

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INÓCULO E DO PERFIL DE
ALIMENTAÇÃO DO MOSTO NA PRODUÇÃO EM ESCALA
PILOTO E INDUSTRIAL DE ETANOL**

CÉSAR AUGUSTO PORTO MARTINS

**SÃO CARLOS – SP - BRASIL
ABRIL DE 2009**

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INÓCULO E DO PERFIL DE
ALIMENTAÇÃO DO MOSTO NA PRODUÇÃO EM ESCALA
PILOTO E INDUSTRIAL DE ETANOL**

CÉSAR AUGUSTO PORTO MARTINS

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz

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

**SÃO CARLOS – SP - BRASIL
ABRIL DE 2009**

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

M386ae

Martins, César Augusto Porto.

Avaliação do efeito do inóculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol / César Augusto Porto Martins. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
80 f.

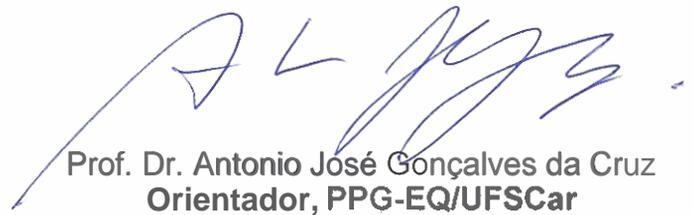
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fermentação alcoólica. 2. Álcool. 3. Bioprocesso. 4. Modelagem computacional e simulação. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Título.

CDD: 663.13 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **CÉSAR AUGUSTO PORTO MARTINS** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 22 DE ABRIL DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz
Orientador, PPG-EQ/UFSCar



Prof.ª. Dr.ª. Maria Lúcia Gonsales da Costa Araújo
IQ-DQTA/UNESP- Araraquara



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

*Este trabalho é dedicado aos meus pais,
minha esposa e meus filhos pela
confiança depositada em mim, pelo
incentivo e apoio aos meus estudos.*

AGRADECIMENTOS

A minha família, Pai, Mãe, Irmãos e minha querida esposa, que sempre me incentivaram e me apoiaram ao longo da realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Antonio José Gonçalves da Cruz, que sempre me incentivou e acreditou no meu potencial para realizar este trabalho, estando sempre à disposição.

Aos meus professores do mestrado que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao meu amigo Raul pela amizade e estímulo.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a elaboração deste trabalho.

1. INTRODUÇÃO

O etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), também chamado álcool etílico, ou simplesmente álcool, pode ser produzido por meio de duas vias. Na primeira via, denominada química ou petroquímica, o etanol é obtido a partir da hidratação do eteno. Na segunda, a via bioquímica, o etanol (também denominado bioetanol) é obtido a partir da fermentação de biomassa agrícola por microrganismos. No Brasil, segundo maior produtor de etanol do mundo, a matéria-prima empregada é a cana-de-açúcar. O maior produtor mundial, os Estados Unidos, produz o etanol empregando o milho como matéria-prima (dados referentes ao ano de 2008). O bioetanol vem ganhando espaço no cenário mundial como um dos principais combustíveis obtidos a partir de fontes renováveis de energia.

No Brasil a quantidade de cana-de-açúcar processada pelas usinas na safra 2008/09 foi de 563 milhões de toneladas. Esse valor foi 14,1% superior ao da safra anterior (2007/08). Foram produzidos 31,4 milhões de toneladas de açúcar e 26,9 bilhões de litros de etanol. A produção de etanol aumentou 19,9% em relação à safra passada (UNICA, 2009). Quanto à área plantada, esta foi estimada em 6,7 milhões de hectares na safra 2008/09, com um aumento de 15,7% em relação à área ocupada na safra anterior (IBGE, 2009). São Paulo é o estado maior produtor de cana, com uma área de 4,45 milhões ha disponíveis para colheita. Estes dados colocam o setor sucroalcooleiro como um dos mais importantes agronegócios brasileiros.

No estado de São Paulo, o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) possui 176 unidades associadas (usinas de açúcar e álcool, destilarias, companhias energéticas e associações de fornecedores de cana-de-açúcar) responsáveis por 60% da cana produzida no Brasil (CTC, 2009).

A Figura 1.1 apresenta um mapa com a distribuição do setor sucroenergético no Brasil. Observa-se que a produção de cana-de-açúcar concentra-se nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil. As áreas assinaladas em vermelho na Figura 1.1 representam os locais onde se concentram as plantações e as unidades produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

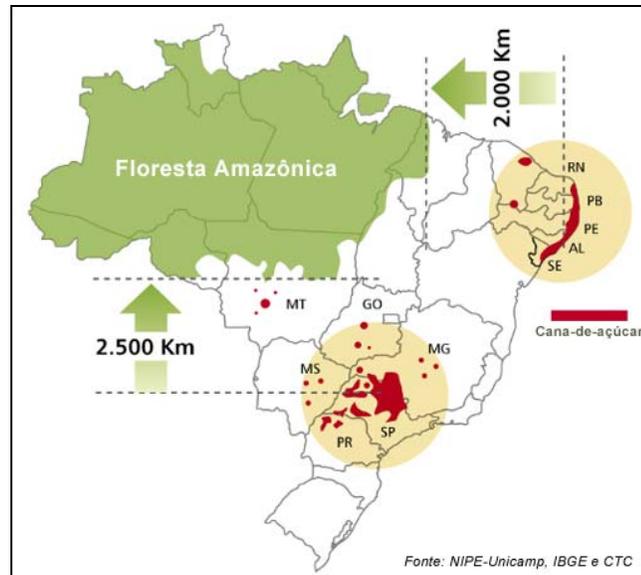


Figura 1.1. Mapa ilustrativo da produção do setor sucroenergético brasileiro (UNICA, 2009).

A Figura 1.2 mostra dados da evolução da quantidade de cana-de-açúcar processada no Brasil. Observa-se nesta figura que a quantidade de cana processada manteve-se praticamente constante entre as safras de 1990/91 até 1993/94. Da safra 1994/95 até a safra 1999/00 houve um pequeno aumento, com redução na safra seguinte (2000/01). A partir desta safra, os números do setor iniciaram um forte aumento e comparando-se os valores da safra 2008/09 com aqueles da safra 2000/2001 observa-se um aumento de 91,5%.

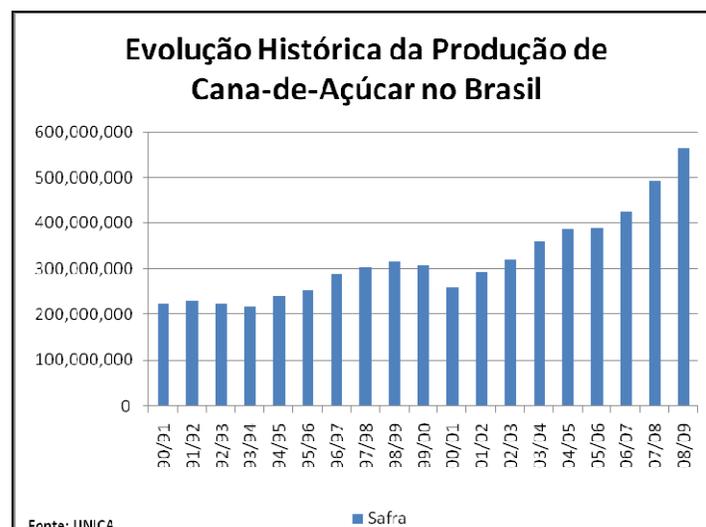


Figura 1.2. Evolução histórica da quantidade de cana-de-açúcar processada no Brasil (UNICA, 2009).

No Brasil, a maioria das usinas utiliza um processo industrial integrado, devido à produção concomitante de açúcar e álcool. Outro aspecto relevante é que as unidades mais modernas, que atualmente denominam-se unidades sucroenergéticas, produzem também a energia elétrica necessária para o próprio processamento e, em alguns casos, tem disponível para venda o excedente de energia gerado. Este fato torna o custo de produção do etanol brasileiro menor que o do petróleo e do álcool a partir de outras matérias-primas como, por exemplo, o milho nos Estados Unidos. Apesar de todo o potencial para a cogeração, que tem se potencializado a partir do aumento da eficiência energética das usinas através da instalação de caldeiras que operam a altas pressões em substituição das tradicionais caldeiras que operam a 22 kgf/cm² por modernas e mais eficientes que operam até 90 kgf/cm².

A produção de energia elétrica é apenas uma das alternativas para o uso do bagaço. Pesquisas vêm sendo realizadas para transformar o excedente de bagaço em álcool, por meio da hidrólise da celulose, ou ainda, para o seu melhor aproveitamento pela indústria moveleira e para a fabricação de ração animal.

Embora no Brasil a produção de etanol corresponda a um processo clássico e estabelecido há ainda a necessidade de se implementar melhorias em diversos pontos do mesmo. Ganhos de produção podem ser obtidos na etapa de fermentação. Por esta razão encontram-se vários estudos sobre o assunto na literatura (VASCONCELOS E VALDMAN, 1988; CARVALHO et al., 1990; VASCONCELOS, 1993, 1996(a, b), 1999; ANDRIETTA et al. 2003; VASCONCELOS et al., 2004; PHISALAPHONG et al., 2006; BORGES, 2008). No sentido de aprimorar os processos existentes, principalmente no que tange a implementação de metodologias analíticas e medidas em linha (*on-line*) de variáveis de processo, modificações estão sendo implementadas com o objetivo de tornar o processo mais automatizado.

As unidades produtoras de etanol buscam continuamente inserir melhorias em seus processos. Assim o diferencial entre elas está no processo produtivo que garante a competitividade no setor.

Dentre os tipos de processos fermentativos industriais utilizados pelas usinas brasileiras destaca-se a fermentação por “batelada” com reciclo de células (clássico Melle-Boinot). Além deste, pode-se citar o processo contínuo e o processo semi-contínuo, com suas derivações como reutilização de células ou ligação de dornas em série e paralelo (AMORIM, 1996).

O “boom” na produção de etanol no Brasil ocorreu a partir da implantação do Programa Nacional do Álcool (Pro-Álcool) no ano de 1975, uma iniciativa nacional em

resposta à crise do petróleo de 1973. Hoje o álcool é utilizado em mistura com gasolina no Brasil e em países como, Estados Unidos, União Européia, México, Índia, Argentina, Colômbia e, mais recentemente, no Japão. Contudo, o uso exclusivo de álcool, em larga escala, como combustível está concentrado no Brasil. Vem contribuindo também para o aumento no consumo de combustível no Brasil a tecnologia dos carros bicompostíveis.

No processo de produção de etanol em “batelada” a variável tempo tem grande influência na produtividade em etanol do processo. Dessa forma, a velocidade de enchimento da dorna tem um papel fundamental. A utilização de vazões elevadas implicam em tempos de enchimento menores, mas pode ocasionar formação excessiva de espuma, inibição da produção de etanol pelo acúmulo de substrato e conseqüentemente, podem aumentar o tempo do processo, reduzindo a produtividade em etanol. Por outro lado, vazões muito baixas resultam em bateladas com maior duração, o que ocasiona menores produtividades em etanol.

Dentre os diversos aspectos relacionados com o processo de fermentação alcoólica, a modelagem cinética do processo fermentativo tem merecido especial atenção (VASCONCELOS, 1987; CARVALHO et al., 1990; ATALA et al. 1998; RIVERA et al., 2007; DARÉ, 2008; BORGES, 2008). Modelos cinéticos clássicos considerando efeitos inibitórios do substrato (açúcar), do produto (etanol) e das próprias células têm sido propostos para simulação deste processo (LUONG, 1984). A busca por um modelo matemático que represente de forma mais fidedigna o processo pode ser útil no que diz respeito a aplicação em estudos para otimização e controle. 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.

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a influência da concentração do inóculo e do perfil de alimentação do mosto na produção de etanol em escala piloto e industrial. Os parâmetros utilizados para essa comparação foram a produtividade em etanol e o rendimento fermentativo (eficiência). Buscou-se encontrar condição sub-ótima de operação com o objetivo de maximizar a produtividade em etanol no processo.

A partir dos dados experimentais obtidos, foram avaliados dois modelos matemáticos propostos para descrever o processo de produção de etanol em escala piloto e industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item serão apresentados os principais conceitos relacionados à fermentação alcoólica, para melhor entendimento do trabalho realizado.

2.1. Fermentação: definindo o termo

O termo fermentar provém do latim vulgar *fermentare*, que por sua vez deriva do verbo *fervere*, que em português significa ferver (LATdict, 2009). A origem provém da característica do mosto quando fermenta, ou seja, devido à formação e ao desprendimento de bolhas de dióxido de carbono durante o processo. Pasteur definiu a fermentação como “respiração sem ar”, devido ao caráter anaeróbio deste conjunto de reações. Produtos oriundos da fermentação como vinho, cerveja, pão, são conhecidos desde a Antiguidade. A causa da fermentação não era compreendida até o século XIX, quando um cientista francês de nome Louis Pasteur, catedrático de química da recém criada Faculdade de Ciências da Universidade de Lille (França), iniciou seus estudos no tema (GOUVEIA-MATOS, 1997).

As leveduras e algumas bactérias são capazes de produzir etanol e dióxido de carbono, processo este denominado de fermentação alcoólica. O Homem utiliza há milênios estes dois produtos da fermentação (etanol e dióxido de carbono) na fabricação de bebidas e pão.

Os lactobacilos (bactérias presentes no leite) causam a fermentação láctica, tendo como produto final o ácido láctico. As acetobactérias realizam a fermentação acética, gerando o ácido acético (vinagre) (PELCZAR et al., 1996).

2.2. Fermentação Alcoólica

De maneira simplificada, a estequiometria da fermentação alcoólica pode ser representada pela equação (2.1) utilizando como fonte de carbono a glicose (SHULER e KARGI, 2002).



Observa-se pela equação (2.1) que ocorre a formação de dois mols de etanol e dois mols de dióxido de carbono para cada mol de glicose convertido. O rendimento teórico em etanol a partir da glicose é $0,511 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$.

Os principais microrganismos utilizados na produção de etanol são as leveduras, sendo as do gênero *Saccharomyces* as mais utilizadas empregando como matéria-prima

hexoses. Produzem etanol a partir de lactose e pentoses os microrganismos *Kluyveromyces fragilis* e *Candida sp.* Algumas bactérias, como as do gênero *Zymomonas* apresentam rendimentos que podem superar 95% do teórico. As leveduras, contudo, vêm sendo as mais utilizadas para produção industrial de etanol (SHULER e KARGI, 2002).

2.2.1. Produção de Etanol pelas Leveduras

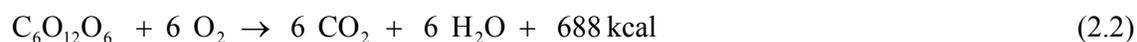
A levedura é um organismo facultativo. Cresce na presença de oxigênio e também na sua ausência, neste caso, o processo é denominado fermentação.

A levedura realiza a fermentação de açúcares com o objetivo de obter energia química para sua sobrevivência, sendo o etanol apenas um subproduto deste processo (AMORIM, 1986).

A transformação do açúcar (glicose) em etanol (álcool etílico) e dióxido de carbono (CO₂) envolve uma seqüência de reações, catalisadas por enzimas, no interior da levedura.

O objetivo principal da levedura durante o metabolismo anaeróbio da glicose é gerar energia (na forma de adenosina tri-fosfato, ATP). Esta energia é utilizada internamente pela célula para manter seu complexo maquinário celular. O etanol e o dióxido de carbono são produtos de excreção, sem utilidade para a célula. O etanol, além de outros subprodutos do metabolismo, pode ser utilizado para gerar mais energia, porém apenas em condições aeróbias (AMORIM, 1986; LIDÉN, 1993; PELCZAR et al., 1997; SCHULER E KARGI, 2002).

Em termos energéticos, o crescimento da levedura em aerobiose (na presença de oxigênio) é mais eficiente na produção de energia (na forma de ATP) que seu crescimento em anaerobiose, a fermentação. É por este motivo que em condições aeróbias ocorre grande multiplicação das células (aumento da biomassa). Este é o processo de produção de fermento, onde o produto é a própria biomassa formada. As equações (2.2) e (2.3) expressam empiricamente a reação global da completa oxidação e fermentação alcoólica de um açúcar simples, a glicose.



Observa-se que a completa oxidação da glicose obtém um rendimento energético máximo de 688 kcal, enquanto que na fermentação alcoólica para a mesma quantidade de açúcar obtém-se 54 kcal.

Durante a fermentação, na seqüência de reações de produção de ATP, intrínsecas à formação de etanol, rotas metabólicas alternativas aparecem para propiciar a formação de materiais necessários à produção de biomassa (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, etc), bem como para formação de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência, os quais desviam esqueletos carbônicos provenientes do açúcar, reduzindo a produção de etanol. Composto como o glicerol, os ácidos orgânicos (principalmente o succínico e o acético), que conjuntamente com a biomassa são quantitativamente os principais subprodutos metabolicamente relacionados ao equilíbrio do redox celular em anaerobiose.

A fermentação alcoólica é um processo não oxidativo, ou seja, sem a participação de oxigênio molecular (O₂). Portanto, para que o equilíbrio de redox celular seja mantido, todo o NADH formado (em reações de oxidação) deve ser consumido (em reações de redução), estas acopladas à produção de etanol e de glicerol.

O glicerol é o composto secundário formado em maior quantidade durante a fermentação alcoólica. Ele é formado na mesma via de síntese do etanol, com um desvio, competindo com este pela utilização do poder redutor (NADH), motivo pelo qual sua produção é inversamente proporcional a do etanol, causando queda na eficiência fermentativa.

A formação de glicerol é função do tipo de levedura, da pressão osmótica do meio de cultivo, da formação de ácidos orgânicos (succínico e acético) e do crescimento da levedura.

A literatura reporta que concentrações de potássio maiores que 56.000 mg/L no meio de cultivo aumenta em dez vezes a formação de glicerol. AMORIM, 1986 relata que o aumento da concentração do íon potássio de 1.000 para 10.000 mg/L aumentou significativamente a produção de glicerol.

2.2.2. Metabolismo da Glicose

A glicólise (do grego *glíkys*, que significa doce, e *lysis*, que significa quebra) ou mecanismo de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), algumas vezes chamado de via da hexose difosfato, é a via de degradação da glicose. Nesta via uma molécula de glicose (seis átomos de carbono) é quebrada em duas moléculas de ácido pirúvico (três átomos de carbono). Duas moléculas de ATP são consumidas no processo. Entretanto, quatro moléculas de ATP são

formadas pela fosforilação em nível de substrato. Assim, existe um saldo positivo de duas moléculas de ATP nesta via. Duas moléculas de NADH_2 são produzidas e devem ser oxidadas a NAD de modo que a glicólise possa continuar a degradar outras moléculas de glicose (PELCZAR et al., 1997; NELSON e COX, 2002). A Figura 2.1 ilustra esta via.

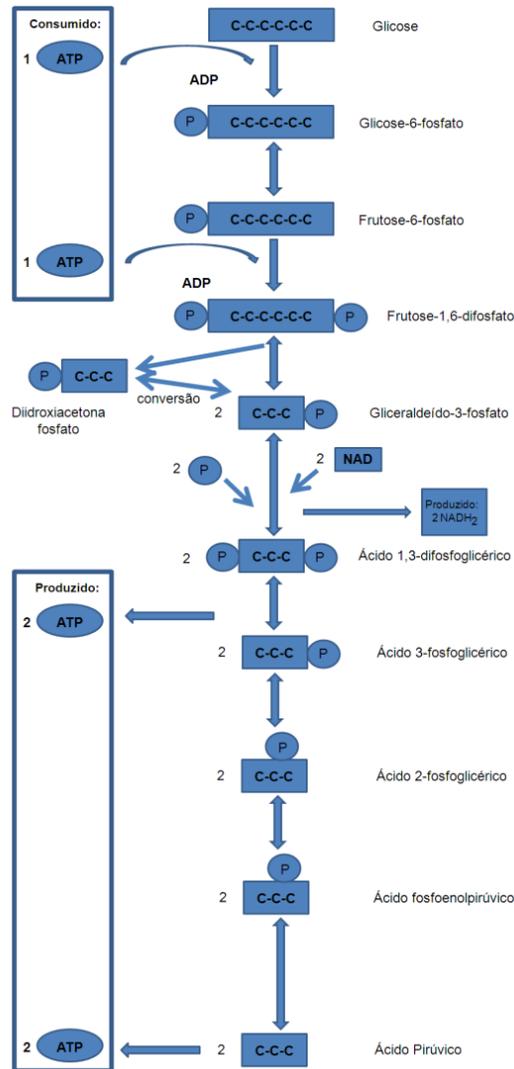


Figura 2.1. Glicólise: via de degradação da glicose.
Adaptado de PELCZAR et al. (1997).

No que diz respeito à fase de ativação, a glicose é fosforilada por uma transferase (hexoquinase) formando glicose-6-fosfato, sendo transformada, por uma isomerase em frutose-6-fosfato. Sofre nova fosforilação, desta vez por outra transferase (fosfofrutoquinase), formando frutose-1,6-difosfato. Uma liase separa-a depois em duas moléculas de três

carbonos: gliceraldeído-3-fosfato. No final desta fase foram consumidos dois ATP (NELSON e COX, 2002).

Segue-se a fase de produção de energia. Por cada molécula, uma oxirredutase retira dois hidrogênios e fornece um fósforo ao composto formando 1,3 difosfoglicerato. Os hidrogênios são usados para reduzir o NAD (nicotinamida adenina dinucleotideo), dando origem a NADH₂. O difosfoglicerato perde um átomo de fósforo, fosforilando uma molécula de ADP (adenosina difosfato) formando ATP, reação esta catalisada por uma transferase. Uma ligase remove depois uma molécula de água e outra transferase catalisa a formação de outra molécula de ATP, formando-se o ácido pirúvico. Tem-se assim a formação de 4 moléculas de ATP. O co-fator necessário a algumas das enzimas aqui referenciadas é o íon magnésio (NELSON e COX, 2002).

Os organismos vivos e, portanto, as leveduras, regeneram o NAD a partir do NADH₂ por duas formas: pela fermentação e pela respiração.

A fermentação é um processo independente do oxigênio no qual o NADH₂ que é produzido durante a glicólise ou outra via de degradação é utilizado para reduzir um aceptor orgânico de elétrons produzido pela própria célula. Por exemplo, as leveduras crescem em meio contendo glicose na ausência de oxigênio (fermentação alcoólica), Figura 2.2. Após a produção de ácido pirúvico pela glicólise, as leveduras removem uma molécula de CO₂ do ácido pirúvico (pela ação da enzima descarboxilase) para formar o acetaldeído (equação 2.4). O acetaldeído recebe dois prótons do NADH₂ (reação catalisada pela enzima desidrogenase alcoólica) formando o etanol (equação 2.5). Este passo permite a regeneração do NAD para ser novamente utilizado na glicólise. Os co-fatores para a fermentação alcoólica são a vitamina B₁(tiamina) e o íon zinco (II) (NELSON e COX, 2002).

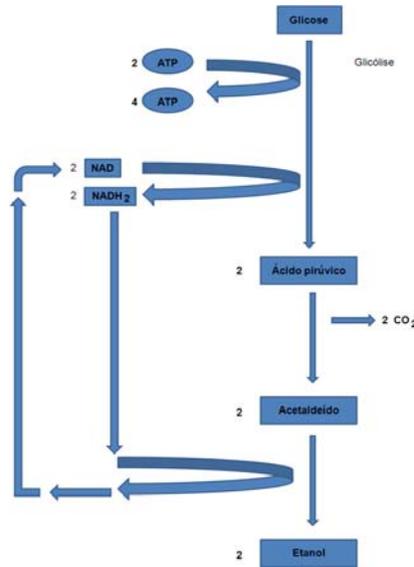


Figura 2.2. Fermentação alcoólica: NADH₂ reduz o acetaldeído a etanol.
Adaptado de PELCZAR et al. (1997).



A fermentação é um processo pouco eficiente na produção de energia, porque os produtos finais ainda contêm grande quantidade de energia química. No caso da produção de etanol, produto final produzido pelas leveduras, esta molécula possui grande conteúdo energético, fato de ser um excelente combustível e liberar grande quantidade de calor durante a queima.

A respiração é o processo de regeneração de NAD utilizando o NADH₂ como doador de elétrons para um sistema de transporte de elétrons. Se o oxigênio é o receptor final de elétrons do sistema de transporte de elétrons, o processo é chamado respiração aeróbia.

A respiração tem uma grande vantagem sobre a fermentação: não somente o NAD é regenerado, mas o sistema de transporte de elétrons produz uma força promotiva que pode ser dirigida para a síntese adicional de moléculas de ATP. Quando as células de leveduras crescem aerobicamente na presença de glicose, as moléculas de NADH₂ produzidas durante a glicólise podem doar seus elétrons para o sistema de transporte de elétrons que tem o

oxigênio como acceptor final de elétrons. Isso resulta não somente na regeneração do NAD, mas também na geração de uma força promotiva, a qual pode conduzir a síntese de moléculas adicionais de ATP (Figura 2.3) (NELSON e COX, 2002).

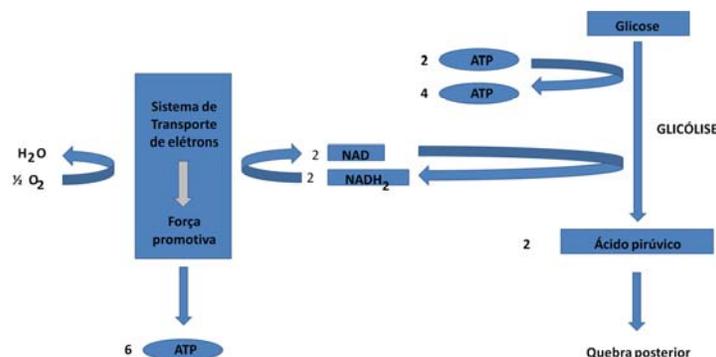


Figura 2.3. Respiração aeróbia onde o NADH₂ atua como doador de elétrons para um sistema de transporte de elétrons, que resulta na síntese de ATP.

Adaptado de PELCZAR et al. (1997).

A degradação da glicose por organismos aeróbios normalmente não pára com a produção do ácido pirúvico. Posteriormente a quebra inicia-se com a oxidação do ácido pirúvico pelo NAD a acetil-CoA (um ácido de dois carbonos, o ácido acético, ligado à coenzima A). Cada uma das duas moléculas de NADH₂ resultantes pode servir como doador de elétrons para um sistema de transporte de elétrons, com consequência síntese de ATP.

Cada uma das duas moléculas de acetil-CoA é condensada com um ácido de quatro carbonos, o ácido oxalacético, para formar um ácido de seis carbonos, o ácido cítrico. Este é o primeiro passo em uma seqüência de reações conhecidas como ciclo do ácido cítrico. Para cada duas moléculas de acetil-Co-A que entram no ciclo, acontecem os seguintes eventos:

1. Seis moléculas de NADH₂ são produzidas, as quais podem servir como doadores de elétrons para um sistema de elétrons, com subsequente síntese de ATP;
2. Duas moléculas de guanosina trifosfato (GTP) são geradas por fosforilação em nível de substrato. As duas moléculas de GTP são energeticamente equivalentes a duas moléculas de ATP (equação 2.6);



3. Duas moléculas da co-enzima no estado reduzido chamada flavina adenina dinucleotídeo (FAD) são produzidas. Cada FADH_2 pode servir como doador de elétrons para um sistema de transporte de elétrons, com subsequente síntese de dois ATPs.

No caso das leveduras respirando aerobicamente na presença de glicose, o total de ATP produzido pela quebra completa de uma molécula de glicose é de 38 moléculas de ATPs. Destes, 34 são formados quando NADH_2 e FADH_2 servem como doadores de elétrons para o sistema de transporte de elétrons da célula (Figura 2.4). O restante é formado pela fosforilação em nível de substrato durante a glicólise e o ciclo do ácido cítrico (NELSON e COX, 2002).

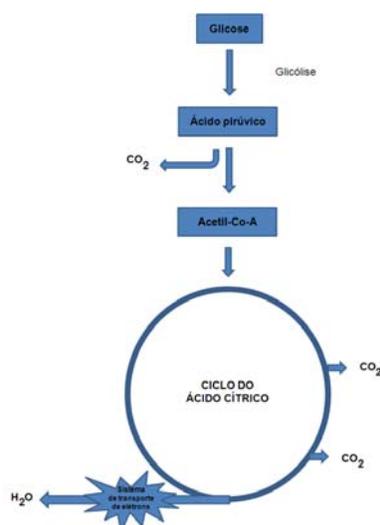


Figura 2.4. Produção de ATP pelas leveduras em crescimento aeróbio na presença de glicose. Adaptado de PELCZAR et al. (1997).

Quando as células de leveduras crescem anaerobicamente são produzidas pela fermentação somente duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose. Depreende-se que a respiração aeróbia é mais eficiente que a fermentação na extração de energia química da glicose.

Quando a levedura *S. cerevisiae* é cultivada na presença de sacarose como fonte de carbono, esta molécula é convertida extracelularmente em glicose e frutose pela ação da enzima invertase (β -frutofuranosidase, E.C.3.2.1.26) excretada pela levedura (Figura 2.5).

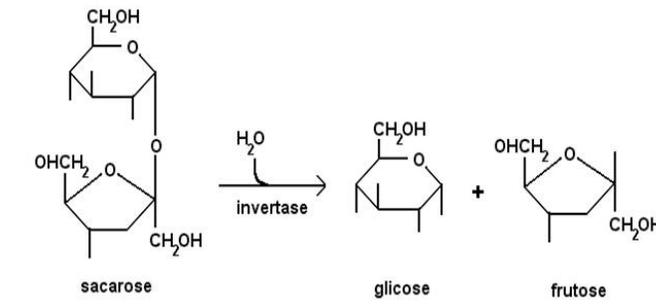


Figura 2.5. Equação da reação da hidrólise da sacarose catalisada pela enzima invertase em meio aquoso. A glicose e a frutose são açúcares redutores.

A glicose é, então, transportada para o interior da célula, provavelmente pelo mecanismo da difusão facilitada, e a glicose intracelular é imediatamente fosforilada (segundo a glicólise, vide Figura 2.1).

As principais rotas metabólicas da levedura *S. cerevisiae* são mostradas esquematicamente na Figura 2.6.

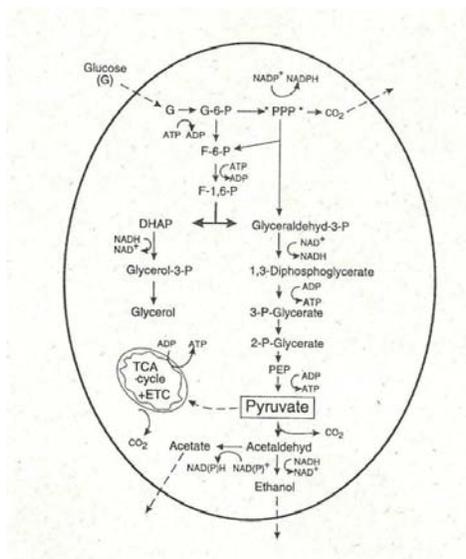


Figura 2.6. Rotas catabólicas básicas da levedura *S. cerevisiae* (LIDÉN, 1993).

Abreviações utilizadas: G = glicose; G-6-P = glicose-6-fosfato; F-6-P = frutose-6-fosfato; F-1,6-P = frutose-1,6-difosfato; DHAP = dihidróxiacetona fosfato; PPP = via da pentose fosfato; PEP = fosfoenolpiruvato; ciclo TCA = ciclo do ácido tricarboxílico; ETC – cadeia de transporte de elétrons.

O glicerol é um subproduto do processo de produção de etanol formado em maior quantidade. Ele é formado na mesma via de síntese do etanol, como um desvio, competindo com este pela utilização do poder redutor do NADH (LIDÉN, 1993).

A sua produção é inversamente à produção de etanol, o que causa uma queda na eficiência do processo. A formação de glicerol é função do tipo de levedura, da pressão

osmótica do meio de cultura, da formação de ácidos orgânicos (succínico e acético) e do crescimento da levedura (LIDÉN, 1993).

O glicerol é considerado um agente osmorregulador, pois sua formação é aumentada em meios com baixa atividade de água (alta pressão osmótica), determinada pela presença de solutos como açúcar e sais. BASSO et al. (1996) relatam que um aumento no teor do íon potássio de 100 para 10.000 mg/L aumentam significativamente a produção de glicerol. Apontam que a literatura descreve aumentos da ordem de dez vezes na concentração de glicerol ocorreram quando a concentração do íon potássio foi de 56.000 mg/L.

A explicação bioquímica para formação do glicerol reside no fato de que sua formação está acoplada à manutenção do equilíbrio redox intracelular (Figura 2.7). Como a biossíntese do glicerol utiliza o poder redutor do NADH, a produção do mesmo tem que ser aumentada quando há excesso de NADH na célula. Isto ocorre quando há uma maior produção de biomassa (crescimento) ou formação de ácidos orgânicos (succínico e acético).

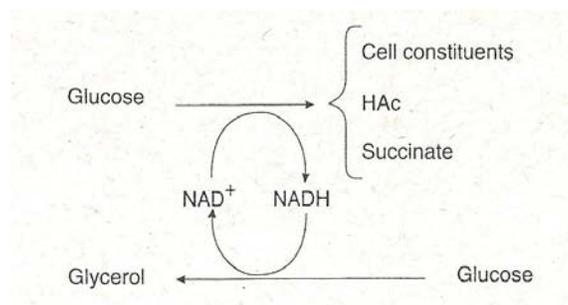


Figura 2.7. Esquema ilustrativo representando o glicerol como um agente redox durante o metabolismo anaeróbico da levedura *S. cerevisiae* (LIDÉN, 1993).

O catabolismo da glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com o objetivo de produzir ATP, pode ocorrer pela via aeróbia ou anaeróbia. A via glicolítica é comum as duas, tendo como produto final o piruvato. Na ausência de oxigênio, ocorre a via anaeróbia. Na Figura 2.8 apresenta-se diagrama esquemático do catabolismo da glicose (via aeróbia e anaeróbia) em células da levedura *S. cerevisiae*.

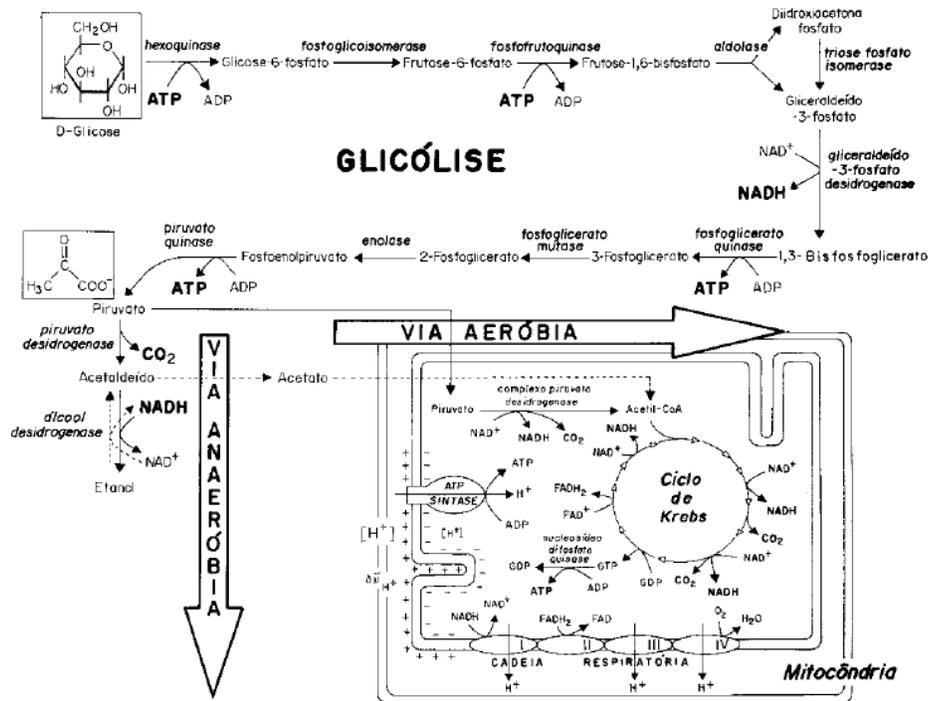


Figura 2.8. Diagrama esquemático do catabolismo da glicose em células da levedura *S. cerevisiae* (VOLPE e RETTORI, 2000).

2.3. Processos Fermentativos

O processo de produção de etanol mais simples no Brasil é o de produção de aguardente com fermentação em “batelada” e sem recirculação do fermento. O mosto (geralmente caldo de cana decantado e somente peneirado) é adicionado à dorna lentamente sobre o fermento (chamado “pé-de-cuba”) que ocupa um volume de 10 a 15% em relação ao volume total final (AMORIM, 1996).

Para a produção de etanol, a maioria das usinas emprega o processo em “batelada” com recirculação e tratamento de levedura (processo Melle-Boinot).

O processo em “batelada” é mais seguro quando se tem problemas de manutenção e de assepsia, pois ao final de cada batelada a dorna é esvaziada e realiza-se a assepsia, antes de iniciar nova fermentação.

O processo contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua do mosto a uma determinada vazão, sendo o volume de reação mantido constante pela retirada contínua do caldo fermentado. Estes processos, quando bem operados, levam a uma maior produtividade, porém com custos iniciais e de operação maiores, e exigindo sistemas de controle mais sofisticados. A fermentação contínua é um processo que requer maior conhecimento do comportamento da levedura em relação ao ambiente de cultivo. Variáveis

como pH, temperatura, concentrações de sacarose, etanol e células, além da viabilidade celular, exercem grande influência na produtividade do sistema (ATALA et al., 2000). FINGUERUT (2005) relata que nos processos de fermentação contínuos têm sido verificadas mutações nas células das leveduras, não só de comportamento fermentativo, como também relacionado às suas características genéticas.

Ao longo dos anos foram sendo selecionadas cepas com maior capacidade de produção de etanol tais como PE-1 e PE-2 (isolada na Usina da Pedra, Serrana-SP), CAT-1 (isolada na Usina Virgolino de Oliveira, Catanduva-SP) e BG-1 (isolada na Usina Barra Grande, Lençóis Paulista-SP).

Atualmente as usinas brasileiras operam com rendimento (calculado com base em subprodutos) na faixa de 90% (AMORIM et al., 2001). O teor alcoólico atingido ao final do processo encontra-se na faixa de 8,5 a 9,0 °GL (CTC, 2009).

2.4. O Etanol no Brasil

As mudanças climáticas e as oscilações no preço do petróleo ao longo dos anos (Figura 2.9) têm aumentado o interesse mundial pela busca por fontes alternativas de energia. O aumento na demanda por bioetanol, consequência da preocupação mundial em se reduzir as emissões de gases causadores do efeito estufa e do aumento nos preços do petróleo, tem incentivado a busca por meios de produção mais eficientes deste biocombustível.

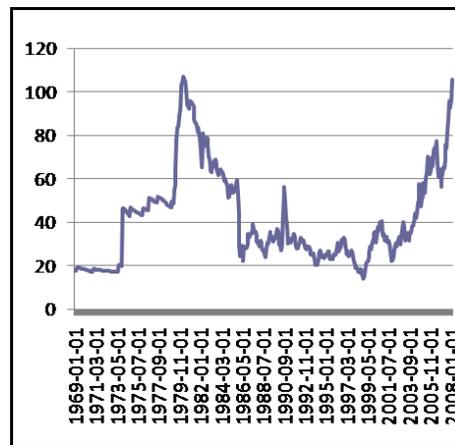


Figura 2.9. Evolução histórica do preço do barril de petróleo.

Fonte: <http://jccavalcanti.wordpress.com/2008/04/23/serie-historica-do-preco-do-barril-de-petroleo/>

A preocupação mundial com o aquecimento global e o aumento no preço do petróleo geram a expectativa de grande aumento na produção de bioetanol nos próximos anos. O

Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, que é a matéria-prima mais eficiente para produção de etanol atualmente, e o maior exportador e bioetanol, sendo que a produção em larga escala deste combustível já dura mais de 30 anos.

O bioetanol, produzido no Brasil a partir da cana-de-açúcar, é considerado um dos principais substitutos da gasolina, sendo empregado como combustível na forma hidratada (entre 92,6 a 93,8% INPM), no caso de motores movidos a álcool, ou na forma anidra (mínimo de 99,3% INPM), em mistura à gasolina. O Brasil é um dos países pioneiros na utilização do bioetanol como combustível.

Historicamente, foi a partir dos anos 30, com incentivo do governo para produção de álcool-motor, que o Brasil aumentou a produção de álcool anidro significativamente (AMORIM, 2005). A partir dos anos 70, mais precisamente 1975, com o lançamento do Programa Nacional do Álcool (Pro-Álcool), o setor industrial foi incentivado a incrementar a produção de álcool anidro, motivado pelo aumento na proporção da mistura álcool anidro na gasolina (AMORIM, 2005). A Tabela 2.1 apresenta a evolução do percentual de mistura do etanol anidro à gasolina no Brasil.

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 Pro-Álcool tornou-se o maior programa energético do mundo, com a utilização de combustível líquido alternativo, renovável e menos poluente (AMORIM, 2005).

Tabela 2.1. Proporção da mistura de álcool anidro à gasolina.			
Ano	Volume de álcool (L)	Volume de gasolina (L)	Porcentagem de etanol na gasolina (%)
1979	0,14	0,86	14
1980	0,17	0,83	17
1981	0,12	0,88	12
1982 - 1986	0,20	0,80	20
1987 - 2002	0,22	0,78	22
2002 - 2007	0,24	0,76	24
2007-2009	0,25	0,75	25

Fonte: ANP (2009).

Analisando o histórico da produção de etanol no Brasil (Figura 2.10) observa-se que a partir da safra 2000/01 houve um aumento na produção de etanol. Este aumento acentua-se a partir da safra 2002/03 com o advento da tecnologia *Flex-Fuel* (motores capazes de utilizar a mistura gasolina-álcool em qualquer proporção).

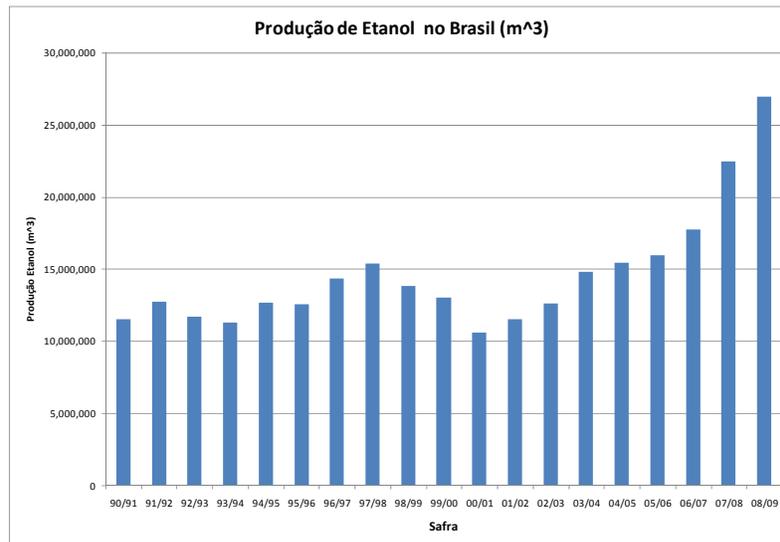


Figura 2.10. Evolução histórica da produção de etanol (anidro e hidratado) no Brasil.

Fonte UNICA (2009).

2.5. Fatores que influenciam na Fermentação Alcoólica

O principal microrganismo utilizado na fermentação alcoólica, em escala industrial, é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A espécie de levedura a ser escolhida para fermentação varia em função das características do mosto, operação com concentrações elevadas de etanol. *S. cerevisiae* tem como característica principal a fermentação de hexoses, crescimento em pH na faixa de 3,0 a 5,0 (ácido) o que minimiza problemas de contaminação durante o processo (SCHULER e KARGI, 2002).

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

As leveduras são mesófilas e possuem temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol na faixa de 26 a 35°C. O aumento da temperatura no meio fermentativo favorece a contaminação bacteriana, além de favorecer a toxidez da levedura pelo etanol (AMORIM et al., 2001). O aumento da temperatura também ocasiona uma maior formação de espuma no processo.

Outro microrganismo com grande potencial para produção de etanol é a bactéria *Zymomonas mobilis*. Esta bactéria tem algumas vantagens em relação a *S. cerevisiae* como: boa tolerância ao etanol, rendimentos próximos ao teórico, elevada velocidade de consumo de substrato e baixo crescimento celular (GUNASEKARAN e RAJ, 1990). Contudo, este microrganismo é muito sensível (cultivo em pH próximo da neutralidade) e exige condições estéreis de mosto, o que dificulta sua aplicação industrial nas atuais usinas brasileiras.

Outro fator importante para o controle da fermentação alcoólica é o pH do meio de cultivo. AMORIM (2001) relata que o pH ideal para fermentação alcoólica encontra-se entre 4 a 5. Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos de etanol, devido à baixa produção de glicerol. Esta condição também auxilia no controle da infecção, pois reduz o crescimento de bactérias contaminantes.

A contaminação bacteriana influencia de forma negativa a fermentação alcoólica, uma vez que a bactéria compete com a levedura pelo mesmo substrato e gera 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 (SKINNER e LEATHERS, 2004).

Sabe-se que as bactérias lácticas são as principais contaminantes do processo de fermentação alcoólica. A concentração dos ácidos láctico e acético é medida periodicamente para controle dos níveis de infecção. Testes com culturas puras de *S. cerevisiae* em presença de ácidos lácticos e acéticos demonstram que as mesmas se estressam e produzem menos etanol e biomassa (SKINNER e LEATHERS, 2004).

A contaminação bacteriana ocorre em diferentes tipos de substrato, como os provenientes do milho, do trigo e da cana-de-açúcar, entre outros. Por esta razão, 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 e LEATHERS, 2004).

A floculação da levedura pode estar associada à contaminação bacteriana, embora se conheça outras causas para o início da floculação, como, por exemplo, a contaminação por bagacilho. Este fenômeno é caracterizado pela aglutinação das células de levedura, formando flocos os quais se separam rapidamente do meio de cultivo, ficando suspensos. Há várias opiniões 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 (NAHVI et al., 2002).

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 à suplementação adequada de alguns elementos para obtenção de uma fermentação satisfatória (VASCONCELOS, 1987). Normalmente os compostos adicionados ao mosto são sulfatos de zinco, magnésio e manganês e difosfato de amônio.

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 influencia na melhor absorção do mesmo pela levedura. A forma amoniacal é mais favorável ao seu aproveitamento (VASCONCELOS, 1987). Na ausência desta forma, a levedura procura outras fontes como aminoácidos, que influenciam na formação de subprodutos, como alcoóis 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 alcoóis superiores ocorre devido à descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos, por isto é favorecido pela falta de nitrogênio amoniacal. Os parâmetros de fermentação também influenciam diretamente na formação destes alcoóis, como temperatura, pH e composição do meio (GUTIERRES, 1993).

Muito se discute em relação a 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 alimentação do mosto às dornas tem influência direta na produtividade e na eficiência da fermentação. Este controle é importante para que o processo fermentativo não sofra interrupção ou tenha sua velocidade reduzida pelo acúmulo excessivo de substrato (*sugar shock*). Este problema geralmente é controlado nas unidades industriais através do controle da concentração de açúcares redutores totais (ART) no meio de fermentação (VASCONCELOS, 1991).

Com o advento do Pro-Álcool, a produção brasileira de etanol teve um aumento de aproximadamente 48 vezes a produção da safra 1975/1976 (VASCONCELOS, 1987; ÚNICA, 2009). Dessa forma, a variável tempo de fermentação passou a ter grande importância e conseqüentemente as velocidades de enchimento das dornas passaram a ter papel fundamental para a produtividade do processo. Este fato está associado ao avanço tecnológico no processo.

2.6. Processos Industriais de Fermentação Alcoólica

No início dos anos sessenta, o processo clássico de fermentação de cortes era muito utilizado nas indústrias brasileiras. Este processo consistia em iniciar o enchimento de uma dorna, onde previamente fora adicionado o fermento, com mosto e ao término transferir metade de seu volume para outra dorna, iniciando a alimentação de mosto. E assim sucessivamente (BORZANI et al., 1975). Com a implantação do processo Melle-Boinot no Brasil, muitas usinas e destilarias iniciaram o processo de substituição do modelo de produção de cortes. O processo Melle-Boinot (batelada alimentada com reciclo de células) surgiu na França na década de trinta e se popularizou no Brasil no final da década de sessenta. Este modelo de processo contribuiu para evolução da fermentação alcoólica, devido as suas inúmeras vantagens, como a menor reprodução celular e elevado rendimento em etanol, eliminação dos contaminantes por centrifugação do meio fermentado, fermentação mais pura com utilização do tratamento ácido e eliminação do preparo de cultura pura, devido ao reciclo de fermento (ANDRIETTA, 1994).

O processo Melle-Boinot trouxe vários benefícios à fermentação alcoólica, tais como, o reaproveitamento do fermento, que antes era enviado para coluna de destilação, juntamente com o vinho. Com isto o rendimento fermentativo aumentou, pois menor quantidade de açúcar era necessária para produzir um maior volume de álcool, uma vez que se reduziu a massa de açúcar destinada à produção de células. Entretanto, com o tempo, descobriram-se algumas desvantagens do processo. A centrifugação não eliminava todos os microrganismos, 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. Com vantagens e desvantagens descobertas ao longo do tempo, o processo Melle-Boinot é, ainda, o método mais usado até hoje pelas destilarias do Brasil (AMORIM, 2005).

Um processo químico pode ser classificado com base no procedimento de entrada e retirada de matéria em: processo em batelada (descontínuo), semi-contínuo e contínuo. Em

uma fermentação descontínua, o substrato é inicialmente carregado em um recipiente e, ao término do processo, o produto é retirado do mesmo. Em uma fermentação contínua, a matéria-prima é adicionada com uma vazão constante e o meio fermentado é retirado com a mesma vazão de alimentação. No processo de fermentação semi-contínuo, o meio de cultura é adicionado ao longo do processo, sendo o produto retirado somente ao término (BORZANI, 2001).

O processo contínuo tem como característica principal, a operação em regime permanente. Este modelo é pouco utilizado pelas usinas, pelo excessivo grau de controle necessário e pela necessidade de garantir a esterilidade do processo. Testes realizados em escala 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, 2001).

A cana de açúcar é a principal matéria-prima para produção de álcool no Brasil. É composta por fibra e caldo (água e sólidos solúveis totais). A Tabela 2.2 apresenta a composição média da cana-de-açúcar (COPERSUCAR, 2009).

Tabela 2.2. Composição média da cana-de-açúcar	
Composição	Teor
Água	65 - 75
Açúcares	11 - 18
Fibras	8 - 14
Sólidos solúveis	12 - 23

A Tabela 2.3 apresenta os principais constituintes da cana-de-açúcar (COPERSUCAR, 2009).

Tabela 2.3. Principais constituintes da cana-de-açúcar	
Constituintes	Sólidos solúveis (%)
Açúcares	75 a 93
Sacarose	70 a 91
Glicose	2 a 4
Frutose	2 a 4
Sais	3,0 a 5,0
De ácidos inorgânicos	1,5 a 4,5
De ácidos orgânicos	1,0 a 3,0
Proteínas	0,5 a 0,6
Amido	0,001 a 0,05
Gomas	0,3 a 0,6
Ceras e graxas	0,05 a 0,15
Corantes	3 a 5

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 a fábrica de açúcar, utiliza-se mel proveniente da centrifugação do açúcar, que contém teor de açúcar acima de 65% para preparo do mosto, juntamente com o caldo, tendo o brix ajustado para a faixa entre 19 a 23. O mosto preparado para fermentação contém minerais e nutrientes orgânicos, suficientes para se iniciar a fermentação (WHEALS, 1999). A Figura 2.11 ilustra um típico fluxograma do processo fermentativo.

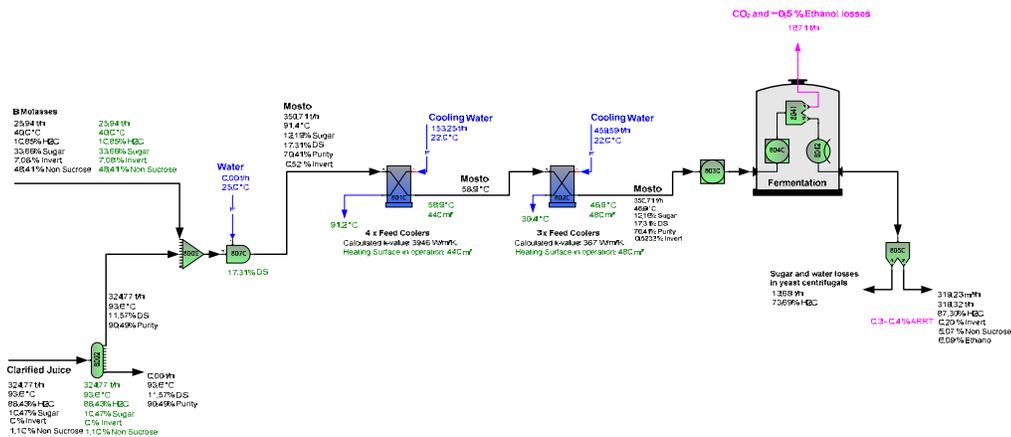


Figura 2.11. Ilustração de um fluxograma típico do processo fermentativo.

No Brasil, 70% das usinas utilizam processo batelada. O processo contínuo também é usado em algumas usinas. Ambos os processos utilizam centrifugação para separar o creme de levedura do vinho e reutilização deste creme no processo. O creme, geralmente é tratado com ácido sulfúrico para reduzir a contaminação por bactéria e correção do pH (WHEALS, 1999)

A utilização de altas concentrações do inóculo (8-17% em base úmida) e temperaturas na faixa de 33 a 35°C contribuem para redução do crescimento celular e aumento da produção de álcool (10 a 12 °GL), gerando rendimento de etanol da ordem de 90 a 92%. O curto tempo de fermentação (6 – 8 h) tem importância dentro do processo fermentativo pois é uma das variáveis que afeta, diretamente, a produtividade em etanol e ainda permite que a levedura seja reciclada até 3 vezes por dia, durante 200 dias de safra. A contaminação bacteriana pode ocorrer, mas ela é controlada pelo uso de antibióticos. Algumas usinas possuem avançadas tecnologias em controle e automação (WHEALS, 1999).

2.7. Cinética da Fermentação

Os processos bioquímicos são muito dinâmicos quando comparados aos processos químicos, devido à complexidade dos sistemas biológicos.

O estudo matemático da cinética microbiana tem como base duas fases (LEVEAU, 1985):

- 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 único que descreva adequadamente o processo de produção de etanol. Além do que, as condições para fermentação alcoólica são muito mais severas do que o meio 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 influem nesta velocidade de transformação e correlacioná-los por meio de equações

matemáticas. Uma vez descoberto os fatores que influenciam na velocidade de transformação, temos uma ferramenta de otimização de processo (COPERSUCAR, 1987).

Em uma fermentação ocorrem muitas transformações ao mesmo tempo: células crescem, se reproduzem e morrem, substâncias diversas existentes no meio são consumidas pelos microorganismos e produtos de metabolismo são lançados no meio (Figura 2.12). No caso da fermentação alcoólica, os principais fatores a se medir são: a variação da concentração de células com o tempo, a variação da concentração de substrato (açúcares fermentescíveis) com o tempo e a variação da concentração de etanol com o tempo. Outras substâncias como CO_2 ou variação de nutrientes, podem ser medidas eventualmente (SHULER e KARGI, 2002).

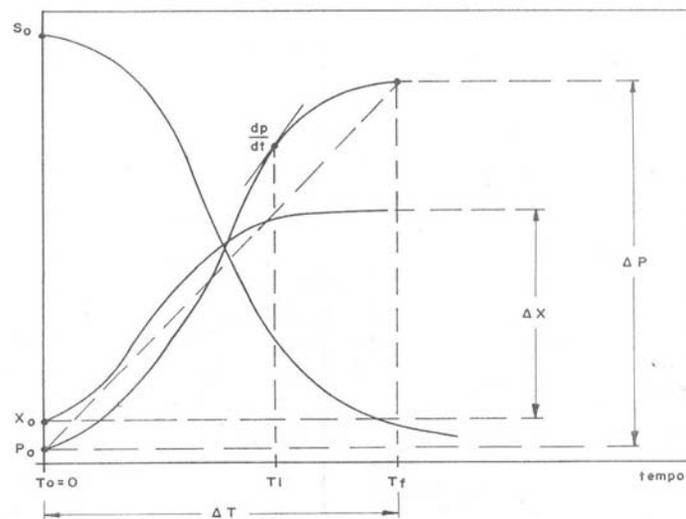


Figura 2.12. Variação das concentrações de substrato (S), células (X) e produto (P) com o tempo em um processo descontínuo.

Considerando os parâmetros:

S = Concentração de substrato presente no meio em um instante t;

X = Concentração dos microorganismos presentes no meio em um instante t;

P = Concentração de produto presente no meio em um instante t.

A Figura 2.12 representa o comportamento de um processo fermentativo descontínuo, onde enquanto ocorre consumo de substrato, ocorre também formação de produto e célula. A partir da curva apresentada na Figura 2.12 é possível determinar as velocidades médias de transformações em um período de tempo (equações 2.1 a 2.3).

$$-\frac{r_s}{\Delta t} = \frac{\Delta S}{\Delta t} = \frac{(S_o - S_f)}{(t_f - t_o)} \quad (2.1)$$

$$-\frac{r_p}{\Delta t} = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{(P_o - P_f)}{(t_f - t_o)} \quad (2.2)$$

$$-\frac{r_x}{\Delta t} = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{(X_o - X_f)}{(t_f - t_o)} \quad (2.3)$$

Estas velocidades médias de transformação do processo auxiliam 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 das relações (equações 2.4 a 2.6).

$$r_s = -\frac{\Delta S}{\Delta t} \left[\frac{g}{L \cdot h} \right] \quad (2.4)$$

$$r_x = -\frac{\Delta X}{\Delta t} \left[\frac{g}{L \cdot h} \right] \quad (2.5)$$

$$r_p = -\frac{\Delta P}{\Delta t} \left[\frac{g}{L \cdot h} \right] \quad (2.6)$$

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 outras fermentações, onde a formação de produto está indiretamente associada à utilização do substrato, como por exemplo, a produção de ácido cítrico. E ainda podemos citar as fermentações onde a síntese do produto está aparentemente não 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, possui 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 CO₂

ou O_2 contidos no meio. A classificação compreende, fermentação simples, onde 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 metabólito intermediário; e *stepwise*, onde os nutrientes são convertidos em metabólitos intermediários e posteriormente convertidos em produto (COPERSUCAR, 1987).

A fermentação simples pode ser de dois tipos, com ou sem crescimento de microorganismo associado, como se observa nas Figuras 2.13 e 2.14, respectivamente.

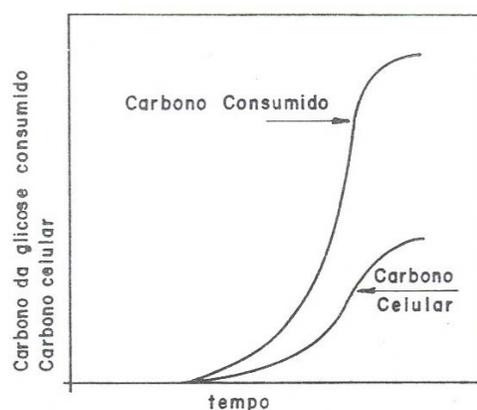


Figura 2.13. Reação simples representativa do crescimento de *Aerobacter cloacaer*.

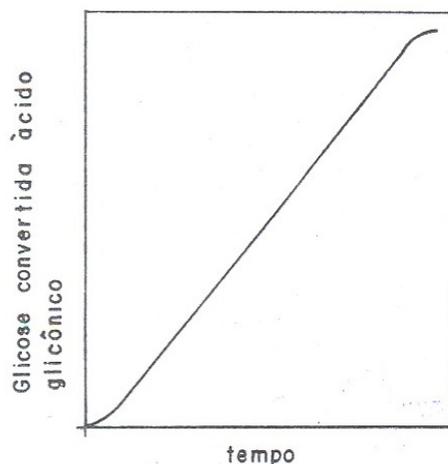


Figura 2.14. Reação simples representativa da conversão de glicose em ácido glicônico por micélio de *Aspergillus niger* ressuspendido.

A cinética da fermentação alcoólica é um assunto de interesse dos centros de pesquisa especializados, tendo em vista seu potencial industrial e econômico (LIMA e MARCONDE, 2002). O objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é quantificar as taxas de crescimento celular, de consumo de substrato, de formação de produtos e demais parâmetros relacionados (VIEGAS, 2003). A complexidade da descrição cinética que é requerida e apropriada depende das situações físicas e da aplicação pretendida. Não é possível a formulação de um modelo que inclua todas as características e detalhes celulares (STREMEL, 2001). Os modelos cinéticos normalmente usados em fermentações podem ser divididos em (BAILEY e OLLIS, 1986):

- Não estruturados e não segregados, nos quais as células de microorganismos são consideradas como soluto;
- Estruturados e não segregados, onde as células são tratadas como seres individuais de múltiplos componentes, porém com composição média semelhante;
- Não estruturados e segregados, onde as células são tratadas como seres individuais distintos, porém descritos por um único componente; e
- Estruturados e segregados, onde as células de microorganismos são consideradas como indivíduos distintos e formados de múltiplos componentes.

O tipo de modelo mais encontrado na literatura para descrever a fermentação alcoólica é do tipo não estruturado e não segregado. A equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que considera a presença de substrato como limitante para o crescimento (HAN e LEVENSPIEL, 1988). A cinética de Monod está apresentada na Tabela 2.2, pela Eq. 2.10 e é aplicável somente quando não ocorre a presença de produtos metabólicos tóxicos (LUONG, 1985).

THATIPAMALA et al. (1992) verificaram na fermentação alcoólica o rendimento de biomassa com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* diminuiu de 0,156 para 0,026 com o aumento da concentração de etanol de 0 a 107 g/l, indicando uma relação entre o rendimento da biomassa e a inibição pelo produto. Estes autores propuseram um modelo para representar a diminuição do coeficiente de rendimento célula-substrato ($Y_{X/S}$) com o aumento das concentrações iniciais de etanol e de substrato e a diminuição da taxa de crescimento específico com o aumento da concentração inicial de substrato. Foi considerado um modelo específico para a fase de adaptação (fase lag) e observaram experimentalmente que a inibição pelo substrato afetou mais o rendimento em etanol do que a inibição pelo produto, por

provocar a diminuição da viabilidade celular. Observaram ainda que a fase *lag* aumentou com o aumento da concentração inicial de substrato.

A inibição do crescimento celular devido à concentração de etanol é evidenciada acima de 15g/l. A concentração máxima de etanol permitida, acima da qual as células não crescem, foi predita em 112g/l. A capacidade de produção de etanol em que as células são completamente inibidas foi de 115 g/L de etanol (LUONG, 1985; FERREIRA, 1998). Além da inibição provocada pela presença de etanol, outro fator a ser avaliado é a limitação relacionada ao crescimento microbiano ao substrato ou mesmo a outras substâncias presentes no meio (HAN e LEVENSPIEL, 1988). A inibição pelo substrato desativa importantes enzimas, além de modificar o caminho metabólico que é vital para a sobrevivência da levedura. O efeito inibidor provocado pelo substrato na fermentação alcoólica ocorre quando a concentração supera 150g/l (THATIPAMALA et al., 1992).

A fermentação alcoólica é também afetada pela temperatura do biorreator, onde o rendimento alcoólico é maior em temperaturas mais baixas, 15°C a 20°C, porém apresentam uma demora para obtenção da população máxima. Quando a temperatura no biorreator é de 25°C a 30°C a taxa inicial de fermentação é maior e a temperaturas superiores a 35°C decresce a viabilidade celular (TORIJA et al., 2003) e podem ocorrer perdas e contaminações. O intervalo de temperatura usual em indústrias é de 31 a 33 °C (AMORIM, 2005).

Um modelo para a produção de etanol a partir de uma mistura de glicose e maltose foi proposto por LEE et al. (1995), que incluiu um termo representando o efeito de repressão da glicose no consumo de maltose. FERREIRA et al. (1998) estimaram os parâmetros do modelo cinético de Andrews, citado por LUONG (1987), considerando concentrações iniciais de substrato na faixa de 5 a 190 g/l, por meio de experimentos num reator em batelada usando *Saccharomyces cerevisiae*. BARBA et al. (2001) estimaram os parâmetros do modelo de crescimento para a fermentação de soro usando *K. lactis* por meio de experimentos em batelada e batelada alimentada. Os dados experimentais de dois testes em batelada e os pontos experimentais da fase batelada do teste em batelada alimentada foram utilizados para a estimação dos parâmetros. O modelo foi validado pelo experimento em batelada alimentada.

TOSETTO (2002) analisou o comportamento cinético da cepa de levedura Y904 em nove diferentes matérias-primas provenientes de unidades produtoras de açúcar e álcool. Foram estudadas as cinéticas de produção de etanol, células e de consumo de substrato, assim como o desempenho da cepa em cada matéria-prima com relação à produtividade e

rendimento em etanol. Para a avaliação cinética, foram utilizados seis modelos do tipo não estruturado. Os que mais se adequaram aos dados experimentais, com a utilização de um único substrato e concentrações iniciais de sacarose entre 150 e 190 g/L, foram os modelos de GHOSE e THYAGI (1979), com o parâmetro n diferente de um, e o de JIN et al. (apud TOSETTO, 2002). Em todos os ensaios realizados, observou-se que a velocidade específica de produção de etanol esteve vinculada à velocidade específica de crescimento microbiano até determinada fase da fermentação. Após esta fase, a diminuição da velocidade de crescimento microbiano não causou a diminuição da velocidade específica de produção de etanol, mostrando que as mesmas não estão mais associadas. VASCONCELOS et al. (1992) testaram dez modelos cinéticos para o processo de fermentação alcoólica industrial em batelada alimentada, com vazão variável de alimentação e reciclo do microrganismo agente da fermentação (*S. cerevisiae*). Foram realizados vinte e dois ensaios experimentais na destilaria anexa à Usina Seresta – AL, utilizando mosto de caldo de cana-de-açúcar. O volume de operação dos fermentadores foi de aproximadamente 145.000 litros. Os autores concluíram que o modelo o qual considerou a inibição pelo produto na forma parabólica, foi o que apresentou os melhores ajustes dos resultados experimentais.

Os resultados experimentais do processo simultâneo de sacarificação e fermentação de bagaço a etanol usando uma cepa recombinante *S. cerevisiae* YPB-G foram avaliados por KROUMOV et al. (2006) para desenvolver um modelo não estruturado de nível bi-hierárquico. O desenvolvimento do modelo incluiu uma aplicação da metodologia de análise da superfície de resposta para avaliar os parâmetros chave dos modelos cinéticos e analisar a taxa de síntese de enzimas amilolíticas.

LAKANA et al. (2007) utilizaram sorgo suplementado com 0,5% de sulfato de amônia da concentração inicial de células e de açúcar como substrato para a produção de etanol por *S. cerevisiae* TISTR 5048 pelo processo em batelada e em batelada alimentada. Os autores verificaram que na fermentação em batelada quanto maiores as concentrações de substrato, maiores as concentrações de produto, o rendimento Y_p e o tempo de fermentação, e que os parâmetros cinéticos são dependentes da concentração inicial de células e de açúcar. Para a fermentação em batelada alimentada, foi determinada a estratégia ótima de alimentação de substrato, e concluíram que a quantidade de açúcares totais consumida no final dos experimentos foi similar para os dois processos, enquanto a concentração máxima de etanol e o rendimento de etanol no processo em batelada

foram inferiores com relação ao processo em batelada alimentada. Entretanto a produtividade foi menor no processo em batelada alimentada.

Embora o efeito de inibição pelo etanol seja considerado nos modelos do tipo Aiba, estes modelos prevêem que a concentração de etanol pode tender a valores infinitos antes que o crescimento celular seja completamente inibido, o que parece pouco razoável. Por outro lado, quando a fermentação contínua de etanol é operada a uma baixa taxa de diluição, e especialmente no caso onde a concentração de açúcar do meio é baixa, a concentração de açúcar limitante pode não ser detectável. Nestas condições, as taxas específicas para crescimento celular e produção de etanol seriam nulas, o que também não é correto, uma vez que o meio com células e etanol na prática é continuamente produzido. Portanto, apesar destes modelos serem amplamente citados na literatura desde que foram propostos, pouca discussão tem sido feita quanto a estas inconsistências estruturais. BAI et al. (2008) discutem a carência claramente demonstrada nos estudos publicados sobre o tema: as equações cinéticas são restritas a faixas de validade muito estreitas e distantes das encontradas no processo industrial; os parâmetros cinéticos estimados demonstram forte correlação e não são estatisticamente tratados e poucos estudos tratam do efeito da temperatura sobre estes modelos.

A Tabela 2.4 apresenta vários modelos da cinética da fermentação alcoólica formulados por diversos autores considerando os efeitos inibitórios.

Tabela 2.4. Modelos matemáticos existentes na literatura para a fermentação alcoólica (BORGES, 2008).		
Referência	Modelo	Nº Eq.
Sem inibição (Monod)	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s}$	2.7
<i>Aiba et al., (1968)</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s} \exp(-k_2 \times p)$	2.8
	$v = v_{max} \frac{s}{k_s + s} \exp(-k_2 \times p)$	2.9

Aiba et al., (1969)	$\mu = \frac{\mu_m}{1 + p/k_p} \frac{s}{k_s + s}$	2.10
Aiba et al., (1969)	$v = \frac{v_m}{1 + p/k'_p} \frac{s}{k'_s + s}$	2.11
Ghose e Thyagi, (1979)	$\mu = \mu_m \frac{s}{s + k_s + s^2/k_i} \left(1 - \frac{p}{p_{\max}}\right)$	2.12
Levenspiel, (1980)	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s} \left(1 - \frac{p}{p_{\max}}\right)^n$	2.13
Hoppe e Hansford, (1982);	$\mu = \mu_m \frac{k_p}{k_p + p} \frac{s}{k_s + s}$	2.14
apud Gòdia et al., (1988)	$v = v_m \frac{k'_p}{k'_p + p} \frac{s}{k'_s + s}$	2.15
Lee et al.,(1983)	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s}\right) \left(1 - \frac{p}{p_{\max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m$	2.16
Sevely et al., (1980); apud Dourado, (1987)	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s}\right) \left(\frac{k_p}{p + k_p}\right) \left(1 - \frac{p}{p_{\max}}\right)$	2.17
Jin et al., (1981); apud Dourado, (1987)	$\mu = \mu_m \exp(-k_1 p - k_2 s) \left(\frac{s}{k_s + s}\right)$	2.18
Han e Levenspiel, (1988)	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s(1 - l/l_{\max})^m + s}\right) \left(1 - \frac{l}{l_{\max}}\right)^n$	2.19

<i>Andrews e Noack</i>	$\mu = \mu_m \left(\frac{1}{1 + k_s/s + s/k_i} \right)$	2.20
<i>Webb</i>	$\mu = \mu_m \frac{s(1 + ks/k'_s)}{k_s + s + s^2/k'_s}$	2.21
<i>Yano et al</i>	$\mu = \mu_m \left(\frac{1}{1 + k_s/s + \sum_j (s/k_i)^j} \right)$	2.22
<i>Teissier-type</i>	$\mu = \mu_m [\exp(-s/k_i) \exp(-s/k_s)]$	2.23
<i>Webb *</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{s + k_s(1 + s/k_i)} \exp(1,17\sigma)_*$	2.24
<i>Wayman e Tseng, (1976)</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{s - k_s}, s < s'$	2.25
	$\mu = \mu_m \frac{s}{s + k_s} - k_i(s - s'), s > s'$	2.26
<i>Dagley e Hinshelwood</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{s + k_s} (1 - kp)$	2.27
<i>Holzberg et al.</i>	$\mu = \mu_m - k(p - k_i)$	2.28
<i>Jerusalimskye Neronova</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s} \frac{k_i}{k_i + p}$	2.29
<i>Bazua e Wilke,(1977)</i>	$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{p}{p_{max}} \right)^{0,5} \frac{s}{k_s + s}$	2.30
<i>Aboutboul et al., (1988)</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s + (s^2/k_i)} \exp(-k_p p)$	2.31
	$v = v_{max} \frac{s}{k'_s + s + (s^2/k'_i)} \exp(-k'_p p)$	2.32
<i>Thatipamala et al., (1992)</i>	$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{p}{p_{max}} \right)^n$	2.33
	$\mu = \mu_m \left(\frac{s_{max} - s}{s_{max} - s_{min}} \right)$	2.34

<i>Andrews, (1968)</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s + s^2/k_i}$	2.35
<i>Stepanova e Romanovskii, (1965)</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s + s^2/k_i} \left(\frac{k_p}{k_p + s} \right)$	2.36
<i>Han e Levenspiel, (1987); apud Ferreira, (1998)</i>	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s} \right) \left(1 - \frac{s}{s_{max}} \right)^m \left(1 - \frac{p}{p_{max}} \right)^n$	2.37
<i>Aiba et al., (1968), acoplado ao de Edwards, (1987); apud Ferreira, (1998)</i>	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s} \right) \exp[-(k_1 s + k_2 p)]$	2.38
<i>Wang e Sheu, (2000)</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s + s^2/k_i} \left(\frac{k_p}{k_p + p + p^2/k_1} \right)$	2.39
	$v = v_{max} \frac{s}{k'_s + s + s^2/k'_i} \frac{k'_p}{k'_p + p + p^2/k'_1}$	2.40
<i>Tosetto, (2002)</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s + s^2/k_i} \left(1 - \frac{p}{p_{max}} \right)^n$	2.41
<i>Andrietta et al., (2003)</i>	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s + s^2/k_i} \left(1 - \frac{p}{p_{max}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right)^m$	2.42

*Onde σ é a força iônica.

A multiplicidade de modelos cinéticos que descrevem o crescimento microbiano é devido ao fato destes serem construídos para uma levedura específica, em condições experimentais pré-definidas (DOURADO et al., 1987).

Diversos fatores como a evaporação e perdas do processo, adição de soluções de ácidos e bases para o controle do pH, adição de antiespumante, produção de substâncias que mudam o volume do meio, crescimento celular, entre outros, podem afetar significativamente as várias concentrações e, conseqüentemente, os valores dos parâmetros calculados. O volume de biomassa no meio fermentativo, por exemplo, pode apresentar efeitos sobre os valores dos rendimentos, eficiências, produtividades, taxas de consumo e produção, calculados a partir das concentrações de substrato e de

produto medidas em experimentos. BORZANI (2003) propõe correções que consideram tal efeito nos processos em batelada.

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

Com base na revisão bibliográfica e informações industriais, foi levantado que:

- ✓ O processo de fermentação em batelada alimentada apresenta menores riscos de contaminação, maior flexibilidade de operação, e controle da concentração de substrato no fermentador (diminui os efeitos inibitórios desfavoráveis à produção de etanol) quando comparado aos processos contínuo e batelada convencional;
- ✓ As leveduras *S. cerevisiae* são microrganismos de alta eficiência fermentativa, sendo que algumas cepas industriais, com características diferenciadas, são mais tolerantes aos produtos da fermentação. Apesar de haver outros microrganismos que apresentam alta eficiência fermentativa, a possibilidade de empregá-los em indústrias, principalmente no Brasil, ainda é muito pequena;
- ✓ Considerando os modelos cinéticos apresentados, o modelo de GHOSE e THYAGI (1979) modificado por TOSETTO (2002), que considera inibições pelo substrato e pelo produto, descreveu adequadamente as fermentações conduzidas em algumas indústrias brasileiras quando comparado a outros modelos apesar dos parâmetros não terem apresentado significado físico.

Em virtude destes fatores, o processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada pela levedura *S. cerevisiae* foi escolhido como objeto de estudo no presente trabalho. O desempenho do processo em batelada alimentada devido à variação do tempo de enchimento e da concentração de sacarose na alimentação foi avaliado por meio da produção de etanol, do rendimento e da produtividade.

2.8. Considerações Finais

A partir da revisão bibliográfica realizada fica evidente a importância de se realizar um estudo da influência do perfil de alimentação do mosto e da concentração do inóculo na produtividade em etanol do processo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este item descreve os principais materiais e metodologias de análises empregadas neste trabalho.

3.1. Testes Fermentativos

Os testes fermentativos tanto em escala industrial quanto em escala piloto foram realizados em usina localizada no estado de São Paulo.

3.1.1. Testes Fermentativos: Dorna Industrial

A unidade de fermentação da usina é composta por 15 dornas de 400 m³, com volume útil de trabalho de 360 m³ e seis pré-fermentadores de 60 m³. O processo de fermentação realizado é do tipo “batelada alimentada”, com reutilização de fermento (processo Melle-Boinot). O sistema de filtração do vinho levedurado é composto por cinco filtros tipo cesto, pressurizados a 2,1 kgf/cm² e por seis centrífugas industriais, sendo quatro com vazão de operação de 80 m³/h e duas com vazão de 90 m³/h. O resfriamento do mosto é realizado por dois conjuntos de trocadores de calor a placas, sendo o primeiro composto por quatro trocadores os quais são alimentados com água “bruta” (água proveniente da captação do rio) e o segundo composto por três trocadores que utilizam como fluido de resfriamento água proveniente da torre de resfriamento.

As dornas de fermentação possuem sistemas de resfriamento tipo serpentinas, com exceção da dorna de número um, que possui sistema de resfriamento por trocador de calor a placas.

As fermentações são monitoradas e controladas por meio de sistema de automação, onde são monitorados parâmetros como a temperatura, o volume da dorna, a vazão de alimentação de mosto, o pH e o brix. Por meio do sistema de aquisição de dados é possível programar o enchimento da dorna pela manipulação da vazão de mosto. A Figura 3.1 apresenta um esquema ilustrativo do sistema de fermentação em escala industrial existente na usina.

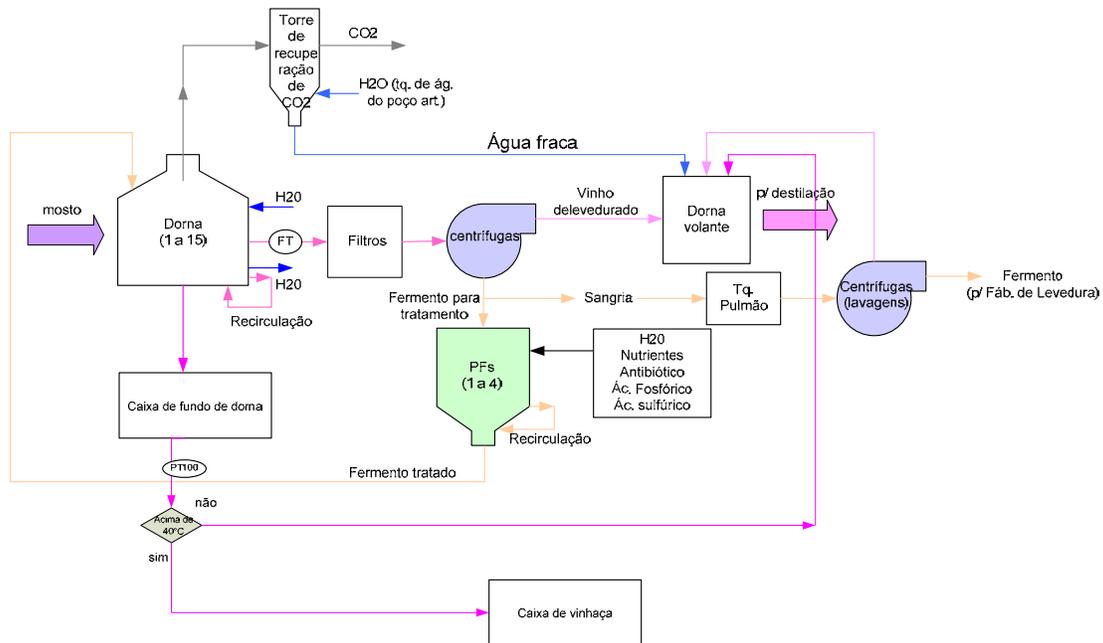


Figura 3.1. Diagrama ilustrativo do sistema de fermentação em escala industrial.

Obs: Nesta figura, o termo “água fraca” refere-se à solução hidroalcoólica obtida na saída da torre de recuperação de etanol, com teor de álcool da ordem de 1 °GL.

3.1.2. Testes Fermentativos: Escala Piloto

No presente trabalho foi utilizada também uma unidade de fermentação em escala piloto para a realização de cultivos. A dorna de fermentação neste sistema tinha volume total de 40 L (volume útil 36 L) o que corresponde a uma escala 10.000 vezes menor que a industrial. A dorna teste 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 apresenta uma fotografia do sistema experimental utilizado nos cultivos em escala piloto.



Figura 3.2. Fotografia da unidade de fermentação experimental em escala piloto.

úmida) e tendo pH entre 2,2 a 2,8, com o objetivo de minimizar a infecção do processo. O controle de temperatura da dorna mantinha a mesma em valores inferiores a 35°C, com “set-point” ajustado em 32°C.

Após a adição do inóculo, os cultivos tiveram início com a alimentação do mosto (fase semicontínua) até o enchimento da dorna. O processo prosseguia 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 mosto de alimentação (% m/m), teor de etanol (° GL) e vazão de alimentação F (em m³/h, dorna industrial ou L/h, dorna piloto). A Tabela 3.1 apresenta as condições dos ensaios industriais realizados. A Tabela 3.2 apresenta informações sobre os ensaios realizados em escala piloto.

Tabela 3.1. Dados coletados dos testes em escala industrial.

Teste	Cx(BU) inicial - (%)	massa celulas-inicio (ton)	Inóculo (%)	oGL-inicial	Tempo fermentação (h)	F (m3/h)	Taxa diluicao(D) - h-1	Cx(BU) final - (%)	oGL-final
Indus_2h_2	14,20	2,34	1,97	4,06	13,00	155,00	0,43	3,63	9,44
Indus_2h_2	14,54	2,40	2,02	3,66	16,00	155,00	0,43	4,68	9,90
Indus_4h_2	14,54	2,40	2,02	3,92	14,00	77,50	0,22	5,08	8,28
Indus_4h_2	14,60	2,41	2,03	3,66	12,00	77,50	0,22	5,10	7,84
Indus_2h_2	14,85	2,45	2,06	3,66	15,00	155,00	0,43	5,50	8,86
Indus_2h_2	15,38	2,54	2,14	3,92	13,00	155,00	0,43	4,15	10,29
Indus_4h_2	15,52	2,56	2,16	4,41	12,00	77,50	0,22	3,33	8,28
Indus_6h_2	18,00	2,97	2,50	4,76	13,00	51,50	0,14	4,62	8,56
Indus_4h_3	20,30	3,35	2,82	3,52	12,00	77,50	0,22	3,33	8,86
Indus_2h_3	21,10	3,48	2,93	3,78	12,00	155,00	0,43	5,26	9,58
Indus_4h_3	21,17	3,49	2,94	3,78	12,00	77,50	0,22	4,02	9,14
Indus_4h_3	21,30	3,51	2,96	3,52	11,50	77,50	0,22	5,26	10,38
Indus_2h_3	21,50	3,55	2,99	4,06	11,50	155,00	0,43	5,26	8,42
Indus_2h_3	21,60	3,56	3,00	3,78	11,50	155,00	0,43	5,11	8,42
Indus_4h_3	21,60	3,56	3,00	4,20	11,00	77,50	0,22	6,45	8,56
Indus_2h_3	21,70	3,58	3,01	3,66	13,00	155,00	0,43	4,90	10,48
Indus_6h_3	22,70	3,75	3,15	3,38	11,50	51,50	0,14	6,00	8,86
Indus_6h_3	23,07	3,81	3,20	3,66	12,00	51,50	0,14	3,84	8,28
Indus_2h_3	23,70	3,91	3,29	3,78	11,00	155,00	0,43	5,71	8,72
Indus_6h_3	20,50	4,06	3,42	3,10	9,00	30-70	-	5,11	8,28
Indus_6h_3	26,10	4,31	3,63	3,38	10,50	51,50	0,14	5,71	8,72
Indus_6h_3	27,00	4,46	3,75	4,41	12,00	51,50	0,14	5,36	9,30
Indus_6h_5	29,80	5,90	4,97	4,34	12,00	30-70	-	6,56	10,62
Indus_6h_5	30,50	6,04	5,08	5,04	15,00	30-70	-	6,15	12,90
Indus_6h_6	39,10	7,74	6,52	6,30	12,00	30-70	-	7,19	11,66
Indus_2h_6	48,70	8,04	6,76	6,14	7,50	155,00	0,43	10,78	9,30
Indus_2h_6	48,90	8,07	6,79	5,16	7,50	155,00	0,43	8,03	9,58
Indus_6h_6	49,20	8,12	6,83	6,42	9,00	51,50	0,14	8,09	10,02
Indus_4h_6	49,60	8,18	6,89	6,86	8,00	77,50	0,22	8,57	8,86
Indus_6h_6	49,80	8,22	6,92	8,86	9,50	51,50	0,14	8,14	9,88
Indus_2h_6	50,00	8,25	6,94	8,56	7,00	155,00	0,43	8,00	9,74
Indus_6h_7	43,20	8,55	7,20	6,00	11,00	30-70	-	7,25	10,92
Indus_4h_7	51,85	8,56	7,20	6,56	7,50	77,50	0,22	7,84	9,58
Indus_6h_7	52,40	8,65	7,28	6,56	9,50	51,50	0,14	7,92	9,58
Indus_4h_7	53,13	8,77	7,38	8,86	8,00	77,50	0,22	8,09	9,88
Indus_2h_7	53,91	8,90	7,49	6,00	9,00	155,00	0,43	7,86	10,18
Indus_2h_8	62,00	10,23	8,61	8,42	7,00	155,00	0,43	10,07	10,32
Indus_2h_8	62,70	10,35	8,71	9,58	7,00	155,00	0,43	9,63	9,63
Indus_4h_8	63,30	10,44	8,79	7,98	8,00	77,50	0,22	9,90	10,76
Indus_4h_8	63,46	10,47	8,81	8,28	6,50	77,50	0,22	10,32	10,32
Indus_6h_8	63,50	10,48	8,82	8,28	7,50	51,50	0,14	9,63	10,32
Indus_6h_8	63,60	10,49	8,83	7,14	8,50	51,50	0,14	10,63	10,62
Indus_5h_8	40,00	10,56	8,89	5,16	8,00	50,00	0,14	12,00	9,44
Indus_6h_9	69,80	11,52	9,69	9,14	8,00	51,50	0,14	11,75	10,18
Indus_6h_10	70,58	11,65	9,80	8,28	9,00	51,50	0,14	11,96	10,62
Indus_5h_10	30,00	11,88	10,00	5,04	9,00	50,00	0,14	10,70	9,58
Indus_5h_10	31,00	12,28	10,33	4,34	8,00	50,00	0,14	11,48	9,00
Indus_4h_10	31,33	12,41	10,44	5,44	7,00	50-60	-	12,00	10,32
Indus_5h_10	31,43	12,45	10,48	5,16	8,00	50,00	0,14	10,60	9,14
Indus_5h_11	32,03	12,68	10,68	4,62	8,00	50,00	0,14	12,00	9,14
Indus_5h_11	32,66	12,93	10,89	5,04	7,00	50,00	0,14	12,12	9,58
Indus_4h_11	33,33	13,20	11,11	5,30	8,00	50,00	0,14	11,33	9,14
Indus_5h_11	33,33	13,20	11,12	5,16	8,00	50,00	0,14	13,07	9,44
Indus_5h_11	33,33	13,20	11,13	5,58	8,00	50,00	0,14	11,33	8,42
Indus_5h_11	34,46	13,65	11,49	4,76	8,00	50,00	0,14	12,00	9,14
Indus_5h_11	34,67	13,73	11,56	4,41	9,00	50,00	0,14	12,31	9,44
Indus_4h_11	34,67	13,73	11,56	5,04	8,00	50,00	0,14	13,33	8,72
Indus_4h_12	35,33	13,99	11,78	6,00	7,00	50-60	-	12,00	10,18
Indus_4h_12	36,67	14,52	12,22	4,76	8,00	50,00	0,14	12,92	9,00
Indus_5h_12	37,24	14,75	12,41	4,34	8,00	50,00	0,14	12,70	9,14

Nos testes industriais o volume do P.F. (pré-fermentador) variou de $68,83 \pm 29,89 \text{ m}^3$, o Brix do mosto variou de $20,52 \pm 1,38 \text{ }^\circ\text{Bx}$ e o ART do mosto variou de $17,88 \pm 1,16$.

Tabela 3.2. Dados coletados dos testes em escala piloto.

Teste	Cx(BU) inicial - (%)	massa celulas-início (ton)	Inóculo (%)	oGL-inicial	Tempo fermentação (h)	Tempo alimentação (h)	F (m ³ /h)	Taxa diluicao(D) - h-1	Cx(BU) final - (%)	oGL-final
Pilot_2h_12,5	56,55	1,49	12,57	2,70	7,00	2,00	233,33	6,48	12,80	11,36
Pilot_2h_12,5	56,11	1,48	12,47	5,72	7,25	2,00	233,33	6,48	12,56	11,52
Pilot_2h_12,5	56,11	1,48	12,47	5,72	7,25	2,00	233,33	6,48	12,60	11,98
Pilot_2h_12,5	56,00	1,48	12,44	6,14	7,25	2,00	233,33	6,48	13,26	11,82
Pilot_2h_13	41,40	1,50	12,65	3,66	6,00	2,00	208,33	5,79	12,90	10,46
Pilot_2h_13	41,40	1,50	12,65	3,66	6,00	2,00	208,33	5,79	13,17	10,76
Pilot_2h_13	42,00	1,52	12,83	3,38	6,00	2,00	208,33	5,79	13,33	10,76
Pilot_2h_13	42,00	1,52	12,83	3,38	6,00	2,00	208,33	5,79	13,37	10,92
Pilot_2h_14	47,00	1,71	14,36	4,06	5,75	2,00	208,33	5,79	14,47	11,36
Pilot_2h_14	45,90	1,67	14,03	4,90	5,75	2,00	208,33	5,79	14,30	11,66
Pilot_2h_14	45,90	1,67	14,03	4,90	5,75	2,00	208,33	5,79	14,70	11,52
Fast - 2h_14	45,98	1,67	14,05	4,90	5,75	2,00	208,33	5,79	15,00	11,36
Pilot_2h_15	49,35	1,79	15,08	4,76	5,15	2,00	208,33	5,79	15,99	11,36
Pilot_2h_15	49,35	1,79	15,08	4,76	5,15	2,00	208,33	5,79	15,97	11,52
Pilot_2h_15	49,54	1,80	15,14	4,90	4,80	2,00	208,33	5,79	15,71	11,22
Pilot_2h_15	49,54	1,80	15,14	4,90	4,80	2,00	208,33	5,79	16,13	11,22

Nos testes em escala piloto o volume do P.F. (pré-fermentador) variou de $10,25 \pm 1,30 \text{ m}^3$, o brix do mosto variou de $26,05 \pm 0,15 \text{ }^\circ\text{Bx}$ e o ART do mosto variou de $23,30 \pm 0,35$.

3.3. Metodologia Analítica

3.3.1. Determinação da concentração celular (C_x)

Durante os cultivos, a concentração celular foi determinada como porcentagem em base seca, $C_{x_{bs}}$ (% m/m), e em base úmida, $C_{x_{bu}}$ (% v/v). Na determinação de $C_{x_{bs}}$ (% m/m) foi utilizado o método direto proposto por SINGH et al. (1994). Aliquotas do caldo de massa conhecida foram centrifugadas a 1.600·g por 30 minutos a 5°C. Descarta-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em água destilada e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sedimento final foi transferido para recipiente previamente seco e tarado, e a massa seca obtida após a secagem em estufa a 105°C, resfriamento em dessecador e pesagem até massa constante. A determinação foi feita em triplicata e a concentração celular expressa em porcentagem em base seca (% m/m).

A determinação da concentração celular em base úmida, $C_{x_{bu}}$ (% v/v), ou volume de células compactadas (VCC) foi determinada de acordo com procedimento descrito por KOSHIMIZU et al. (1982).

3.3.2. 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 dos açúcares na amostra do meio de cultivo com HCl 0,75 N a 65°C por 40 minutos.

3.3.3. Determinação da Concentração de Etanol

A concentração de etanol presente nas amostras do creme de levedura e do vinho foi determinada por meio da medida de densidade e expressas em °GL (%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.

3.4. Cálculos dos Coeficientes de Rendimento

Nesse item são apresentadas as equações para cálculos do coeficiente de rendimento de substrato (ART) a produto principal (etanol), $Y_{P/S}$, e o coeficiente de rendimento de células a substrato (ART), $Y_{X/S}$. Os coeficientes de rendimento foram calculados com base nos balanços materiais, utilizando informações de variáveis de processo como as

concentrações das espécies envolvidas nos balanços, a vazão de alimentação do mosto e os volumes iniciais e finais dos cultivos.

3.4.1. Cálculos do coeficiente do rendimento de substrato a etanol ($Y_{P/S}$) e do rendimento (eficiência) em etanol (η_P)

O coeficiente de rendimento de substrato (ART) a produto (etanol) é calculado pela equação (3.1).

$$Y_{P/S} = \frac{\text{quantidade gerada de etanol}}{\text{quantidade consumida de ART}} = \frac{\text{EtOH}_{\text{gerado}}}{\text{ART}_{\text{consumido}}} \quad (3.1)$$

O cálculo da quantidade gerada de etanol ($\text{EtOH}_{\text{gerado}}$) é realizado pela equação (3.2).

$$\text{EtOH}_{\text{gerado}} = \text{EtOH}_{\text{acumulado}} = \text{massa}_{\text{EtOH-final}} - \text{massa}_{\text{EtOH-inicial}} \quad (3.2)$$

$$\text{EtOH}_{\text{gerado}} = (\text{°GL}_F \cdot V_{FA} - \text{°GL}_I \cdot V_{IA}) \cdot \frac{\rho_{\text{EtOH}}}{100} \quad (3.3)$$

onde:

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

°GL_F : °GL final ou no vinho (% v/v)

°GL_I : °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 (m^3)

V_{IA} : volume inicial do “pé de cuba” (m^3)

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

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

$$\text{ART}_{\text{consumido}} = \text{ART}_{\text{alimentado}} - \text{ART}_{\text{acumulado}} \quad (3.5)$$

$$\text{ART}_{\text{acumulado}} = (\text{ART}_F \cdot V_{FA} - \text{ART}_I \cdot V_{IA}) \cdot \frac{\rho_c}{100} \quad (3.6)$$

$$\text{ART}_{\text{alimentado}} = F \cdot CS \cdot t \quad (3.7)$$

onde:

- ART_{acumulado}: quantidade de ART acumulada na dorna durante o processo (kg);
 ART_{alimentado}: quantidade de ART alimentado na dorna durante o processo (kg);
 ART_F: concentração de ART final ou concentração de açúcares residuais totais (ARRT) no vinho fermentado (% m/m);
 ART_I: ART inicial ou concentração de açúcares residuais totais (ARRT) no inóculo (“pé de cuba”) (% m/m);
 ρ_c : densidade média do caldo (1.080 kg/m³).

O cálculo do rendimento (eficiência) em etanol (η_P) teve como base os balanços materiais (equação 3.7).

$$\eta_P = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \cdot 100 (\%) \quad (3.8)$$

onde:

0,511: rendimento teórico do processo

As concentrações das substâncias solúveis presentes no caldo, como o etanol e os açúcares (ART) 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 o volume total inicial (V_I) final (V_F), pelas equações (3.8) e (3.9) (BORZANI, 2006).

$$V_{IA} = V_I \cdot \left(1 - \frac{C_{X_{bs-I}} \cdot \rho_c}{\sigma \cdot \rho_x \cdot 100} \right) \quad (3.9)$$

$$V_{FA} = V_F \cdot \left(1 - \frac{C_{X_{bs-F}} \cdot \rho_c}{\sigma \cdot \rho_x \cdot 100} \right) \quad (3.10)$$

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)
 σ : conteúdo de massa seca na biomassa (0,30 kg_{ms}/kg)
 ρ_x : densidade celular (1.100 kg/m³)

A quantidade de ART alimentada ($ART_{\text{alimentado}}$) é proveniente da alimentação do mosto, sendo que este é alimentado com vazão variável (equação 3.1). No caso da planta piloto, a composição de mosto (e a concentração de ART) é fixa em virtude do preparo antecipado do mosto, em outras palavras, prepara-se o mosto com a quantidade fixa de ART. No entanto, durante a alimentação da dorna industrial ocorre uma pequena flutuação na % (m/m) de ART na alimentação, em virtude do mosto alimentado ser composto pela mistura contínua de melaço com água ou caldo ao longo dos cultivos. Para o presente trabalho consideramos a quantidade de ART alimentada fixa durante toda a alimentação da dorna industrial, pois somente coletou-se amostra do mosto, para análise do ART, no início da alimentação de cada um dos testes industriais.

3.4.2. Cálculo da Produtividade em Etanol (Prd_p)

O cálculo utilizado para a produtividade em etanol (Prd_p) foi realizada pela equação (3.11):

$$Prd_p = \frac{\Delta m_p}{V_F \cdot t_{\text{ferm}}} \quad (3.11)$$

3.4.3. Cálculo da Produtividade em Células (Prd_x)

O cálculo utilizado para a produtividade em células (Prd_x) foi realizado pela equação (3.12).

$$Prd_x = \frac{\Delta m_x}{V_F \cdot t_{\text{ferm}}} \quad (3.12)$$

3.4.4. 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 para a dorna industrial e piloto pela equação (3.13).

$$Y_{x/s} = \frac{(C_{x_{bs-F}} \cdot V_F - C_{x_{bs-I}} \cdot V_I) \cdot \rho_c}{(F_0 \cdot t_{\text{alim}} \cdot ART_M \cdot \rho_M) \cdot \rho_c} \quad (3.13)$$

Com base nas equações apresentadas os valores precisos dos coeficientes de rendimento nas escalas piloto e industrial, irão depender da precisão dos valores medidos das concentrações das espécies envolvidas (metodologias analíticas utilizadas), bem como dos valores de vazão volumétrica (F) fornecida pelo sistema supervisorio.

3.5. Modelagem Matemática do Processo Fermentativo

O processo industrial mais utilizado no Brasil para a produção de etanol em “batelada”, na verdade, é dividido em duas etapas. Na primeira etapa, o cultivo é operado em batelada alimentada. Parte-se de um inóculo (“pé de cuba”) o qual ocupa uma parte do volume total da dorna, sendo o mosto alimentado à vazão constante ou linear com o tempo até completar o volume útil da dorna. Após esta fase, tem início a segunda etapa (em batelada) que varia em função do tempo necessário para o consumo total dos açúcares fermentescíveis presentes no meio de cultivo.

Neste trabalho foram ajustados parâmetros de dois modelos para representar o processo de produção de etanol.

3.5.1. Modelo 1

DARÉ (2008) em sua dissertação de mestrado propôs um modelo matemático para descrever o processo de produção de etanol em dorna piloto. Apresenta-se a descrição do modelo:

- **Etapa de tratamento da levedura**

No processo “Melle-Boinot”, após o final da batelada, a levedura é recuperada do vinho fermentado e reciclada no processo após tratamento. Durante a etapa de tratamento da levedura, 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 (3.14) 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 (3.15).



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 (3.16).

$$r_{t_X2} = \frac{k_1 \cdot C_{X1}^m}{k_2 + C_{X1}} = -r_{t_X1} \quad (3.16)$$

Na etapa de produção, pode ocorrer morte celular, representada pela equação (3.17).



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 (3.18) e (3.19) e com as células do tipo 2, pelas equações (3.20) e (3.21).



$$\frac{r_{P_1}}{p_1} = -r_S = k_p \cdot C_{X_1} \quad (3.19)$$



$$\frac{r_{P_2}}{p_2} = \frac{r_{X_2}}{y_1} = \frac{p_2}{y_1} \cdot r_{X_2} = Y_{P/X_2} \cdot r_{X_2} \quad (3.21)$$

De acordo com o modelo proposto, diferentemente das células do tipo 1, as células do tipo 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 3.22.

$$r_{X_2} = \mu \cdot C_{X_2} \quad (3.22)$$

Considerando a inibição do etanol no crescimento celular das células do tipo 2, seguindo o modelo de LEVENSPIEL (1976), tem-se a equação (3.23).

$$r_{X_2} = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n \cdot C_{X_2} \quad (3.23)$$

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.

As equações do modelo matemático para as etapas em batelada alimentada e batelada são apresentadas.

- **Etapa em Batelada Alimentada**

Balço de massa para as células:

$$\frac{dC_{X1}}{dt} = -\frac{k_1 \cdot C_{X1}^m}{k_2 + C_{X1}} - \left(\frac{F}{V}\right) \cdot C_{X1} \quad (3.24)$$

$$\frac{dC_{X2}}{dt} = \frac{k_1 \cdot C_{X1}^m}{k_2 + C_{X1}} + \mu \cdot C_{X2} - \left(k_d + \frac{F}{V}\right) \cdot C_{X2} \quad (3.25)$$

Balço de massa para o etanol:

$$\frac{dC_p}{dt} = p_1 \cdot k_p \cdot C_{X1} + Y_{P/X2} \cdot \mu \cdot C_{X2} - \frac{F}{V} \cdot C_p \quad (3.26)$$

Balço de massa para o substrato:

$$\frac{dC_s}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_{Se} - C_s) - k_p \cdot C_{X1} - \frac{\mu \cdot C_{X2}}{Y_{X2/S}} \quad (3.27)$$

Balço de massa total:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\rho_M}{\rho_c} \cdot (F_0 + k \cdot t) \quad (3.28)$$

- **Etapa em Batelada**

Balço de massa para as células:

$$\frac{dC_{X1}}{dt} = -\frac{k_1 \cdot C_{X1}^m}{k_2 + C_{X1}} - k_d \cdot C_{X1} \quad (3.29)$$

$$\frac{dC_{X2}}{dt} = \frac{k_1 \cdot C_{X1}^m}{k_2 + C_{X1}} + (\mu - k_d) \cdot C_{X2} \quad (3.30)$$

Balço de massa para o etanol:

$$\frac{dC_p}{dt} = p_1 \cdot k_p \cdot C_{X1} + Y_{P/X2} \cdot \mu \cdot C_{X2} \quad (3.31)$$

Balanço de massa para o substrato:

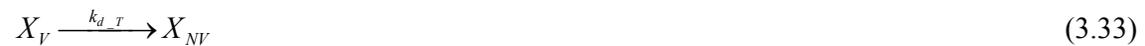
$$\frac{dC_s}{dt} = -k_p \cdot C_{X1} - \frac{\mu \cdot C_{X2}}{Y_{X2/S}} \quad (3.32)$$

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

3.5.2. Modelo 2

Com base no artigo publicado por ATALA et al. (1998), foi proposto o seguinte modelo matemático para o processo de produção de etanol.

Na etapa de produção, pode ocorrer morte celular, representada pela equação (3.33).

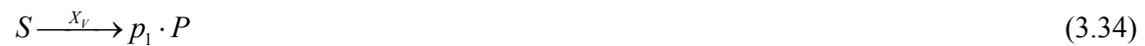


onde:

X_V : representa células viáveis

X_{NV} : representa células não viáveis

A formação do produto (etanol) ocorre de forma não associada (equação 3.34) e associada (equação 3.35) ao crescimento celular.



onde:

S: representa o substrato (ART)

X_V : representa as células viáveis

P: representa o produto (etanol)

A velocidade de crescimento das células viáveis foi calculada pela equação (3.36), a velocidade de degradação das células viáveis pela equação (3.37), a velocidade de formação de produto pela equação (3.38) e a velocidade de consumo de substrato pela equação (3.39).

$$r_X = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \cdot \exp(-K_i \cdot C_S) \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_{P\max}} \right)^n \cdot \left(1 - \frac{C_{X_v}}{C_{X\max}} \right)^m \cdot C_{X_v} \quad (3.36)$$

$$r_d = k_{d_T} \cdot \exp(k_{d_P} \cdot C_P) \cdot C_{X_v} \quad (3.37)$$

$$r_P = Y_{P/X} \cdot r_X + m_P \cdot C_{X_v} \quad (3.38)$$

$$r_S = \frac{r_X}{Y_{X/S}} + m_X \cdot C_{X_v} \quad (3.39)$$

A velocidade máxima específica de crescimento celular (μ_{\max}) foi calculada em função da temperatura do meio de cultivo, conforme a equação (3.40), a concentração máxima de inibição por etanol foi estimada pela equação (3.41), o coeficiente de rendimento célula-substrato pela equação (3.42), o coeficiente de morte pelo etanol pela equação (3.43), o coeficiente de morte pela temperatura pela equação (3.44) e o coeficiente de rendimento produto-célula pela equação (3.45). As equações dos parâmetros cinéticos (3.40 a 3.45) foram obtidas de ATALA et al. (1998).

$$\mu_{\max} = 1,57 \cdot \exp\left(\frac{-41,47}{T}\right) - 1,29 \cdot 10^4 \cdot \exp\left(-\frac{431,4}{T}\right) \quad (3.40)$$

$$C_{P\max} = -0,4421 \cdot T^2 + 26,41 \cdot T - 279,75 \quad (3.41)$$

$$Y_{X/S} = -0,00547 \cdot T + 0,239 \quad (3.42)$$

$$k_{dP} = 0,00718 \cdot T^2 - 0,45 \cdot T + 7,43 \quad (3.43)$$

$$k_{dT} = 4 \cdot 10^{13} \cdot \exp\left(-\frac{41.947}{1,987 \cdot (T + 273,15)}\right) \quad (3.44)$$

$$Y_{p/X} = 1,1667 \cdot T - 27,467 \quad (3.45)$$

Uma vez definida as hipóteses do modelo reacional e das equações das velocidades de reação, segue a apresentação dos sistemas de equações de balanços materiais que compõem a modelagem do processo.

As equações do modelo matemático para as etapas em batelada alimentada e batelada são apresentadas.

- **Etapa em Batelada Alimentada**

Balanço de massa para as células viáveis:

$$\frac{dC_{X_v}}{dt} = r_x - r_d - C_{X_v} \cdot \frac{F}{V} \quad (3.46)$$

Balanço de massa para as células não viáveis:

$$\frac{dC_{X_{nv}}}{dt} = r_x + r_d - C_{X_{nv}} \cdot \frac{F}{V} \quad (3.47)$$

Balanço de massa para o etanol:

$$\frac{dC_p}{dt} = -\frac{F}{V} \cdot C_p + r_p \quad (3.48)$$

Balanço de massa para o substrato:

$$\frac{dC_s}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_{s0} - C_s) - r_s \quad (3.49)$$

Balanço de massa total:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\rho_m}{\rho_c} \cdot F \quad (3.50)$$

- **Etapa em Batelada**

Balanço de massa para as células viáveis:

$$\frac{dC_{X_v}}{dt} = r_x - r_d \quad (3.51)$$

Balanço de massa para as células não viáveis:

$$\frac{dC_{X_{nv}}}{dt} = r_x + r_d \quad (3.52)$$

Balanço de massa para o etanol:

$$\frac{dC_p}{dt} = r_p \quad (3.53)$$

Balanço de massa para o substrato:

$$\frac{dC_s}{dt} = -r_s \quad (3.54)$$

Balanço de massa total:

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (3.55)$$

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

3.6. Simulações em Computador

As equações diferenciais ordinárias resultantes dos balanços de massa dos modelos 1 e 2 foram resolvidas com auxílio de computador empregando método numérico de integração Runge-Kutta-Gill (4ª ordem e passo variável) programado em Fortran (PRESS et al., 1986).

Os parâmetros dos modelos foram ajustados como base ajuste visual (comparação entre os valores experimentais e simulados pelo modelo).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Coeficientes de Rendimento (Eficiência de Fermentação)

Neste item são apresentados os resultados referentes ao rendimento (eficiência) em etanol (η_P), à produtividade em etanol (Prd_P) e em células (Prd_X) e os coeficientes de rendimento célula-substrato ($Y_{X/S}$) e produto-substrato ($Y_{P/S}$), para os ensaios realizados na planta piloto e na dorna industrial.

4.1.1. Planta Piloto

A Tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos nos cultivos realizados em escala piloto. Cabe salientar que todos os cultivos nesta escala foram realizados à vazão constante de alimentação de mosto, com concentração de ART constante no mosto (em cada ensaio). Ao longo dos experimentos foram analisadas as concentrações de ART, células e etanol, sendo possível, portanto, obter maior precisão na estimativa dos valores de η_P , Prd_P , Prd_X , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ de acordo com metodologia proposta no item 3 (Materiais e Métodos).

Os testes em escala piloto tiveram as seguintes variações:

Parâmetro	Média \pm Desvio Padrão
Inóculo (%)	13,61 \pm 1,07
°GL Inicial (°GL)	4,53 \pm 0,93
Tempo Alimentação (h)	2
Brix Mosto (°Bx)	26,05 \pm 0,15
ART Mosto	23,30 \pm 0,35

Os experimentos realizados na planta piloto (**Fast_2h_12,5**, **Fast_2h_13**, **Fast_2h_14** e **Fast_2h_15**) correspondem a quadruplicatas realizadas com perfil de alimentação constante e por período fixo (mosto alimentado por duas horas), com variações nos valores de concentração de inóculo (C_{X1}).

Tabela 4.1. Condições experimentais e resultados obtidos nos cultivos em escala piloto.

Teste	Cx(BU) inicial - (%)	Tempo fermentação (h)	Cx(BU) final - (%)	Rendimento Etanol (%)	Produtividade Etanol (kg/m ³ /h)	Produtividade de Células (kg/m ³ /h)
Pilot_2h_12,5	56,55	7,00	12,80	82,96	12,13	0,11
Pilot_2h_12,5	56,11	7,25	12,56	82,30	11,16	0,04
Pilot_2h_12,5	56,11	7,25	12,60	85,99	11,66	0,06
Pilot_2h_12,5	56,00	7,25	13,26	82,30	11,38	0,37
Pilot_2h_13	41,40	6,00	12,90	82,61	12,29	0,14
Pilot_2h_13	41,40	6,00	13,17	85,26	12,68	0,29
Pilot_2h_13	42,00	6,00	13,33	86,42	12,80	0,27
Pilot_2h_13	42,00	6,00	13,37	87,85	13,01	0,30
Pilot_2h_14	47,00	5,75	14,47	88,61	13,89	0,06
Pilot_2h_14	45,90	5,75	14,30	87,32	13,95	0,16
Pilot_2h_14	45,90	5,75	14,70	86,12	13,76	0,39
Fast - 2h_14	45,98	5,75	15,00	88,05	13,54	0,55
Pilot_2h_15	49,35	5,15	15,99	89,05	15,18	0,58
Pilot_2h_15	49,35	5,15	15,97	90,48	15,43	0,57
Pilot_2h_15	49,54	4,80	15,71	86,09	15,99	0,39
Pilot_2h_15	49,54	4,80	16,13	86,09	15,99	0,68

Observa-se pelos resultados, dos testes em escala piloto, que o coeficiente de rendimento de substrato a etanol ($Y_{P/S}$) apresentou valores que variam de $0,440 \pm 0,012$, dentro da faixa daqueles tradicionalmente esperados para o processo em questão (entre 78,1 e 90,5% do teórico), o que indica 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 apresentaram uma variação com valores de $0,010 \pm 0,006$, o que pode ser explicado pela alta sensibilidade desse parâmetro em relação às medidas de concentração celular no início (C_{xI}) e no final do cultivo (C_{xF}). Como os valores de $Y_{X/S}$ são pequenos e, pequenas flutuações nos valores de C_{xI} e de C_{xF} geram grandes variações nos valores calculados de $Y_{X/S}$ isso pode explicar essa maior variação 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}). O grau alcoólico final variou de $11,30 \pm 0,39$ °GL.

Observa-se que cultivos, quando realizados sob mesma vazão de alimentação (F) e variando-se as concentrações de inóculo obtiveram-se valores bastante próximos de

rendimentos (eficiência) fermentativos embora com valores de produtividade diferentes o que vêm a corroborar com o esperado, ou seja, altas concentrações de inóculo combinados com alta concentração de ART trazem efeitos positivos no que diz respeito a produtividade em etanol (Figura 4.1).

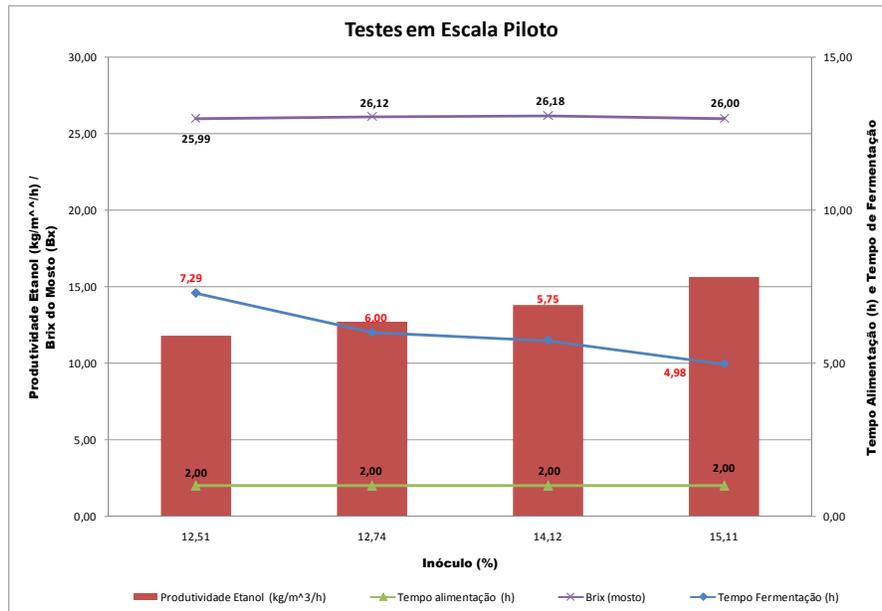


Figura 4.1. Produtividade em etanol em função da concentração de inóculo em mostos com alta concentração de ART (26%).

Na Figura 4.1 observa-se uma redução do tempo de fermentação com o aumento da concentração de inóculo, mantendo os demais parâmetros constantes.

A Tabela 4.2 mostra que os valores de rendimento (eficiência) fermentativo não variam significativamente se considerarmos no cálculo o volume ocupado pelas células, conforme metodologia descrita por BORZANI (2006).

Tabela 4.2. Resultados de Rendimento de Etanol e Rendimento de Etanol considerando o volume ocupado pelas células.

Teste	Rendimento Etanol (%)	Volume Líquido Inicial (m ³)	Volume Líquido final (m ³)	Rendimento Etanol considerando volume ocupado pelas células (%)
Pilot_2h_12,5	82,96	3,48	31,39	74,36
Pilot_2h_12,5	82,30	3,51	31,48	76,41
Pilot_2h_12,5	85,99	3,51	31,46	79,60
Pilot_2h_12,5	82,30	3,52	31,23	75,98
Pilot_2h_13	82,61	6,45	31,36	74,77
Pilot_2h_13	85,26	6,45	31,26	76,82
Pilot_2h_13	86,42	6,38	31,20	77,53
Pilot_2h_13	87,85	6,38	31,19	78,73
Pilot_2h_14	88,61	5,83	30,79	79,32
Pilot_2h_14	87,32	5,95	30,85	78,90
Pilot_2h_14	86,12	5,95	30,71	77,47
Fast - 2h_14	88,05	5,94	30,60	78,98
Pilot_2h_15	89,05	5,57	30,24	79,17
Pilot_2h_15	90,48	5,57	30,25	80,40
Pilot_2h_15	86,09	5,55	30,34	77,05
Pilot_2h_15	86,09	5,55	30,19	76,63

A variância do rendimento fermentativo, dentro dos dados apresentados na Tabela 4.2, é de 10,14 e no caso do rendimento fermentativo considerando o volume ocupado pelas células a variância é de 9,70, ou seja, mostra que o rendimento fermentativo não é função da concentração do inóculo.

O fato de utilizarmos a concentração de ART do mosto constante nos ensaios pilotos proporcionou maior precisão no cálculo do volume total de ART alimentado e conseqüentemente maior precisão nos demais parâmetros que sofrem a influência da concentração do ART.

4.1.2. Planta Industrial

A Tabela 4.3 apresenta os principais resultados obtidos nos cultivos realizados na dorna industrial sob diferentes condições experimentais. Os valores dos coeficientes de rendimento e do rendimento (eficiência) fermentativo foram calculados de acordo com metodologia proposta no item 3 (Materiais e Métodos).

Os testes em escala industrial tiveram as seguintes variações:

Parâmetro	Média ± Desvio Padrão
Inóculo (%)	6,72 ± 3,43
°GL Inicial (°GL)	5,38 ± 1,74
Tempo Alimentação (h)	4,25 ± 1,50
Brix Mosto (°Bx)	20,52 ± 1,38
ART Mosto	17,88 ± 1,16

Os experimentos realizados na planta industrial, representam, conforme a Tabela 4.3, o Teste Industrial (Indus), o tempo de alimentação “x” h e o inóculo “y”, como, por exemplo, o teste Indus_2h_2 que representa um teste industrial realizado com tempo de alimentação de 2 horas e inóculo de 2% (C_{xI}).

Tabela 4.3. Condições experimentais e resultados obtidos nos cultivos em escala industrial.

Teste	Cx(BU) inicial - (%)	Volume PF (m3)	Tempo fermentação (h)	Cx(BU) final - (%)	°GL-final	Rendimento Etanol (%)	Produtividade Etanol (kg/m ³ /h)	Produtividade de Células (kg/m ³ /h)
Indus_2h_2	14,20	50,00	13,00	3,63	9,44	82,59	5,39	0,42
Indus_2h_2	14,54	50,00	16,00	4,68	9,90	87,63	4,63	0,55
Indus_4h_2	14,54	50,00	14,00	5,08	8,28	71,94	4,36	0,72
Indus_4h_2	14,60	50,00	12,00	5,10	7,84	73,09	4,82	0,84
Indus_2h_2	14,85	50,00	15,00	5,50	8,86	79,81	4,39	0,76
Indus_2h_2	15,38	50,00	13,00	4,15	10,29	93,13	5,92	0,51
Indus_4h_2	15,52	50,00	12,00	3,33	8,28	76,44	5,04	0,32
Indus_6h_2	18,00	50,00	13,00	4,62	8,56	77,04	4,80	0,54
Indus_4h_3	20,30	50,00	12,00	3,33	8,86	78,46	5,51	0,14
Indus_2h_3	21,10	50,00	12,00	5,26	9,58	78,29	5,96	0,64
Indus_4h_3	21,17	50,00	12,00	4,02	9,14	79,71	5,67	0,30
Indus_4h_3	21,30	50,00	11,50	5,26	10,38	97,21	6,79	0,66
Indus_2h_3	21,50	50,00	11,50	5,26	8,42	72,45	5,39	0,65
Indus_2h_3	21,60	50,00	11,50	5,11	8,42	76,77	5,42	0,61
Indus_4h_3	21,60	50,00	11,00	6,45	8,56	76,62	5,72	1,04
Indus_2h_3	21,70	50,00	13,00	4,90	10,48	93,62	6,05	0,48
Indus_6h_3	22,70	50,00	11,50	6,00	8,86	80,18	5,76	0,82
Indus_6h_3	23,07	50,00	12,00	3,84	8,28	76,33	5,11	0,17
Indus_2h_3	23,70	50,00	11,00	5,71	8,72	77,12	5,88	0,73

* Continua na próxima página.

Teste	Cx(BU) inicial - (%)	Volume PF (m3)	Tempo fermentação (h)	Cx(BU) final - (%)	oGL-final	Rendimento Etanol (%)	Produtividade Etanol (kg/m ³ /h)	Produtividade de Células (kg/m ³ /h)
Indus_6h_3	20,50	60,00	9,00	5,11	8,28	76,97	6,81	0,62
Indus_6h_3	26,10	50,00	10,50	5,71	8,72	81,23	6,20	0,66
Indus_6h_3	27,00	50,00	12,00	5,36	9,30	78,76	5,71	0,44
Indus_6h_5	29,80	60,00	12,00	6,56	10,62	89,02	6,51	0,44
Indus_6h_5	30,50	60,00	15,00	6,15	12,90	92,28	6,35	0,23
Indus_6h_6	39,10	60,00	12,00	7,19	11,66	105,01	6,98	0,19
Indus_2h_6	48,70	50,00	7,50	10,78	9,30	88,46	8,89	1,77
Indus_2h_6	48,90	50,00	7,50	8,03	9,58	85,29	9,33	0,54
Indus_6h_6	49,20	50,00	9,00	8,09	10,02	86,88	8,01	0,46
Indus_4h_6	49,60	50,00	8,00	8,57	8,86	78,97	7,80	0,69
Indus_6h_6	49,80	50,00	9,50	8,14	9,88	82,85	7,19	0,42
Indus_2h_6	50,00	50,00	7,00	8,00	9,74	83,25	9,64	0,50
Indus_6h_7	43,20	60,00	11,00	7,25	10,92	82,25	7,12	0,02
Indus_4h_7	51,85	50,00	7,50	7,84	9,58	83,18	9,12	0,28
Indus_6h_7	52,40	50,00	9,50	7,92	9,58	84,69	7,20	0,22
Indus_4h_7	53,13	50,00	8,00	8,09	9,88	80,48	8,53	0,29
Indus_2h_7	53,91	50,00	9,00	7,86	10,18	84,83	8,20	0,14
Indus_2h_8	62,00	50,00	7,00	10,07	10,32	88,77	10,32	0,69
Indus_2h_8	62,70	50,00	7,00	9,63	9,63	83,64	9,36	0,43
Indus_4h_8	63,30	50,00	8,00	9,90	10,76	88,08	9,52	0,46

Teste	Cx(BU) inicial - (%)	Volume PF (m3)	Tempo fermentação (h)	Cx(BU) final - (%)	oGL-final	Rendimento Etanol (%)	Produtividade Etanol (kg/m ³ /h)	Produtividade de Células (kg/m ³ /h)
Indusl_4h_8	63,46	50,00	6,50	10,32	10,32	90,55	11,14	0,76
Indus_6h_8	63,50	50,00	7,50	9,63	10,32	82,50	9,65	0,36
Indus_6h_8	63,60	50,00	8,50	10,63	10,62	92,54	8,94	0,70
Indus_5h_8	40,00	80,00	8,00	12,00	9,44	83,98	8,18	1,28
Indus_6h_9	69,80	50,00	8,00	11,75	10,18	83,66	8,79	0,85
Indus_6h_10	70,58	50,00	9,00	11,96	10,62	88,86	8,31	0,79
Indus_5h_10	30,00	120,00	9,00	10,70	9,58	93,02	6,93	0,26
Indus_5h_10	31,00	120,00	8,00	11,48	9,00	92,12	7,45	0,47
Indus_4h_10	31,33	120,00	7,00	12,00	10,32	87,36	9,59	0,73
Indus_5h_10	31,43	120,00	8,00	10,60	9,14	87,85	7,32	0,05
Indus_5h_11	32,03	120,00	8,00	12,00	9,14	92,11	7,50	0,55
Indus_5h_11	32,66	120,00	7,00	12,12	9,58	93,63	8,91	0,58
Indus_4h_11	33,33	120,00	8,00	11,33	9,14	87,54	7,27	0,09
Indus_5h_11	33,33	120,00	8,00	13,07	9,44	81,34	7,62	0,81
Indus_5h_11	33,33	120,00	8,00	11,33	8,42	75,58	6,47	0,09
Indus_5h_11	34,46	120,00	8,00	12,00	9,14	89,18	7,45	0,21
Indus_5h_11	34,67	120,00	9,00	12,31	9,44	95,41	6,99	0,28
Indus_4h_11	34,67	120,00	8,00	13,33	8,72	87,60	6,95	0,73
Indus_4h_12	35,33	120,00	7,00	12,00	10,18	83,45	9,22	0,11
Indus_4h_12	36,67	120,00	8,00	12,92	9,00	86,67	7,31	0,29
Indus_5h_12	37,24	120,00	8,00	12,70	9,14	92,51	7,59	0,12

Diferentemente dos experimentos realizados em escala piloto, na escala industrial as vazões de alimentação de mosto variavam linearmente com tempo, e

tiveram tempos de alimentação diferentes: 2h, 4h, 5h e 6h. Ainda dentro de cada um dos perfis de alimentação trabalhamos com concentração de inóculo variando de 2% a 11%.

As demais variáveis mostradas na Tabela 4.3 foram calculadas de acordo com metodologia proposta no item 3 (Materiais e Métodos).

Para a determinação da concentração celular (C_x), utilizou-se o método de base úmida, visto que as usinas em geral utilizam este método.

Para auxiliar na análise dos resultados realizamos a média dos valores dos testes separando nas seguintes faixas de concentração de inóculo:

- ✓ Concentração do inóculo entre 2% e 4% - v/v;
- ✓ Concentração do inóculo entre 5% e 7% - v/v;
- ✓ Concentração do inóculo entre 7% e 9% - v/v;
- ✓ Concentração do inóculo entre 9% e 11% - v/v;
- ✓ Concentração do inóculo entre 11% e 14% - v/v.

A Tabela 4.4 apresenta os resultados médios de acordo com as faixas de concentração de inóculo apresentada.

Tabela 4.4. Resultados médios dos ensaios fermentativos.

Teste	C_x (BU) inicial - (%)	Volume PF (m ³)	Inóculo (%)	oGL-inicial	Tempo fermentação (h)
Médias Inóculo 2@4%	19,99	50,00	2,78	3,87	12,38
Média Inóculo 5@7%	42,57	54,29	6,31	6,63	10,36
Média Inóculo 7@9%	56,09	53,33	8,17	7,40	8,13
Média Inóculo 9@11%	44,25	96,67	10,22	6,08	7,94
Média Inóculo 11@14%	36,58	120,00	12,19	5,00	8,27

Teste	Tempo alimentação (h)	Brix (mosto)	ART Mosto	Cx(BU) final - (%)	oGL-final
Médias Inóculo 2@4%	3,60	19,97	17,55	4,86	9,07
Média Inóculo 5@7%	5,14	21,97	18,19	7,53	10,53
Média Inóculo 7@9%	4,25	20,77	17,81	9,26	10,13
Média Inóculo 9@11%	5,00	20,74	18,16	11,23	9,73
Média Inóculo 11@14%	4,64	20,89	18,06	13,18	8,98

Teste	Rendimento Etanol (%)	Produtividade Etanol (kg/m ³ /h)	Produtividade de Células (g/m ³ /h)	Y _x /s	Y _p /s
Médias Inóculo 2@4%	80,77	5,49	557,26	0,042	0,413
Média Inóculo 5@7%	88,32	7,50	419,26	0,024	0,411
Média Inóculo 7@9%	85,46	8,94	469,21	0,023	0,437
Média Inóculo 9@11%	89,30	8,25	417,99	0,023	0,426
Média Inóculo 11@14%	87,07	6,99	389,11	0,025	0,425

Para estudo comparativo dos ensaios fermentativos realizados em escala piloto e industrial elaborou-se a Tabela 4.5 que mostra a média dos ensaios em escala piloto e industrial.

Tabela 4.5. Resultados médios dos ensaios fermentativos em escala piloto e industrial.

Teste	Cx(BU) inicial - (%)	Volume PF (m ³)	Inóculo (%)	oGL-inicial	Tempo fermentação (h)
Médias Inóculo 2@4%	19,99	50,00	2,78	3,87	12,38
Média Inóculo 5@7%	42,57	54,29	6,31	6,63	10,36
Média Inóculo 7@9%	56,09	53,33	8,17	7,40	8,13
Média Inóculo 9@11%	44,25	96,67	10,22	6,08	7,94
Média Inóculo 11@14%	36,58	120,00	12,19	5,00	8,27
Pilot_ 2h_12,5	45,20	110,00	13,81	4,31	5,81
Pilot_ 2h_13	48,56	110,00	14,84	4,83	5,21
Pilot_ 2h_14	53,05	45,50	13,85	3,80	5,90
Pilot_ 2h_15	52,41	87,50	12,51	5,31	6,94

* Dados dos ensaios fermentativos em escala Piloto em Scale-up.

Teste	Tempo alimentação (h)	Brix (mosto)	ART Mosto	Cx(BU) final - (%)	oGL-final
Médias Inóculo 2@4%	3,60	19,97	17,55	4,86	9,07
Média Inóculo 5@7%	5,14	21,97	18,19	7,53	10,53
Média Inóculo 7@9%	4,25	20,77	17,81	9,26	10,13
Média Inóculo 9@11%	5,00	20,74	18,16	11,23	9,73
Média Inóculo 11@14%	4,64	20,89	18,06	13,18	8,98
Pilot_ 2h_12,5	2,00	26,21	23,66	14,21	11,37
Pilot_ 2h_13	2,00	25,96	23,04	15,67	11,37
Pilot_ 2h_14	2,00	25,94	23,56	14,35	11,29
Pilot_ 2h_15	2,00	26,02	23,11	12,83	11,45

* Dados dos ensaios fermentativos em escala Piloto em Scale-up.

Teste	Rendimento Etanol (%)	Produtividade Etanol (kg/m ³ /h)	Produtividade de Células (g/m ³ /h)	Y _{x/s}	Y _{p/s}
Médias Inóculo 2@4%	80,77	5,49	557,26	0,042	0,413
Média Inóculo 5@7%	88,32	7,50	419,26	0,024	0,411
Média Inóculo 7@9%	85,46	8,94	469,21	0,023	0,437
Média Inóculo 9@11%	89,30	8,25	417,99	0,023	0,426
Média Inóculo 11@14%	87,07	6,99	389,11	0,025	0,425
Pilot_ 2h_12,5	87,47	13,65	225,72	0,007	0,447
Pilot_ 2h_13	88,42	15,03	523,45	0,016	0,452
Pilot_ 2h_14	84,52	14,06	342,05	0,009	0,432
Pilot_ 2h_15	83,30	11,62	152,47	0,006	0,426

* Dados dos ensaios fermentativos em escala Piloto em Scale-up.

Os valores encontrados para $Y_{p/s}$ foram, em alguns ensaios, semelhantes aos valores encontrados nos cultivos em escala piloto, conforme podemos observar no gráfico apresentado na Figura 4.2.

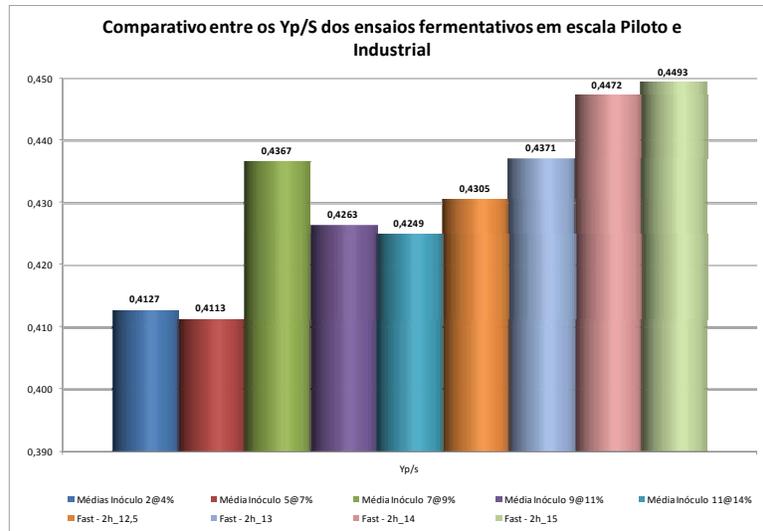


Figura 4.2. Valores médios de $Y_{p/S}$ calculados nos ensaios em escala piloto e industrial.

Os valores de $Y_{p/S}$ obtidos nos diferentes ensaios estiveram entre 0,4113 e 0,4493, ou seja, entre 80,5 e 87,9% do valor teórico. Os melhores rendimentos foram obtidos para os ensaios realizados empregando perfil de alimentação de mosto de 2 horas e inóculo com concentração na faixa de 14 a 15 % base úmida.

A Figura 4.3 apresenta o resultado comparativo entre a concentração de inóculo utilizada e o tempo de fermentação nos diferentes perfis de alimentação.

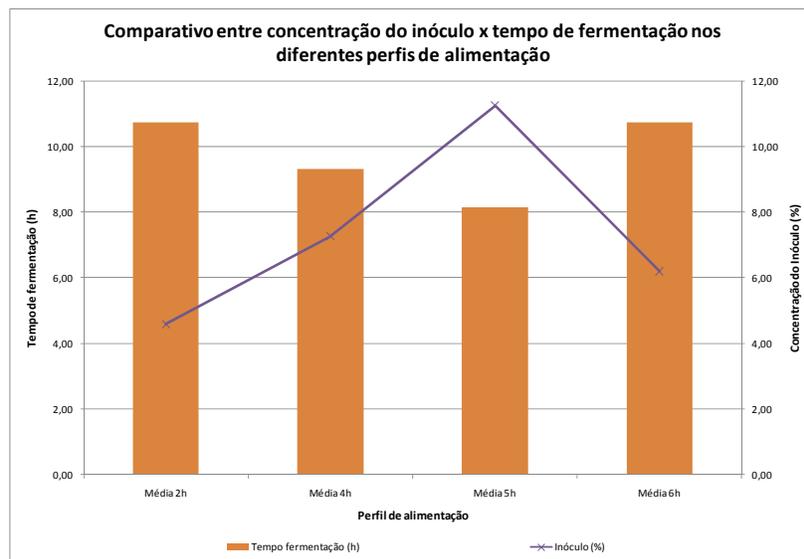


Figura 4.3. Comparação entre os perfis de alimentação e as médias de resultados para a concentração do inóculo e tempo de fermentação.

Pela Figura 4.3 observa-se que a concentração do inóculo exerce uma maior influência no tempo de fermentação. Vazões de alimentação altas combinadas com concentrações baixas de inóculo remetem a tempos de fermentação elevados. Por outro lado, vazões lentas e concentrações de inóculo baixas produzem também tempos de fermentação elevada. O melhor resultado foi obtido quando se utilizou um perfil de alimentação de 5 horas e inóculo com concentração em torno de 11,5 % em base úmida.

A Figura 4.4 apresenta um gráfico comparativo entre a produtividade e rendimento (eficiência) em etanol para os diferentes perfis de alimentação de mosto (tempo de alimentação).

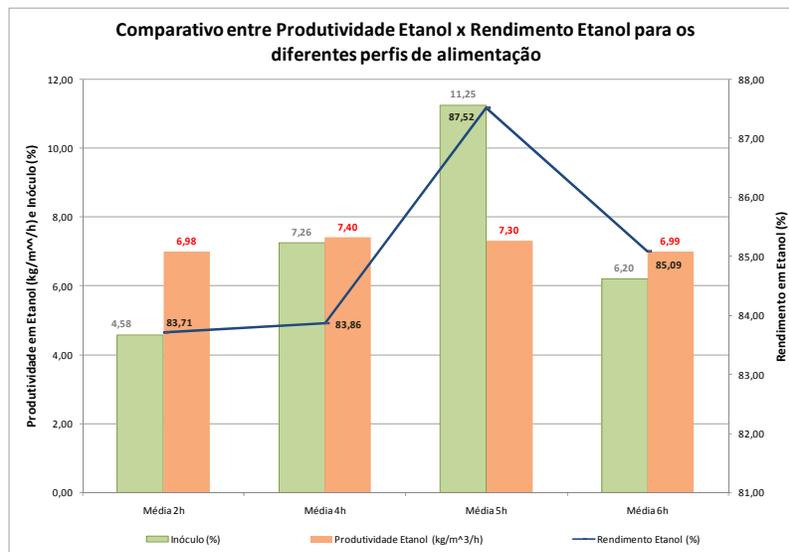


Figura 4.4. Gráfico comparativo entre os perfis de alimentação e as médias dos resultados para a concentração do inóculo, produtividade em etanol e rendimento (eficiência) fermentativo.

Observa-se pela Figura 4.4 que o melhor resultado em relação ao rendimento (eficiência) em etanol foi obtido com o perfil de alimentação do mosto em 5 horas e utilizando concentração de inóculo de 11,25% v/v (base úmida). Por outro, lado, quando se considera a produtividade em etanol observa-se pequena variação (6,98 a 7,4 kg_{etanol}/m³/h) entre os diferentes perfis de alimentação do mosto e mesmo quando alta concentração de inóculo foi utilizada. A partir dos ensaios realizados, nas condições avaliadas, a condição sub-ótima para a produção de etanol é dada através da alimentação do mosto em 5 horas empregando concentração de inóculo de 11,25% base úmida.

4.1.3. Comparação dos Resultados obtidos em Escala Piloto e Industrial

A Figura 4.5 apresenta uma compilação dos resultados do rendimento (eficiência) e produtividade em etanol nos diferentes perfis de alimentação para os ensaios realizados em escala piloto e industrial.

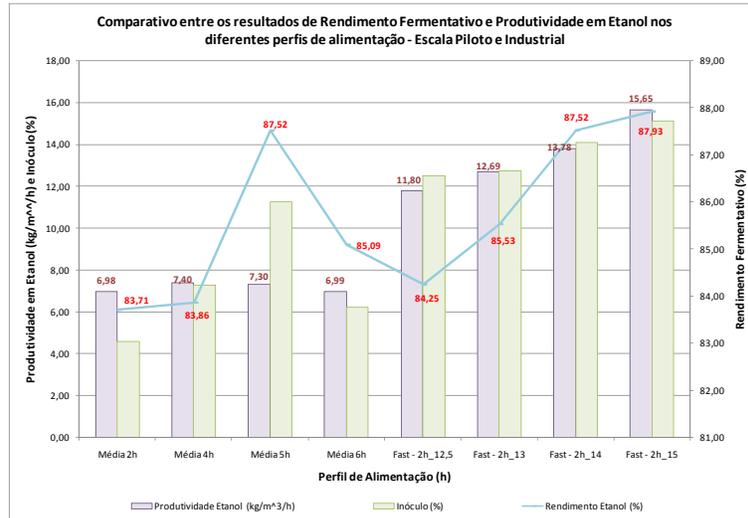


Figura 4.5. Gráfico comparativo entre os perfis de alimentação e as médias dos resultados para a concentração do inóculo, produtividade em etanol e rendimento (eficiência) fermentativo para as escalas piloto e industrial.

A partir da análise da Figura 4.5 depreende-se que os ensaios em escala piloto (Pilot_2h_12,5 a Pilot_2_h_15) foram fortemente influenciados pela concentração do inóculo, ou seja, concentrações maiores resultaram em rendimentos (eficiência) e produtiva mais elevados. A de se observar que todos os testes realizados na escala piloto utilizaram o mesmo perfil de alimentação (2 horas). Para os ensaios conduzidos na dorna industrial (Média_2h a Média_6h), a condição sub-ótima foi encontrada para os ensaios realizados com o perfil de alimentação do mosto em 5 horas e utilizando concentração de inóculo de 11,25% base úmida (conforme já discutido anteriormente).

A análise conjunta dos ensaios realizados em escala piloto e industrial sugerem que novos testes industriais sejam realizados utilizando um perfil de alimentação do mosto de 2 horas e concentração inicial de inóculo de 15% base úmida. Este teste servirá para confirmar os resultados obtidos na escala piloto.

Os gráficos das Figuras 4.6 e 4.7 apresentam o perfil da “produtividade específica de etanol” ($Prod_p/Y_{p/s}/C_s$) obtida nos testes realizados em escala piloto e industrial, respectivamente. Ressalta-se que para os testes em escala piloto a

concentração de substrato (CS) foi constante ao longo do tempo. Já para os ensaios na dorna industrial foi considerada a concentração inicial de substrato no mosto (tempo zero) como sendo constante ao longo do tempo (por falta de outra medida).

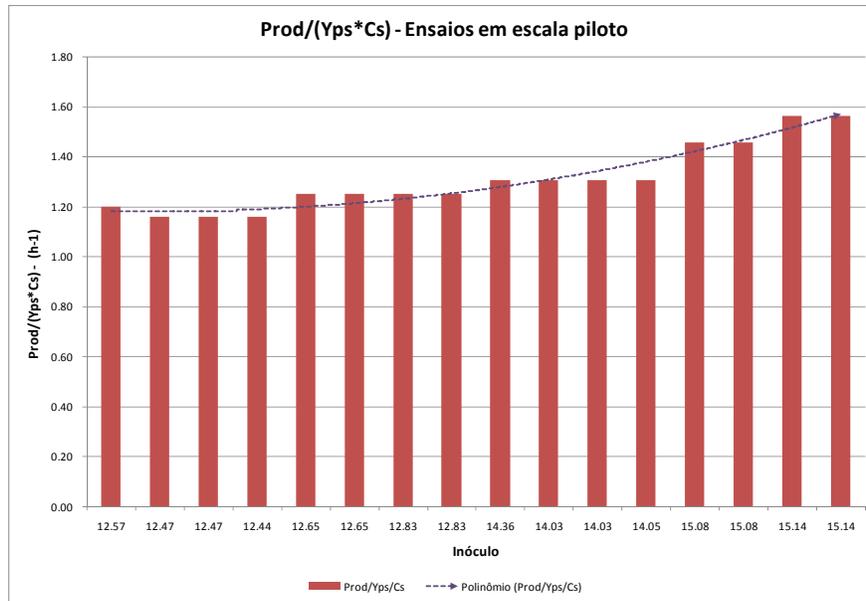


Figura 4.6. Gráfico da “produtividade específica de etanol” obtida nos testes realizados em escala piloto.

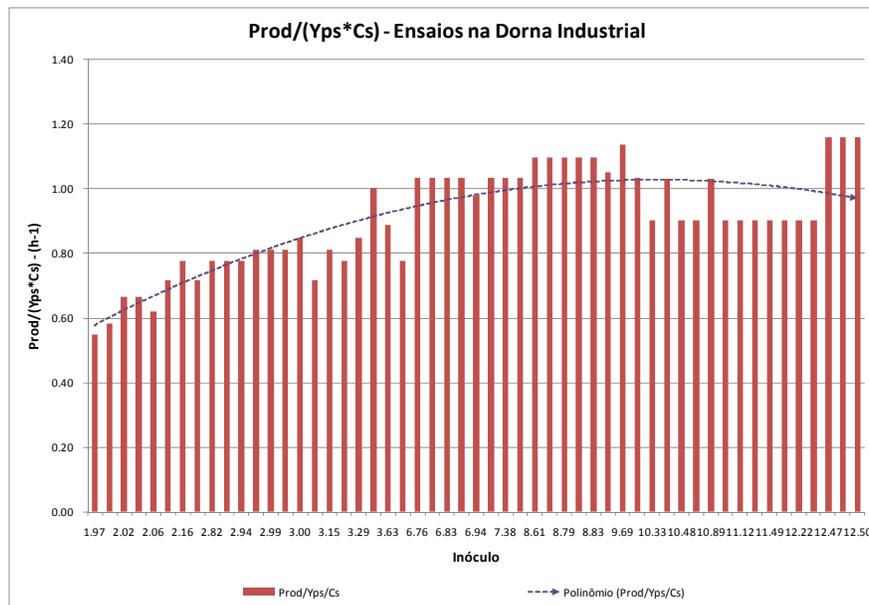


Figura 4.7. Gráfico da “produtividade específica de etanol” obtida nos testes realizados em escala industrial.

A partir dos resultados obtidos, observou-se um aumento na “produtividade específica de etanol” em função da concentração de inóculo, para os ensaios em escala

piloto (Figura 4.6). Nos testes em escala industrial, a “produtividade específica de etanol” passou por um ponto de máximo na faixa de concentração de inóculo de 9% em base úmida (Figura 4.7). Contudo, quando se utilizou inóculos com concentrações mais elevadas (da mesma ordem de grandeza daqueles utilizados em escala piloto) obteve-se um incremento na produtividade específica em etanol. Este fato corrobora a necessidade de se avaliar as condições estudadas na escala piloto em escala industrial.

4.2. Modelagem Matemática do Processo

Foram realizadas simulações empregando o modelo 1 e o modelo 2 utilizando dados experimentais obtidos na escala piloto e industrial.

4.2.1. Simulações com o Modelo 1

A Tabela 4.6 apresenta os parâmetros cinéticos empregados nas simulações realizadas com o modelo 1.

μ_{\max} (h ⁻¹)	0,341
K_S (g/L)	3,04
$Y_{P/X1}$ (g/g)	0,437
K_P (g/L)	1,21
K_D (h-1)	0,0083
k_1 ()	2,17
k_2 ()	0,55
n (-)	1
$Y_{x/s}$ (g/g)	*
$Y_{p/s}$ (g/g)	*

* proveniente do balanço de massa de cada teste.

A Figura 4.8 apresenta os resultados simulados pelo modelo 1 para ensaio realizado com vazão de suplementação de mosto de 155 m³/h durante 2 horas e concentração inicial de ART no mosto de 17,26%. A concentração inicial de inóculo empregada neste teste foi de 48,9% v/v (base úmida). Observa-se um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Os valores experimentais, de $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$, calculados para este teste foram 0,08 e 0,42, respectivamente. Nesta simulação o valor empregado

para o coeficiente de rendimento $Y_{p/s}$ foi 0,41. Esta pequena alteração foi necessária para que o valor final simulado da concentração de etanol se ajustasse ao experimental.

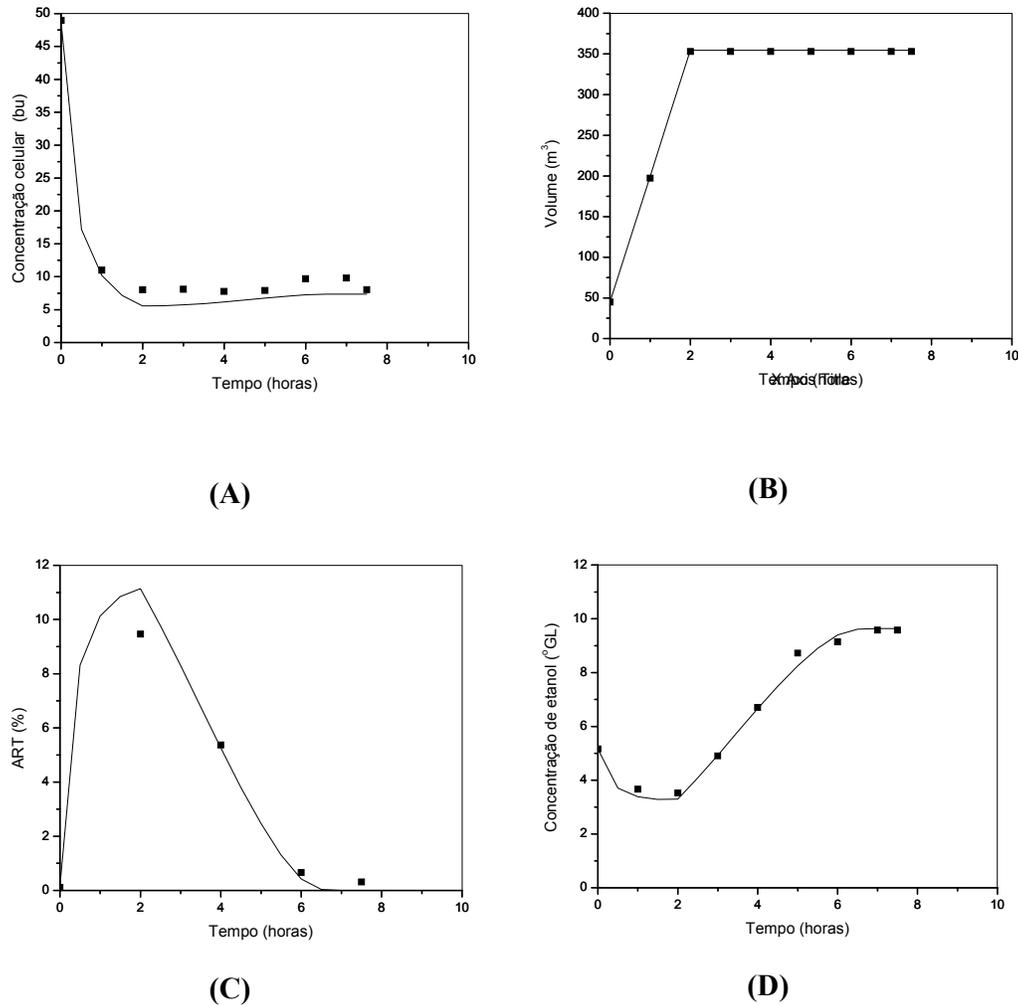


Figura 4.8. Valores experimentais e simulados pelo modelo 1 para o teste 600_gpl_2h_02. (A) Concentração celular (% base úmida); (B) Volume da dorna; (C) Concentração de ART (%); (D) Concentração de etanol (° GL).

A Figura 4.9 apresenta o resultado simulado pelo modelo 1 para ensaio realizado com vazão de suplementação de mosto de 77,55 m³/h durante 4 horas (concentração inicial de ART no mosto 18,20%). A concentração inicial de inóculo empregada neste teste foi de 48,9% (base úmida). Observa-se um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Os valores experimentais, de $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$, calculados para este teste foram 0,11 e 0,43, respectivamente.

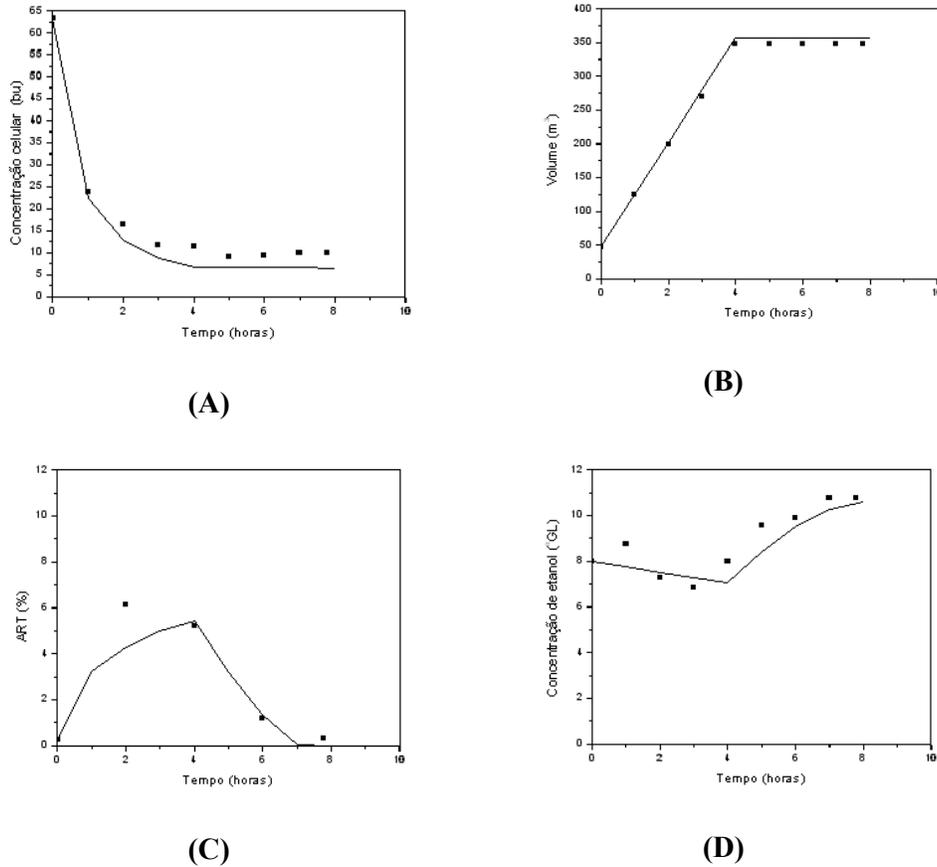


Figura 4.9. Valores experimentais e simulados pelo modelo 1 para o teste 800_gpl_4h_01. (A) Concentração celular (% base úmida); (B) Volume da dorna; (C) Concentração de ART (%); (D) Concentração de etanol (° GL).

A Figura 4.10 apresenta os resultados simulados pelo modelo 1 para ensaio realizado com vazão de suplementação de mosto de $155 \text{ m}^3/\text{h}$ durante 2 horas e concentração inicial de ART no mosto 17,85%. A concentração inicial de inóculo empregada neste teste foi de 14,2% v/v (base úmida). Os valores experimentais, de $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$, calculados para este teste foram 0,04 e 0,41, respectivamente. Na simulação o valor do coeficiente $Y_{X/S}$ foi ajustado para 0,08. Mesmo assim, os valores simulados para a concentração celular e de substrato não se ajustaram aos dados experimentais. Contudo, o modelo forneceu uma boa simulação para os valores da concentração celular. Este teste teve uma duração de 13 horas.

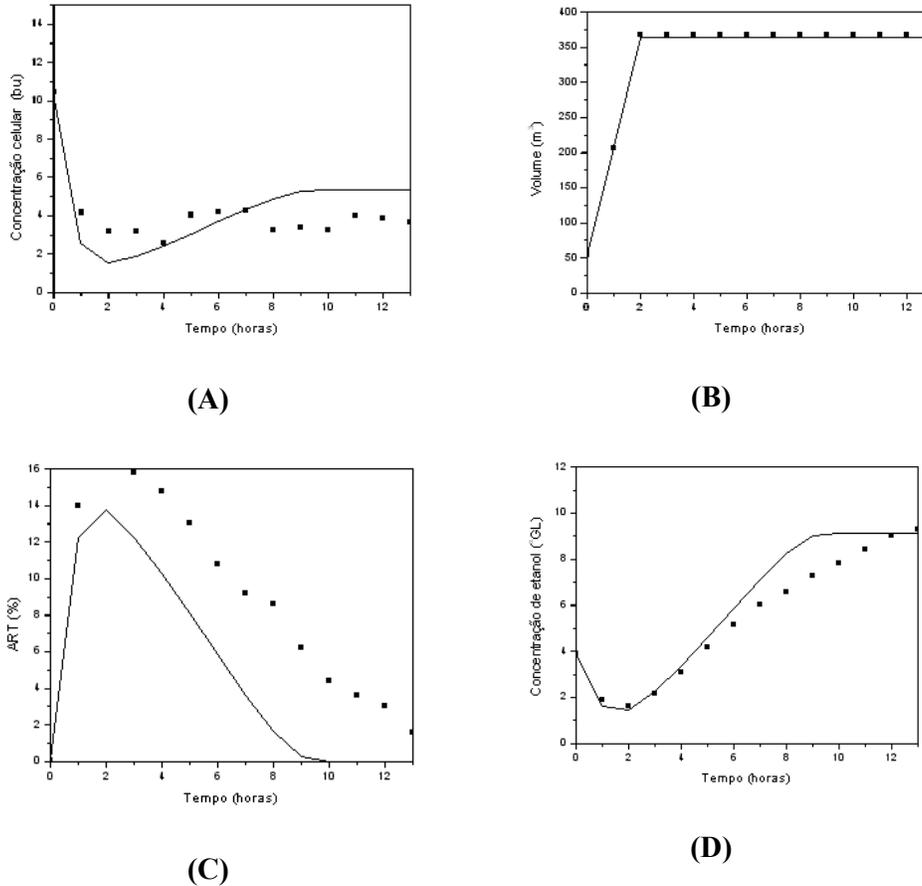


Figura 4.10. Valores experimentais e simulados pelo modelo 1 para o teste 200_gpl_2h_01. (A) Concentração celular (% base úmida); (B) Volume da dorna; (C) Concentração de ART (%); (D) Concentração de etanol (° GL).

4.2.2. Simulações com o Modelo 2

Os mesmos experimentos foram utilizados para simulação empregando o modelo 2. A Tabela 4.7 apresenta os valores dos parâmetros empregados nas simulações.

K_s (g/L) *	4,1
m_x (h ⁻¹)	0,10
m_p (h ⁻¹) *	0,1
n (-) *	1
m (-)	1

* Valores obtidos de ATALA et al. (1998)

Os demais parâmetros do modelo foram determinados a partir das equações (3.40) a (3.45) em função da temperatura média do teste realizado.

A Figura 4.11 apresenta os resultados simulados pelo modelo 2 para ensaio realizado com vazão de suplementação de mosto de 155 m³/h durante 2 horas e concentração inicial de ART no mosto 17,26%. A concentração inicial de inóculo empregada neste teste foi de 48,9% v/v (base úmida). A temperatura média medida no interior da dorna ao longo do teste foi de 33 °C. Observa-se um bom ajuste do modelo aos dados experimentais da concentração celular e de ART ao longo da “batelada”. Contudo, o modelo superestimou o valor da concentração de etanol ao final do ensaio.

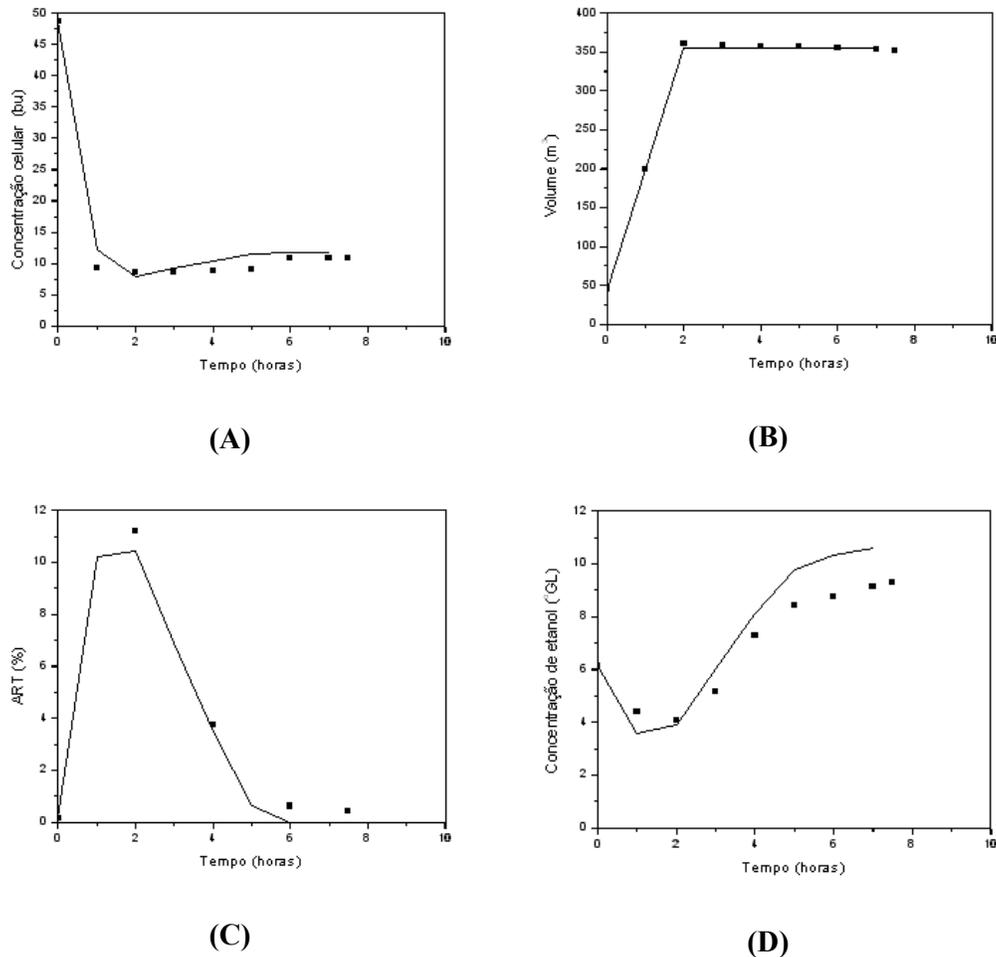
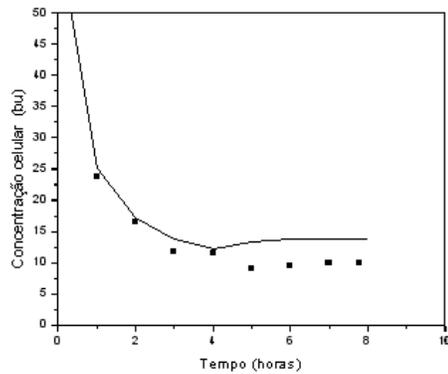
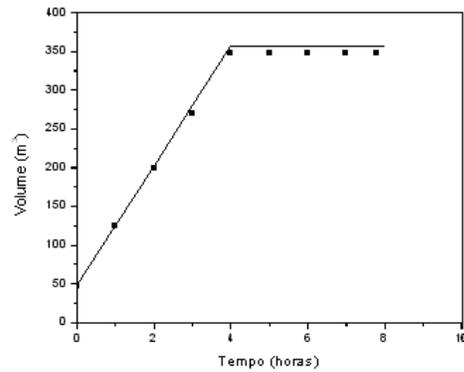


Figura 4.11. Valores experimentais e simulados pelo modelo 1 para o teste 600_gpl_2h_02. (A) Concentração celular (% base úmida); (B) Volume da dorna; (C) Concentração de ART (%); (D) Concentração de etanol (° GL).

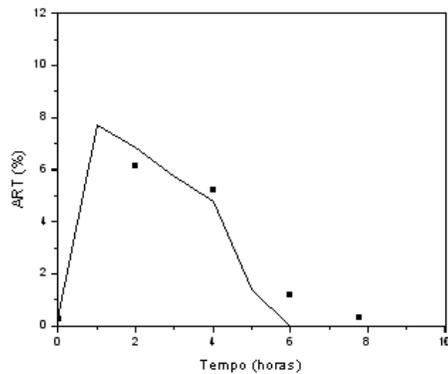
A Figura 4.12 apresenta os resultados simulados pelo modelo 2 para ensaio realizado com vazão de suplementação de mosto de 77,55 m³/h durante 4 horas e concentração inicial de ART no mosto 18,20%. A concentração inicial de inóculo empregada neste teste foi de 48,9% v/v (base úmida). A temperatura média medida no interior da dorna ao longo do teste foi de 33 °C. Neste teste observa-se um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.



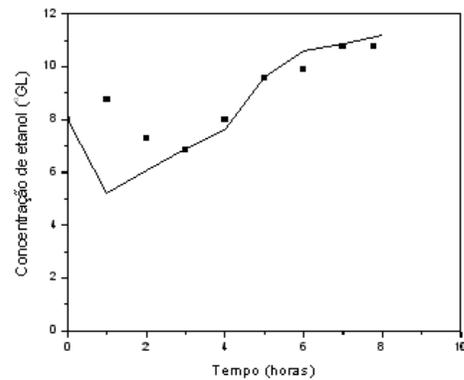
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 4.12. Valores experimentais e simulados pelo modelo 1 para o teste 800_gpl_4h_01. (A) Concentração celular (% base úmida); (B) Volume da dorna; (C) Concentração de ART (%); (D) Concentração de etanol (° GL).

A Figura 4.13 apresenta os resultados simulados pelo modelo 2 para ensaio realizado com vazão de suplementação de mosto de $155 \text{ m}^3/\text{h}$ durante 2 horas e concentração inicial de ART no mosto 17,85%. A concentração inicial de inóculo empregada neste teste foi de 14,2% v/v (base úmida). A temperatura média medida no interior da dorna ao longo do teste foi de $34 \text{ }^\circ\text{C}$. Neste teste o modelo não forneceu uma boa simulação para os valores da concentração celular, de substrato e superestimou a concentração de etanol ao final do processo. Contudo, o resultado pode ser considerado satisfatório, haja visto que o modelo foi capaz de apresentar a tendência do processo.

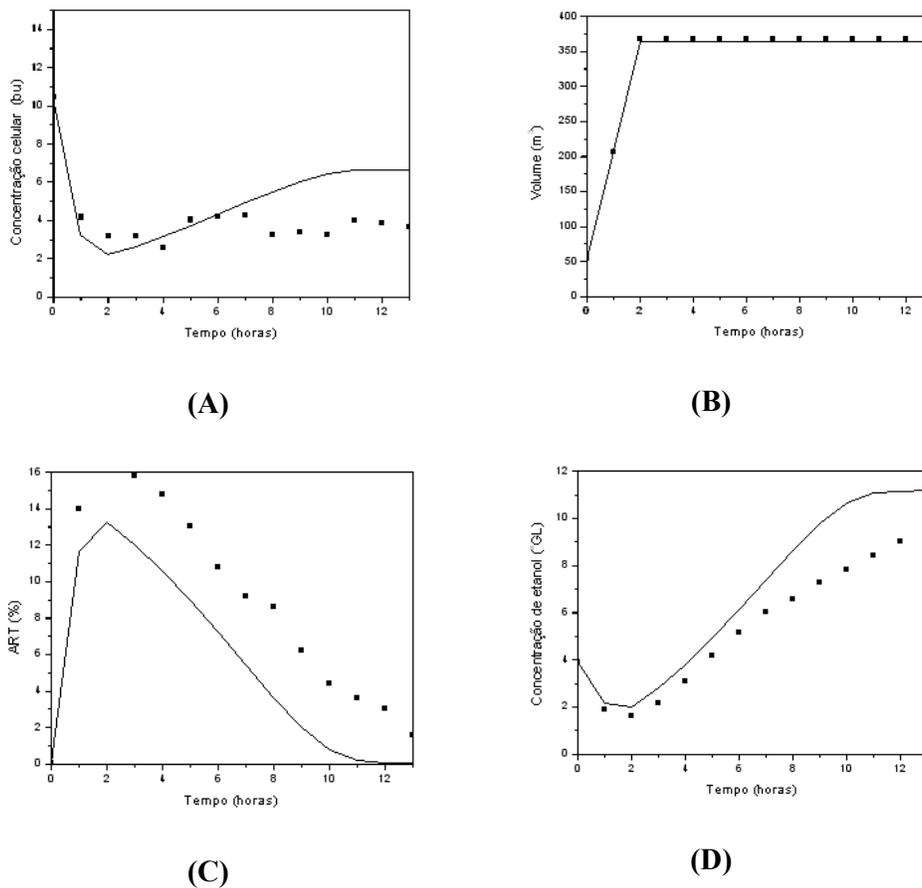


Figura 4.13. Valores experimentais e simulados pelo modelo 1 para o teste 200_gpl_2h_01. (A) Concentração celular (% base úmida); (B) Volume da dorna; (C) Concentração de ART (%); (D) Concentração de etanol (° GL).

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos através dos experimentos realizados na escala industrial e piloto pode-se concluir que:

- a. com o aumento da concentração do inóculo houve um incremento na produtividade em etanol;
- b. há um ponto ótimo para concentração de inóculo, concentração de substrato (ART) e produtividade em etanol;
- c. diferentes *set-ups* para o processo fermentativo podem ser utilizados, a partir dos resultados obtidos, com o objetivo de maximizar produção de etanol ou maximizar a produção de células (levedura).

A partir dos resultados da combinação entre a escala industrial e a escala piloto pode-se concluir que:

- a. o aumento na concentração do inóculo resultou em aumento de produtividade em etanol;
- b. a concentração do inóculo e produtividade em etanol são diretamente proporcionais (correlação positiva);
- c. há possibilidade de se empregar *set-ups* da fermentação industrial utilizando diferentes concentrações de inóculo e diferentes concentrações de substrato (ART) com o objetivo de maximizar produtividade em etanol e rendimento (eficiência) da fermentação.

Os resultados da modelagem e simulação do processo indicaram que os dois modelos matemáticos foram capazes de representar, satisfatoriamente, o processo (ajustaram-se aos dados experimentais) nas condições experimentais avaliadas. O modelo 1 foi o que apresentou melhores resultados.

Em função dos resultados, o modelo poderia ser utilizado para controle do processo fermentativo.

6. Referências Bibliográficas

ANDRIETA, 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).

AMORIM, H. V. Fermentação Alcoólica – Ciência e Tecnologia. 2005, 448p.

ATALA, D.I.P., COSTA, A.C., MACIEL FILHO, R. MAUGERI FILHO, F. Fermentação alcoólica com alta densidade celular: modelagem cinética e convalidação de parâmetros. *In: Anais do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ)*, p.1-9, Porto Alegre, RS, 1998. <disponível em CD>

BAILEY, J.; OLLIS, D. Biochemical Engineering Fundamentals – Second Edition – Seven Chapter – Kinetics of substrate utilization, product formation, and biomass production in cell cultures, 1986.

BORGES, P.C.S. Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, UFU, 2008 (Dissertação).

BORZANI, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. Biotecnologia – Engenharia Bioquímica. v. 3, Editora Edgard Blucher Ltda, 1975.

CTC, 2009. Seminário CTC Etanol: Perspectivas e Desafios. 04/2009, Piracicaba, 2009. <<http://www.ctcanavieira.com.br>>

COPERSUCAR. Fermentação. 1ª edição, Coordenadoria de Processos – Divisão Industrial, Centro de Tecnologia Copersucar, Piracicaba, SP, 1987.

Gouveia-Matos, J. A. M. Ciência para ajudar a vida. Química Nova na Escola, Pasteur, Nº 6, NOVEMBRO, 1997.

GUNASEKARAN, P.; RAJ, K. C. Ethanol fermentation technology - *Zymomonas mobilis*. Current Science, vol. 77, n. 1, p. 56-68, 1999.

Disponível on-line: <<http://ces.iisc.ernet.in/curscinew/july10/articles14.htm>>

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

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 – Department of Chemical Engineering University of Cape Town Rondebosch, South Africa, 1982.

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, Norman Rodge, London, 8p., 1934.

LATdict, 2009. <<http://www.latin-dictionary.net/q/latin/fervere.html>>

LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COLUMAN, G. A. Chemical Engineering Department, Cleveland State University, Cleveland, Ohio 44115, Biotechnology and Bioengineering, vol. XXV, Pp. 497-511, 1983.

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)

LUONG, J.H.T. Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation. Biotechnology and Bioengineering, v. 27, 280-285, 1984.

NAHVI, I., EMTIAZI, G., ALKABI, L. 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.

NELSON, D.L., COX, M.M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 3ª edição, Sarvier Editora Livros Médicos, São Paulo, 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.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia :conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo. Makron Books, 1997.

RIVERA, E.C., COSTA, A.C., ANDRADE, R.R., ATALA, D.I.P., MAUGERI FILHO, F. Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature dependent kinetics of biotechnological processes. Biochemical Engineering Journal, 2007 (doi: 10.1016/j.bej.2007.02.11).

SHULER, M. L., KARGI, F. Bioprocess Engineering: Basic Concepts. Prentice Hall PTR, 2nd ed., 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, n°4, 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

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. Operação e Simulação do Processo de Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada com Vazão Variável de Alimentação. Escola de Engenharia Química da UFRJ, 1987 (Dissertação).

VASCONCELOS, João Nunes. Influencia do Perfil de Alimentação de Substrato sobre o Processo de Fermentação Alcoólica; *Álcool e Açúcar*, nº 66, Março 1993.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; ALVES, D. M. G.; *Fuel ethanol after 25 years*, 1999. Elsevier Science Ltd.

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.