante significativo de estudos sobre o assunto presente, bem como esforços vêm sendo realizados para melhorar os processos existentes,

principalmente no que tange a ao aumento da automação do processo, implementação de metodologias analíticas e medidas em linha (“on-line”) de variáveis de processo, buscando avanços também na automação e controle dos mesmos.

O rendimento em etanol é um dos parâmetros mais importantes a ser avaliado nos processos de uma usina. Devido ao fato da maioria das usinas não apresentar um nível de automação razoável, nem realizar medidas analíticas freqüentes durante as bateladas, o rendimento em etanol é atualmente, quase na totalidade das unidades, calculado a partir dos subprodutos, segundo metodologia proposta pela então Coopersucar, conforme citado por Fernandes (2003), considerando as quantidades produzidas de levedura, acidez, glicerol, teor alcoólico e considerando os açúcares redutores residuais totais (ARRT) (Finguerut, 2007).

A metodologia do cálculo de rendimento da fermentação por subprodutos utiliza apenas dados diários, desconsiderando as condições de alimentação da dorna, como perfil da vazão ao longo do tempo e quantidade de açúcar (ART) no mosto de alimentação. Logo, embora se trate de uma metodologia consolidada no setor, é possível a partir da automação do processo fermentativo, que dispõe informações mais freqüentes, obter o rendimento em etanol em cada batelada a partir de balanços de massa, considerando as quantidades produzidas de etanol e de levedura e açúcar consumido.

As unidades produtoras de etanol buscam melhorias contínuas em seus processos. Uma vez que o produto final é padronizado, o diferencial entre elas está no processo produtivo que garante a competitividade no setor. Dentre os tipos de processos fermentativos industriais destaca-se a fermentação por “batelada” com reciclo de células, processo muito utilizado pelas usinas brasileiras. Além deste, pode-se citar os processos contínuos e semicontínuos, com suas derivações como reutilização de células ou ligação de dornas em série e paralelo.

Dentre os diversos aspectos relacionados com o processo de fermentação alcoólica, a modelagem cinética do processo fermentativo tem merecido especial atenção. Modelos cinéticos clássicos considerando efeitos inibitórios do substrato (açúcar) e do produto têm sido propostos e utilizados na simulação deste processo. No entanto, tais modelos não têm representado adequadamente o processo industrial de fermentação alcoólica, no qual a dorna inicialmente contendo o inóculo (“pé de cuba”) é alimentada com uma vazão de mosto até seu enchimento, seguindo a fermentação, em batelada, até o término do substrato.

Em virtude da necessidade de se calcular com maior precisão o rendimento do processo fermentativo, o presente trabalho teve como objetivo principal propor uma nova metodologia de cálculo do rendimento em etanol por batelada, uma vez que a medição atual

realizada nas usinas não contempla em si a conversão de açúcar em etanol ou biomassa, pois é baseada na medição de subprodutos do processo.

Ainda, foi proposto um modelo cinético para descrever o processo convencional de fermentação alcoólica considerando a existência de dois comportamentos celulares ao longo do processo, no que diz respeito ao consumo de substrato e à produção de etanol. O trabalho contemplou a análise de várias bateladas de fermentação tanto em escala piloto quanto em industrial, sob diferentes condições iniciais de inóculo e de alimentação do mosto.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Produção de etanol no Brasil

No Brasil como em outros lugares do mundo, a fermentação caracteriza-se como um processo antigo. Este processo era utilizado no preparo de bebidas e de alguns alimentos, muito antes de ser objeto de estudo de pesquisadores. A cachaça, bebida destilada obtida a partir do caldo de cana, teria sido descoberta por acaso e se tornou um dos principais produtos da economia brasileira.

O processo de fabricação do álcool no Brasil sofreu poucas mudanças até o início do século XX. Até o início dos anos 30, o Brasil produzia álcool apenas para fabricação de bebidas e aplicação em indústria química ou farmacêutica. Entre 1932 e 1940, com incentivo do governo para produção de motor a álcool para carro, o Brasil aumentou significativamente a produção de álcool anidro (Amorim, 2005).

Em 1975, com o advento do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), os usineiros foram incentivados a aumentarem a produção de álcool anidro, devido ao aumento da demanda de consumo desse combustível. De acordo com os dados da Tabela 2.1, houve uma grande evolução ao longo dos anos da proporção de álcool anidro na gasolina, saltando de 14% em 1979 para 24% a partir de 2002. Paralelamente, muitas pesquisas foram desenvolvidas no país visando à obtenção do álcool hidratado (Amorim, 2005).

Tabela 2.1: Proporção de álcool anidro misturado à gasolina:

Ano	Porcentagem de etanol na gasolina (%)
1979	14
1980	17
1981	12
1982 - 1986	20
1987 - 2002	22
2002 - 2005	24

Fonte – Unica (2007)

Em 1979, o governo firmou o Protocolo de Intenções com a Associação dos Fabricantes de Veículos Automotivos (Anfavea), onde as montadoras se comprometeram a fabricarem veículos adaptados ao uso do álcool hidratado. O Proálcool tornou-se o maior programa energético do mundo, com a utilização de combustível líquido alternativo, renovável e pouco poluente (Amorim, 2005).

Mais recentemente houve o advento do carro “flex-fuel” que utiliza opcionalmente álcool hidratado ou gasolina como combustível. O sucesso de vendas desse tipo de veículo demonstrado na Tabela 2.2 fez com que houvesse um aumento ainda maior de consumo interno de etanol no país.

Tabela 2.2: Demanda de carros a álcool e flex fuel no Brasil (em milhares de unidades)

Ano	Gasolina	Etanol	Flex Fuel	GNV	Total
2003	14510	2473	24	560	17657
2004	15134	2232	188	740	18295
2005	15406	1947	651	930	18944
2006	15311	1381	1539	1130	19543
2007	15336	1223	2644	1300	20197
2008	14736	948	3776	1530	20988
2009	14426	738	4945	1720	21633
2010	14698	531	6182	1880	22693

*Fonte – ANFAVEA (2005)*

Após implementação do Proálcool no Brasil, o processo de fermentação foi o que obteve maiores progressos no setor sucroalcooleiro, com o objetivo de aumentar a produtividade do mesmo. Pode-se destacar como pontos importantes neste avanço tecnológico o controle microbiológico e operacional do processo, o uso de leveduras selecionadas, o controle da nutrição da levedura e temperatura do processo, o uso de antimicrobianos adequados, o controle de enchimento das dornas e o controle de perdas nas centrífugas, entre outros (Vasconcelos, 2006).

## 2.2. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é conhecida desde os tempos mais remotos. No entanto, apenas em 1863 Pasteur demonstrou a natureza microbiológica da fermentação como um processo anaeróbio, ou seja, que ocorre na ausência de oxigênio. A partir daí, principalmente na década de 1930, muitas pesquisas foram desenvolvidas para o entendimento das reações enzimáticas responsáveis pela transformação do açúcar (glicose) em etanol e gás carbônico pelas leveduras.

A fermentação alcoólica envolve 12 reações enzimáticas em seqüência ordenada, que ocorrem no citoplasma celular. Essas enzimas sofrem ações de diversos fatores

como nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, pH, temperatura e outros, que podem favorecer ou não o desempenho das leveduras (Lima *et al.*, 2001).

Devido à importância biotecnológica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na produção de alimentos e bebidas alcoólicas em todo o mundo e na produção de combustível renovável no Brasil, este microrganismo tornou-se o mais estudado e, portanto, seu metabolismo é o mais conhecido, sendo o microrganismo mais amplamente utilizado no processo de fermentação alcoólica (Shuler e Kargi, 2002).

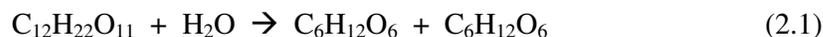
Shuler e Kargi (2002) ainda citam outro microrganismo com grande potencial para produção de etanol, a bactéria *Zymomonas mobilis*, que apresenta algumas vantagens em relação a *S. cerevisiae*, como a boa tolerância ao etanol e rendimentos próximos ao teórico. Entretanto, este microrganismo é muito sensível e exige condições estéreis de mosto, o que torna sua aplicação industrial inviável atualmente.

De acordo com Lima *et al.* (2001), a *S. cerevisiae* possui linhagens diferentes quando isoladas de meios diferentes, como nos mostos de vinho, cerveja ou de destilarias. Cada linhagem tem suas características próprias, desenvolvidas em função das condições do meio e que afetam diretamente o rendimento do processo.

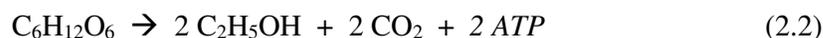
As leveduras são mesófilas e requerem temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol, na faixa de 32 a 35°C. O aumento da temperatura no meio fermentativo favorece a contaminação bacteriana e a toxidez da levedura pelo etanol.

A levedura é um microrganismo aeróbio facultativo, ou seja, na presença de oxigênio, a mesma transforma glicose em biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Na ausência de oxigênio, a maior parte da glicose é convertida em etanol e CO<sub>2</sub>, sempre com o objetivo de obter ATP (adenosina trifosfato) para realização de suas atividades metabólicas. Os substratos utilizados pela levedura podem ser tanto de fonte externa como sacarose, glicose, frutose, entre outros, como de seus próprios constituintes como trealose e glicogênio (Lima *et al.*, 2001).

A levedura hidrolisa a molécula de sacarose pela ação da enzima invertase, gerando uma molécula de glicose e uma molécula de frutose:



A partir das moléculas de 6 carbonos obtidas, a levedura inicia seu metabolismo de acordo com as condições do meio, produzindo etanol e CO<sub>2</sub> em condições de anaerobiose:



Na presença de oxigênio ocorre a respiração:



### 2.3. Fatores que influenciam a fermentação alcoólica

De acordo com Lima *et al.* (2001) um fator importante para o controle da fermentação alcoólica é o pH do meio. O pH ideal para fermentação alcoólica encontra-se na faixa de 4 a 5. No processo de fermentação com reutilização da levedura, faz-se seu tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2,0 a 3,2, durante aproximadamente um hora, visando a redução da carga microbiana. A fermentação alcoólica inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0. Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos em etanol, devido à baixa produção de glicerol. Além disso, as bactérias contaminantes não resistem ao pH ácido.

A contaminação bacteriana influencia de forma negativa a fermentação alcoólica, uma vez que as bactérias competem com a levedura pelo mesmo substrato e geram subprodutos que são inibidores do crescimento da levedura. As instalações de usinas geralmente não são projetadas para trabalhar com culturas puras, entretanto infecções crônicas devem ser eliminadas, pois afetam o rendimento da produção de etanol.

Sabe-se que as bactérias lácticas são os principais contaminantes do processo de fermentação alcoólica. Concentrações de ácidos láctico e acético são medidas periodicamente para controle dos níveis de infecção. Testes com culturas puras de *S. cerevisiae* em presença de ácidos láctico e acético demonstram que as mesmas se estressam e produzem menos etanol e biomassa. Ainda, a contaminação bacteriana ocorre em diferentes tipos de substrato, como os provenientes do milho, do trigo e da cana-de-açúcar, entre outros. Vários agentes químicos e bioquímicos têm sido testados para combater estas bactérias, como peróxido de hidrogênio, metabissulfito de potássio e antibióticos, como a penicilina (Skinner, 2004).

De acordo com Nahvi *et al.* (2002), a floculação da levedura pode estar associada à contaminação bacteriana, embora se conheça outras causas para o início da floculação. A floculação da levedura pode ser descrita como o fenômeno de acoplamento das células, que se separam rapidamente do meio, ficando suspensas. Há várias explicações diferentes sobre as causas da floculação. Uma delas está associada à presença de cálcio no meio fermentativo. Outros pesquisadores acreditam ocorrer apenas ligações entre os grupos aniônicos da parede celular das leveduras e ainda há observações em relação a proteínas específicas, encontradas apenas em meio floculado.

A busca do entendimento do mecanismo da floculação em células de leveduras tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisadores. Segundo Jin e Speers (1999), até

a década de 1960 muitos estudos avaliaram o efeito das condições do meio de cultura como concentração de sais, açúcares, etanol, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e proteólises no mecanismo de floculação. Após a década de 1970, estudos genéticos têm auxiliado na compreensão dos mecanismos que influenciam a floculação no nível molecular.

A floculação em linhagens de levedura é um fenômeno diretamente associado a proteínas do tipo das lectinas (“*lectin like proteins*”), também conhecidas como floculinas que atuam ligando-se seletivamente aos resíduos de manose (mananas) presentes na parede celular de outras cepas. Para que essa interação ocorra, é imprescindível a presença de íons de cálcio livres para que haja a ativação destas floculinas (Bidard *et al.*, 1995; Costa e Morada-Ferreira, 2001).

Alcarde (2001) explica que as lectinas são proteínas que atuam nas ligações entre resíduos de açúcar. Segundo o mesmo autor, por um mecanismo similar, algumas proteínas da parede celular das leveduras (floculinas) podem se ligar aos resíduos de açúcar das glicoproteínas da parede celular de outras leveduras. A Figura 2.1, adaptada do artigo de Verstrepen *et al.* (2003), mostra a ligação floculina-manose em cepas de leveduras com características floculantes.

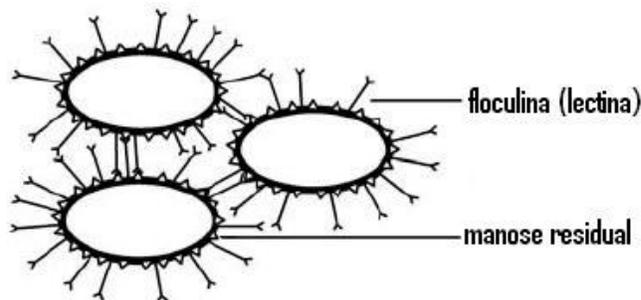


Figura 2.1: Ligação floculina–manose em cepas leveduras floculantes (adaptada de Verstrepen *et al.*, 2003).

Resíduos de manose podem estar presentes na parede celular tanto de cepas floculantes como não-floculantes, fortalecendo assim a hipótese de que o fator determinante para que ocorra a floculação é a presença de floculinas nestas cepas. (Verstrepen *et al.*, 2003).

Os nutrientes também têm papel importante na obtenção de um bom rendimento industrial para fermentação alcoólica. O caldo de cana, por sua natureza, possui sais minerais. Entretanto suas quantidades variam em função do solo, clima e período do ano. Desta forma, torna-se necessário a suplementação adequada de alguns elementos para obtenção de uma fermentação satisfatória.

O fósforo é um suplemento essencial, pois favorece a ação das leveduras e aumenta eficiência e produtividade do processo fermentativo. Outro elemento importante no metabolismo da levedura é o nitrogênio. A forma como esse nutriente se encontra disponível influencia na melhor absorção do mesmo pela levedura, onde a forma mais favorável ao seu aproveitamento é a amoniacal. Na ausência desta forma, a levedura procura outras fontes, como aminoácidos, que influenciam na formação de subprodutos como álcoois isoamílico, amílico, propílico entre outros. Os nutrientes metálicos também apresentam grande importância no processo fermentativo, uma vez que são responsáveis pelo bom desempenho das reações enzimáticas (Vasconcelos, 1987).

A formação de álcoois superiores ocorre devido à descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos e é favorecido pela falta de nitrogênio amoniacal. Os parâmetros de fermentação também influenciam diretamente na formação destes álcoois, como temperatura, pH e composição do meio (Gutierrez, 1993).

Muito se discute em relação à necessidade ou não de suplementação de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio. Alguns pesquisadores concluem que a adição é benéfica, enquanto outros questionam o assunto. O fósforo, por exemplo, apresenta grande importância na fermentação, pois representa fonte de energia para o metabolismo celular. Entretanto, foi verificado que o fósforo acelera a formação de alcoóis superiores, principalmente devido ao efeito sinérgico, quando combinado ao nitrogênio (Silva *et al.*, 2006).

Considerando que tanto os açúcares quanto o etanol exercem efeito de inibição sobre o metabolismo da levedura, a forma de alimentação de substrato nas dornas tem influência direta na eficiência da fermentação. Este controle é importante para que o processo fermentativo não sofra interrupção ou tenha sua velocidade reduzida por excesso de substrato. Este parâmetro geralmente é controlado nas unidades industriais através do acompanhamento da concentração de açúcares redutores totais (ART) no meio de fermentação.

Após o advento do Proálcool, a produção brasileira de etanol teve um aumento de vinte vezes, assim a variável tempo de fermentação passou a ter grande importância no processo. Como consequência a velocidade de enchimento passou a ter também papel fundamental no processo (Vasconcelos, 1993).

Vazões muito elevadas podem causar transbordamento do meio de fermentação, gerando perdas de processo, além de aumentar a concentração de substrato no início e causar inibição do metabolismo da levedura. Por outro lado, vazões muito baixas conduzem a tempo de fermentação elevado, implicando em menores produtividades. O

melhor controle do enchimento das dornas está associado ao maior esforço tecnológico, uma vez que é muito difícil manter patamares constantes no controle manual (Vasconcelos, 1993).

## **2.4. Processos industriais de fermentação alcoólica**

### **2.4.1. Classificação dos processos fermentativos**

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a maneira através da qual o substrato é adicionado e o produto é retirado. Numa fermentação descontínua, o substrato é inicialmente carregado numa dorna e, ao término do processo, o produto é retirado da mesma. Numa fermentação contínua, a matéria-prima é adicionada com uma vazão constante e o meio fermentado é retirado com a mesma vazão de alimentação. Ainda existe o processo de fermentação semicontínua, no qual a adição de mosto e retirada de produto são efetuadas intermitentemente.

O modelo contínuo tem como característica principal, a operação em estado estacionário, onde as propriedades do vinho permanecem constantes com o tempo. Este modelo não é muito utilizado pelas indústrias, entretanto muito se pesquisa sobre o mesmo. Testes realizados em escalas piloto e semi-industrial mostram a possibilidade do cultivo de diversos produtos através deste sistema e demonstram as vantagens em relação ao sistema descontínuo (Borzani *et al.*, 2001).

Os sistemas contínuos podem ocorrer com algumas variações, com tanques ligados em série e com ou sem recirculação de microrganismos.

O processo descontínuo ou em batelada teve grande destaque nos anos 60, quando até então o processo clássico de fermentação de cortes era muito utilizado nas indústrias brasileiras. Depois da chegada do processo Melle-Boinot no Brasil, muitas usinas e destilarias iniciaram o processo de substituição do modelo de produção. O processo Melle-Boinot, em batelada alimentada com reciclo de células, surgiu na França na década de 30, e contribuiu para a evolução da fermentação alcoólica, devido às suas inúmeras vantagens, como menor reprodução celular, elevado rendimento em etanol, eliminação dos contaminantes por centrifugação do meio fermentado e por utilização do tratamento ácido e eliminação do preparo de cultura pura devido ao reciclo de fermento (Andrietta, 1994).

De acordo com Amorim (2005), o processo Melle-Boinot trouxe vários benefícios à fermentação alcoólica, principalmente o reaproveitamento do fermento, que antes era enviado para coluna de destilação juntamente com o vinho. Aumentou-se assim a eficiência do processo fermentativo, pois com uma menor quantidade de açúcar se produz um

maior volume de álcool, uma vez que se reduz a quantidade de açúcar destinada à produção de células. Entretanto, com o tempo, descobriram-se algumas desvantagens do processo. A centrifugação não eliminava todos os microorganismos, como se acreditava no início, separando apenas as bactérias de menor tamanho, como *cocos* e *micrococos*. Os bastonetes, de maior tamanho, chegavam até se concentrar no processo de centrifugação. Apesar das vantagens e desvantagens descobertas ao longo do tempo, o processo Melle-Boinot é, ainda hoje, o método mais utilizado pelas destilarias do Brasil.

#### **2.4.2. Processo fermentativo industrial**

A cana de açúcar é a matéria-prima para produção de álcool no Brasil. Ela é composta por aproximadamente 12–17% de açúcares (90% sacarose e 10% glicose e frutose em massa) e 68–72% de água. A extração média em uma usina de açúcar e álcool é de aproximadamente 95% de açúcar da cana e o resíduo sólido gerado na extração é o bagaço (Wheals, 1999).

Geralmente, o caldo obtido na extração para produção do etanol é aquecido em torno de 110°C, com o objetivo de reduzir a carga microbiana do mesmo, e em seguida segue para decantação. Em destilarias isoladas pode-se evaporar o caldo para o preparo do mosto e início da fermentação. Já em destilarias, que são anexas à fábrica de açúcar, utiliza-se mel proveniente da centrifugação do açúcar, que contém teor de açúcar acima de 65% m/m para preparo do mosto, sendo diluído com água ou com caldo de cana. O mosto preparado para fermentação contém minerais e nutrientes orgânicos suficientes para se iniciar a fermentação (Wheals, 1999).

No Brasil, 70% das destilarias utilizam processo de fermentação em batelada, com capacidade de produção de aproximadamente 1,5 milhões de litros de álcool. O processo contínuo também é usado em algumas usinas. Ambos os processos utilizam centrifugação para separar o creme de levedura do vinho e reutilizam este creme no processo. O creme geralmente é tratado com ácido sulfúrico para reduzir a contaminação por bactérias. A reutilização do creme no processo de fermentação alcoólica em batelada, chamada de Melle-Boinot, viabilizou o aumento da produção de álcool nas usinas. A utilização de altas concentrações de células (8-17% v/v) e temperaturas de 33 a 35°C contribuem para redução do crescimento celular e aumento da produção de álcool (8 a 11°GL), gerando alto rendimento de etanol (90 a 92%) (Wheals, 1999).

Segundo Souza *et al.* (2007), as usinas do Brasil trabalham com concentrações de açúcares redutores entre 10 e 20% m/v e com altas concentrações de células (10-12% v/v), o que ajuda a minimizar o efeito inibidor do substrato e do produto, tornando possível uma redução no tempo de fermentação. Os autores testaram a cepa industrial BG1 em diferentes concentrações de açúcares redutores e em condições variáveis de pH e temperatura, e constataram que a BG1 manteve uma viabilidade alta em períodos de fermentação de 4 horas, em concentrações de açúcares acima de 150 g/L.

A fermentação alcoólica gera também produtos secundários como glicerol, ácidos orgânicos e alcoóis superiores e, simultaneamente, ocorre formação de biomassa celular. Estima-se que 5% do açúcar metabolizado pela levedura seja utilizado para formação dos subprodutos. Em condições industriais isto pode variar até 10%, uma vez que estão envolvidos fatores químicos e microbiológicos. Desta forma, estima-se que a eficiência industrial de fermentação seja de aproximadamente 90% (Lima *et al.*, 2001).

O curto tempo de fermentação de 6 a 10 h permite que a levedura seja reciclada até três vezes por dia, durante 200 dias de safra. A contaminação bacteriana pode ocorrer, mas ela é controlada pelo uso de antibióticos e antimicrobianos. Algumas usinas possuem bom nível de automação e controle da fermentação (Wheals, 1999).

## 2.5. Cinética da fermentação

Os processos bioquímicos são complexos quando comparados aos processos químicos, devido à natureza dos sistemas biológicos.

Segundo Leveau (1985), o estudo matemático da cinética microbiana tem como base duas fases:

Abiótica – fase que corresponde ao meio ambiente, condições físico-químicas imediatas das células e pode ser manipulável, como a adição de nutrientes ao meio.

Biótica – fase relacionada às propriedades genéticas, bioquímicas e fisiológicas do microorganismo e não pode ser manipulada durante o processo de fermentação (Vasconcelos, 1987).

A fermentação alcoólica é um processo bastante conhecido, entretanto não existe um modelo cinético que descreva adequadamente o processo de produção de etanol. Além do que, as condições para fermentação alcoólica são muito mais severas do que aquelas para crescimento celular (Bailey e Ollis, 1986).

O estudo da cinética das fermentações é importante na determinação das velocidades de transformações que ocorrem durante a fermentação. É possível determinar os fatores que influenciam nesta velocidade de transformação e correlacioná-los por meio de equações matemáticas. Uma vez determinados os fatores que influenciam na velocidade de transformação, temos uma ferramenta de otimização de processo. (Copersucar, 1987)

Em uma fermentação ocorrem muitas transformações simultâneas, onde células crescem, se reproduzem e morrem, substâncias diversas existentes no meio são consumidas pelos microrganismos e produtos de metabolismo são lançados no meio. No caso da fermentação alcoólica, os principais fatores a serem medidos são as variações das concentrações de células, de substrato (açúcares fermentescíveis) e de concentração de etanol com o tempo. Outras substâncias como  $\text{CO}_2$  ou outros nutrientes, podem ser avaliadas eventualmente (Copersucar, 1987).

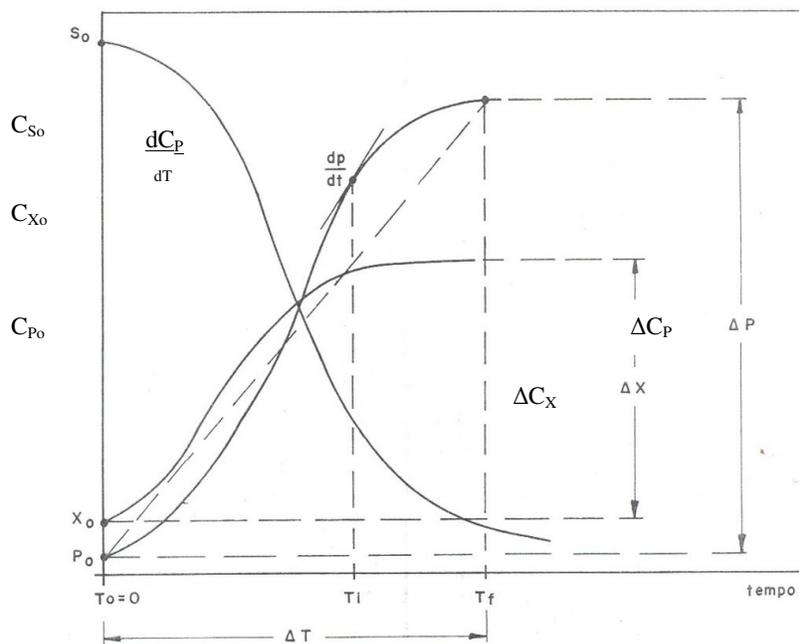


Figura 2.2: Variação de  $C_S$ ,  $C_X$  e  $C_P$ , com o tempo em um processo descontínuo (Copersucar, 1987).

Considerando as variáveis concentração de substrato ( $C_S$ ), concentração de microrganismos ( $C_X$ ) e concentração de produto ( $C_P$ ) presente no meio em um instante  $t$ , a Figura 2.2 representa o comportamento de um processo fermentativo descontínuo, onde ocorre consumo de substrato com simultâneas formação de produto e geração de células. A partir da curva apresentada na Figura 2.2 é possível determinar as velocidades médias de transformações num período de tempo ( $\Delta t$ ):

$$r_s = \frac{\Delta C_S}{\Delta t} = \frac{(C_{so} - C_{sf})}{(t_f - t_o)} \quad (2.4)$$

$$r_p = \frac{\Delta C_P}{\Delta t} = \frac{(C_{Pf} - C_{Po})}{(t_f - t_o)} \quad (2.5)$$

$$r_x = \frac{\Delta C_X}{\Delta t} = \frac{(C_{xf} - C_{xo})}{(t_f - t_o)} \quad (2.6)$$

A velocidade média de transformação do processo auxilia no entendimento do fenômeno e na determinação de equipamentos para tal, como tamanho do fermentador. Em alguns casos é de grande interesse a medição de velocidades instantâneas no processo fermentativo, para tal utiliza-se as equações:

$$r_s = -\frac{dC_S}{dt} \left[ \frac{g}{L \cdot h} \right] \text{ ou } \left[ \frac{kg}{m^3 \cdot h} \right] \quad (2.7)$$

$$r_p = \frac{dC_P}{dt} \left[ \frac{g}{L \cdot h} \right] \text{ ou } \left[ \frac{kg}{m^3 \cdot h} \right] \quad (2.8)$$

$$r_x = \frac{dC_X}{dt} \left[ \frac{g}{L \cdot h} \right] \text{ ou } \left[ \frac{kg}{m^3 \cdot h} \right] \quad (2.9)$$

A cinética dos processos fermentativos pode ser classificada em função da formação do produto. Na fermentação alcoólica, a formação do produto está diretamente relacionada ao consumo de substrato. Existem outros bioprocessos onde a formação de produto está parcialmente associada à utilização do substrato como por exemplo, a produção de ácido cítrico. Ainda, pode-se citar as fermentações onde a síntese do produto aparentemente não está associada ao consumo do substrato, como a produção de penicilina (Copersucar, 1987).

Os processos fermentativos podem ser classificados em função da reação que ocorre na transformação do substrato em produto. Os processos fermentativos são tipicamente heterogêneos, pois possuem a fase líquida que corresponde ao meio de fermentação, a fase sólida que é constituída pelos microorganismos e ainda existe a fase gasosa, representada pelo CO<sub>2</sub> ou O<sub>2</sub> contidos no meio. A fermentação simples ocorre quando o nutriente é transformado em produto em proporção constante, sem acúmulo de intermediários; fermentação simultânea, onde os nutrientes são convertidos em produtos em proporção variável, sem acúmulo de intermediário; fermentações consecutivas, onde os nutrientes são convertidos em produto com acúmulo de metabólitos intermediários, e “stepwise”, onde os nutrientes são convertidos em metabólitos intermediários e posteriormente convertidos em produto (Copersucar, 1987).

O estudo da cinética dos processos fermentativos exige o conhecimento e a utilização de parâmetros que possibilitem a análise da produção de células e produção da substância desejada, como o etanol. Entre estes parâmetros encontram-se, a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_X$  ou simplesmente  $\mu$ ), a velocidade específica de consumo do substrato ( $\mu_S$ ) e a velocidade específica de formação de produto ( $\mu_P$ ):

$$\mu_X = \mu = \frac{r_X}{C_X} \quad (2.10)$$

$$\mu_S = \frac{r_S}{C_S} \quad (2.11)$$

$$\mu_P = \frac{r_P}{C_P} \quad (2.12)$$

O tempo de geração é também um parâmetro importante, pois define o tempo necessário para haver duplicação do número de células existentes no meio de cultivo. Os fatores de conversão de substrato em célula ou em produto, também possuem grande importância na análise de processos fermentativos, pois através destes parâmetros é possível medir o rendimento da fermentação. São eles:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta C_X}{\Delta C_S} \quad (2.13)$$

onde  $Y_{X/S}$  corresponde ao coeficiente de rendimento de substrato em células num determinado intervalo de tempo e:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta C_P}{\Delta C_S} \quad (2.14)$$

onde  $Y_{P/S}$  corresponde ao fator de conversão de substrato em produto num determinado intervalo de tempo.

### 2.5.1. Modelos cinéticos sem inibição

Os nutrientes do meio possuem grande importância no metabolismo celular, tanto na síntese de produtos como crescimento celular. Entretanto o excesso de nutrientes pode inibir ou reprimir o crescimento celular. Desta forma, é comum utilizar a concentração do principal nutriente do meio ou substrato, como limitante para o crescimento celular. Se mantivermos constantes as concentrações dos nutrientes do meio, variando apenas a concentração do nutriente essencial ou do substrato limitante, teremos uma relação hiperbólica entre a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ ) e a concentração de substrato limitante ( $C_S$ ). A Equação 2.15 que relaciona  $\mu$  e  $C_S$  foi proposta por Monod (1942),

e apresenta forma similar à equação que Henri e Ollis (1902) e Michaelis e Menten (1913) propuseram como modelo para descrever o comportamento de reações enzimáticas (Bailey e Ollis, 1986).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (2.15)$$

Onde:

$\mu_{\max}$ : velocidade específica máxima de crescimento celular ( $h^{-1}$ )

$K_S$ : constante de saturação (g/L ou  $kg/m^3$ )

Observações:  $\mu = \mu_{\max}$  quando  $C_S \gg K_S$  e  $\mu = \mu_{\max}/2$  quando  $K_S = C_S$

A equação de Monod serviu como base para o estabelecimento de um grande número de modelos mais complexos, com a introdução de modificações na expressão original (Vasconcelos, 1987).

### 2.5.2. Modelos cinéticos com inibição

Com objetivo de se entender melhor o desenvolvimento dos processos fermentativos através da cinética, obtém-se as velocidades das transformações que ocorrem durante o processo e estuda-se a influência de fatores atuantes nestas velocidades. Um dos fatores que influencia a velocidade de crescimento celular e, por conseqüência, a de formação de produto (etanol) é a própria concentração de etanol ( $C_P$ ). Segundo Vasconcelos (1987), há algumas expressões propostas na literatura que descrevem a dependência da velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\max}$ ) com a concentração de etanol ( $C_P$ ). Estas expressões podem ter formas linear, hiperbólica, exponencial e parabólica.

Várias pesquisas foram realizadas para se determinar as relações entre o crescimento celular e a produção de etanol. O efeito da inibição sobre as leveduras influencia tanto o crescimento celular como a produção de etanol, onde a tolerância a altas concentrações depende da cepa. Segundo Jones (1981), as leveduras mais tolerantes são do gênero *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*.

De acordo com Vasconcelos (1987), o efeito provocado pelo etanol é não competitivo e afeta apenas as velocidades específicas. Diante de diversos experimentos, comprovou-se que com o aumento da temperatura ocorre o aumento da inibição pelo etanol. Steikraus (1976) verificaram que a velocidade de produção do etanol é maior que a velocidade de difusão através da membrana e este etanol intracelular, a 30°C, pode

“envenenar” as células. O efeito do etanol ocorre principalmente na membrana celular, devido desidratação e perda de atividade das enzimas que participam da glicólise.

A capacidade de produção de etanol pela levedura depende da tolerância da cepa em relação à concentração de etanol no meio e à temperatura, além de outras propriedades como a capacidade de produção da invertase. Souza *et al.* (2007) realizaram experimentos comparando a cepa 63M com a cepa industrial BG1 de *S. cerevisiae*. Em seus experimentos os autores constataram que a viabilidade da BG1 foi maior que a viabilidade da cepa 63M, em períodos longos de fermentação. Entretanto, a produção de etanol pela BG1 foi mais baixa que a produção de etanol pela cepa 63M.

Além do etanol, alguns subprodutos da fermentação são inibitórios para levedura, em concentrações acima de 5% v/v. A concentração de glicose também pode ser inibitória em concentrações acima de 100 g/L. Estudos vêm sendo realizados a fim de se obter cepas mais resistentes ao etanol. Uma alternativa para evitar a inibição pelo etanol é a retirada contínua do mesmo durante a fermentação (Shuler e Kargi, 2002).

Efeitos de inibição pelo etanol têm sido estudados para *S. cerevisiae* em cultivos contínuos sob condições de alta concentração de etanol, sendo este adicionado ao meio ou produzido pela própria levedura. Hoppe e Hansford (1982) verificaram que o etanol produzido pela própria levedura produz maior efeito de inibição do que o etanol proveniente de fonte externa. Steinkraus (1976) também demonstraram que o efeito do etanol produzido pelo microrganismo é mais efetivo que o etanol adicionado artificialmente. A partir dos resultados obtidos notou-se que o efeito inibitório irreversível observado, pode ocorrer devido à alta concentração de etanol intracelular, que pode desnaturar parte das enzimas da via glicolítica, especialmente as hexoquinases (Vasconcelos, 1987, Hoppe e Hansford, 1982).

Aiba *et al.* (1968) propuseram um modelo de inibição por produto dado pela equação 2.16 para descrever a fermentação alcoólica, onde  $K_P$  é a constante de inibição pelo produto:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \frac{K_P}{K_P + C_P} \quad (2.16)$$

Os autores testaram o efeito inibitório do etanol na velocidade específica de crescimento celular, com uma levedura de panificação e a H-1 (uma levedura industrial). Em seus experimentos, a concentração de glicose foi controlada para limitar a atividade metabólica da levedura, na produção de saquê. Segundo os autores, o efeito do álcool foi mais prejudicial para produção de biomassa do que para a fermentação em si. Desde concentrações relativamente baixas de etanol observou-se um início de inibição à multiplicação das células,

enquanto que a atividade de fermentação apresentou boa tolerância a concentrações de etanol de até 20%.

Entre os modelos estudados para inibição de células por produção de etanol, Hoppe e Hansford (1982) propuseram um modelo similar ao modelo utilizado para inibição não competitiva na cinética enzimática, que já havia sido estudado por Aiba e Shoda (1968). Este modelo derivou-se da cinética de Monod com adição de um termo de inibição pelo etanol, como segue:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{C_S + K_S} \cdot \frac{K_P}{K_P + Y_{P/S} \cdot (C_{Sf} - C_{S0})} \quad (2.17)$$

Segundo Luong (1984), a dependência de  $\mu$  com a concentração de etanol  $C_P$  pode ser descrita de 4 formas:

i) Relação linear

$$\mu = \mu_{\max} - K_i \cdot C_P = \mu_{\max} \cdot \frac{(1 - C_P)}{C_P^*} \quad (2.18)$$

onde  $K_i$  é uma constante empírica. O termo  $C_P^* = \mu_{\max}/K_i$  corresponde à concentração de etanol acima da qual cessa o crescimento celular.

A relação linear entre  $\mu$  e  $C_P$  foi originalmente proposta por Hinshelwood (1952) utilizando *Lactis aerogenes* e mais tarde confirmada por Holzberg *et al.* (1967). Esta relação só é aplicável para fermentações onde não há limitação por substrato (Aiba *et al.*, 1968, Luong, 1984).

ii) Relação Exponencial

Esta relação foi proposta por Aiba *et al.* (1968) conforme segue:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot e^{-K_2 \cdot C_P} \quad (2.19)$$

onde  $K_2$  é uma constante empírica que depende do método de cultivo (batelada ou contínuo).

iii) Relação Hiperbólica

Aiba e Shoda (1968) propuseram um modelo que correlaciona  $\mu$  e  $C_P$  de forma hiperbólica:

$$\mu_i = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \frac{1}{1 + C_P \cdot K_3} \quad (2.20)$$

iv) Relação Parabólica

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n \quad (2.21)$$

Do ponto de vista matemático, nas equações 2.19 e 2.20,  $\mu$  só se aproxima de zero quando  $C_P$  se aproxima de infinito. Entretanto, isto não é observado na prática, pois existe uma concentração limite na qual o crescimento celular e a fermentação são cessados. A tolerância por etanol de uma cepa é de aproximadamente 100 g/L para crescimento e 200 g/L para produção de etanol (Luong, 1984).

O modelo parabólico para medir a influência do etanol como inibidor foi proposto por Levenspiel (1974). Alguns pesquisadores já haviam estudado modelos semelhantes anteriormente (Luong, 1984). A partir dos perfis cinéticos traçados para inibição do etanol, propôs-se um modelo cinético que descrevesse o efeito de inibição do etanol formado no crescimento da célula durante a fermentação:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left[ 1 - \left( \frac{C_P}{C_{P^*}} \right)^\alpha \right] \quad (2.22)$$

Relação similar pode ser observada para produção de etanol, que também sofre interferência da inibição do etanol na célula:

$$\mu_P = Y_{P/X} \cdot \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{C_S + K'_S} \cdot \left[ 1 - \left( \frac{C_P}{C_{P_m}} \right)^\beta \right] \quad (2.23)$$

onde  $Y_{P/X}$  é o coeficiente de rendimento de células a etanol ( $Y_{P/X} = Y_{P/S} / Y_{X/S}$ ),  $K'_S$  é a constante de saturação com relação à produção de etanol e  $C_{P_m}$  é a concentração de etanol a partir da qual a cessa a produção de etanol.

Hill e Robinson (1990) testaram o efeito do etanol utilizando a cepa *S. cerevisiae* NRRL Y132. Os autores observaram que a glicose em baixas concentrações não altera a velocidade inicial de crescimento da levedura, diferente da variação de concentração de etanol, uma vez que a levedura ajusta seu metabolismo para diferentes concentrações de etanol no meio. De acordo com Hill e Robinson (1990), a velocidade específica de crescimento da levedura sofre um declínio linear com a concentração de etanol, para valores acima de 78,7 g/L.

Hill e Robinson (1990) ainda realizaram experimentos com a cepa *S. cerevisiae* NRRL Y132 para avaliar a influência do etanol e encontraram valores de  $Y_{P/S}$  em torno de  $0,46 \pm 0,16$  g/g, valor similar aos já então relatados por Cysewski e Wilke (1976), de 0,46 g/g, e por Ghose e Tyagi (1979), de 0,47 g/g. Os pesquisadores demonstraram que valores de  $Y_{X/S}$ , decresceram evidentemente de 0,099 g/g para valores próximos de zero, quando a concentração de etanol aumentou de 40,9 g/L para 119 g/L.

A velocidade específica de crescimento celular pode também ser inibida por constituintes do meio, como o próprio substrato. Vários modelos de inibição foram estudados, como o proposto por Andrews (1968), onde  $K_{is}$  é a constante de inibição pelo substrato:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{\left( K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{is}} \right)} \quad (2.24)$$

Andrews (1968) realizou experimentos que demonstraram o efeito de inibição por substrato em processos batelada e contínuo. Os resultados demonstraram que o efeito de inibição causa um aumento da fase lag do processo em batelada, enquanto causa instabilidade no processo contínuo.

Embora existam diferentes modelos cinéticos na literatura que descrevem o comportamento do processo de produção de etanol em laboratório, estes se apresentam limitados para representar o comportamento do processo fermentativo na escala industrial.

No processo industrial denominado de “batelada”, tem-se um processo semicontínuo, durante alimentação da dorna, que contém inicialmente o inóculo (“pé de cuba”), seguido de uma etapa em batelada até o término do substrato.

Os modelos de inibição explicam com precisão o comportamento do processo (crescimento celular, consumo de substrato e geração de produto) na etapa final em batelada. No entanto, na etapa inicial do processo os modelos de literatura não se ajustam adequadamente aos resultados experimentais. Logo, faz-se necessário a proposta de um modelo que explique o comportamento da etapa inicial do processo.

## **2.6. Eficiência de fermentação alcoólica**

São poucos trabalhos de literatura que apresentam metodologias ou cálculos de eficiência da fermentação alcoólica. Na seqüência serão apresentadas duas bibliografias que tratam especificamente do assunto.

### **2.6.1. Eficiência de fermentação por subprodutos**

A eficiência da fermentação ou eficiência em etanol (produto) na indústria ( $\eta_P$ ) é usualmente determinada de acordo com os subprodutos gerados no processo. Esse cálculo foi proposto originalmente pelo então Centro de Tecnologia Copersucar (1987) e é descrito por Fernandes (2003). Tal método de cálculo foi proposto de tal modo que se possa obter a

eficiência de fermentação com base em informações básicas de processo que praticamente todas as usinas podem fornecer, inclusive em fermentações contínuas.

O método de cálculo se baseia no balanço material para o ART, que adentra o processo via alimentação do mosto. A quantidade de ART alimentada é na sua maior parte consumida para a geração de etanol, CO<sub>2</sub>, células, glicerol, pelas leveduras e acidez tanto pelas leveduras como pelas bactérias contaminantes. A quantidade de ART não fermentescível, denominados açúcares redutores residuais totais (ARRT) que acumula na dorna somada à quantidade de ART consumido para a geração de etanol e subprodutos do processo é igual à quantidade de ART alimentada. Logo, o balanço da mesma para o ART é dado por:

$$\text{Entra (ART)} = \text{consome (ART)} + \text{acumula (ART)} \quad (2.25)$$

Na equação 2.25, o que acumula é igual à massa de ARRT alimentada e não consumida. A quantidade consumida de ART é convertida em etanol e subprodutos pela equação que segue:

$$\begin{aligned} \text{Consome (ART)} = & \text{ gera (Etanol)} + \text{ gera (CO}_2\text{)} + \text{ gera (Células)} + \\ & + \text{ gera (Glicerol)} + \text{ gera (Acidez)} \end{aligned} \quad (2.26)$$

Dividindo-se a equação 2.25 pela quantidade alimentada de ART (entra (ART)), tem-se que:

$$1 = \text{Consome (ART)}/\text{Entra (ART)} + \text{Acumula (ART)}/\text{Entra (ART)} \quad (2.27)$$

Como a quantidade alimentada de ART é muito superior que a quantidade que acumula (ARRT), pode-se supor que a quantidade de ART alimentada é aproximadamente igual à quantidade de ART consumida e assim pode-se escrever a equação 2.26 em termos de coeficientes de rendimento e da fração acumulada de ARRT ( $Y_{ARRT/S}$ ).

$$1 = Y_{P/S} + Y_{CO_2/S} + Y_{Gli/S} + Y_{X/S} + Y_{Ac/S} + Y_{ARRT/S} \quad (2.28)$$

Sendo  $Y_{X/S}$  a relação entre o que gera de células, que é igual ao que acumula de células ( $\Delta m_X$ ) e o que consome de ART ( $\Delta m_S$ ), logo:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta m_X}{\Delta m_S} = \frac{\Delta m_X \cdot \Delta m_P}{\Delta m_P \cdot \Delta m_S} = \frac{\Delta m_X}{\Delta m_P} \cdot Y_{P/S} \quad (2.29)$$

Generalizando para os outros fatores, tem-se que:

$$Y_{CO_2/S} = \frac{\Delta m_{CO_2}}{\Delta m_P} \cdot Y_{P/S} \quad (2.30)$$

$$Y_{Gli/S} = \frac{\Delta m_{Gli}}{\Delta m_P} \cdot Y_{P/S} \quad (2.31)$$

$$Y_{Ac/S} = \frac{\Delta m_{Ac}}{\Delta m_P} \cdot Y_{P/S} \quad (2.32)$$

$$Y_{ARRT/S} = \frac{\Delta m_{ARRT}}{\Delta m_P} \cdot Y_{P/S} \quad (2.33)$$

Substituindo-se as equações 2.29 a 2.33 na equação 2.28 e rearranjando-a, tem-se que:

$$Y_{P/S} = \frac{1}{1 + \frac{\Delta m_X}{\Delta m_P} + \frac{\Delta m_{CO_2}}{\Delta m_P} + \frac{\Delta m_{Gli}}{\Delta m_P} + \frac{\Delta m_{Ac}}{\Delta m_P} + \frac{\Delta m_{ARRT}}{\Delta m_P}} \quad (2.34)$$

Sendo,

$$\eta_P = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \cdot 100 \quad (2.35)$$

Tem-se que:

$$\eta_P = \frac{100}{0,511 \cdot \left( 1 + \frac{\Delta m_X}{\Delta m_P} + \frac{\Delta m_{CO_2}}{\Delta m_P} + \frac{\Delta m_{Gli}}{\Delta m_P} + \frac{\Delta m_{Ac}}{\Delta m_P} + \frac{\Delta m_{ARRT}}{\Delta m_P} \right)} \quad (2.36)$$

As relações entre as quantidades geradas de células, CO<sub>2</sub>, glicerol e acidez, e a quantidade de ARRT acumulada são definidas como perdas especificadas, em relação à quantidade que seria formada de etanol ( $\Delta m_P$ ), pelas constantes  $K_L$ ,  $K_{CO_2}$ ,  $K_{Gli}$ ,  $K_{Ac}$  e  $K_{ARRT}$ . Logo a equação 2.35 é reescrita da forma que segue:

$$\eta_P = \frac{100}{0,511 \cdot (1 + K_L + K_{CO_2} + K_{AC} + K_{Gli} + K_{ARRT})} \quad (2.37)$$

Tem-se pela estequiometria da fermentação alcoólica,  $K_{CO_2} = 44/46$ , logo:

$$\eta_P = \frac{100}{1 + 0,511 \cdot K_L + 0,511 \cdot K_{AC} + 0,511 \cdot K_{Gli} + 0,511 \cdot K_{ARRT}} \quad (2.38)$$

Devido à dificuldade de se mensurar a produção de CO<sub>2</sub> em uma fermentação alcoólica, os pesquisadores realizaram testes piloto em condições normais de fermentação e chegaram experimentalmente na seguinte equação, que determina a constante de CO<sub>2</sub>:

$$K_{CO_2} = 0,956 + 1,33 K_L \quad (2.39)$$

Substituindo a equação 2.39 na equação 2.37, tem-se que:

$$\eta_P = \frac{100}{1 + 1,19 \cdot K_L + 0,511 \cdot K_{AC} + 0,511 \cdot K_{Gli} + 0,511 \cdot K_{ARRT}} \quad (2.40)$$

A equação 2.38 foi originalmente proposta pelo então Centro de Tecnologia Copersucar (CTC, “Manual de Métodos Analíticos – Controle Químico da Fermentação, versão 3, 2001) citado por Fernandes (2003).

Nessa equação, as perdas são calculadas de acordo com as equações que seguem:

$$K_L = \frac{C_{X_{bu-DV}} \cdot 0,33}{\text{°GL}_{VC} \cdot 0,7893} \quad (2.41)$$

$$K_{Gli} = \frac{C_{G-VC}}{\text{°GL}_{VC} \cdot 0,7893} \quad (2.42)$$

$$K_{AC} = \frac{Ac_F \cdot V_F - Ac_I \cdot V_I - Ac_M \cdot V_M}{\left(\frac{\text{°GL}_F}{100} \cdot V_F - \frac{\text{°GL}_I}{100} \cdot V_I\right) \cdot 789,3} \cdot 1,837 \quad (2.43)$$

$$K_{ARRT} = \frac{ART_F}{\text{°GL}_{VC} \cdot 0,7893} \quad (2.44)$$

onde:

$C_{X_{bu-DV}}$  : concentração celular na dorna volante (% v/v)

$\text{°GL}_{VC}$  : °GL no vinho centrifugado (% v/v)

$\text{°GL}_I$  : °GL inicial ou no pré-fermentador (“pé de cuba”) (% v/v)

$C_{G-VC}$ : concentração de glicerol no vinho centrifugado (% m/m)

$Ac_F$ : acidez no vinho final (g/L ou kg/m<sup>3</sup>)

$Ac_I$ : acidez inicial ou no “pé de cuba” (g/L ou kg/m<sup>3</sup>)

$Ac_M$ : acidez do mosto (g/L ou kg/m<sup>3</sup>)

$V_F$ : volume final (m<sup>3</sup>)

$V_I$ : volume inicial ou volume do “pé de cuba” (m<sup>3</sup>)

$V_M$ : volume de mosto (m<sup>3</sup>)

$ART_F$ : concentração de ART final ou concentração de açúcares residuais totais (ARRT) no vinho fermentado (% m/m)

A equação 2.40 fornece o valor da fermentação por subprodutos e é padrão para o setor sucroalcooleiro. Caso não houvesse perdas pela produção paralela de subprodutos, os valores de K seriam nulos e ter-se-ia uma eficiência de 100% em etanol.

De acordo com pesquisa realizada pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), as perdas na fermentação são as maiores perdas determinadas encontradas nas usinas. (Finguerut, 2007)

Nota-se que na equação 2.38 faz-se a penalização do rendimento máximo sob algumas perdas chamadas de constantes de processo ( $K$ 's). As constantes relacionam as quantidades geradas de diversos subprodutos em relação à quantidade que seria gerada de etanol.

Segundo a equação 2.39, a quantidade de  $\text{CO}_2$  gerada é diretamente proporcional à quantidade de levedura produzida. Como esta equação é empírica, é possível deduzir que uma alteração nas condições de fermentação pode alterar significativamente a mesma (Finguerut, 2007).

Verifica-se que  $K_L$  é o índice que mais impacta na eficiência da fermentação (maior coeficiente), uma vez que por definição, quando ocorre maior produção de levedura, a produção de etanol é afetada negativamente (Finguerut, 2007).

Segundo Lehninger (1989), a fermentação apresenta uma rota focada para a produção de álcool, onde ocorre inibição do crescimento celular e formação de duas moléculas de  $\text{CO}_2$ . Outra rota é focada na produção de biomassa, onde a formação de  $\text{CO}_2$  aumenta em 100%, passando a serem formadas quatro moléculas de  $\text{CO}_2$ .

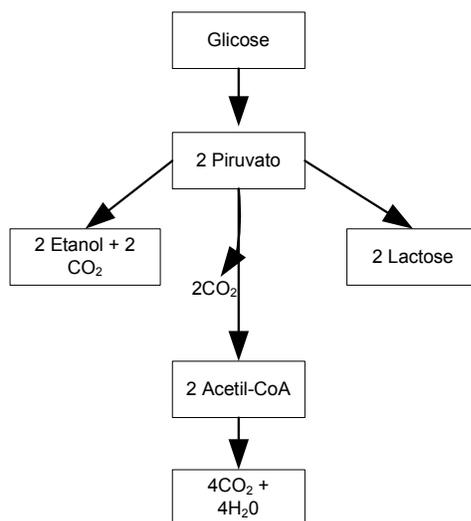


Figura 2.3: Três possíveis rotas catabólicas do piruvato formado na glicólise (Lehninger, 1989)

O modelo de eficiência de fermentação por subprodutos desenvolvido pela Copersucar apresenta uma estimativa de eficiência e depende muito da precisão das medidas analíticas necessárias para os cálculos. Ainda, as medições são feitas em pontos específicos do processo, para que seja possível o cálculo das constantes de perdas ( $K$ 's). Na prática, as usinas se utilizam destas medições para calcular as perdas e finalmente calcular a eficiência da fermentação (Fernandes, 2003).

A formação de glicerol está associada à manutenção do equilíbrio redox celular, o qual ocorre quando há formação de ácidos orgânicos, biomassa e da presença de sulfito no mosto. A formação de glicerol também está relacionada uma resposta ao estresse osmótico, devido a concentrações elevadas de açúcares ou sais de mosto. O glicerol também faz parte da composição da parede celular da levedura. Uma das características do glicerol é sua solubilidade em alto teor alcoólico. Desta forma, pode ocorrer erro na medição da produção de glicerol em processos com concentração alcoólica alta, devido à dissolução do glicerol da parede celular, que é quantificado como glicerol produzido (Lehninger, 1989).

A Figura 2.6 ilustra a via glicolítica com os principais produtos formados:

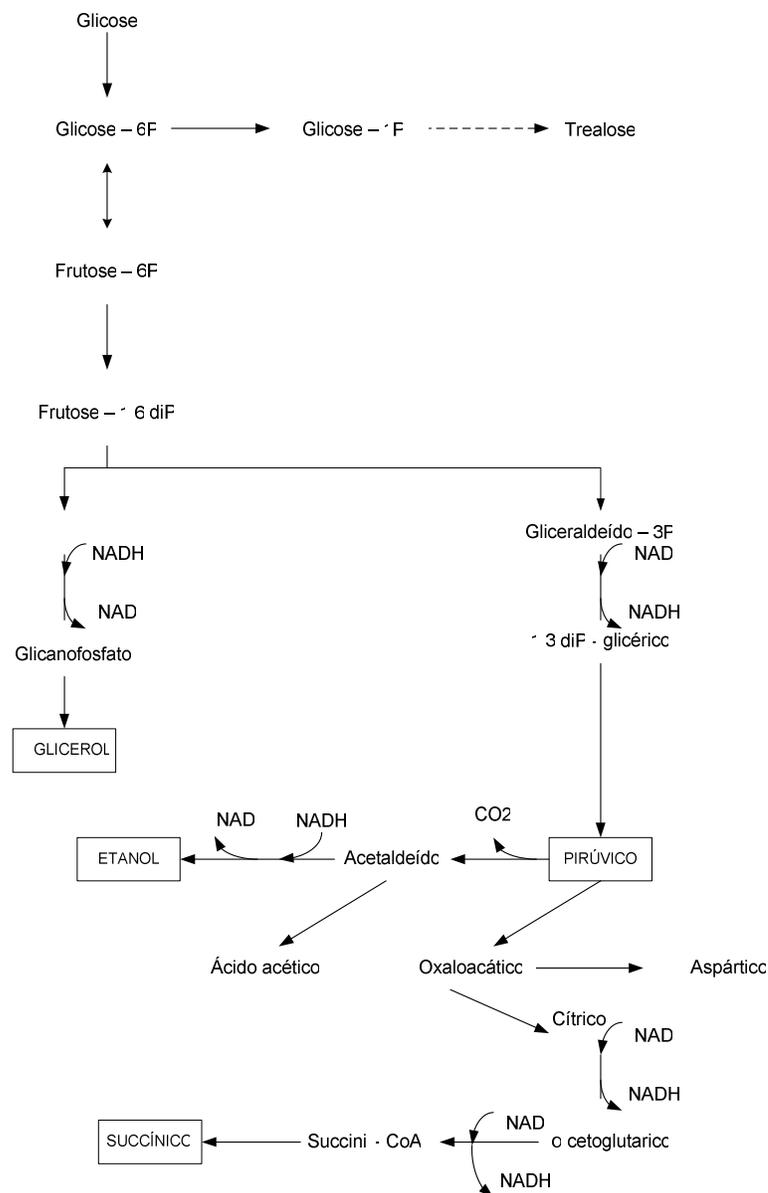


Figura 2.4: Formação do glicerol e de ácidos orgânicos (Lehninger, 1989)

O  $K_{Ac}$  é proposto para quantificar os principais ácidos excretados pela levedura, como os ácidos succínico e acético. O ácido succínico é o segundo produto orgânico secundário mais abundante. Admite-se que sua formação se deve a um meio fermentativo inadequado, entretanto o motivo da excreção deste ácido pela levedura ainda estava sendo estudado (Lehninger, 1989).

Um cálculo mais preciso de eficiência de fermentação por balanço de massa seria possível atualmente em algumas usinas, devido à moderna automação das mesmas. Ainda, existem estudos aprofundados no que se refere à medição de eficiência de fermentação, como a consideração ou não da concentração de álcool intracelular da levedura. Muito se discute quanto a determinação de uma medição correta da eficiência de fermentação e conseqüente melhora do controle do processo.

Segundo Borzani (2006), há uma correlação entre a concentração de biomassa inicial e a eficiência de fermentação. Estudos realizados demonstram que se contabilizarmos apenas o álcool extracelular presente no vinho no cálculo da eficiência de fermentação, a eficiência decresce linearmente com o aumento da concentração da biomassa inicial. Entretanto, quando o etanol intracelular é também considerado como etanol produzido, a eficiência de fermentação passa a não ser mais afetada pela concentração de biomassa.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Ensaio de Fermentação**

Os testes fermentativos, tanto em escala industrial quanto em escala piloto, foram realizados numa unidade industrial no período de 24/04/07 a 06/12/07, correspondente a Safra 07/08.

##### **3.1.1. Escala Industrial**

O sistema de fermentação da unidade (usina São José – Zilor) é composto por 15 dornas de 400 m<sup>3</sup> e 4 pré-fermentadores de 60 m<sup>3</sup>, configuração típica de usinas deste porte. O processo de fermentação realizado é do tipo “batelada”, com reutilização de fermento (Melle-Boinot). O sistema de filtração do vinho é composto por filtros tipo cesto. Já o sistema de centrifugação é composto por 6 centrífugas industriais, sendo quatro com vazão de 80 m<sup>3</sup>/h e duas com vazão de 90 m<sup>3</sup>/h. O resfriamento do mosto é realizado por dois conjuntos de trocadores de calor de placas, sendo o primeiro composto por 4 trocadores e o segundo composto por 3 trocadores que utilizam água da torre de resfriamento para troca térmica.

As dornas de fermentação possuem sistemas de resfriamento tipo serpentinas e trocadores de calor de placa.

Um sistema de automação monitora e controla as condições de fermentação. São monitorados parâmetros como temperatura, volume e vazão de alimentação de mosto. A Figura 3.1 que segue ilustra o sistema de fermentação em escala industrial utilizado no presente trabalho.

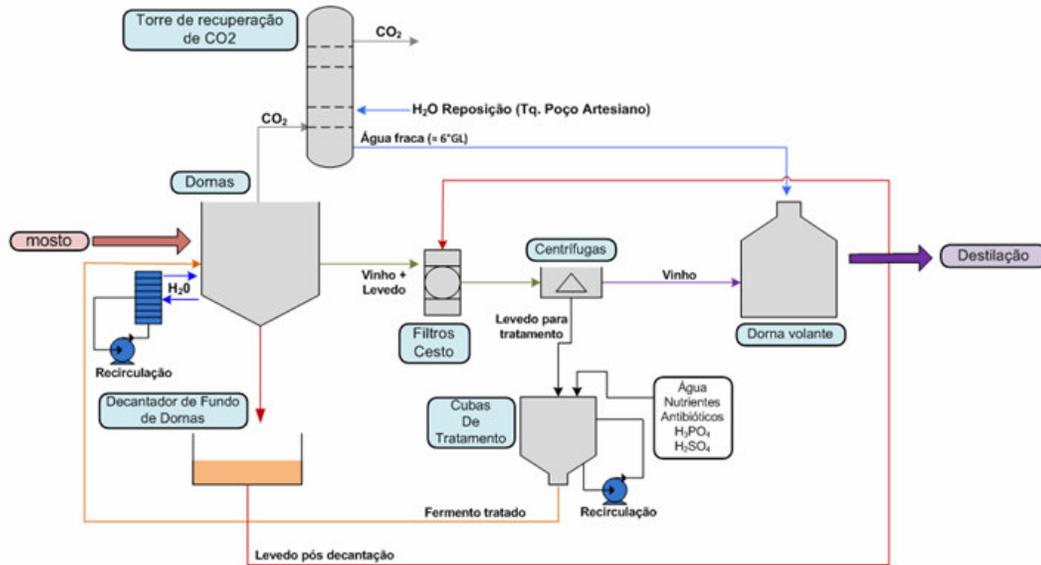


Figura 3.1: Ilustração do sistema de fermentação em escala industrial.

### 3.1.2. Escala Piloto

No presente trabalho foi também utilizado um sistema de fermentação em escala piloto com dorna de volume total de 40 L e volume útil de 36 L, que corresponde a uma escala 10.000 vezes menor que a industrial. A dorna piloto possui sistema de medida e monitoramento de pH e sistemas de controle de temperatura, vazão de alimentação de mosto e de nível. A Figura 3.2 ilustra o sistema experimental utilizado nos cultivos em escala piloto.

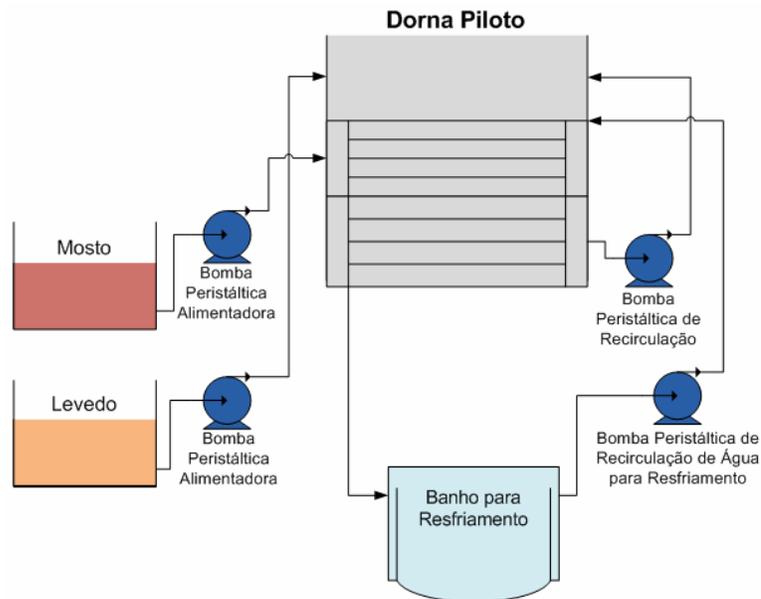


Figura 3.2: Ilustração do sistema experimental em escala piloto.

### 3.1.3. Metodologia Experimental

Foram realizados cinco cultivos em escala industrial e cinco cultivos em escala piloto sob diferentes condições de alimentação de mosto. O mosto foi alimentado com vazão (F) variando linearmente com o tempo, de acordo com a equação que segue:

$$F = F_0 + k t \quad (3.1)$$

onde  $F_0$  é a vazão inicial e  $k$  é a constante definida como o coeficiente angular da reta.

Os inóculos apresentaram volumes em torno de 1/3 do volume final, sendo os mesmos preparados variando a concentração de levedo entre 7 e 11% v/v e tendo pH entre 2,2 e 2,8, visando combater a infecção do processo. O controle de temperatura da dorna manteve a mesma em valores inferiores a 35°C, com “set-point” de 32°C.

Os cultivos tiveram início com a alimentação do mosto (fase semicontínua) até o enchimento da dorna, finalizando o processo com uma etapa em batelada até o completo consumo dos açúcares fermentescíveis.

Ao longo dos ensaios foram obtidas informações relativas à concentração celular (em % v/v e em % m/m), concentração de ART no caldo e no mosto de alimentação (em % m/m), teor de etanol (em °GL) e vazão de alimentação F (em m<sup>3</sup>/h ou L/h). A Tabela 3.1 apresenta as condições de alimentação dos cultivos realizados em planta piloto e em planta industrial. Os resultados obtidos nos cultivos em escala industrial foram utilizados para avaliação da metodologia de cálculo da eficiência da fermentação em etanol ( $\eta_p$ ). Os resultados obtidos nos cultivos em escala piloto foram utilizados na avaliação da modelagem cinética proposta.

Tabela 3.1: Condições de alimentação empregadas nos cultivos

Ensaio	Planta	$F_0^*$ (L/h ou m <sup>3</sup> /h)	$k^*$ (L/h <sup>2</sup> ou m <sup>3</sup> /h <sup>2</sup> )
I-40-60	Industrial	40	4
I-45-55	Industrial	45	2,22
I-50-50	Industrial	50	0
I-55-45	Industrial	55	-2,22
I-60-40	Industrial	60	-4,44
P-5-5A	Piloto	5	0,02
P-5-5B	Piloto	5	0,02
P-7.5-7.5A	Piloto	7,5	0,08
P-7.5-7.5B	Piloto	7,5	0,08
P-15-15	Piloto	15	0,3

\*escala piloto ( $F_0$  em L/h e  $k$  em L/h<sup>2</sup>) e escala industrial ( $F_0$  em m<sup>3</sup>/h e  $k$  em m<sup>3</sup>/h<sup>2</sup>)

## **3.2. Metodologia Analítica**

### **3.2.1. Medida de pH**

Os valores de pH das amostras foram medidos com o auxílio de um pHmetro da marca Mettler Toledo, modelo MP220.

### **3.2.2. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores Totais (ART)**

A concentração de açúcares redutores totais (ART) foi determinada pelo método de Lane e Eynin (1934) após hidrólise da sacarose com HCl 0,75 N a 65°C por 40 minutos.

### **3.2.3. Determinação da Concentração Celular (Cx)**

Durante os cultivos, a concentração celular foi determinada como porcentagem em base mássica,  $Cx_m$  (% m/m), e em base volumétrica,  $Cx_v$  (% v/v). Na determinação de  $Cx_m$  (% m/m) foi utilizado o método direto proposto por Singh et al. (1994). Alíquotas do vinho ou do creme de massas conhecidas foram centrifugadas a 1600·g a 5°C por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em água destilada e centrifugado novamente. O sedimento final foi transferido para recipiente previamente seco e tarado e a massa seca foi obtida após a secagem em estufa a 105°C por 16 horas, posteriormente resfriada em dessecador e pesada até massa constante. A determinação foi feita em triplicata e a concentração celular expressa em % m/m.

### **3.2.4. Determinação da Acidez Total**

A acidez sulfúrica nas amostras de levedo, vinho bruto e mosto expressa em g  $H_2SO_4/L$  foi determinada com base na metodologia descrita por Zago et al. (1996). Centrifugava-se uma dada quantidade de amostra. Do sobrenadante pipetava-se 20 mL, colocava-se em Erlenmeyer e adicionava-se 50 mL de água desmineralizada, colocava-se em ebulição em chapa aquecedora por 5 minutos. Esfriava-se e titulava-se em pHmetro até pH 8,5 com solução de NaOH 0,1N padronizada.

### 3.2.5. Determinação da Concentração de Etanol

A concentração de álcool etílico presente nas amostras de creme de levedura e de vinhos foi avaliada através da medida de densidade e expressa em °GL, ou seja, % v/v de etanol a 20°C, após destilação prévia de 25mL da amostra no microdestilador Kjeldhal adaptado para álcool. A densidade do destilado foi medida utilizando-se densímetro Paar, modelo dma 45 e a concentração em °GL foi obtida através de tabela de para conversão de densidade em grau alcoólico.

### 3.2.6. Determinação da Concentração de Glicerol

O teor de glicerol produzido no processo de fermentação pelas leveduras foi quantificado com base no método Copersucar.

A metodologia consiste no preparo da amostra, previamente filtrada em algodão, com solução de ácido tricloroacético 1% m/v, em balão volumétrico de 100 mL. Da amostra preparada, homogeneizou-se e centrifugou-se 20 mL para o preparo de outra mistura entre o sobrenadante e a solução tampão. Preparou-se tubo de ensaios onde se adicionou solução oxidante numa medida de 5:1. Aqueceram-se os tubos de ensaio à 56°C em banho maria por 2 minutos, adicionaram-se reagentes de cor e esperou-se mais 10 minutos para o desenvolvimento da cor. Resfriaram-se os tubos e mediu-se a absorbância da solução à 410 nm em cubeta de 10 mm, no espectrofotômetro HACH, modelo DR2500.

### 3.2.7. Análise Viabilidade Celular

A análise de viabilidade tem como objetivo determinar, nas diversas etapas do processo de fermentação alcoólica, a quantidade de células de leveduras vivas por volume das soluções testadas, bem como a porcentagem de células viáveis em brotamento e também a quantidade de células de bactérias (bastonetes) por volume, avaliando a razão entre leveduras e bactérias do meio (Razão de Infecção).

A determinação da viabilidade celular de *S. cerevisiae* foi realizada com base na metodologia de Oliveira et al. (1996), utilizando como corante solução de azul de metileno/citrato de sódio. As amostras foram analisadas em câmara de Neubauer através de microscópio óptico Nikon eclipse, modelo E-200 e o resultado expresso em % de células vivas.

### 3.3. Determinação dos Coeficientes de Rendimento

Nesse item é apresentada a seqüência de equações para cálculo do coeficiente de rendimento de substrato (ART) a produto principal, qual seja, etanol ( $Y_{P/S}$ ) e coeficientes de rendimento de substrato (ART) a produtos secundários ou subprodutos, como dióxido de carbono ( $Y_{CO_2/S}$ ), células ( $Y_{X/S}$ ), glicerol ( $Y_{G/S}$ ) e acidez ( $Y_{AC/S}$ ). Todos os coeficientes de rendimento foram calculados com base nos balanços materiais, sendo imprescindíveis informações fidedignas acerca de diversas variáveis de processo como concentrações das espécies envolvidas nos balanços, bem como das vazões de alimentação e dos volumes iniciais e finais dos cultivos.

#### 3.3.1. Cálculos do Coeficiente do Rendimento de Substrato a Etanol ( $Y_{P/S}$ ) e da Eficiência da Fermentação ( $\eta_P$ )

Em virtude do alto grau de automação da planta industrial da Usina São José, foi proposta uma metodologia de cálculo da eficiência da fermentação em etanol ( $\eta_P$ ) com base nos balanços materiais. A eficiência em etanol ( $\eta_P$ ) é dada pela equação 3.2.

$$\eta_P = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \cdot 100 (\%) \quad (3.2)$$

Sabendo-se que o coeficiente de rendimento de substrato (ART) a produto (etanol) é dado por:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{quantidade gerada de etanol}}{\text{quantidade consumida de ART}} = \frac{\text{EtOH}_{\text{gerado}}}{\text{ART}_{\text{consumido}}} \quad (3.3)$$

Realizando o balanço de massa para o etanol, tem-se que:

$$\text{EtOH}_{\text{gerado}} = \text{massa}_{\text{EtOH-final}} - \text{massa}_{\text{EtOH-inicial}} \quad (3.4)$$

$$\text{EtOH}_{\text{gerado}} = (\text{°GL}_F \cdot V_{FA} - \text{°GL}_I \cdot V_{IA}) \cdot \frac{\rho_{\text{EtOH}}}{100} \quad (3.5)$$

onde:

$\text{EtOH}_{\text{gerado}}$  : quantidade de etanol gerada no processo (kg)

$\text{°GL}_F$  :  $\text{°GL}$  final ou no vinho (% v/v)

$\text{°GL}_I$  :  $\text{°GL}$  inicial ou no pré-fermentador (“pé de cuba”) (% v/v)

$V_{FA}$  : volume final da fase aquosa ou volume da fase aquosa do vinho ( $\text{m}^3$ )

$V_{IA}$  : volume inicial da fase aquosa ou volume da fase aquosa do “pé de cuba” ( $\text{m}^3$ )

$\rho_{\text{EtOH}}$  : densidade do etanol a  $20^\circ\text{C}$  ( $789,3 \text{ kg/m}^3$ )

Realizando-se o balanço de massa para o ART, tem-se que:

$$\text{ART}_{\text{consumido}} = \text{ART}_{\text{alimentado}} - \text{ART}_{\text{acumulado}} \quad (3.6)$$

$$\text{ART}_{\text{acumulado}} = \frac{(\text{ART}_F \cdot V_{FA} \cdot \rho_{FA} - \text{ART}_I \cdot V_{IA} \cdot \rho_{FI})}{100} \quad (3.7)$$

onde:

$\text{ART}_{\text{acumulado}}$  : quantidade de ART acumulada na dorna durante o processo (kg)

$\text{ART}_F$  : concentração de ART final ou concentração de açúcares residuais totais (ARRT) no vinho fermentado (% m/m)

$\text{ART}_I$  : ART inicial ou concentração de açúcares residuais totais (ART) no inóculo (“pé de cuba”) (% m/m)

$\rho_{FA}$  : densidade da fase aquosa final - vinho delevado (função do °GL do vinho)

$\rho_{FI}$  : densidade da fase aquosa inicial (função do °GL do vinho)

As concentrações das substâncias solúveis presentes no vinho, como o etanol, os açúcares (ART), o glicerol e os ácidos, entre outras, são quantificadas na fase aquosa do caldo. O sobrenadante ou volume da fase aquosa compreende a parcela volumétrica do caldo isenta de células. Logo a massa desses componentes devem ser calculadas pelos produtos das concentrações dessas substâncias pelos volumes das fases aquosas do caldo no início ( $V_{IA}$ ) e no final ( $V_{FA}$ ) dos cultivos, que se relacionam com os volumes totais inicial ( $V_I$ ) e final ( $V_F$ ), pelas equações que seguem, de acordo com metodologia proposta por BORZANI (2006) que calcula os volumes das fases aquosas em função das concentrações celulares:

$$V_{IA} = V_I \cdot \left( 1 - \frac{C_{X_{bs-I}} \cdot \rho_c}{\sigma \cdot \rho_x} \cdot \frac{1}{100} \right) \quad (3.8)$$

$$V_{FA} = V_F \cdot \left( 1 - \frac{C_{X_{bs-F}} \cdot \rho_v}{\sigma \cdot \rho_x} \cdot \frac{1}{100} \right) \quad (3.9)$$

onde:

$C_{X_{bs-I}}$  :  $C_{X_{bs}}$  inicial ou  $C_{X_{bs}}$  no “pé de cuba” (% m/m)

$C_{X_{bs-F}}$  :  $C_{X_{bs}}$  no vinho final (% m/m)

$\sigma$  : conteúdo de massa seca na biomassa (0,30 kg<sub>ms</sub>/kg)

$\rho_x$  : densidade celular (1100 kg/m<sup>3</sup>)

$\rho_c$  : densidade do creme ou do “pé de cuba” (função do °GL)

$\rho_v$  : densidade do vinho final (função do °GL do vinho)

A quantidade de ART alimentada ( $ART_{\text{alimentado}}$ ) é proveniente da alimentação do mosto, sendo que este é alimentado com vazão variável ( $F=F_0+k t$ ). No caso da planta piloto, a composição de mosto e, portanto, a concentração de ART é fixa em virtude da quantidade alimentada se tratar de uma quantidade fixa de mel diluído. No entanto, durante a alimentação da dorna industrial ocorre uma flutuação na concentração de ART na alimentação, em virtude do mosto alimentado ser composto pela mistura contínua de meloço com água ou caldo ao longo dos cultivos. Sendo a quantidade de ART alimentada (em kg) função da vazão volumétrica de alimentação ( $F$ ) e do teor de ART (% m/m) do mosto, logo deve-se ter um perfil da concentração de ART no mosto em função do tempo de alimentação da dorna, para o cálculo mais preciso possível da quantidade de ART alimentada, da quantidade de  $ART_{\text{consumido}}$  (equação 3.6) e, por fim, da eficiência da fermentação.

No caso da planta piloto, sabendo-se que:

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (3.10)$$

e

$$F = F_0 + k t \quad (3.11)$$

Logo a quantidade de ART alimentado durante o cultivo ( $ART_{\text{alimentado}}$ ) na planta piloto é dada por:

$$ART_{\text{alimentado}} = (F_0 \cdot t_{\text{alim}} + \frac{k}{2} \cdot t_{\text{alim}}^2) \cdot ART_M \cdot \frac{\rho_M}{100} \quad (\text{piloto}) \quad (3.12)$$

onde:

$ART_{\text{alimentado}}$  : quantidade de ART alimentada na dorna durante o processo (kg)

$F_0$  : vazão inicial de alimentação (L/h)

$k$  : constante angular da equação de alimentação ( $L/h^2$ )

$t_{\text{alim}}$  : tempo de alimentação da dorna (h)

$ART_M$  : concentração de ART no mosto constante (% m/m)

$\rho_M$  : densidade média do mosto (1,080 kg/L)

No caso da alimentação da dorna industrial, a partir de valores de  $F$  e  $ART_M$  obtidos ao longo do tempo de alimentação, o cálculo de  $ART_{\text{alimentado}}$  é dado por:

$$ART_{\text{alimentado}} = \int_0^{t_{\text{alim}}} F(t) \cdot ART_M(t) \cdot \frac{\rho_M}{100} dt \quad (3.13)$$

onde:

$F(t)$  : vazão de alimentação que varia com o tempo ( $m^3/h$ )

$\rho_M$  : densidade média do mosto ( $1080 \text{ kg/m}^3$ )

$ART_M$  : concentração de ART no mosto variável com o tempo (% m/m)

Durante os ensaios na planta industrial foram coletadas informações de F e  $ART_M$  ao longo da alimentação a partir do sistema supervisório e o valor de  $ART_{alimentado}$  pode ser obtido graficamente como a área (A) abaixo da curva de  $F \cdot ART_M \cdot \rho_M / 100$  vs t.

Portanto, os coeficientes de rendimento de substrato em etanol ( $Y_{P/S}$ ), bem como as eficiências das fermentações em etanol ( $\eta_P$ ) podem ser calculados pelas equações que seguem:

Planta Piloto:

$$Y_{P/S} = \frac{(\text{°GL}_F \cdot V_{FA} - \text{°GL}_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_{EtOH}}{(F_0 \cdot t_{alim} + \frac{k}{2} \cdot t_{alim}^2) \cdot ART_M \cdot \rho_M - (ART_F \cdot V_{FA} - ART_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c} \quad (3.14)$$

e

$$\eta_P = \frac{(\text{°GL}_F \cdot V_{FA} - \text{°GL}_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_{EtOH}}{(F_0 \cdot t_{alim} + \frac{k}{2} \cdot t_{alim}^2) \cdot ART_M \cdot \rho_M - (ART_F \cdot V_{FA} - ART_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c} \cdot \frac{100}{0,511} (\%) \quad (3.15)$$

Planta Industrial:

$$Y_{P/S} = \frac{(\text{°GL}_F \cdot V_{FA} - \text{°GL}_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_{EtOH}}{\int_0^{t_{alim}} F(t) \cdot ART_M(t) \cdot \rho_M dt - (ART_F \cdot V_{FA} - ART_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c} \quad (3.16)$$

e

$$\eta_P = \frac{(\text{°GL}_F \cdot V_{FA} - \text{°GL}_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_{EtOH}}{\int_0^{t_{alim}} F(t) \cdot ART_M(t) \cdot \rho_M dt - (ART_F \cdot V_{FA} - ART_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c} \cdot \frac{100}{0,511} (\%) \quad (3.17)$$

### 3.3.2. Cálculo do Coeficiente do Rendimento de Substrato a CO2 ( $Y_{CO2/S}$ )

Em virtude do dióxido de carbono ( $CO_2$ ) ser produzido simultaneamente e na mesma proporção estequiométrica que o etanol ( $C_2H_5OH$ ), a partir do consumo dos açúcares redutores glicose e frutose ( $C_6H_{12}O_6$ ), o coeficiente de rendimento de substrato (ART) a  $CO_2$  ( $Y_{CO2/S}$ ) é calculado pela equação que segue:

$$Y_{CO2/S} = \frac{44}{46} \cdot Y_{P/S} \quad (3.18)$$

### 3.3.3. Cálculo do Coeficiente do Rendimento de Substrato a Células ( $Y_{X/S}$ )

Da mesma forma que o etanol (P), as células (X) também são geradas durante o processo fermentativo. Logo, o cálculo de  $Y_{X/S}$  segue um equacionamento similar que o cálculo de  $Y_{P/S}$ , sendo  $Y_{X/S}$  calculado da forma que segue:

Planta Piloto:

$$Y_{X/S} = \frac{(C_{X_{bs-F}} \cdot V_F - C_{X_{bs-I}} \cdot V_I) \cdot \rho_c}{(F_0 \cdot t_{alim} + \frac{k}{2} \cdot t_{alim}^2) \cdot ART_M \cdot \rho_M - (ART_F \cdot V_{FA} - ART_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c} \quad (3.19)$$

Planta Industrial:

$$Y_{X/S} = \frac{(C_{X_{bs-F}} \cdot V_F - C_{X_{bs-I}} \cdot V_I) \cdot \rho_c}{\int_0^{t_{alim}} F(t) \cdot ART_M(t) \cdot \rho_M dt - (ART_F \cdot V_{FA} - ART_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c} \quad (3.20)$$

### 3.3.4. Cálculo do Coeficiente do Rendimento de Substrato a Glicerol ( $Y_{G/S}$ )

De forma similar às determinações de  $Y_{P/S}$  e  $Y_{X/S}$ , obtém-se coeficiente do rendimento de substrato a glicerol ( $Y_{G/S}$ ) da forma que segue:

Planta Piloto:

$$Y_{G/S} = \frac{(C_{G-F} \cdot V_{FA} - C_{G-I} \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c}{(F_0 \cdot t_{alim} + \frac{k}{2} \cdot t_{alim}^2) \cdot ART_M \cdot \rho_M - (ART_F \cdot V_{FA} - ART_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c} \quad (3.21)$$

Planta Industrial:

$$Y_{G/S} = \frac{(C_{G-F} \cdot V_{FA} - C_{G-I} \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c}{\int_0^{t_{alim}} F(t) \cdot ART_M(t) \cdot \rho_M dt - (ART_F \cdot V_{FA} - ART_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c} \quad (3.22)$$

onde:

$C_{G-F}$  : concentração de glicerol no vinho final (% m/m)

$C_{G-I}$  : concentração de glicerol inicial ou no “pé de cuba” (% m/m)

### 3.3.5. Cálculo do Coeficiente do Rendimento de Substrato a Acidez ( $Y_{AC/S}$ )

Em virtude de parte dos açúcares do mosto serem consumidos pelas leveduras ou por bactérias contaminantes presentes na dorna, havendo produção de ácidos, esse conteúdo é quantificado como “acidez total” em g/L ou kg/m<sup>3</sup>. Logo, pode-se determinar

coeficiente do rendimento de substrato a acidez ( $Y_{AC/S}$ ) nas escalas piloto e industrial pelas equações que seguem:

Planta Piloto:

$$Y_{AC/S} = \frac{Ac_F \cdot V_{FA} - Ac_I \cdot V_{IA} - Ac_M \cdot (F_0 \cdot t_{alim} + k \cdot t_{alim}^2)}{(F_0 \cdot t_{alim} + \frac{k}{2} \cdot t_{alim}^2) \cdot ART_M \cdot \rho_M - (ART_F \cdot V_{FA} - ART_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c} \quad (3.23)$$

Planta Industrial:

$$Y_{AC/S} = \frac{Ac_F \cdot V_{FA} - Ac_I \cdot V_{IA} - Ac_M \cdot (F_0 \cdot t_{alim} + k \cdot t_{alim}^2)}{\int_0^{t_{alim}} F(t) \cdot ART_M(t) \cdot \rho_M dt - (ART_F \cdot V_{FA} - ART_I \cdot V_{IA}) \cdot \rho_c} \quad (3.24)$$

onde:

$Ac_F$  : acidez no vinho final (g/L ou kg/m<sup>3</sup>)

$Ac_I$  : acidez inicial ou no “pé de cuba” (g/L ou kg/m<sup>3</sup>)

$Ac_M$  : acidez do mosto (g/L ou kg/m<sup>3</sup>)

Com base nas equações é possível obter valores precisos da eficiência da fermentação e dos coeficientes de rendimento nas escalas piloto e industrial, sendo que a precisão dos cálculos depende da precisão dos valores obtidos de concentrações pelas metodologias analíticas utilizadas, bem como dos valores de vazão volumétrica (F) obtidos pelo sistema supervisório.

Embora todo o equacionamento relacionado ao cálculo da eficiência da fermentação tenha sido desenvolvido para as escalas piloto e industrial, em virtude não quantificação de alguns subprodutos nos ensaios em planta piloto, tal metodologia foi somente avaliada utilizando os resultados dos ensaios em escala industrial.

### 3.4. Modelagem Matemática do Processo Fermentativo

O processo industrial para a produção de etanol utilizado na unidade industrial é o clássico em “batelada”. Na verdade, este processo é dividido em duas etapas. Na primeira etapa, o cultivo é operado em “batelada alimentada”. Parte-se de um inóculo (“pé de cuba”) que ocupa um volume de cerca de 1/3 do volume total, sendo o mosto alimentado à vazão constante ou linear com o tempo até o enchimento da dorna. Após o enchimento da dorna, inicia-se a segunda etapa em batelada até o consumo total dos açúcares fermentescíveis. Os modelos encontrados na literatura explicam com relativa precisão o comportamento da fermentação alcoólica (crescimento celular, consumo de substrato e geração de produto) na

etapa final em batelada. No entanto, na etapa inicial do processo (fase semicontínua ou em batelada alimentada), os modelos encontrados na literatura não se ajustam adequadamente aos resultados experimentais, em virtude de haver no início da alimentação um rápido consumo de substrato com conseqüente produção de etanol sem, no entanto, se observar crescimento celular, que só se inicia após um dado período de alimentação de mosto. Ou seja, é como se as células apresentassem dois comportamentos cinéticos de crescimento distintos ao longo do processo fermentativo. No sentido de explicar esse comportamento celular observado no processo industrial, é proposta a seguinte modelagem cinética para o processo de fermentação alcoólica.

### Etapa de tratamento da levedura

No processo “Melle-Boinot”, após o final de cada “batelada”, as leveduras são recuperadas do vinho fermentado e recicladas ao processo para novas “bateladas” após tratamento. Durante a etapa de tratamento das leveduras, na presença de oxigênio, as células provenientes da etapa de centrifugação da batelada anterior, ditas do tipo 2 ( $X_2$ ) transformam-se em células do tipo 1 ( $X_1$ ), que não crescem devido à ausência de substrato. As células do tipo 1 que formam o inóculo ou “pé de cuba” permanecem, por um longo período durante a etapa de tratamento na ausência de substrato (ART), em “estado de fome” (“*starvation state*”), modificando seu estado fisiológico. A equação (1) representa a transformação de  $X_2$  em  $X_1$ :



onde:

$X_1$  : células famélicas ou “estado de fome”;

$X_2$  : células oriundas da centrifugação do vinho fermentado que consomem açúcar, crescem e produzem etanol.

### Etapa de produção de etanol em batelada alimentada

Quando se inicia a alimentação de mosto à dorna na etapa inicial em batelada alimentada, agora na presença de substrato, inicia-se novamente a transformação das células do tipo 1 ( $X_1$ ) em células do tipo 2 ( $X_2$ ), segundo estequiometria apresentada pela equação (3.26).



O que se observa no início desta etapa é um rápido consumo de substrato com simultânea produção de etanol sem, no entanto, se observar crescimento celular. Logo, a hipótese considerada é que as células do tipo 1 consomem substrato rapidamente para gerar energia (ATP) e, por decorrência do metabolismo de oxidação das hexoses na glicólise, produzem etanol. No entanto, a energia produzida (ATP) nesse processo não é utilizada para o crescimento celular. Ela é utilizada exclusivamente na reestruturação do maquinário celular ou numa nova mudança fisiológica, considerada no modelo como uma transformação das células do tipo 1 em células do tipo 2, que voltam a ter a capacidade de crescer e produzir etanol, simultaneamente à medida que consomem o substrato.

A velocidade de transformação das células do tipo 1 em células do tipo 2,  $r_{t_{X2}}$ , é representada pela equação (3.27).

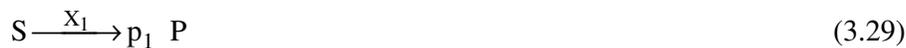
$$r_{t_{X2}} = \frac{k_1 \cdot C_{X1}}{k_2 + C_{X1}} = -r_{t_{X1}} \quad (3.27)$$

Na etapa de produção, pode ocorrer morte celular, representada pela equação (3.28).



onde  $X_{2NV}$  representa células do tipo 2 não viáveis.

A estequiometria e a cinética de produção de etanol relacionadas com as células do tipo 1 estão representadas pelas equações (3.29) e (3.30) e com as células do tipo 2, pelas equações (3.31) e (3.32).



$$\frac{r_{P1}}{p_1} = -r_S = k_p \cdot C_{X1} \quad (3.30)$$



$$\frac{r_{P2}}{p_2} = \frac{r_{X2}}{y_1} \rightarrow r_{P2} = \frac{p_2}{y_1} \cdot r_{X2} \rightarrow r_{P2} = Y_{P/X2} \cdot r_{X2} \quad (3.32)$$

De acordo com o modelo proposto, diferentemente das células do tipo 1 ( $X_1$ ), as células do tipo 2 ( $X_2$ ) têm capacidade de crescer, logo consomem o substrato convertendo-o em etanol (P) e em mais células do tipo 2 ( $X_2$ ) de acordo com a equação 3.31.

A velocidade de crescimento das células do tipo 2 ( $X_2$ ) é dada pela equação 3.33

$$r_{X2} = \mu \cdot C_{X2} \quad (3.33)$$

Considerando que a inibição do etanol no crescimento celular das células do tipo 2 segue o modelo de Levenspiel (1976), tem-se que:

$$r_{X2} = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_{P^*}}\right)^n \cdot C_{X2} \quad (3.34)$$

Após apresentação das hipóteses do modelo reacional e das equações de reação, segue a apresentação dos sistemas de equações de balanços materiais que compõem a modelagem do processo.

### Etapa em Batelada Alimentada

Balanco de massa para as células:

$$\frac{dC_{X1}}{dt} = -\frac{k_1 \cdot C_{X1}^m}{k_2 + C_{X1}} - \left(k_d + \frac{F}{V}\right) \cdot C_{X1} \quad (3.35)$$

$$\frac{dC_{X2}}{dt} = \frac{k_1 \cdot C_{X1}^m}{k_2 + C_{X1}} + \mu \cdot C_{X2} - \frac{F}{V} \cdot C_{X2} \quad (3.36)$$

Balanco de massa para o etanol:

$$\frac{dC_P}{dt} = p_1 \cdot k_p \cdot C_{X1} + Y_{P/X2} \cdot \mu \cdot C_{X2} - \frac{F}{V} \cdot C_P \quad (3.37)$$

Balanco de massa para o substrato:

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_{Se} - C_S) - k_p \cdot C_{X1} - \frac{\mu \cdot C_{X2}}{Y_{X2/S}} \quad (3.38)$$

Balanco de massa total:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\rho_M}{\rho_c} \cdot (F_0 + k \cdot t) \quad (3.39)$$

### Etapa em Batelada

Balanco de massa para as células:

$$\frac{dC_{X1}}{dt} = -\frac{k_1 \cdot C_{X1}^m}{k_2 + C_{X1}} - k_d \cdot C_{X1} \quad (3.40)$$

$$\frac{dC_{X2}}{dt} = \frac{k_1 \cdot C_{X1}^m}{k_2 + C_{X1}} + \mu \cdot C_{X2} \quad (3.41)$$

Balanço de massa para o etanol:

$$\frac{dC_p}{dt} = p_1 \cdot k_p \cdot C_{X1} + Y_{P/X2} \cdot \mu \cdot C_{X2} \quad (3.42)$$

Balanço de massa para o substrato:

$$\frac{dC_s}{dt} = -k_p \cdot C_{X1} - \frac{\mu \cdot C_{X2}}{Y_{X2/S}} \quad (3.43)$$

No presente trabalho, o modelo apresentado foi ajustado a valores experimentais obtidos nos cultivos nas escalas piloto sob diferentes condições de alimentação da dorna.

As equações do modelo matemático proposto (ou resultantes do balanço de massa) foram integradas utilizando o método de Runge-Kutta-Gill de quarta ordem com passo variável (Press et al., 1992). Os parâmetros do modelo foram estimados empregando o algoritmo proposto por Marquardt (1963).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já citado anteriormente, foram realizados cinco experimentos em dorna industrial e piloto. As concentrações de células, de substrato (ART) e de produto (etanol) obtidas nos cultivos em escalas piloto e industrial em %m/m (piloto) e %v/v (industrial) para células, %m/m para ART e °GL (para etanol) foram convertidas em termos de g/L pelas equações que seguem:

$$C_X(\text{kg}/\text{m}^3) = 10,80 \cdot C_{XM}(\% \text{m}/\text{m}) \quad (4.1)$$

$$C_X(\text{kg}/\text{m}^3) = 3,06 \cdot C_{XV}(\% \text{v}/\text{v}) \quad (4.2)$$

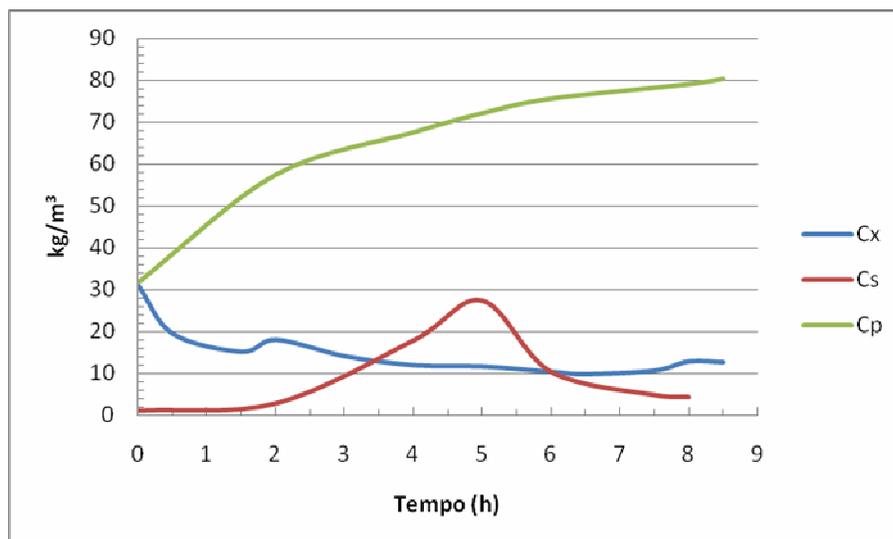
$$C_S(\text{kg}/\text{m}^3) = 10 \cdot \text{ART}(\% \text{m}/\text{m}) \quad (4.3)$$

$$C_P(\text{kg}/\text{m}^3) = 7,893 \cdot \text{°GL}(\% \text{v}/\text{v}) \quad (4.4)$$

Para obtenção das equações 4.2 e 4.3 foi utilizada análise dimensional. A equação 4.2 foi proposta por Borzani (1983) e o valor da constante de proporcionalidade de 3,06 foi obtido por regressão linear de dados de  $C_X$  (g/L) e  $C_{XV}$  (%v/v) obtidos em diferentes cultivos realizados na unidade industrial.

### 4.1. Cultivos em escala industrial

As Figuras 4.1 a 4.5 ilustram os perfis de concentração de células ( $C_X$ ), ART ( $C_S$ ) e etanol ( $C_P$ ) obtidos nos cultivos em escala industrial.



**Figura 4.1:** Perfis de concentração de células ( $C_X$ ), substrato ( $C_S$ ) e de etanol ( $C_P$ ) ao longo do cultivo I-40-60

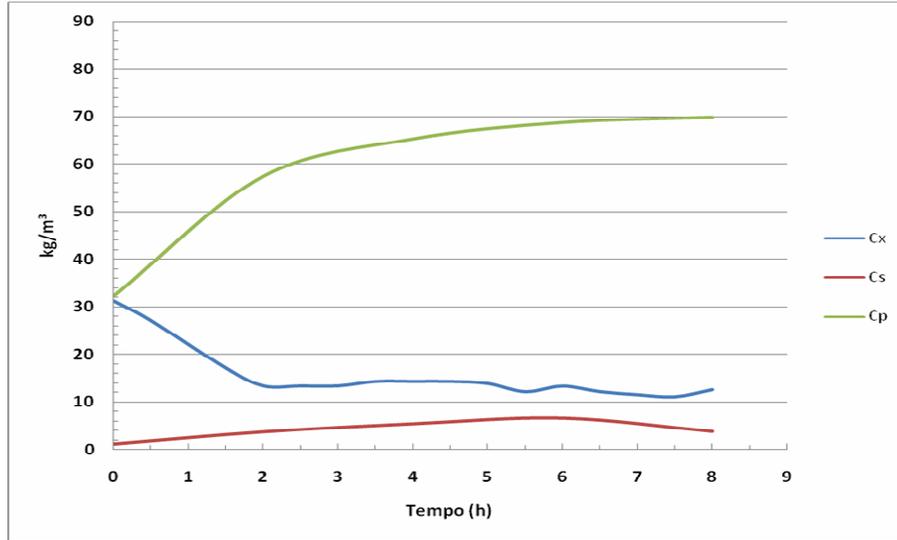


Figura 4.2: Perfis de concentração de células ( $C_X$ ), substrato ( $C_S$ ) e de etanol ( $C_P$ ) ao longo do cultivo I-45-55

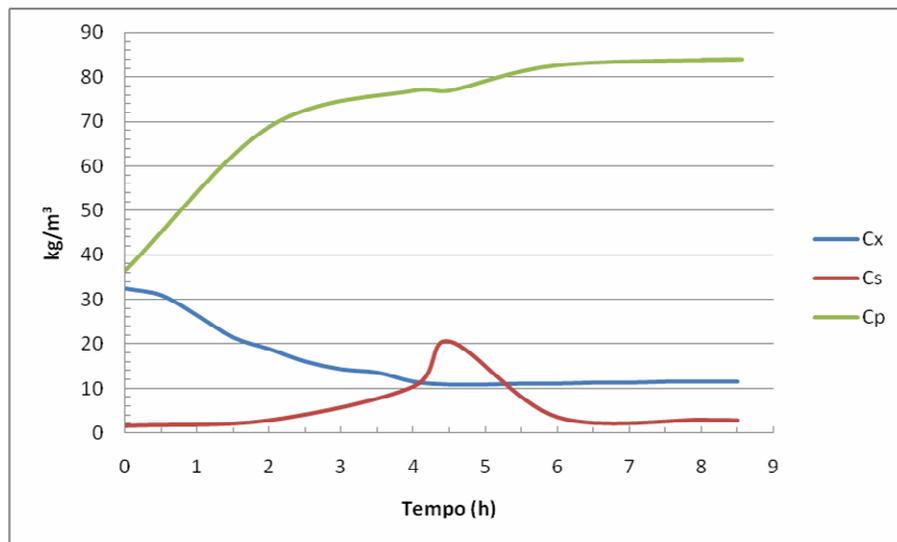
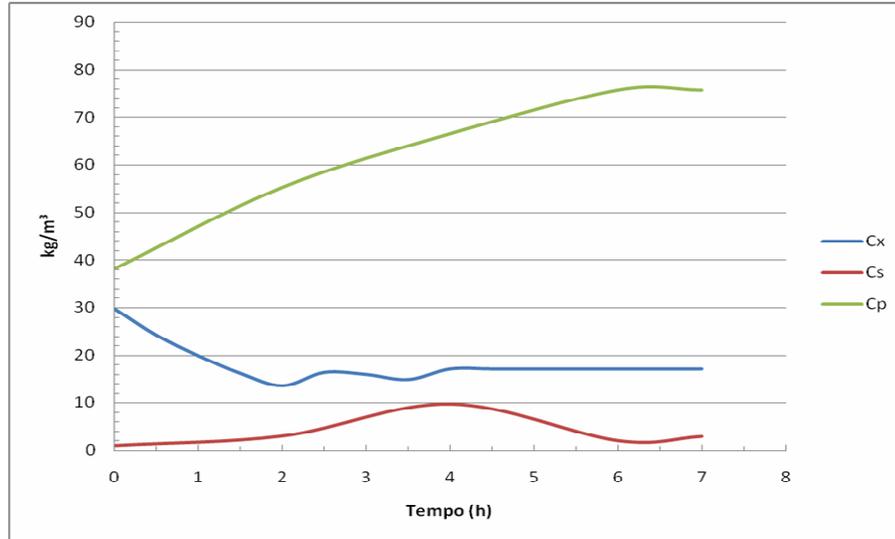
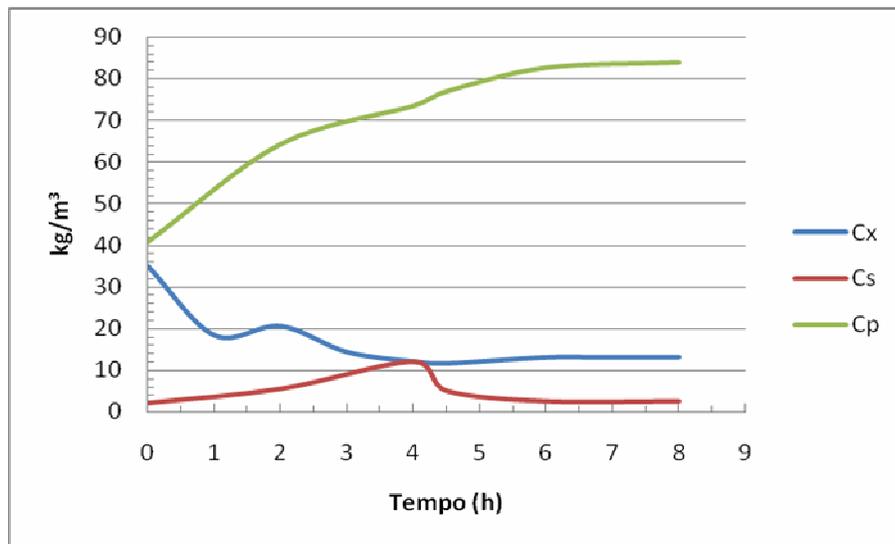


Figura 4.3: Perfis de concentração de células ( $C_X$ ), substrato ( $C_S$ ) e de etanol ( $C_P$ ) ao longo do cultivo I-50-50



**Figura 4.4:** Perfis de concentração de células ( $C_X$ ), substrato ( $C_S$ ) e de etanol ( $C_P$ ) ao longo do cultivo I-55-45



**Figura 4.5:** Perfis de concentração de células ( $C_X$ ), substrato ( $C_S$ ) e de etanol ( $C_P$ ) ao longo do cultivo I-60-40

Pode-se observar que os perfis de concentrações apresentaram comportamentos similares. Ainda, observa-se que os tempos de cultivo não foram proporcionais aos tempos de enchimento (alimentação) das dornas, o que mostra que nessa faixa experimental possa ter ocorrido inibição do crescimento celular por excesso de substrato. Exceto no cultivo I-45-55, observa-se uma redução no rendimento de substrato a célula, que também pode ser explicado pelo excesso de substrato no início da fermentação, causando inibição do crescimento celular. Porém, o tempo total de fermentação é influenciado pela redução da taxa de crescimento

celular, que quanto menor, maior será o tempo de fermentação. A Tabela 4.1 apresenta uma síntese das condições de cultivo e dos principais resultados obtidos nos cultivos em escala industrial sob as diferentes condições experimentais estudadas. Os valores dos coeficientes de rendimento e da eficiência da fermentação foram calculados de acordo com metodologia proposta no item Materiais e Métodos.

**Tabela 4.1:** Condições iniciais, de alimentação e finais e principais parâmetros obtidos nos cultivos em escala industrial.

ENSAIO		I-40-60	I-45-55	I-50-50	I-55-45	I-60-40
Data		5/10/07	15/10/07	6/10/07	14/10/07	6/10/07
Condições Iniciais	$V_0$ (m <sup>3</sup> )	116,00	134,99	120,22	128,66	125,00
	$Cx_0$ (%)	28,69	28,86	30,00	29,55	33,00
	$^{\circ}GL_0$	4,02	4,08	4,64	4,84	5,72
	$Ac_0$ (mg/L)	2,27	2,47	2,55	1,47	2,17
	$Brot_0$ (%)	10,60	9,90	6,10	14,60	9,60
	$Viab_0$ (%)	80,10	75,00	88,80	80,40	83,90
Condições de Alimentação	$ART_{mosto}$ (%)	variável	variável	variável	variável	variável
	$Ac_m$ (g/L)	1,23	1,26	1,07	1,25	1,07
	$F_0$ (m <sup>3</sup> /h)	40	45	50	55	60
	$F_f$ (m <sup>3</sup> /h)	60	55	50	45	40
	$t_{alim}$ (h)	5,0	4,5	4,5	4,5	4,5
	$ART_{alim}$ (kg)	55.956,0	45.165,4	52.389,4	46.808,0	52.654,0
Condições Finais	$V_f$ (m <sup>3</sup> )	369,43	363,10	365,00	363,10	363,00
	$t_f$ (h)	8,5	8,0	8,5	7,0	10,0
	$ARRT_f$ (%)	0,33	0,31	0,20	0,27	0,23
	$Cx_f$ (%)	11,65	12,12	10,60	15,86	12,06
	$^{\circ}GL_f$	10,18	8,86	10,62	9,58	10,76
	$Brot_f$ (%)	10,20	8,40	13,20	15,90	5,10
	$Viab_f$ (%)	85,80	77,20	83,10	78,10	87,70
	$pH_f$	4,80	4,50	4,50	4,80	4,85
	$Gli_f$ (% m/m)	0,48	0,44	0,47	0,44	0,47
	$Ac_f$ (mg/L)	2,40	1,88	1,69	1,62	1,77
Parâmetros do Processo	$\eta_p$ (%)	84,43	85,31	92,14	84,17	88,25
	$Y_{P/S}$ (kgP/kgS)	0,4314	0,4359	0,4708	0,4301	0,4510
	$Y_{X/S}$ (kgX/kgS)	0,0584	0,0375	0,0167	0,1398	0,0160
	Soma	0,94	0,92	0,97	1,01	0,93
	$V_{fliq}$ (m <sup>3</sup> )	329,52	322,29	329,12	309,70	322,41
	$V_{0liq}$ (m <sup>3</sup> )	85,14	98,39	86,34	92,95	86,25
	$Y_{glicerol}$	0,0287	0,0319	0,0298	0,0295	0,0291
	$Y_{ac/s}$ (kgac/kgS)	0,0052	0,0017	0,0014	0,0016	0,0025
	$Y_{ARRT/s}$ (kgARRT/kgS)	0,0151	0,0162	0,0097	0,0132	0,0108

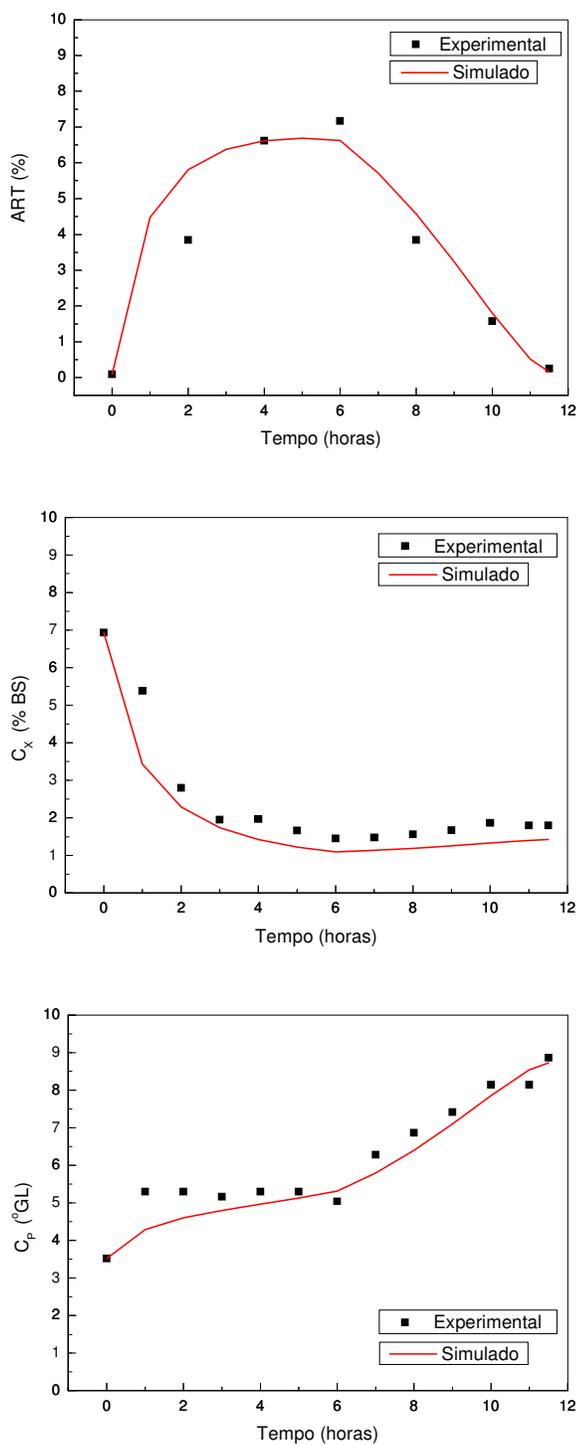
Observa-se que os maiores valores finais de concentração de etanol foram obtidos nos cultivos I-50-50 (10,62°GL) e I-60-40 (10,76°GL), respectivamente. No entanto, é importante observar que o cultivo I-60-40 teve início com uma alta concentração de etanol no “pé de cuba” (5,72°GL), além de apresentar um tempo maior de cultivo (10 h) em relação aos demais.

Nos dados da tabela 4.2 não observamos interferência da viabilidade e brotamento no tempo de fermentação, o que normalmente se espera é um aumento no tempo de fermentação para baixas viabilidades. Já com o brotamento, observa-se um aumento no rendimento de transformação de substrato em célula com o aumento do brotamento, resultado também esperado. A produção de glicerol foi estável e também não observamos influência direta no cálculo do rendimento de transformação de substrato em produto. Já na acidez tivemos variações, porém também não podemos afirmar, baseado nos resultados, a sua influência no resultado final de rendimento.

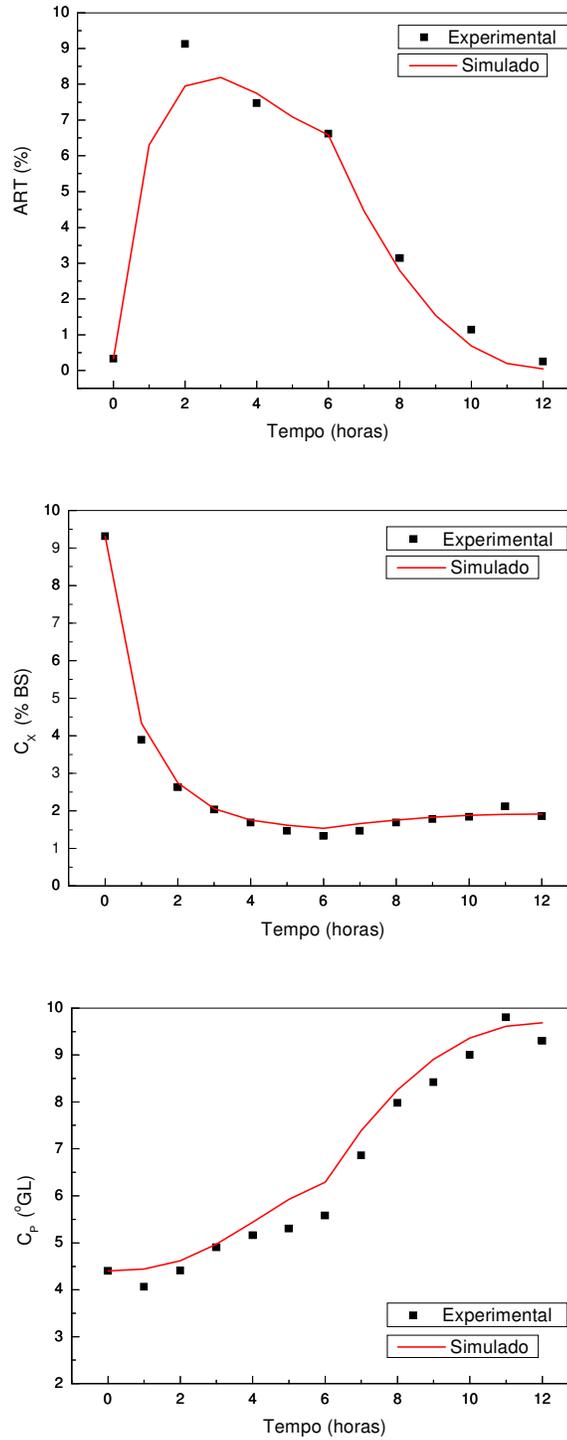
Já no cultivo I-50-50, o rendimento foi o mais elevado em função do baixo  $C_{Xf}$ , que pode ter influência de uma imprecisão desta análise, devido às dificuldades de amostragem e também analítica que já citamos.

## 4.2. Cultivos em escala piloto

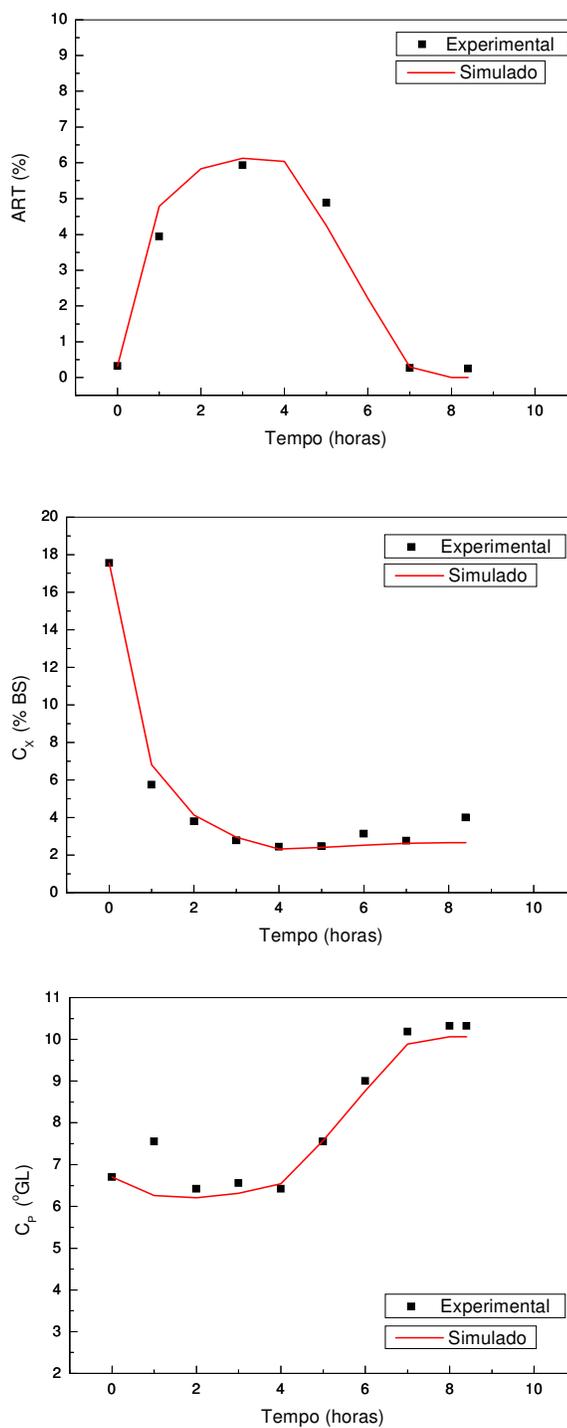
As Figuras 4.6 a 4.10 ilustram os perfis experimentais e simulados de concentração de células ( $C_X$ ), ART ( $C_S$ ) e etanol ( $C_P$ ) obtidos nos cultivos.



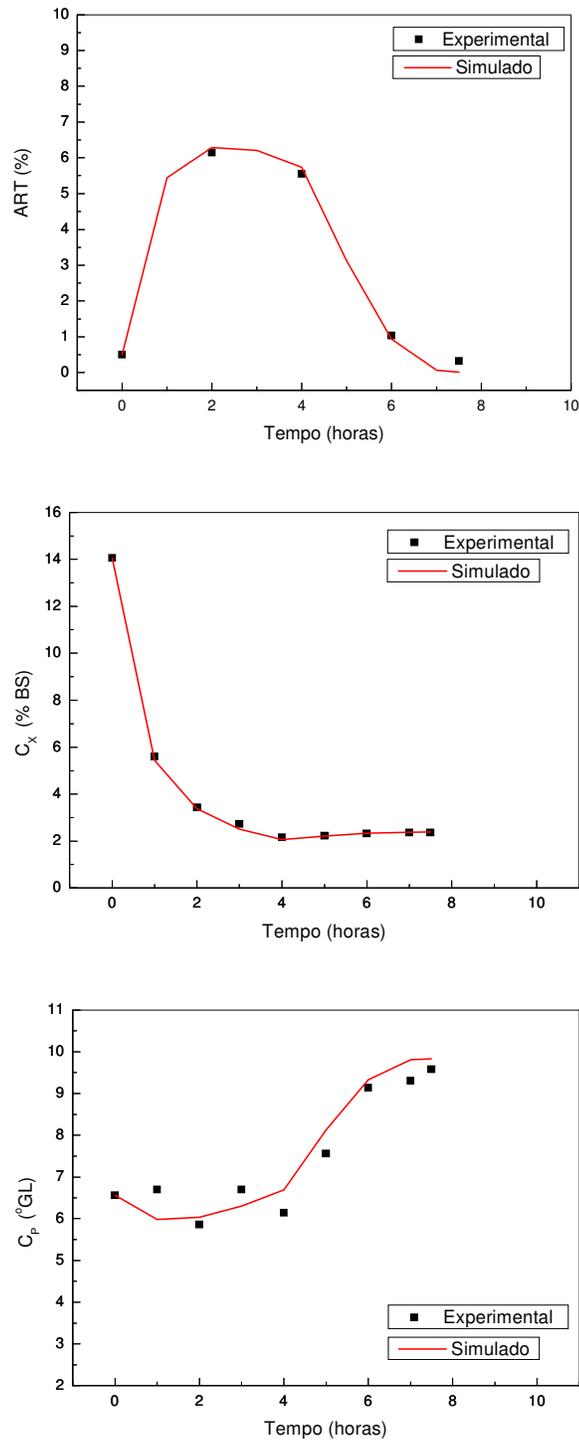
**Figura 4.6:** Valores experimentais e simulados de  $C_s$ ,  $C_x$  e  $C_p$  relativos ao cultivo P-5-5A



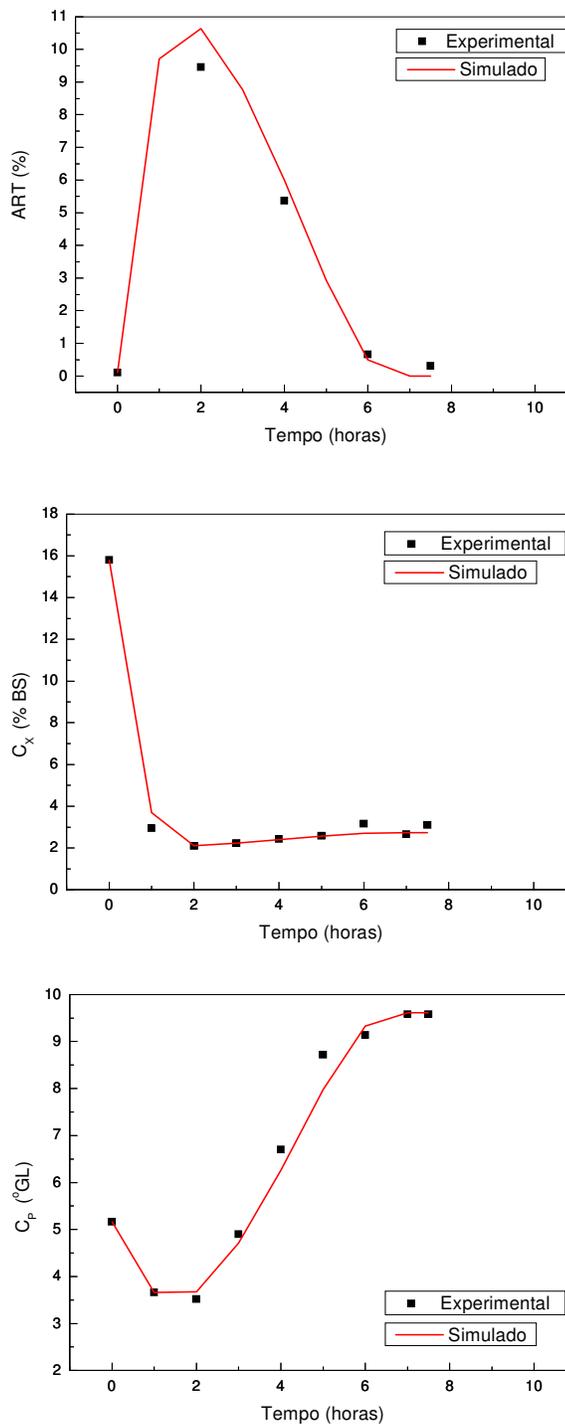
**Figura 4.7:** Valores experimentais e simulados de  $C_s$ ,  $C_x$  e  $C_p$  relativos ao cultivo P-5-5B



**Figura 4.8:** Valores experimentais e simulados de C<sub>s</sub>, C<sub>x</sub> e C<sub>p</sub> relativos ao cultivo P-7.5-7.5A



**Figura 4.9:** Valores experimentais e simulados de Cs, Cx e Cp relativos ao cultivo P-7.5-7.5B



**Figura 4.10:** Valores experimentais e simulados de Cs, Cx e Cp relativos ao cultivo P-15-15

Pode-se observar a partir das Figuras 4.7 a 4.11 que todos os cultivos em escala piloto apresentaram perfis similares de concentrações na faixa experimental de condições de alimentação pesquisadas. Para os perfis de células, observa-se uma boa similaridade entre os resultados experimentais e simulados, resultado da maior quantidade de dados coletados nos experimentos e também pela precisão analítica da massa seca. Nos perfis de concentração de ART, tivemos variações mais significativas, principalmente nas primeiras horas e atribuímos como um dos fatores a homogeneidade do meio, onde ainda temos uma grande quantidade de células em relação ao mosto alimentado. Já nos perfis de concentração de etanol, tivemos maiores variações, com a mesma dificuldade de coleta de amostras homogêneas.

A Tabela 4.2 apresenta uma síntese das condições experimentais e dos principais resultados obtidos nos cultivos realizados em escala piloto. Cabe salientar que os cultivos na escala piloto foram realizados à vazão constante de alimentação de mosto, com ART do mosto constante e que foram analisados nesses cultivos as concentrações de ART, células e etanol, sendo possível, portanto, obter os valores de  $Y_{X/S}$ ,  $Y_{P/S}$  e  $\eta_p$ , de acordo com metodologia proposta no item Materiais e Métodos.

**Tabela 4.2:** Condições experimentais e resultados obtidos nos cultivos em escala piloto.

	ENSAIO	P-5-5A	P-5-5B	P-7.5-7.5A	P-7.5-7.5B	P-15-15
	Data	9/8/07	23/7/07	10/8/07	14/8/07	16/8/07
<b>Condições Iniciais</b>	$V_0$ (L)	4,90	5,30	4,90	4,90	4,70
	$Cx_0$ (%)	6,93	9,31	17,56	14,06	15,80
	$^{\circ}GL_0$	3,38	4,40	6,70	6,56	5,16
<b>Condições de Alimentação</b>	$ART_{mosto}$ (%)	17,38	18,32	17,55	17,31	17,26
	$Ac_m$ (g/L)	1,19	0,97	1,34	1,12	1,22
	$F_0$ (L/h)	5,0	5,1	7,3	7,7	15,0
	$F_f$ (L/h)	4,1	5,2	7,6	7,8	15,6
	$t_{alim}$ (h)	6,0	6,0	4,0	4,0	2,0
	$ART_{alim}$ (kg)	5.405,9	5.896,1	5.629,3	5.589,7	5.536,3
<b>Condições Finais</b>	$V_f$ (L)	33,7	35,1	34,6	34,8	34,4
	$t_f$ (h)	11,5	12,0	8,4	8,0	7,5
	$ARRT_f$ (%)	0,25	0,25	0,25	0,32	0,23
	$Cx_f$ (%)	1,80	1,86	4,01	2,37	3,10
	$^{\circ}GL_f$	8,9	9,3	10,3	9,6	9,60
	$pH_f$	4,1	4,5	4,5	4,3	4,10
<b>Parâmetros do Processo</b>	$h_p$ (%)	80,52	79,46	87,93	83,80	84,56
	$Y_{P/S}$ (kgP/kgS)	0,4115	0,4060	0,4493	0,4282	0,4321
	$Y_{X/S}$ (kgX/kgS)	0,0522	0,0328	0,1108	0,0378	0,0735
	<b>Soma</b>	0,86	0,83	0,99	0,88	0,92
	$V_{ftiq}$ (L)	33,14	34,49	33,31	34,04	33,41
	$V_{0liq}$ (L)	4,59	4,84	4,10	4,26	4,01

De acordo com os dados da tabela 4.2, observamos que, com o aumento do inóculo ( $C_{X0}$ ), houve um decréscimo no tempo de fermentação, que também foi influenciado pela vazão de alimentação do mosto, onde mesmo com vazão elevada, obtivemos o menor tempo de fermentação, com um bom rendimento. Observando-se os valores do rendimento em célula e produto, os valores foram similares nos pares de testes P-5-5A e P-5-5B, com rendimentos semelhantes, porém nos testes P-7.5-7.5A e P-7.5-7.5B, o valor de rendimento em produto foi semelhante e rendimento em células foi diferente, o que podemos sugerir que foi influenciado pelo inóculo maior.

### 4.3. Coeficientes de rendimento e de eficiência de fermentação

#### 4.3.1. Escala piloto

Observa-se pelos resultados da Tabela 4.1 que o coeficiente de rendimento de substrato a etanol ( $Y_{P/S}$ ) apresentou valores entre 0,4114 e 0,4493  $\text{g.g}^{-1}$ , dentro da faixa daqueles tradicionalmente esperados para o processo em questão, o que sugere que a metodologia proposta para o cálculo de  $Y_{P/S}$  com base nos conceitos de balanços de massa é adequada. Quanto aos valores do coeficiente de rendimento de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), os mesmos variaram numa faixa mais ampla, entre 0,0378 e 0,1108  $\text{g.g}^{-1}$ , o que pode ser explicado pela alta sensibilidade desse parâmetro em relação às medidas de concentração celular ( $C_X$ ) no início ( $C_{XI}$ ) e no final dos cultivos ( $C_{XF}$ ). Como os valores de  $Y_{X/S}$  são pequenos, inferiores a 0,10  $\text{g.g}^{-1}$ , exceto num ensaio, logo pequenas flutuações nos valores de  $C_{XI}$  e de  $C_{XF}$  geram grandes variações nos valores calculados de  $Y_{X/S}$ . Ainda, as precisões dos valores de  $C_{XI}$  e de  $C_{XF}$  também influenciam, no entanto em menor grau, na precisão dos valores de  $Y_{P/S}$ , uma vez que os valores de  $C_{XI}$  e de  $C_{XF}$  são utilizados nos cálculos dos volumes das fases aquosas inicial e final ( $V_{IA}$  e  $V_{FA}$ ).

Dentre os experimentos realizados na planta piloto, os cultivos P-5-5 e P-7.5-7.5 foram realizados em duplicata, com vazões constantes de 5,2 e 7,7 L/h e com pequenas variações nos valores de concentração de inóculo ( $C_{X0}$ ). Observa-se que esses cultivos, quando realizados sob mesma vazão de alimentação ( $F$ ) e com concentrações de inóculo com valores próximos (P-5-5A e P-5-5B), apresentaram valores semelhantes de coeficientes de rendimento, principalmente de  $Y_{P/S}$ , por este não ser tão sensível e afetado pelas medidas de concentração celular.

Nos cultivos P-7.5-7.5, onde a vazão de alimentação foi maior, nota-se que houve variação no  $Y_{X/S}$  e pode-se observar que tal fato foi causado pela variação de ( $C_{XF}$ ), principalmente no ensaio P-7.5-7.5A, onde obteve-se o maior valor de  $C_{XF}$  de todos os ensaios, evidenciando a influência no resultado de  $Y_{X/S}$ . Desta forma, pode-se notar a importância da análise da concentração celular no cálculo de  $Y_{P/S}$ , pois mesmo analisando-se pelo método da massa seca, observa-se que a metodologia precisa ser reavaliada para o processo, pois outros sólidos alimentados ao processo fermentativo via mosto, como matéria seca do mel e sais insolúveis, influenciam no resultado e podem levar a erros analíticos e a falsas conclusões acerca do desempenho do processo. Os resultados obtidos no cultivo P7.5-7.5A é um exemplo desta influência. Já com relação a  $Y_{P/S}$ , não houve variações consideradas significativas.

No ensaio P-15-15, a vazão de alimentação de mosto foi elevada, onde grande quantidade de ART foi alimentada num menor tempo. Porém, como a concentração do inóculo também foi elevada no início da fermentação, o cultivo transcorreu normalmente, sendo obtidos valores de  $Y_{P/S}$  e  $Y_{X/S}$  semelhantes aos dos demais cultivos.

O fato de se utilizar o ART do mosto constante nos cultivos em escala piloto proporcionou maior precisão no cálculo do volume total de ART alimentado e, portanto, nos coeficientes de rendimento  $Y_{X/S}$  e  $Y_{P/S}$ .

Independentemente das condições experimentais empregadas nos cultivos em escala piloto, os valores encontrados para  $Y_{P/S}$  e, portanto, para a eficiência de fermentação ( $\eta_P$ ) apresentaram valores muito próximos. Ainda, considerando que na escala piloto tem-se condições mais apropriadas de cultivo, como temperatura, vazão e composição de ART no mosto constantes, observa-se que os valores obtidos de eficiência de fermentação ( $\eta_P$ ) variaram na faixa de 80,5 a 87,9, bem abaixo da faixa de valores de literatura de 90 a 92% (Wheals, 1999).

#### **4.3.2. Escala industrial**

Diferentemente da planta piloto, na escala industrial as vazões de alimentação de mosto foram variadas linearmente com tempo ao longo dos cultivos e foram obtidos valores de outras variáveis de forma a possibilitar o cálculo de outros coeficientes de rendimento e da eficiência em etanol ( $\eta_P$ ) por metodologia tradicional das usinas. Assim, os valores de eficiência da fermentação obtidos pela metodologia proposta com base nos balanços de massa para etanol e ART foram comparados com os valores obtidos na escala

piloto e com aqueles obtidos a partir dos subprodutos, metodologia tradicional utilizada nas usinas.

Para a determinação da concentração celular ( $C_X$ ), utilizou-se o método de base úmida, visto que as usinas em geral utilizam este método. Esse é outro ponto que difere os cultivos da escala planta piloto daqueles realizados na planta industrial.

Os valores encontrados para  $Y_{P/S}$  e  $Y_{X/S}$  foram semelhantes aos valores encontrados nos cultivos pilotos e também observou-se o mesmo comportamento de  $Y_{X/S}$  em relação à concentração celular, reforçando o comentário feito anteriormente referente a necessidade de metodologia adequada para a análise precisa de  $C_X$ . Tem-se conhecimento de que a precisão analítica para a determinação da concentração celular em base úmida é inferior à do método da massa seca, visto que a metodologia prevê centrifugação do creme de levedura logo após a coleta da amostra e ocorre desprendimento de  $CO_2$  durante a centrifugação, o que influencia a precisão da leitura do resultado. A vantagem deste método é que é muito mais rápido, sendo realizado em poucos minutos, enquanto que os resultados de  $C_X$  pelo método da massa seca são obtidos após várias horas de secagem. No entanto, um método ainda mais preciso para a determinação de  $C_X$  nas dornas seria a contagem do número de células em câmara de Neubauer, o que eliminaria a contabilização de outros sólidos insolúveis presentes no vinho. Os resultados obtidos em  $N^o$  células/mL seriam relacionados com a concentração verdadeira em  $kg/m^3$  para utilização nos cálculos de balanço de massa.

Mesmo com essa influência, observa-se que os resultados foram consistentes e, analisando o cultivo I-55-45, nota-se que o resultado da concentração celular final ( $C_{XF}$ ) foi bem maior que os dos demais, gerando um valor de  $Y_{X/S}$  elevado, servindo como exemplo para demonstrar o impacto da influência da metodologia analítica na obtenção de  $Y_{X/S}$ .

Alguns subprodutos gerados foram analisados, como glicerol e acidez, para que fosse possível calcular a somatória dos coeficientes de rendimento  $Y_i$ 's (Soma). Para calcular a soma dos coeficientes de rendimento, quais sejam, de ART em etanol ( $Y_{P/S}$ ), de ART em células ( $Y_{X/S}$ ), de ART em glicerol ( $Y_{Gli/S}$ ) e de ART em acidez ( $Y_{Ac/S}$ ), foram consideradas as quantidades formadas desses produtos em relação à quantidade total de ART consumida, desconsiderando a quantidade de açúcares redutores residuais totais (ARRT). Se considerarmos que o ART é consumido prioritariamente para formar etanol, células, glicerol e acidez, os valores da soma dos  $Y_i$ 's deveriam ser próximos de 1. Sabe-se que para "fechar" esse balanço de massa seria necessário determinar as concentrações de possíveis outros compostos gerados na fermentação, como alcoóis superiores (óleo fúsel), ácidos orgânicos, bem como o arraste de álcool por  $CO_2$ , bem como fazer uma análise crítica sobre a quantidade

de açúcares redutores residuais totais (ARRT). Estes açúcares são determinados no mosto e no vinho através de análise laboratorial e são chamados de ARRT. O teor de ARRT encontrado no vinho corresponde a açúcares não metabolizados pela levedura, que possuem hidroxilas livres e por isto reagem com o indicador químico após hidrólise ácida e são detectados pelo método de determinação de açúcares redutores. Estes açúcares, não fermentescíveis, provêm da cana de açúcar e podem estar presentes em maior ou menor quantidade em função da qualidade da cana. O amido e a dextrana são exemplos de açúcares não fermentescíveis e que geralmente são encontrados nas extremidades da cana de açúcar. Também pode ser que parte do ARRT seja gerado a partir do consumo de ART pelas bactérias presentes no caldo, como por exemplo, o *Leuconostoc mesenteroides* que converte glicose em dextrana. Segundo Amorim (2001), 5% do açúcar metabolizado pela levedura é utilizado para formação dos subprodutos.

Observa-se pelos resultados de eficiência da fermentação ( $\eta_P$ ), que a mesma apresentou valores na faixa entre 80,5 e 87,9 para a piloto e entre 84,2 e 92,1 para a escala industrial, faixas próximas entre si. No entanto, independentemente da escala (piloto ou industrial), a menos do valor máximo de 92,1 obtido no cultivo I-50-50, os valores obtidos foram abaixo da faixa tradicionalmente esperada para o processo em questão de 90 a 92% (Wheals, 1999).

Ressalta-se que a precisão dos valores de  $\eta_P$  é fortemente afetada pela qualidade dos resultados analíticos. Logo, dada a importância desse parâmetro na monitoração do processo fermentativo, seria adequado realizar todas as análises em triplicata de modo a se obter valores com maior precisão possível.

Comparando os resultados de eficiência de fermentação obtidos em escala piloto e industrial, podemos observar que os valores são semelhantes, porém, há maior amplitude de variação na escala industrial, devido aos problemas com os resultados analíticos, como por exemplo, a concentração celular que foi medida com base na metodologia de base úmida (% v/v), ponto já discutido anteriormente. Outro ponto a ser ressaltado é referente à amostragem na escala industrial. Por exemplo, se na amostra coletada durante a fermentação ainda houver açúcar fermentescível, a fermentação tem continuidade até sua chegada ao laboratório para ser analisada. Logo, torna-se necessário implementar amostragens instantâneas para a escala industrial, de forma a se ter resultados mais confiáveis. O ideal seria obter amostras através de amostradores contínuos para medições em linha (“on-line”) e em tempo real. Na escala piloto, operada no laboratório da usina, vários destes problemas são evitados e conseqüentemente os erros são menores.

### 4.3.3. Eficiência da fermentação por subprodutos

A eficiência de fermentação utilizada na usina estudada contempla atualmente as imprecisões de medições e de análises, principalmente pelo quadro de amostragens do processo, como por exemplo para o cálculo da concentração celular. Esta eficiência é calculada diariamente em função dos subprodutos gerados no processo, que são medidos em pontos específicos.

Com base no equacionamento proposto por Fernandes (2003), apresentado no item 2.6.1 da Revisão Bibliográfica, foi possível a determinação da eficiência da fermentação por subprodutos para os cultivos em escala industrial. Salienta-se que nas empresas do setor, a eficiência de fermentação é também calculada considerando a quantidade de levedura sangrada (purgada) do processo, que vai para secagem e posterior comercialização como fonte protéica. Nesse cálculo é considerado um termo adicional na equação, o coeficiente de levedo  $K_L$  e a equação utilizada nesse caso para o cálculo de  $\eta_P$  é a equação 2.40. Quando não se considera a sangria, o coeficiente de levedo  $K_L$  é considerado nulo.

A Tabela 4.3 apresenta as condições de experimentos dos cultivos e os resultados de eficiências de fermentação ( $\eta_P$ ) obtidos pela metodologia proposta (balanço de massa) e por subprodutos desconsiderando e considerando a sangria de levedura do sistema.

**Tabela 4.3:** Condições experimentais e resultados de eficiência de fermentação alcoólica em escala industrial

<b>ENSAIO</b>	<b>I-40-60</b>	<b>I-45-55</b>	<b>I-50-50</b>	<b>I-55-45</b>	<b>I-60-40</b>
<b>Data</b>	5/10/07	15/10/07	6/10/07	14/10/07	6/10/07
<b><math>V_0</math> (m<sup>3</sup>)</b>	116,00	134,99	120,22	128,66	125,00
<b><math>C_{x_0}</math> (%)</b>	28,69	28,86	30,00	29,55	33,00
<b><math>^{\circ}GL_0</math></b>	4,02	4,08	4,64	4,84	5,72
<b><math>C_{x_f}</math> (%)</b>	11,65	12,12	10,60	15,86	12,06
<b><math>^{\circ}GL_f</math></b>	10,18	8,86	10,62	9,58	10,76
<b><math>\eta_{P-BM}</math> (%)</b>	84,43	85,31	92,14	84,17	88,25
<b><math>\eta_{P-SS}</math> (%) - sem sangria</b>	94,00	91,60	93,30	93,50	94,30
<b><math>\eta_{P-CS}</math> (%) - com sangria</b>	91,50	87,40	87,00	91,40	91,20

$\eta_{P-BM}$  : eficiência de fermentação calculada por balanço de massa

$\eta_{P-SP}$  : eficiência de fermentação calculada por subprodutos (processo sem e com sangria)

Pelos resultados da Tabela 4.3, observa-se que com a sangria de levedura, a eficiência da fermentação alcoólica por subprodutos diminui consideravelmente, uma vez que com base nessa lógica a levedura produzida utilizaria parte do açúcar para produção de

biomassa, em detrimento da produção de álcool. No entanto, na metodologia proposta de cálculo de  $\eta_P$  com base nos balanços de massa, a produção de levedura que leva a uma maior concentração de levedura no vinho final influencia no cálculo do volume final da fase aquosa e, por consequência, no valor de  $\eta_P$ .

Os valores encontrados de eficiência de fermentação com base na metodologia proposta ( $\eta_{P-BM}$ ) foram menores que aqueles calculados com base nos subprodutos desconsiderando ( $\eta_{P-SS}$ ) e considerando ( $\eta_{P-CS}$ ) a sangria do processo, a menos do resultado do cultivo I-50-50, muito superior aos demais, o que sugere que algum erro analítico tenha ocorrido. Desconsiderando-se esse valor, os demais valores encontrados de  $\eta_{P-BM}$  foram em média 8,3% inferiores aos de  $\eta_{P-SS}$  e 5,3% e inferiores a aos de  $\eta_{P-CS}$ .

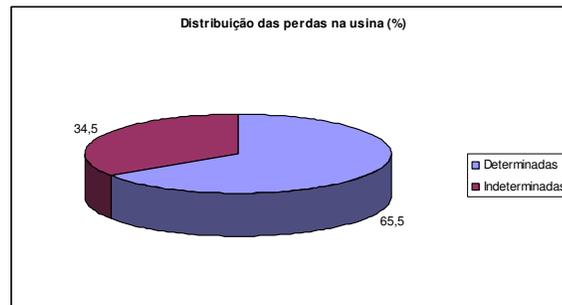
Observa-se que os resultados obtidos na metodologia proposta são inferiores aos resultados calculados de acordo com a atual metodologia utilizada na usina, mesmo descontando a levedura sangrada do processo. Pela metodologia proposta, o cálculo da eficiência é baseado no balanço de massa da fermentação, ou seja, o cálculo é direto considerando as quantidades de etanol gerado e de ART consumidos. Já no cálculo atualmente utilizado, a “eficiência por subprodutos” não leva em consideração o consumo de substrato, ou seja, o  $Y_{P/S}$  é calculado indiretamente com base nas produções de subprodutos do processo (células, glicerol e acidez). Logo, pode-se concluir que esta forma de cálculo leva a resultados mais imprecisos, uma vez que o cálculo considera mais variáveis, o que aumenta a probabilidade de erro devido à maior necessidade de informações analíticas.

Para que o  $Y_{P/S}$  seja calculado adequadamente, é necessário que a usina tenha um bom nível de automação da fermentação, com instrumentos calibrados, amostragens consistentes e que o laboratório seja capaz de emitir resultados com rapidez e precisão. As informações do processo também deverão estar organizadas para facilitar a consulta e aquisição de dados para os cálculos sejam executados automaticamente. Com base nestas premissas, é possível calcular valores de  $Y_{P/S}$  com boa precisão, mostrando que a eficiência com base nos balanços de massa parece ser uma metodologia com menor inclusão de erros, uma vez que é obtida diretamente de valores gerados de etanol e consumidos de ART.

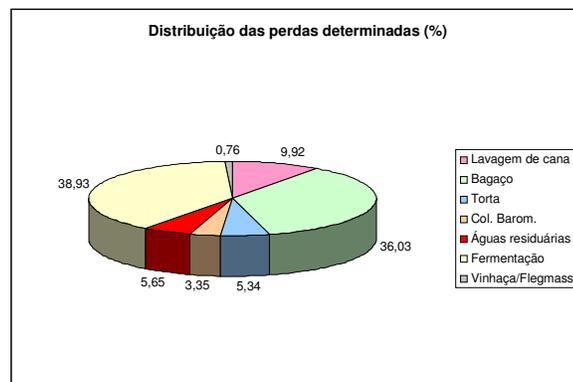
No passado as usinas adotaram a eficiência de fermentação por subprodutos devido ao pequeno ou até inexistente nível de instrumentação e automação. Esse tipo de eficiência também foi amplamente empregado para fermentações contínuas. Sabe-se também do setor sucroalcooleiro a existência de problemas para o cálculo da eficiência industrial, que é baseada no ART que entra com a cana pelo ART produzido, ou seja, açúcar e álcool

transformados em ART. A diferença entre esses valores em relação a 100% são as perdas determinadas e indeterminadas do processo.

As Figuras 4.11 e 4.12 ilustram as distribuições das perdas totais e determinadas em usinas.



**Figura 4.11:** Distribuição das perdas totais em ART em usinas (Finguerut, 2006).



**Figura 4.12:** Distribuição das perdas determinadas em ART em usinas (Finguerut, 2006).

Normalmente, as perdas determinadas são referentes às perdas de ART no bagaço, torta de filtro, água de lavagem de cana, fermentação, dentre outras que são quantificadas. A maior “perda” quantificada na usina é encontrada na fermentação e medida a partir da eficiência de fermentação por subprodutos. Sendo assim, tendo-se a eficiência industrial calculada e as perdas determinadas, a diferença para fechar o balanço de massa é igual à perda indeterminada, que normalmente está entre 2% e 3%. Várias usinas, mesmo apresentando valores das demais perdas dentro de limites aceitáveis, apresentam baixa eficiência industrial com elevada perda indeterminada, mesmo com altos valores de eficiência de fermentação calculada com base nos subprodutos, o que sugere que tal cálculo não apresente precisão adequada. Não há grandes dificuldades para se medir e quantificar as

demais perdas mencionadas, restando a dúvida quanto à precisão desse atual cálculo de eficiência de fermentação com base nos subprodutos.

Baseado na metodologia apresentada neste trabalho, cientes de que a real eficiência da fermentação é menor do que aquela calculada atualmente por subprodutos, tem-se um aumento nas perdas determinadas o que irá abrir um vasto campo de discussões, pesquisas, investimentos, automação, na busca de se aumentar a eficiência da fermentação. Uma questão importante é saber se as usinas estão preparadas para assumir que a eficiência de fermentação real é menor do que eficiência mostrada atualmente e para melhorar a eficiência industrial será necessário melhorar a eficiência da fermentação.

Outro ponto importante é que, como não se determina adequadamente a eficiência de fermentação atualmente, é muito difícil justificar investimentos na fermentação baseados no retorno do investimento, pois se eficiência da fermentação já está elevada as usinas se acomodam e direcionam investimentos para outros setores. Um importante passo também para avaliar a operação da fermentação é a utilização de novas práticas, incluindo maior automação e metodologias analíticas mais precisas e freqüentes, no sentido de se otimizar o processo.

#### 4.4. Modelagem Cinética

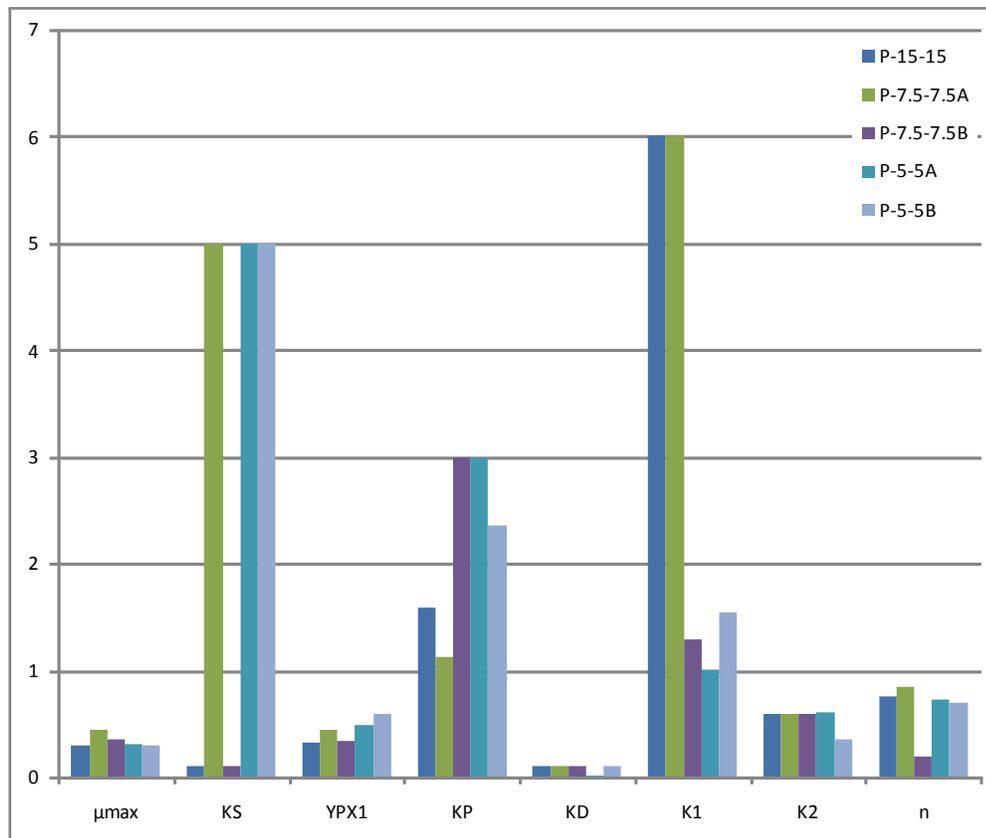
A Tabela 4.4 apresenta os parâmetros cinéticos do modelo proposto estimados a partir do ajuste do modelo aos valores experimentais obtidos nos cultivos em escala piloto e os gráficos da Figura 4.13 apresenta as variações dos coeficientes cinéticos estimados, onde se verifica uma flutuação aceitável entre os valores obtidos nos diferentes cultivos, com desvios padrões baixos em relação aos valores médios calculados.

Observa-se também que os parâmetros clássicos como a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\max}$ ), a constante de saturação ( $K_S$ ), a constante de morte celular ( $k_d$ ) e o expoente do modelo de inibição de Levenspiel (1974) ( $n$ ) apresentaram valores estimados dentro de uma faixa de literatura (Ghose e Tyagi, 1979; Dourado et al., 1987; Porto, 2005).

**Tabela 4.4:** Parâmetros cinéticos estimados para os cultivos em escala piloto

ENSAIO	P-5-5A	P-5-5B	P-7.5-7.5A	P-7.5-7.5B	P-15-15	Média/ Desvio Padrão
$\mu_{\max}$	0,312	0,301	0,438	0,361	0,293	0,341±0,060
$K_S$	5,0	5,0	5,0	0,1	0,1	3,04±2,68
$Y_{PX1}$	0,492	0,588	0,440	0,338	0,329	0,437±0,108
$K_P$	3,000	2,361	1,131	3,000	1,593	2,217±0,839
$K_d$	0,013	0,100	0,100	0,100	0,100	0,083±0,039
$K_1$	1,00	1,54	6,00	1,29	6,00	3,17±2,59
$K_2$	0,60	0,35	0,60	0,60	0,60	0,55±0,11
<b>n</b>	0,72	0,69	0,85	0,20	0,75	0,64±0,25

Na seqüência são apresentados os gráficos que ilustram os ajustes do modelo aos pontos experimentais obtidos nos diferentes cultivos em escala piloto. Pode-se observar que em todos os cultivos, o modelo descreveu adequadamente os comportamentos das concentrações de células ( $C_X$ ), substrato ( $C_S$ ) e de etanol ( $C_P$ ) ao longo de todos os cultivos, mostrando que as hipóteses consideradas na elaboração do modelo são pertinentes quanto à realidade do fenômeno observado.

**Figura 4.13:** Variações dos parâmetros cinéticos obtidos dos ajustes

## 5. CONCLUSÕES

Com relação aos coeficientes de rendimento e a eficiência de fermentação, os resultados obtidos em escalas piloto e industrial com base nos balanços de massa se apresentaram dentro da faixa daqueles tradicionalmente esperados para o processo em questão. Isto sugere que a metodologia proposta para os cálculos de  $Y_{X/S}$ ,  $Y_{P/S}$  e  $\eta_P$  com base nos conceitos de balanços de massa e utilizando a correção do volume do caldo foi adequada.

Pôde-se notar a importância da análise da concentração celular ( $C_X$ ) nos cálculos de  $Y_{X/S}$  e  $Y_{P/S}$  e, portanto, na determinação de  $\eta_P$ , pois outros sólidos alimentados ao processo fermentativo via mosto como matéria seca do mel e sais insolúveis geram erros na análise de  $C_X$ , levando a falsas conclusões acerca do desempenho do processo.

Na planta piloto, mesmo apresentando condições mais apropriadas de cultivo, com temperatura, vazão e composição de ART no mosto constantes, os valores obtidos de eficiência de fermentação ( $\eta_P$ ) variaram na faixa de 80,5 a 87,9.

Quanto aos resultados da planta industrial, a eficiência da fermentação ( $\eta_P$ ) apresentou valores na faixa entre 84,2 e 92,1, faixas próxima à encontrada para a escala piloto. Independentemente da escala (piloto ou industrial), os valores obtidos foram abaixo da faixa tradicionalmente esperada para o processo em questão de 90 a 92% (Wheals, 1999).

A precisão dos valores de  $\eta_P$  foi fortemente afetada pela qualidade dos resultados analíticos. Daí a importância da monitoração do processo fermentativo com análises em triplicata de modo a se obter valores com maior precisão possível.

Os resultados obtidos de eficiência de fermentação ( $\eta_P$ ) pela metodologia proposta foram inferiores aos resultados calculados de acordo com a atual metodologia utilizada na usina por subprodutos, mesmo descontando a levedura sangrada do processo. No entanto, a metodologia proposta parece gerar resultados mais precisos, pois o cálculo da eficiência é baseado no balanço de massa da fermentação, ou seja, o cálculo é direto considerando as

quantidades de etanol gerado e de ART consumidos. O cálculo atualmente utilizado leva a resultados mais imprecisos de  $\eta_p$ , uma vez que avalia indiretamente a produção de etanol considerando outras variáveis, o que aumenta a probabilidade de erro devido à maior necessidade de informações analíticas.

Com relação à modelagem cinética, o modelo descreveu adequadamente os comportamentos das concentrações de células ( $C_X$ ), substrato ( $C_S$ ) e de etanol ( $C_P$ ) ao longo de todos os cultivos, mostrando que as hipóteses consideradas na elaboração do modelo são pertinentes quanto à realidade do fenômeno observado.

Os valores dos coeficientes cinéticos estimados do modelo proposto apresentaram uma flutuação aceitável nos diferentes cultivos, com desvios padrões baixos em relação aos valores médios calculados.

Ainda, valores de parâmetros cinéticos clássicos como a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{max}$ ), a constante de saturação ( $K_S$ ), a constante de morte celular ( $k_d$ ) e o expoente do modelo de inibição de Levenspiel (1976) ( $n$ ) apresentaram valores estimados dentro de uma faixa de literatura.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S., SHODA, M., NAGATAMI, M.; Kinetics of Product Inhibition in Alcohol Fermentation, *Biotechnology and Bioengineering*, v. X, p. 845 – 864, 1968.

ALCARDE, V.E. Avaliação de parâmetros que afetam a floculação de levedura e bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. Campinas. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 91p., 2001.

AMORIM, H. V. Fermentação Alcoólica – Ciência e Tecnologia. 2005, 448p. Fermentec, Piracicaba-SP.

ANDREWS, J. F.; A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates, *Biotechnology and Bioengineering*, v. X, p.707–723, 1968.

ANDRIETTA, S. R.; Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala Industrial – Universidade de Campinas – Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1994. 163p. Tese (Doutorado).

BAILEY, J.E., OLLIS, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals* – 2nd.ed. McGraw Hill, 1986.

BIDARD, F.; BONY M.; BLONDIN B.; DEQUIN S.; BARRE P. The *Saccharomyces cerevisiae* FLO1 flocculation gene encodes a cell surface protein. *Yeast*, v.11, p. 809-822, 1995.

BORZANI, W., SCHIMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., *Biotecnologia Industrial, Engenharia Bioquímica*, Editora Edgard Blücher, v 2, 2001.

BORZANI, W. Calculation of fermentation parameters from the results of a batch teste taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. *Biotechnol Lett*, 25, 1953-1956, 2003. See Erratum, *Biotechnol Lett.*, 26, 357-362, 2004.

BORZANI, W.; Batch Ethanol Fermentation: The correlation between the fermentation efficiency and the biomass initial concentration depends on what is considered as produced ethanol. *Brazilian Journal of Microbiology* v.37, p.87-89, 2006.

BORZANI, W.; VAIRO, M.L.R. Determination of the volume fraction of yeast cells in a sediment or in a suspension. *Biotechnol Lett*, 5, 247-252, 1983.

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR – CTC; Divisão Industrial CTDI; Fermentação, Edição 1, Agosto, 1987.

COSTA M. J.; MORADA - FERREIRA P. S. *cerevisiae* flocculation: identification of specific cell wall proteins. *Proc. Congr. Eur. Brew Conv.* v.24, p. 283-290, 2001.

DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; SEVELY, Y. Modeling and statistic optimization of the ethanol production in a cascade reactor I. Modeling. Biotechnol. Bioeng. 29, p.187-194, 1987.

FERNANDES, A. C.; Cálculos na agroindústria de cana-de-açúcar, 2ed. Piracicaba, STAB – Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 2003. 240p.

FINGUERUT, J. I Workshop Tecnológico Sobre Obtenção de Etanol 2006. Projeto PPPP Etanol – Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena-SP.

FINGUERUT, J., Workshop Tecnológico - Fermentando com Eficiência e Controle de Perdas – 2007. UDOP, Araçatuba – SP.

GHOSE, T.K. AND TYAGI, R.D., 1979. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate I Batch versus continuous systems. Biotechnol. Bioeng. 21, p.1387–1400.

GUTIERREZ, L. E., Produção de Alcoóis Superiores por Linhagens de *Saccharomyces* durante a Fermentação Alcoólica. Sci. Agric., Piracicaba, v.3, p.464-472, 1993.

HILL, G. A.; ROBINSON, C. W.; A Modified Ghose Model for Batch Cultures of *Saccharomyces cerevisiae* at High Ethanol Concentrations, The Chemical Engineering Journal, v.44, p.69-80, 1990.

HOLZBERG, I., FINN, R. K.; STEINKRAUS, K. H. – A Kinetic Study of the Alcohol Fermentation of Grape Juice. Biotechnology and Bioengineering, New York, 9 (3): 413 – 27, july 1967.

HOPPE, G. K., HANSFORD, G. S. , Ethanol Inhibition of Continuous Anaerobic Yeast Growth , Biotechnology Letters, vol. 4, p.39-44, 1982.

JIN, YU-LAI, SPEERS, A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Research International, v.31, n. 6-7, p. 421-440, 1999.

JONES, R. C. ; PAMMENT, N. ; GREENFIELD, P. F. Alcohol Fermentation by yeast – the Effect of Environmental and Other Variables. Process Biochemistry, 16 (3) : 42 -9, april/may 1981.

LANE, J. H.; EYNON, L. Determination of reducing sugars by Fehling's solution with methylene blue indicator. Normam Rodge, London, 8p., 1934.

LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica. São Paulo, Sarvier. 1989, p.725.

LEVEAU, J. Y., BOUIX, M. Cinéticas Microbianas. Biotecnologia, São Paulo, Editora Manole LTDA, 1985. p 103 – 23.

LEVENSPIEL, O. Engenharia das reações químicas. Brasil. Editora Edgar Blücher. (1974).

- LIMA, U. A., AQUARONE E. BORZANI, W., SCHMIDELL, Biotecnologia Industrial v.3, 1.ed.– LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. cap. 1- Produção de Etanol, p.1-39, 2001.
- LUONG, J. H. T. – Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXVII, p. 280-285, 1985.
- MARQUARDT, D. W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. J. Soc. Indust. Appl. Math., 11(2): 431-441, 1963.
- NAHVI, Iraj; EMTIAZI, Giti; ALKABI, Lila; Isolation of a flocculating *Saccharomyces Cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol.- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan – Isfahan – Iran, 2002.
- OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A; AMORIM, H.V. Métodos para o controle microbiológico na produção de açúcar e álcool. Piracicaba: FERMENTEC/ FEALQ/ESALQ, 1996. 89p.
- PORTO, L.M. Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série. tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Departamento de Processos Biotecnológicos, 122 p., 2005.
- PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S.A.; VETTERLING, W. T. ; FLANNERY, B. P. Numerical Recipes in Fortran 77: The Art of Scientific Computing (Vol. 1 of Fortran Numerical Recipes), Second edition, Cambridge University Press, 1992.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering – Basic Concepts, Anaerobic Process – Ethanol ProductionE, 17 (2) : 515 – 518, 2002.
- SILVA, J. A., SILVA, F. L. H., ALVES, R. R. N.; SANTANA, D. P., Influencia das Variáveis Nitrogênio, Fósforo e °Brix na Produção dos Metabólitos Secundários Contaminantes Totais da Fermentação Alcoólica. Quim. Nova, v. 29, nº4, p.695-698, 2006.
- SINGH, A, KUHAD, D.C., SAHAI, V., GHOSH, P. Evaluation of biomass. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, v. 51, p. 4770, 1994.
- SKINNER, K. A., LEATHERS, T. D., Bacterial contaminants of fuel ethanol production, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., Vol 31, p.401–408, 2004.
- SOUZA, C. S.; OLIVEIRA, K. F.; TREVISAN, H. C.; LALUCE, C.; A Strategy to Compare Yeast Strains and Improve Cell Survival in Ethanol Production Processes above 30°C. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 2007.
- STEINKRAUS, K. H. Influence of the Rate of Ethanol Production and Accumulation on the Viability of *Saccharomyces cerevisiae* in Rapid Fermentation. Appl. and Environmental Microbiology, 31 (2): 156 – 62, feb. 1976.

VASCONCELOS, J. N. Influencia da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 105 (4, 5 e 6), p.41-48, 1987.

VASCONCELOS, J. N. Flashes de Destilaria. STAB, Vol. 25 nº2, p.34-38, 2006.

VASCONCELOS, J. N. Influencia do Perfil de Alimentação de Substrato sobre o Processo de Fermentação Alcoólica; Álcool e Açúcar, nº 66, p. 14-19, março1993.

VASCONCELOS, JOÃO NUNES. Operação e Simulação do Processo de Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada com Vazão Variável de Alimentação. Rio de Janeiro, Escola de Química da UFRJ, 1987 223p. (Dissertação de Mestrado).

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F.R. Yeast Flocculation: what brewers should know. Appl. Microbiol. Biotechnol. v.61, p.197-205, 2003.

WHEALS, A. E., BASSO, L. C., AMORIM, H. V., ALVES, D. M. G., Fuel ethanol after 25 years, Elsevier Science Ltd., v. 17, p.482-486, 1999.

ZAGO, E. A; SILVA, L. F. L. F.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM, H. V. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar. Piracicaba: ESALQ - FERMENTEC, 1996. 194 p.