



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE AGUARDENTE DE CANA DE AÇÚCAR  
POR CÉLULAS IMOBILIZADAS**

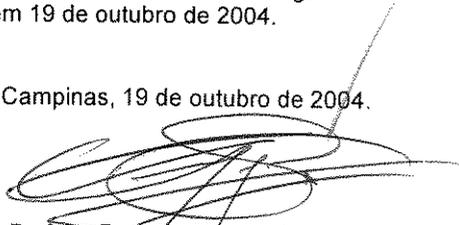
**Carlos Eduardo Budri Cassini  
Engenheiro Químico**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho**

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Carlos Eduardo Budri Cassini**, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de outubro de 2004.

Campinas, 19 de outubro de 2004.

  
Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho  
Presidente da Banca

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Engenharia de Alimentos.

pinas, agosto de 2004



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Fil/Unicamp
	C273P
V	EX
TOMBO BC/	62542
PROC.	16-86-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	21,00
DATA	04.7.05
Nº CPD	

Bibid: 338840

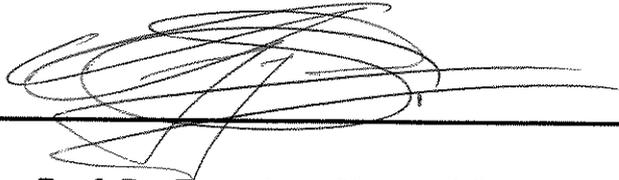
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

C273p Cassini, Carlos Eduardo Budri  
Produção de aguardente de cana de açúcar por células imobilizadas / Carlos Eduardo Budri Cassini. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Francisco Maugeri Filho  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Fermentação. 2.Células imobilizadas. 3.Aguardente. 4.Produtividade. I.Maugeri Filho, Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**Banca Examinadora**

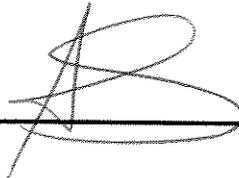


---

**Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho**  
**FEA/UNICAMP**

---

**Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta**  
**CPQBA/UNICAMP**



---

**Prof. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini**  
**FEA/UNICAMP**



---

**Prof. Dr. Fumio Yokoya**  
**FEA/UNICAMP**

## DEDICO ESTE TRABALHO

*A minha esposa, Sandra, as minhas filhas Júlia e Lívia e  
aos meus pais, William e Nilza,  
pelo carinho, amor, compreensão e incentivo.*

## HOMENAGEM

*Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho pelo seu exemplo  
profissional,  
por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho,  
pela orientação, amizade, dedicação, consideração e respeito, minha  
eterna gratidão*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de poder aprender com a realização deste trabalho e poder transmitir os conhecimentos adquiridos.

A minha esposa Sandra pelo apoio, incentivo, compreensão e paciência durante os momentos alegres e tristes.

A meu pai que me substituiu na Destilaria nos momentos em que não podia estar presente.

A Fifa pelos ensinamentos e ajuda que foram decisivos na conclusão do trabalho.

Aos amigos do laboratório, Daniel, Luciano, Bernardo, Marcio, Eduardo, Saartje, Fernanda, Yemiko, Olga, Lia, Clarissa, Helen, pela ajuda e pelos momentos alegres vividos.

Aos amigos de curso, Rodrigo, Marcelo, Honorato, Divair, Davi, Raul, Lucinilton, Luiz pela amizade.

Ao Eng. Élson Luiz Rocha de Souza, responsável pelo laboratório de bebidas do Ministério da Agricultura de Andradas – MG, pelas análises dos componentes voláteis, que foi essencial para a conclusão deste trabalho. Também para a Guará, Alexandre, Luiz Paulo e Maria, do mesmo laboratório.

## SUMARIO

<b>RESUMO</b>	XV
<b>SUMARY</b>	XVII
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	4
3.1. A AGUARDENTE PERANTE A LEGISLAÇÃO	4
3.2. A PRODUÇÃO DA AGUARDENTE ARTESANAL	5
3.2.1. Matéria prima	5
3.2.2. Extração do Caldo de Cana	7
3.2.3. Fermentação	8
3.2.4. Destilação	9
3.2.5. Maturação	10
3.3. A FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS	11
3.3.1. Leveduras	11
3.3.2. Produção de Compostos de Aroma e Sabor	13
3.3.2.1. <i>Etanol</i>	15
3.3.2.2. <i>Álcoois Superiores</i>	15
3.3.2.3. <i>Aldeídos</i>	16
3.3.2.4. <i>Ácidos Orgânicos</i>	17
3.3.2.5. <i>Ésteres</i>	18
3.3.2.6. <i>Compostos Sulfurados</i>	19
3.3.3. Fatores que Influenciam na Formação dos Componentes Voláteis	20
3.3.3.1. <i>Leveduras e Condições de Fermentação</i>	20
3.3.3.2. <i>Destilação</i>	22
3.4. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	25
3.5. FERMENTAÇÃO POR CÉLULAS IMOBILIZADAS	28
3.5.1. Escolha do Suporte para Imobilização	29
3.5.2. Métodos de Imobilização	32
3.5.2.1. <i>Adsorção</i>	33
3.5.2.2. <i>Ligação Covalente</i>	33
3.5.2.3. <i>Oclusão em Géis</i>	34

3.3.2.4. <i>Encapsulamento</i>	35
3.5.2.5. <i>Ligações Cruzadas (Floculação)</i>	36
3.5.3. <i>Produção de Bebidas Alcoólicas</i>	36
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
4.1. EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO	39
4.1.1. Micro Organismos	39
4.1.2. Matéria Prima	39
4.1.3. Fermentações	40
4.1.3.1. <i>Preparo do Inóculo</i>	40
4.1.3.2. <i>Determinação dos Parâmetros de Fermentação para Células Livres</i>	41
4.1.3.3. <i>Determinação dos Componentes Voláteis</i>	42
4.1.3.4. <i>Determinação da Temperatura de Processo para Células Imobilizadas</i>	43
4.1.3.5. <i>Fermentação Contínua e Cultura de Células para Imobilização</i>	44
4.2. ESCOLHA DO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR	45
4.2.1. Estudos de Imobilização em Alginato de Cálcio	45
4.2.2. Estudos de Imobilização em K - Carragena	48
4.2.3. Estudos de Imobilização em Pectina Cítrica	48
4.2.4. Estudos de Imobilização em Alginato de Cálcio + Dióxido de Titânio	49
4.2.5. Estudos de Imobilização em Alginato de Cálcio + K - Carragena	49
4.2.6. Estudos de Imobilização em Alginato de Cálcio + Óxido de Alumínio	50
4.2.7. Fermentações Utilizando os Diferentes Suportes	51
4.3. OBTENÇÃO DE CÉLULAS PARA IMOBILIZAÇÃO	51
4.4. REATORES UTILIZADOS	52
4.4.1. Fermentação Batelada	52
4.4.2. Reator Tubular de Leito Empacotado	53
4.4.3. Reator Tubular de Leito Fluidizado	54
4.4.4. Reator Tubular de Leito Fluidizado com Reciclo	55
4.4.5. Reator de Mistura Contínuo de Cesto	56
4.4.6. Reator de Mistura Contínuo com Reciclo	57
4.4.7. Reator de Mistura Contínuo com Reciclo em Série	58
4.5. DESTILAÇÃO	59
4.6. MÉTODOS ANALÍTICOS	60
4.6.1. Concentração de Células Totais e Viáveis	60
4.6.2. Concentrações de Sacarose, Glicose, Frutose, Glicerol e Etanol	60
4.6.3. Componentes Voláteis	61

4.6.4. Açúcares Redutores Totais	62
4.7. PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO	63
4.7.1. Velocidades	63
4.7.2. Parâmetros Estequiométricos	64
4.7.3. Produtividade	66
4.7.4. Rendimento	66
4.7.5. Conversão	67
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>68</b>
5.1. FERMENTAÇÃO COM CÉLULAS LIVRES	68
5.1.1. Dados experimentais	68
5.2. DETERMINAÇÃO DO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO	88
5.2.1. Imobilização em Alginato de Cálcio	89
5.2.2. Imobilização em K - Carragena	91
5.2.3. Imobilização em Pectina Cítrica	93
5.2.4. Imobilização em Alginato de Cálcio + Dióxido de Titânio	95
5.2.5. Imobilização em Alginato de Cálcio + K - Carragena	97
5.2.6. Imobilização em Alginato de Cálcio + Óxido de Alumínio	97
5.3. DEFINIÇÃO DA LEVEDURA A SER IMOBILIZADA	98
5.3.1. Componentes Voláteis no Caldo Fermentado	99
5.4. ESTUDO DA TEMPERATURA PARA FERMENTAÇÃO CONTÍNUA	101
5.5. FERMENTAÇÃO CONTÍNUA	104
5.5.1. Reator Tubular de Leito Empacotado	105
5.5.2. Reator Tubular de Leito Fluidizado	106
5.5.3. Reator Tubular de Leito Expandido com Reciclo	107
5.5.4. Reator de Mistura Contínuo de Cesto	108
5.5.5. Reator de Mistura Contínuo com Reciclo	113
5.5.6. Reator de Mistura Contínuo de 2 Estágios com Reciclo	115
5.6. PRODUÇÃO DA AGUARDENTE	127
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>131</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>133</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>134</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Critérios de qualidade segundo a legislação vigente	4
Tabela 02: Composição química aproximada da cana de açúcar	5
Tabela 03: Influência do método de imobilização na transformação de sacarose em isomaltose	30
Tabela 04: Meio de cultura para preparo do inóculo	40
Tabela 05: Meio de fermentação para determinação dos parâmetros de fermentação para células livres	42
Tabela 06: Meio de fermentação para determinação dos componentes voláteis	43
Tabela 07: Meio de cultura para determinação da temperatura de processo	44
Tabela 08: Meio de cultura para obtenção de massa celular	44
Tabela 09: Concentrações de alginato de cálcio e K-carragena	50
Tabela 10: Componentes do reagente DNS	63
Tabela 11: Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura A	69
Tabela 12: Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura B	71
Tabela 13: Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura C	73
Tabela 14: Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura D	75
Tabela 15: Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura E	77
Tabela 16: Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura F	79
Tabela 17: Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura M	81
Tabela 18: Quadro geral do processo batelada para células livres	85

Tabela 19: Parâmetros fermentativos obtidos com fermentação utilizando células livres	86
Tabela 20: Componentes voláteis no vinho	100
Tabela 21: Valores das condições iniciais e finais para a levedura B.	102
Tabela 22: Valores das condições iniciais e finais para a levedura M	102
Tabela 23: Valores das condições iniciais e finais para a levedura C	103
Tabela 24: Valores dos parâmetros para a levedura B	103
Tabela 25: Valores dos parâmetros para a levedura M	103
Tabela 26: Valores dos parâmetros para a levedura C	104
Tabela 27: Açúcares residuais e conversão para o reator de cesto	111
Tabela 28: Açúcares residuais e conversão para o reator com recirculação	114
Tabela 29: Condições iniciais e finais para a fermentação contínua	122
Tabela 30: Parâmetros de conversão e produção para os vários tempos de residência	122
Tabela 31: Componentes voláteis no vinho para os diversos tempos de residência	124
Tabela 32: Componentes voláteis na aguardente de cana	128

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01:	Esquema de um alambique simples	10
Figura 02:	Levedura ampliada 200 vezes	12
Figura 03:	Vias básicas para formação dos compostos de aroma e sabor durante a fermentação	14
Figura 04:	Principais métodos de imobilização	33
Figura 05:	Imobilização celular por oclusão em géis	47
Figura 06:	Esquema do processo utilizando um reator tubular de leite empacotado	53
Figura 07:	Esquema do processo utilizando um reator tubular de leite fluidizado	54
Figura 08:	Esquema do processo utilizando um reator tubular de leite fluidizado com reciclo	55
Figura 09:	Esquema do processo utilizando um reator de Mistura Contínuo com as células imobilizadas retidas no interior do cesto	56
Figura 10:	Esquema do processo utilizando um Reator de Mistura contínuo com reciclo.	57
Figura 11:	Esquema do processo utilizando 2 Reatores de Mistura Contínuos com Reciclo em série.	58
Figura 12:	Destilador (alambique) utilizado para produção da aguardente.	59
Figura 13:	Comportamento do sistema fermentativo para a levedura A	70
Figura 14:	Comportamento do sistema fermentativo para a levedura B	72
Figura 15:	Comportamento do sistema fermentativo para a levedura C	74
Figura 16:	Comportamento do sistema fermentativo para a levedura D	76
Figura 17:	Comportamento do sistema fermentativo para a levedura E	78
Figura 18:	Comportamento do sistema fermentativo para a levedura F	80
Figura 19:	Comportamento do sistema fermentativo para a levedura M	82
Figura 20:	Comportamento da concentração de ART para células livres	83
Figura 21:	Comportamento da produção de Etanol para células livres.	83

Figura 22: Comportamento da concentração de Biomassa Viável para células livres	84
Figura 23a Esfera de Alginato de Calcio onde houve acúmulo de CO <sub>2</sub> . e 23 b :	89
Figura 24: Cavidades causadas pelo desprendimento e acúmulo de CO <sub>2</sub> durante a fermentação	91
Figura 25: Esfera seccionada de Pectina Cítrica após a fermentação	93
Figura 26 Esferas de alginato com TiO <sub>2</sub> contendo células imobilizadas e rompidas após a fermentação	95
Figura 27a Formas não esféricas devido a alta viscosidade da solução gel + e 27 b : leveduras durante o processo de imobilização	97
Figura 28: Detalhe do Reator de Cesto	109
Figura 29: Esferas dentro do cesto após o final da fermentação	111
Figura 30: Reator de mistura contínuo de um estágio com reciclo.	113
Figura 31: Reator de mistura contínuo de um estágio com reciclo em funcionamento	115
Figura 32: Reator de mistura contínuo em série com reciclo	117
Figura 33: Detalhe da diferença de nível entre a saída de fermentado e o interior do reator	119
Figura 34: Reatores de mistura contínuos com reciclo em série em funcionamento	121
Figura 35: Variação da concentração de acetaldeído no fermentado em função do tempo de residência	124
Figura 36: Variação da concentração de acetato de etila no fermentado em função do tempo de residência	125
Figura 37: Variação da concentração de álcoois superiores no fermentado em função do tempo de residência	125
Figura 38 Variação da acides volátil no fermentado em função do tempo de residência	126

## RESUMO

Apesar da importância econômica e social da aguardente de cana brasileira, são ainda escassos os estudos sobre seu método de produção. As crescentes exigências dos mercados interno e externo têm feito crescer a preocupação com a qualidade desta bebida. A aguardente de cana é muito apreciada por seu sabor e aroma característicos, que são decorrentes dos processos de fermentação, destilação e envelhecimento em recipientes de madeira. Os principais fatores que interferem na qualidade da aguardente são as leveduras e condições de fermentação. As leveduras utilizadas para a fermentação provêm da própria de cana de açúcar, passam para o caldo durante o processo de extração e é caracterizada por uma grande quantidade de linhagens com a predominância de algumas delas no decorrer da safra.

O principal problema que enfrentam as destilarias artesanais é a falta de padronização do produto e até mesmo a obediência à legislação vigente. O cobre, acidez volátil e o exame organoléptico são os parâmetros que mais contribuem para a frequência de não atendimento a legislação.

Os objetivos deste trabalho foram selecionar uma levedura proveniente de uma destilaria de aguardente artesanal, imobilizá-la em um suporte específico e desenvolver um reator para fermentação contínua, visando um aumento de produtividade e redução nos teores de componentes voláteis que influenciam negativamente a qualidade da aguardente.

Para isso foram necessários o dimensionamento e a montagem de dois reatores CSTR em série. A agitação do meio com as células imobilizadas foi conseguida com a utilização de um agitador magnético e uma bomba centrífuga que realizava o reciclo do meio em cada um dos reatores.

O substrato utilizado foi caldo de cana de açúcar e o micro organismo foi imobilizado em alginato de cálcio. O experimento foi conduzido inicialmente em fermentação batelada. Após o termino da atividade metabólica foi iniciada a alimentação contínua até o sistema atingir o regime. Utilizaram-se vários tempos de residência e amostras foram coletadas após o sistema atingir o regime para a determinação dos componentes voláteis e teores de açúcares redutores totais.

Como resultado obteve-se uma comparação em termos de concentrações de componentes voláteis e produtividade entre as aguardentes produzidas com caldo fermentado proveniente da fermentação contínua com células imobilizadas e caldo fermentado proveniente de fermentação batelada com células livres.

O processo fermentativo contínuo com células imobilizadas conduziu a uma produtividade de 4,42 g/L/h, rendimento 87,10 % e conversão de 98,72 %. A aguardente de cana obtida apresentou concentrações de actaldeído, n-propanol e acidez volátil - componentes que interferem negativamente na qualidade da aguardente - menores quando comparadas à aguardente produzida com a mesma levedura em fermentação com células livres.

## SUMMARY

Besides the economical and social importance of Brazilian sugar cane spirit, there aren't many studies about its production methods. The increasing demand of this product by internal and external markets leads to an increased attention to its quality. The Brazilian sugar cane spirit is very appreciated by its characteristic aroma and flavor, as a consequence of the fermentation process, as well as distillation and maturation been carried out in wood recipients. The main factors that influence the quality of spirit are the yeast strain and fermentation conditions. The yeasts utilized in fermentation come from the raw sugar cane, and go into the sugar cane broth during the extraction process. They are characterized by a great quantity of different yeasts strains, although there are some dominating species which can vary during the year.

The main problems facing the small distilleries are the lack of standardization and still law abiding. The copper, the volatile acidity and organoleptic exam are the major factors that usually skip the regulatory standards.

The goal of this work were to select a yeast strain from a small distillery, to immobilize it in an specific support and to develop a reactor to promote a continuous fermentation, with the aim of increasing the productivity and reducing the undesirable volatile by-products that influence negatively the quality of the spirity.

To do this, it was necessary to design and construct two stirred reactors linked in series, operated continuously. The mixing in the reactor was obtained with a magnetic stirrer and a centrifuge pump to recycle the broth into the reactors.

The substrate utilized was only sugar cane broth and the yeasts were immobilized in calcium alginate. The experiment was initially conducted in batch culture. After the end of metabolic activity the continuous feed was started until the system reach the steady state. The dilution rate was changed during the fermentation time and samples were analysed from ethanol, volatile by-products and sugars.

As comparison, the amounts of volatile compounds and productivity were measured in the continuous fermentation with immobilized cells and in a conventional process with free cells.

The continuous fermentation with immobilized cells led to a productivity of 4,42 g/L/h, yield of 87,10 % and conversion of 98,72 %. The spirit obtained in this process presented acetaldehyde, 1-propanol and volatile acidity contents – compounds that contribute to a negative sensorial quality of spirity – lower than the ones obtained in the conventional process using the same yeast.

# 1. INTRODUÇÃO

A cana de açúcar chegou ao Brasil trazida da Ilha da Madeira pelos portugueses ainda no século XVI. No Engenho de Martim Afonso de Souza descobriram que o vinho da cana, conhecido como “garapa azeda”, líquido resultante dos tachos de rapadura, servia de alimento para os animais. Os escravos passaram também a tomar esta bebida inicialmente apenas fermentada e foram eles que começaram a destilar este líquido, chamando-o de “cagaça”, daí a origem do nome cachaça. A bebida prosperou, chegando até mesmo a ser moeda corrente para compra de escravos na África.

A cachaça sempre foi considerada pelo próprio brasileiro como um produto de segunda categoria, sendo que muitos apreciadores da bebida tinham até mesmo vergonha de consumi-la em público. Somente a partir da última década é que empresários descobriram o grande potencial de mercado que representa o setor. Foram criadas associações de produtores com a finalidade de promover e valorizar o produto, estabelecer normas técnicas e regulamentos para disciplinar as atividades do setor, financiar pesquisas tecnológicas para aperfeiçoar e incentivar a produção, promovendo a sua interiorização e conseqüente desenvolvimento econômico.

O Brasil produz hoje, cerca de um bilhão e quinhentos milhões de litros de aguardente de cana de açúcar anualmente. As exportações brasileiras do produto alcançaram US\$ 9 milhões de dólares em 2002, ante US\$ 7,3 milhões em 1999. A meta é alcançar US\$ 100 milhões com receitas de exportação em 10 anos. Para isto foi criado o Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Aguardente de Cana (PBDAC) onde serão aplicados R\$ 7,3 milhões. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Cachaça de Alambique (IBCA), dos 1,5 bilhão de litros de cachaça produzidos anualmente no país, 1,05 bilhões são de cachaça industrial, produzida em destilarias contínuas, e 450 milhões são de cachaça artesanal, feitas em pequenos alambiques. O setor reúne cerca de 30 mil produtores, com mais de 5 mil marcas. São aproximadamente 400 mil empregos diretos (Vasconcelos, 2003).

Decreto presidencial, publicado em 2001, estabeleceu que o nome cachaça somente pode ser usado por fabricantes brasileiros para denominar a bebida. Isto possibilita o reconhecimento internacional do produto como genuinamente brasileiro, assim como o Whisky está associado à Escócia, a Tequila ao México, o Sake ao Japão, etc.

O mercado de cachaça artesanal encontra-se em plena expansão devido à preferência do consumidor por um produto de aroma e sabor mais agradáveis, o que não é oferecido pelos produtores da cachaça industrial.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é desenvolver um processo de fermentação contínuo utilizando células imobilizadas para a produção de aguardente. Para isto pode-se dividir o trabalho em 4 fases:

- Seleção da levedura a ser imobilizada.
- Determinação do melhor suporte para a imobilização.
- Desenvolvimento do reator.
- Produção da aguardente.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. A AGUARDENTE PERANTE A LEGISLAÇÃO

De acordo com o Ministério da Agricultura, Aguardente de Cana é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54 °GL (graus Gay-Lussac - %v/v), obtida do destilado alcoólico simples de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ou pela destilação do mosto fermentado de cana de açúcar, podendo ser adicionada até 0,6 g/100 mL de açúcar, sendo que para este último caso terá sua denominação acrescida da expressão “adoçada”.

Na composição da aguardente prevê-se que os voláteis totais, não álcool (soma de aldeídos, ácidos voláteis, ésteres, furfural e álcoois superiores), não poderão ser inferiores a 0,2 g nem superiores a 0,65 g/100 mL de álcool anidro. Além disso, os componentes voláteis não álcool deverão obedecer aos limites expostos na Tabela 1.

Tabela 01 - Critérios de qualidade segundo a legislação vigente.

Componentes	Maximo
Acides volátil (mg/100 mL etanol anidro).	150
Ésteres (mg de acetato de etila/100 mL etanol anidro)	200
Aldeídos (mg de aldeído acético/100 mL etanol anidro)	30
Furfural (mg/ 100 mL etanol anidro)	5
Álcoois superiores (mg/100 mL etanol anidro)	300
Metanol (mL/100 mL de etanol anidro)	0,25
Cobre (mg/litro)	5

## 3.2. A PRODUÇÃO DE AGUARDENTE ARTESANAL

### 3.2.1. Matéria Prima

De acordo com a ORPLANA – Organização dos Plantadores de Cana do Estado de São Paulo - a composição química da cana de açúcar é uma função de diversos fatores, como: variedade, solo, clima, sanidade da cultura, grau de maturidade, florescimento, adubação, etc. Sob o ponto de vista industrial, a prévia despalha manual ou a fogo para sua colheita, a intensidade do desponete, o tempo decorrido entre a colheita e a industrialização influenciam, qualitativa e quantitativamente, a sua composição. Tendo em vista estes fatores, a tabela 2 representa a composição química aproximada da cana de açúcar:

Tabela 02 - Composição química aproximada da cana de açúcar

Componentes do caule	Variação (%)
Água	65 – 75
Açúcares	12 – 18
Sacarose	11 – 18
Glicose	0,2 – 1,0
Frutose	0,0 – 0,6
Fibra	8 – 16
Celulose	5,00 – 6,50
Lignina	1,50 – 2,50
Pentosanas	1,75 – 2,25
Materiais Nitrogenados	0,2 – 0,6
Aminoácidos, amidas, albuminóides nitratos	
Gorduras e ceras	0,15 – 0,25
Materiais Minerais	0,2 – 0,6
Sílica (SiO <sub>2</sub> ), Potássio (K <sub>2</sub> O), Sódio (Na <sub>2</sub> O), Cálcio (CaO), Magnésio (MgO), Ferro (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ), Sulfatos (SO <sub>3</sub> ), Cloretos (Cl)	
Pento - hexanonas	0,25 – 0,75
Ácidos livres (málico, succínico, etc).	0,10 – 0,15
Ácidos combinados (málico, succínico, etc).	0,10 – 0,15

Stupiello (1992) relata que a cana de açúcar deve atender a um conjunto de parâmetros tecnológicos e microbiológicos que definam sua qualidade e tenham uma influencia fundamental no seu processamento e, de maneira especial, na fabricação de aguardente, onde as técnicas empregadas não oferecem recursos para minimizar os efeitos causados por uma matéria prima de má qualidade.

Os principais fatores de qualidade são:

- **Variedade:** É o principal fator de qualidade. Devem ser utilizadas variedades com elevada produtividade, resistência a doenças, ótimo poder de rebrota e alto teor de açúcar.
- **Meio Ambiente:** temperatura e umidade são os principais elementos que controlam a deterioração microbiológica. Isto faz com que nos períodos secos e frios a deterioração seja mais lenta que nos períodos quente e úmido.
- **Pragas e doenças:** Metabólitos decorrentes da atividade de microrganismos formados pelo complexo broca-podridão diminuem a eficiência fermentativa.
- **Planejamento agrícola:** A escolha de variedades com maturações precoces, media e tardia permitem que se trabalhe com os teores de açúcar máximo de cada variedade durante toda a safra.

O grau de maturação da cana de açúcar é verificado através da determinação do valor do teor de açucares redutores totais com um densímetro ou refratômetro. Geralmente a cana é cortada sem utilizar o sistema de queima do canavial, e, moída no máximo após 24 horas do corte.

### 3.2.2. Extração do Caldo de Cana

Nas grandes fábricas de aguardente de cana, a extração do caldo é feita por moendas de ternos múltiplos com embebição do bagaço para garantir uma maior extração do açúcar, levando a um rendimento de 96 % ou mais. Nas unidades pequenas a extração é feita em apenas um único terno, sendo a alimentação feita manualmente, obtendo-se um rendimento em torno de 75 % (Yokaya, 1995).

No caso das pequenas destilarias a cana de açúcar não sofre nenhum pré-processamento para moagem. O caldo obtido é recebido em um tanque onde são corrigidos os valores da temperatura, pH e concentração de açúcar e então enviado as dornas de fermentação.

Um caldo muito diluído fermenta rapidamente e facilita a multiplicação celular da levedura, mas a produtividade (quantidade de álcool produzida por volume do líquido por hora) e rendimento (quantidade de álcool produzida por certa quantidade de açúcar) são baixos quando comparados com mosto mais concentrado. Uma concentração excessiva leva a uma lentidão na velocidade de fermentação e comprometimento na multiplicação celular, já que o etanol produzido e a alta concentração inicial de açúcar podem inibir a atividade da levedura. Na prática verifica-se que, para o caso de destilarias de aguardente, um mosto com 18 Brix é apropriado para fermentação.

A levedura apresenta um ótimo de atividade entre pH 4,0 e 4,5 e temperatura entre 30 - 34 °C (Yokoya, 1995). Para o ajuste do pH é utilizado ácido sulfúrico comercial devido ao seu baixo custo e alto ponto de ebulição (340 °C), para que não seja destilado juntamente com a aguardente. O ajuste de temperatura é realizado principalmente nas épocas frias do ano, com a utilização de tanques encamisados ou aquecimento com fogo direto.

### 3.2.3. Fermentação

A fermentação alcoólica é a principal etapa do processo de produção da aguardente de cana. O açúcar e outros componentes presentes no caldo são transformados em etanol, gás carbônico e outros produtos que são responsáveis pela qualidade e defeito do produto. O material a ser fermentado, constituído de caldo de cana e nutrientes (opcional), é denominado de "mosto" e o líquido resultante após o processo fermentativo e a separação das células é denominado de "vinho".

A maioria das usinas sucroalcooleiras usa o sistema de fermentação a batelada ou batelada alimentada, sendo que estes processos estão sendo substituídos pelo processo contínuo. Em todos os processos as leveduras são separadas do meio de fermentação por centrifugação ou sedimentação e reusadas nas fermentações subseqüentes, depois de passarem por um tratamento para reduzir a contaminação bacteriana.

Em destilarias de pequeno porte o método utilizado é a batelada e a separação das células feita por sedimentação devido a sua simplicidade operacional e baixo custo de implantação. O tempo de fermentação varia de 12 a 36 horas dependendo de vários fatores como temperatura, pH, concentração de açúcares e células, etc. Um tempo adicional é requerido para a sedimentação das leveduras após término da fermentação, para que esta seja separada do vinho que será enviado para a destilação.

As leveduras utilizadas nestas indústrias são provenientes da própria cana de açúcar, que passam para o caldo durante sua extração. A técnica usada para sua multiplicação consiste em utilizar fubá de milho e farelo de arroz como nutrientes e caldo de cana diluído como substrato. Pequenas quantidades de caldo diluído são adicionadas nas dornas diariamente até que se consiga volume suficiente para completá-las. Quando são cessadas a fermentação e decantação das leveduras o caldo fermentado é enviado à destilação e a dorna carregada novamente. Alguns

produtores preferem utilizar fermento prensado de panificação diretamente nas dornas de fermentação na proporção de 10 g/L para abreviarem o tempo de partida da fábrica.

#### 3.2.4. Destilação

A destilação se constitui na operação de separação do álcool e das impurezas (voláteis ou não) que compõe o caldo fermentado e é baseada na diferença do grau de volatilização de seus componentes.

Na maioria das destilarias artesanais o modelo de alambique usado é o simples (Figura 1). Este equipamento não permite um bom esgotamento do vinho e, em condições normais de operação, podem fornecer uma aguardente rica de componentes não alcoois, devido a um excesso de retrogradação, determinado pelo desenho e dimensões do capitel, ou então, pela redestilação da fração final do vinho. Entretanto pode-se obter uma aguardente de melhor qualidade com a separação das frações de cabeça, coração e cauda.(Stupiello, 1992).

Na pratica, a fração cabeça é separada quando se obtém aproximadamente de 5 a 10 % do volume estimado de aguardente a ser obtido e a fração cauda é separada quando o líquido que sai do destilador possuir a graduação 38°GL (%v/v) ou a fração coração possuir uma graduação de 48 a 50°GL (%v/v).

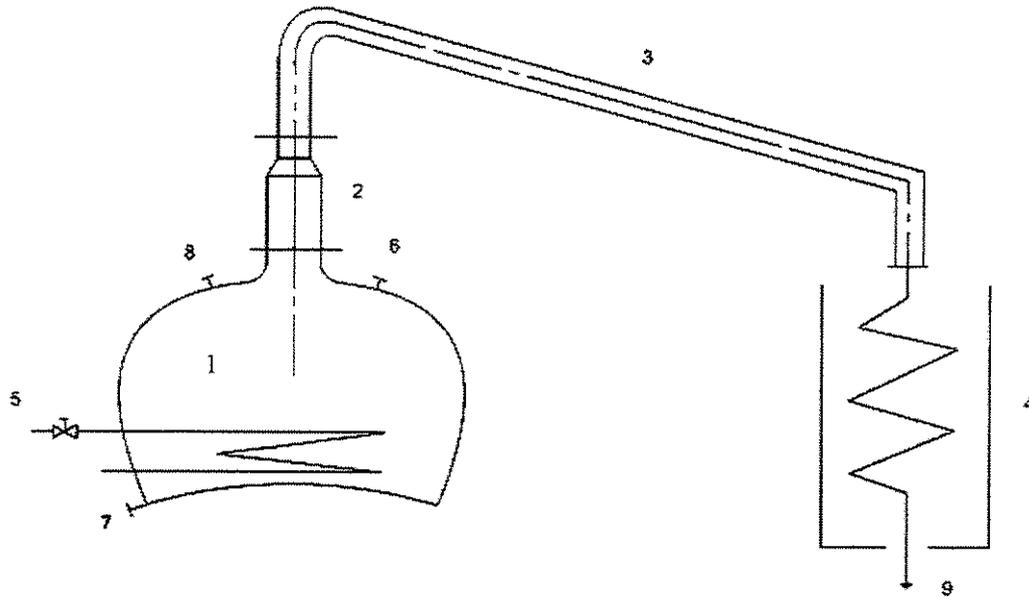


Figura 1- Esquema de um alambique simples. (1) Curcúbita ou caldeira; (2) Capitel, domo ou elmo; (3) Alonga ou tubo de condensação; (4) Resfriador; (5) Tubulação de vapor; (6) Entrada de vinho; (7) Descarga de vinhaça; (8) Válvula reguladora de pressão; (9) Canalização de destilado (Stupiello, 1992b).

### 3.2.5. Maturação

Segundo Nishimura (1998), bebidas recém destiladas como o whisky, possuem gosto picante e odor pungente e desagradável, sendo o processo de envelhecimento e maturação necessários para tornarem agradáveis e desejáveis o seu aroma e sabor. A diferença de qualidade entre o aroma e o sabor entre bebidas envelhecidas e não envelhecidas é geralmente muito significativo. O mecanismo do processo de envelhecimento ainda não está completamente elucidado, mas basicamente pode ser dividido em sete tipos:

1 - Extração direta dos componentes da madeira.

2 - Decomposição das macromoléculas extraídas da madeira, como lignina, celulose e hemicelulose, seguida da sua eluição no destilado.

- 3 - Reação entre os componentes da madeira e dos destilados.
- 4 - Reações envolvendo somente os componentes da madeira.
- 5 - Reações envolvendo somente os componentes do destilado.
- 6 - Evaporação dos componentes de baixo ponto de ebulição através das paredes do recipiente.
- 7 - Formação de complexo molecular estável com álcool e água.

No Brasil, varias madeiras são utilizadas na fabricação de barris e tonéis para o envelhecimento da aguardente. Dias et al (1998), através da identificação de alguns taninos e componentes fenólicos em aguardentes estocadas em tonéis construídos com a madeira Balsamo (*Myroxylon peruiferum*), obtiveram como compostos fenólicos predominantes o ácido ilógico e a vanilina; em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*), o ácido elágico e o ácido vanílico; em tonéis de jequitibá (*Cariniana estrellensis*), o ácido gálico; em tonéis de amburana (*Amburana cearensis*), o ácido vanílico e o sinapaldeído; em tonéis de jatobá (*Hymenea sp*), o coniferaldeido e em tonéis de Ipê (*Tabebuia sp*), o ácido seríngico, o coniferaldeido e o ácido vanílico.

### 3.3. A FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS

#### 3.3.1. Leveduras

As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importante de fungos. Uma levedura típica consta de células pequenas, ovais, com dois a oito micrômetros de diâmetro, que se multiplicam formando brotos ou gêmulas (Figura 2). Estas gêmulas crescem até atingirem quase o tamanho da célula mãe, ocorre a divisão nuclear, e então uma parede divisória se forma entre as duas células.

A maioria delas não vive no solo mas adaptaram - se a ambientes com alto teor de açúcar, tais como o néctar das flores e a superfície das frutas. Como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária a sua sobrevivência.

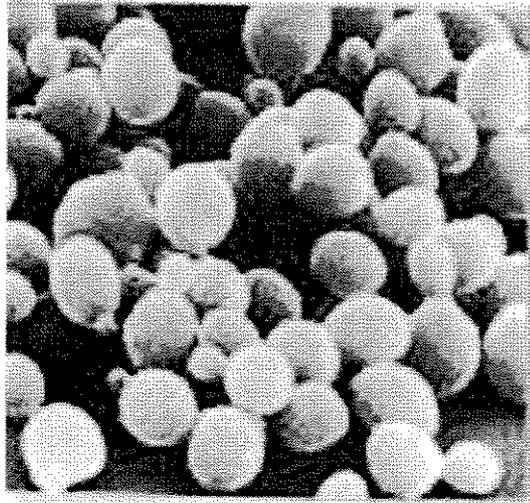


Figura 2 - Levedura ampliada 200 vezes

De acordo com Korhola (1989) as leveduras utilizadas na produção de bebidas alcoólicas devem apresentar as seguintes características: alta tolerância ao álcool, bom rendimento, fermentar rapidamente o meio e, portanto, minimizar o risco de contaminações, produzir a melhor concentração e balanço de compostos secundários desejáveis. Russel et al. (1987) acrescenta ainda que as leveduras devem apresentar estabilidade genética ao fim da fermentação e serem facilmente removidas do meio em fermentação.

A fermentação artesanal da aguardente de cana caracteriza-se por ser conduzida por uma microbiota mista de leveduras com predominância de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Oliveira (2002), isolou 30 linhagens de leveduras provenientes de destilarias artesanais de aguardente, obtendo 24 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, e 6 pertencentes aos gêneros *Candida* (3), *Kloeckera*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces*. Morais et al. (1997) observaram que durante a

multiplicação do fermento natural e no decorrer da fermentação para produção de aguardente artesanal, há uma sucessão de espécies de leveduras, sendo a espécie predominante *S. cerevisiae*, *Candida sake*, *Kluyveromyces marxianus* var. *drosophilum* e leveduras apiculadas também são freqüentes.

### 3.3.2. Produção de Compostos de Aroma e Sabor.

Quando as leveduras fermentam o açúcar, o etanol não é o único composto produzido. Também são produzidos dióxido de carbono e um grande número de componentes secundários, que levam a uma importante contribuição ao aroma e sabor das bebidas, seja ela uma cerveja, vinho ou algum destilado (Berry and Watson, 1987). Estes produtos secundários podem ser divididos em varias categorias, baseado em sua origem metabólica dentro da célula, conforme a Figura 3. O mais abundante destes são os álcoois superiores, que são produzidos juntamente com o etanol, entretanto, muitos componentes presentes em pequenas quantidades desempenham um papel chave no sabor das bebidas. Ácidos orgânicos podem contribuir diretamente no aroma ou indiretamente por estarem envolvidos na formação de ésteres. Compostos carbonílicos como acetaldeído e diacetil, estarão presentes em pequenas concentrações, mas tendo threshold muito baixo, podem desempenhar um papel chave no sabor das bebidas. As leveduras também podem estar envolvidas na produção ou modificação de compostos sulfurados, que tem importância crítica no aroma e sabor das bebidas.(Berry, 1995).

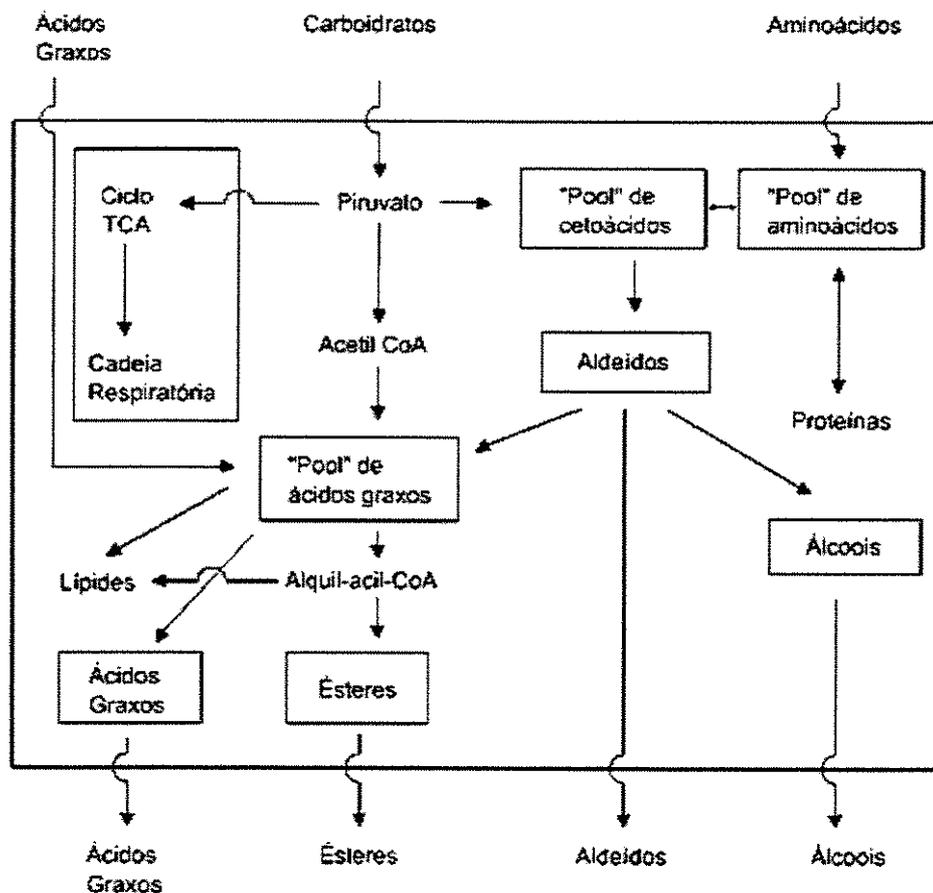


Figura 3 - Vias básicas para formação dos compostos de aroma e sabor durante a fermentação (Yokoya, 1995).

Apesar de diferentes bebidas serem distinguidas umas das outras por suas características organolépticas, não se observam grandes diferenças na sua composição química. A diferença mais importante é o conteúdo quantitativo dos compostos secundários (Suomalainen & Lehtonen, 1979).

A aguardente de cana é composta principalmente de água, etanol, e vários componentes secundários que conferem aroma e sabor. Estes compostos pertencem as seguintes classes: aldeídos, ácidos orgânicos, álcoois superiores, ésteres, furfural, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas, dentre outros (Lima, 1964). Os teores destes

compostos secundários na fermentação alcoólica são geralmente inferiores a 0,1 % (Maia 1994).

Nonato (2001), citado por Oliveira (2001) analisando 12 amostras de aguardente por meio de cromatografia gasosa identificou 38 componentes presentes, dentre eles álcoois, ésteres, ácidos orgânicos, hidrocarbonetos cíclicos e aromáticos.

### 3.3.2.1. *Etanol*

O etanol, maior constituinte orgânico volátil das bebidas, em baixas concentrações tem apenas um leve odor e é um excelente solvente para materiais odoríferos. Tem um leve sabor doce e abranda o ácido. Segundo Willians (1972), o etanol dá corpo às bebidas destiladas, vinhos e cidras, reduz a acidez aparente, aumenta a doçura e tem um efeito global de suavizar outros gostos característicos.

### 3.3.2.2. *Álcoois Superiores*

Os principais álcoois superiores produzidos pelas leveduras são o n-propanol, isobutanol (2-metil-1-propanol), álcool amílico (2-metil-1-butanol), álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) e os álcoois aromáticos hexanol e 2-feniletanol (Nykanen, 1986; Nykanen & Nykanen, 1991). O 3-metil-1butanol é o álcool predominante nas bebidas chegando seu conteúdo ser aproximadamente metade do total da fração de álcoois superiores.

Guidici et al. (1993) relatam que os álcoois superiores são produzidos a partir de aminoácidos correspondentes presentes no meio e que a quantidade formada é influenciada pela composição do meio (concentração de açúcar, pH, concentração e tipo de fonte de nitrogênio), pela temperatura, pelo grau de aeração e ainda pela linhagem da levedura.

Amerine (1972) sugere que os álcoois superiores podem ser importantes não apenas por causa dos seus odores próprios, mas pela sua ação solvente sobre outras substâncias odoríferas, interferindo na volatilidade das mesmas e conseqüentemente nas suas características sensoriais. Almeida & Barreto (1972) observaram a correlação entre os teores de n-propanol e a qualidade sensorial das aguardentes relatando a ocorrência de maiores teores de n-propanol em aguardentes de qualidade inferior.

Boza (1998), verificou que em virtude de suas características físicas, o n-propanol destila com alto grau de uniformidade, sendo a variação de seus teores entre as frações inicial e final da destilação (frações que destilam a 81,89 e a 42,61 % de álcool em volume a 20 °C) em torno de 8%, sendo respectivamente 13,59 e 12,53 mg/100 mL. Logo o controle do nível de n-propanol na aguardente é importante na operação de fermentação.

### 3.3.2.3. Aldeídos

A fração mais volátil das bebidas alcoólicas é composta de compostos carbonílicos, tais como o diacetil e aldeídos, que desempenham um papel importante no desenvolvimento de sabores. O acetaldeído é usualmente o composto encontrado em maior quantidade e representa mais que 90 % do conteúdo dos aldeídos nas bebidas. O baixo conteúdo de acetaldeído nas bebidas é freqüentemente associado a uma melhora da qualidade (Nykanen & Suomalainen, 1983). O acetaldeído e outros aldeídos alifáticos de cadeia curta possuem odor pungente o que pode aumentar o sabor picante das bebidas (Nykanen, 1986).

Ribeiro (1999), realizando fermentações com três linhagens de leveduras, verificou que para os três casos, a concentração de aldeídos variou de forma crescente com a fase exponencial de crescimento, após o qual ocorreu diminuição da concentração, observando-se picos de concentração após o ponto de máxima concentração de etanol.

Yokoya (1995) comenta que o acetaldeído e outros aldeídos (fórmico, butírico, isobutírico, valérico e caproico) são separados do vinho por destilação na fração de produtos de "cabeça".

#### 3.3.2.4. Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos encontrados nas bebidas alcoólicas são componentes de um dos principais grupos de sabor. Dentre os ácidos orgânicos produzidos no processo de fermentação temos os não voláteis como os oxiácidos (principalmente ácido pirúvico e 2-oxoglutarato), ácido L(-) málico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido citramálico, ácido D(-)-2- metilmálico, ácidos 2,3-dihidroxi-butírico substituído, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido L-pirrolidonecarboxílico (5-oxoproline), ácidos glicosídicos (ácido glicônico), glicolato e ácido glutárico (Whiting 1976). Os ácidos graxos voláteis constituem o mais importante grupo de compostos de sabor das bebidas destiladas. O termo acidez volátil se refere a compostos que podem ser vaporizados com o álcool e a água e coletados no destilado, apesar de apresentarem ponto de ebulição mais alto que a água (Nykanen & Nykanen, 1991).

Na acidez volátil estão presentes os ácidos acético, láctico, fórmico, butírico, propiônico e outros em quantidades ínfimas (Amerine et al., 1972). O ácido acético é o principal ácido orgânico excretado pela levedura no meio. Apesar de haver uma grande variação na proporção relativa de ácido acético nas diferentes bebidas, esse ácido normalmente representa de 60 a 95 % da acidez total. (Nykanen & Suomalainen, 1983) É produzido pela oxidação do acetaldeído, com remoção de hidrogênio, na reação que é oposta à redução normal do acetaldeído a etanol (Berry, 1995).

Boza (1988), analisando sensorialmente a qualidade de 16 amostras de aguardente verificou que a qualidade sensorial é inversamente proporcional a acidez volátil. Cleto (1997), verificou que a adição de fubá de milho no processo fermentativo reduz a concentração de n-propanol e diminui a acidez total da aguardente melhorando sua

qualidade. Ele conclui que o amido do fubá tem efeito adsorvente sobre os ácidos graxos de cadeia curta presentes no meio de fermentação, reduzindo a acidez total da aguardente.

### 3.3.2.5. Ésteres

Os ésteres constituem a maior classe de compostos de aroma nas bebidas alcoólicas. Eles são produzidos pela levedura durante a fermentação em uma reação entre álcoois produzidos e por moléculas de acetil CoA, que são intermediários na produção de ácidos orgânicos. A quantidade de éster produzida depende da quantidade relativa de álcool e acetil CoA produzidas pela levedura. Como o etanol é o álcool mais abundante presente na fermentação, o acetato de etila é normalmente o éster encontrado em maior quantidade.(Berry, 1995).

Yoshioka and Hashimoto (1981), relatam que na fase inicial da fermentação, quando o crescimento das leveduras é rápido, não ha formação significativa de ésteres, mas quando o crescimento e a síntese de lipídios cessa, a formação de ésteres é estimulada. Os fatores que influenciam a formação de ésteres são o tipo de levedura utilizada, meio de fermentação, pH, temperatura, aeração e quantidade de inóculo utilizada (Ramsey and Berry, 1983 b, 1984 a, b).

Ribeiro (1999), estudando o comportamento de 3 linhagens de leveduras observou que para duas delas a produção de ésteres foi verificada na 4° hora de fermentação. No período seguinte, com amostras de 8 horas, observou-se à diminuição da concentração, voltando a crescer na 12° hora e no final da fermentação. A maior concentração de ésteres ocorreu na amostra da 16° hora, no fim da fase exponencial. Na terceira linhagem, ocorreu uma tendência crescente de produção de ésteres e a concentração foi marcadamente maior nas amostras coletadas as 16° e 20° hora de fermentação.

Os ésteres contribuem para um aroma de frutas no "bouquet" da bebida. O éster etílico, isobutílico, isoamílico e os ésteres de ácidos graxos de cadeia curta têm um aroma agradável de frutas e são os principais componentes que interferem na percepção do aroma. (Suomalainen & Lehtonen, 1979). Considerando o conteúdo total de ésteres, o acetato de etila geralmente excede 50 % nas bebidas destiladas.

### *3.3.2.6. Compostos Sulfurosos*

Já foram identificados mais de 50 componentes sulfurosos em bebidas alcoólicas, a maioria destes derivados diretamente da matéria prima utilizada na fermentação. Entretanto alguns também são derivados do metabolismo das leveduras. O sulfeto de hidrogênio pode ser produzido durante a degradação da metionina e cisteína liberadas durante a autólise das leveduras ou reciclo das proteínas. Ele também pode ser gerado a partir do enxofre inorgânico presente no meio (Berry, 1995). Isto é de extrema importância, já que na produção de aguardente é usado ácido sulfúrico para correção do pH do meio.

A levedura também pode produzir dimetil sulfeto (DMS), mas não são consideradas fontes importantes deste componente, o qual devem estar presentes nas matérias primas como a cevada maltada.

Compostos sulfurosos apresentam odores desagradáveis, o que aliado a seu baixo limite de detecção, torna sua presença nas bebidas indesejável. Normalmente o sulfeto de hidrogênio produzido é liberado juntamente com o dióxido de carbono formado, mas podem reagir com álcoois formando mercaptanas, composto com um odor e sabor muito desagradáveis (Amerine et al., 1972). Fermentações pouco vigorosas, que se estendem por longos períodos de tempo favorecem a formação de sulfeto de hidrogênio.

Isique et al (1998), determinaram os teores de enxofre de sete amostras de aguardente de cana e submeteu-as a testes de aceitabilidade quanto ao aroma, sabor e impressão global. Os resultados obtidos revelaram haver correlação negativa significativa entre os teores de enxofre e a aceitabilidade das amostras em relação a todas as características avaliadas, ressaltando o papel negativo representado pelos compostos sulfurados presentes nas aguardentes de cana.

### 3.3.3. FATORES QUE INFLUENCIAM NA FORMAÇÃO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS

#### 3.3.3.1. *Leveduras e Condições de Fermentação*

As leveduras e as condições de fermentação têm sido apontadas como os fatores que mais influenciam o sabor e aroma das bebidas alcoólicas (Suomalainen & Lehtonen, 1979), pois é durante a fermentação que a maioria dos compostos de sabor são formados.

Suomalainen (1970) relata que as matérias primas utilizadas na fabricação de bebidas pouco contribuem para a formação do aroma, sendo seus componentes produzidos principalmente pelo metabolismo das leveduras durante a fermentação, dependendo do tipo de levedura utilizada, e das condições sob o qual se conduz a fermentação. Ele verificou que dentro de um grupo de mais de 100 componentes voláteis as mesmas substâncias apareciam na fração de componentes do aroma de cervejas, vinhos e bebidas destiladas, diferindo apenas quantitativamente.

Berry (1995) relata que condições que favorecem o crescimento celular como temperatura, alta quantidade de inóculo, e aeração estimulam a produção de álcoois superiores. Ransay & Berry (1984b) verificaram que a quantidade de álcoois superiores pode ser regulada pelo ajuste da quantidade de inóculo utilizada. Seus resultados indicam que a quantidade de álcoois superiores aumentou de 288 mg para 504 mg por

litro quando a quantidade de inóculo foi aumentada de  $0,5 \times 10^7$  células por mililitro para  $16 \times 10^7$  células por mililitro. Estes níveis correspondem a 0,25 e 8 vezes o nível normal utilizado em destilaria de whisky. Parfait & Jouret (1975) mostraram que o *Schizosaccharomyces pombe* produz uma quantidade muito pequena de álcoois superiores. Guymon et al. (1961), verificaram que uma linhagem mutante de *Saccharomyces cerevisiae* não produzia n-propanol e 2-metil-1butanol.

Os aldeídos são intermediários na produção de álcoois superiores. Logo as condições que favorecem a formação destes álcoois também favorecem a formação de pequenas quantidades de aldeídos (Ransay & Berry, 1983b, 1984a). Eles são excretados pelas leveduras durante a fermentação, podendo ser reabsorvidos e reduzidos ao álcool correspondente durante os últimos estágios de fermentação. Seu nível pode ser estimulado pela adição de  $SO_2$  ao meio (Berry, 1995).

Os fatores que influenciam a formação de ésteres são a levedura, a qualidade do mosto, a temperatura de fermentação, a quantidade do inóculo, agitação e aeração do mosto e sólidos em suspensão (Berry, 1984). Sob condições normais de crescimento muitos ácidos orgânicos produzidos são utilizados na composição da parede celular da levedura. Em condições de estrita anaerobiose, ácidos graxos insaturados e esteróides não podem ser produzidos e a formação da membrana celular é inibida. Nestas condições os ácidos orgânicos se tornam disponíveis para conversão em ésteres, que são excretados no meio.

Condições que restringem o crescimento tais como a falta de aeração e ou nitrogênio, podem conduzir a um aumento na formação de ésteres. A maioria dos ésteres é formada nos últimos estágios da fermentação, ao contrario dos álcoois superiores, que são produzidos abundantemente durante a fase de crescimento. A aeração do meio pode suprimir totalmente a formação de ésteres mesmo em condições que favoreçam a produção de etanol (Berry, 1995).

Ramsay and Berry (1984b) relatam que os mesmos fatores que influenciam a formação de ésteres influenciam a formação de ácidos orgânicos e que a quantidade formada durante a fermentação diminui com o aumento da temperatura.

Krauss and Forch (1975) mostraram que durante a fermentação da cerveja, todas as condições que aceleravam o processo fermentativo levavam a uma diminuição nos teores de ácidos orgânicos.

O ácido acético é produzido principalmente durante os estágios iniciais da fermentação alcoólica, e maiores quantidades são formadas na presença de oxigênio (Amerine et al.). Watson (1983) relata que há um aumento relativo dos ácidos graxos nos estágios finais da fermentação.

A quantidade de glicerol produzida é fortemente influenciada pela linhagem da levedura e diversos fatores interferem na formação de glicerol por leveduras, tais como temperatura, pH, concentração de sacarose, fontes de nitrogênio e inibidores (Gutierrez, 1991).

O sulfeto de hidrogênio produzido durante a fermentação é influenciado pela linhagem da levedura, sendo que este gás é arrastado do meio juntamente com o dióxido de carbono liberado na fermentação.

### *3.3.3.2. Destilação*

As características sensoriais das bebidas alcoólicas são amplamente alteradas pela destilação, já que este processo altera a quantidade relativa dos compostos voláteis. Componentes não voláteis como alguns ácidos orgânicos e polifenóis são virtualmente eliminados pela destilação. A composição dos destilados é determinada por muitos fatores, incluindo o tipo de destilador, o grau de purificação e a seleção das frações usadas para a inclusão na bebida destilada (Cole and Noble, 1995).

No processo de fabricação da aguardente distinguimos 3 frações:

1. Cabeça - Fração inicial recolhida no início da destilação, formada pelos componentes de maior volatilidade.
2. Coração - Fração intermediária que corresponde à aguardente.
3. Cauda - Fração final, que corresponde aos componentes menos voláteis.

A fração cabeça contém vários componentes de aroma que possuem um impacto sensorial negativo, tais como acetaldeído e compostos sulfurados e não entra na composição do produto final (Guymon, 1974). Embora os aldeídos sejam reduzidos pela eliminação da fração cabeça, eles são gerados durante o envelhecimento em recipientes de madeira (Nykanen, 1986).

Os álcoois superiores, compostos presentes em maior quantidades nas bebidas destiladas, tendem a destilar a partir da metade da destilação. A vodka, que é um destilado recolhido com alta graduação alcoólica possui níveis de álcoois superiores menores que outra bebida recolhida com grau alcoólico mais baixo (Guymon, 1972).

Os ácidos graxos e seus ésteres correspondem ao segundo maior grupo de compostos voláteis encontrados nas bebidas destiladas. Alguns destes compostos também são perdidos na fração cabeça. A maioria dos ésteres possui aroma de frutas, como os ésteres etílico, isobutílico e isoamílico e ésteres de ácidos graxos de cadeia curta. Também estão presentes ésteres de alto ponto de ebulição como ésteres dos ácidos cáprico e caprílico.

Ácidos como o capríco, caprílico e cáprico possuem aromas parecidos com o de sabão e estão concentrados na fração cauda, que geralmente é descartada (Guymon, 1974).

A destilação altera o sabor das bebidas não somente pela alteração na proporção relativa dos componentes, mas também devido às reações químicas que ocorrem durante este processo. Reações de Maillard podem formar compostos heterocíclicos durante a destilação (de Rijke and ter Heide, 1983), particularmente em alambiques aquecidos pelo contato direto do fogo com suas superfícies metálicas, onde pode haver a formação de furfural (Simpson, 1971).

Álcoois e ácidos reagem formando ésteres, muitas reações ocorrem na fase vapor, como a redução de aldeídos a ácidos e álcool. Acetais se formam pela adição de dois álcoois e um aldeído. O diacetal formado proporciona uma fragrância delicada à bebida (Watson, 1983).

Os aromas de frutas e flores, causados principalmente por terpenos, são alterados durante a destilação. Alguns terpenos glicosilados são hidrolisados devidos ao calor e a condição ácida dentro do destilador resultando em uma alta concentração de terpenos livres, intensificando o aroma dos destilados (Strauss and Williams, 1983).

O aroma penetrante e apimentado de destilados novos como o rum, conhaque, whisky é causado pela acreolina (2-propenal), um derivado do glicerol, que pode ser formada por bactérias durante a fermentação ou durante a destilação, devido ao calor, a partir do glicerol (Nykanen, 1986).

As metodologias da destilação, batelada ou contínua, alteram a composição do destilado. Hough et al., (1982), verificaram que as concentrações de álcoois superiores eram maiores em amostras de whisky produzidos em alambiques do que aquelas produzidas em destiladores contínuos. O componente 2-feniletanol que possui um aroma agradável de rosas é encontrado em destilados produzidos em alambiques e ausente em destilados produzidos pelos destiladores contínuos. O furfural é produzido em alambiques aquecidos com fogo direto, não sendo encontrado em destilados produzidos pelo processo contínuo (Simpson, 1971).

O material de construção do alambique também influencia na composição dos destilados. Muitas reações são catalisadas nos destiladores de cobre em seus condensadores (Watson, 1983). Além de sua participação na formação de aldeídos, o cobre age de forma a reduzir o teor de compostos sulfurados voláteis no destilado, e portanto o desagradável odor de sulfetos. Nascimento (1999) relata que o principal componente desta classe de compostos é o dimetilsulfeto (DMS). Realizando experimentos que utilizavam destiladores de cobre e aço inoxidável, verificou que as amostras destiladas em alambiques de aço inox apresentaram teores de DMS de 250 mg/L contra 150 mg/L das amostras destiladas em destiladores de cobre.

Bizelli et al. (2000) avaliou a influência da dupla destilação da aguardente de cana utilizando alambiques de cobre. Verificou que a dupla destilação permitiu a redução da acidez total no produto destilado.

Dentre os produtores de cachaça artesanal não há um critério específico para a separação das frações cabeça, coração e cauda. Alguns usam como critério a temperatura dos vapores no topo do alambique. Outros desprezam de 5 a 10% do volume estimado de aguardente a ser obtido em função do teor de sólidos totais (Brix) do caldo de cana. Para a separação da fração cauda alguns produtores interrompem a coleta da fração coração quando o destilado que está saindo do alambique atingir a graduação de 38° GL; outros quando a fração coração estiver com uma concentração de 48 a 50° GL.

### 3.4. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

O estudo da cinética de processos fermentativos tem como objetivo quantificar as velocidades de crescimento celular, de consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados, além da influência de outros fatores tais como pH, temperaturas e inibidores nestas velocidades. Para o estudo da fermentação alcoólica

o modelo não estruturado e não segregado (onde as células são tratadas como um soluto monocomponente) é o mais utilizado. (Bailey e Ollis, 1986).

A equação mais simples foi proposta por Monod em 1948 e relaciona matematicamente a taxa específica de crescimento celular a concentração de substrato limitante de crescimento:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

Onde  $\mu_{\max}$  é a velocidade máxima específica de crescimento celular, S a concentração de substrato limitante e  $K_S$  a constante de Monod.; constante esta que representa o valor de S no qual a taxa específica de crescimento é a metade de seu valor máximo. Esta equação somente é aplicável quando não ha presença de inibidores de crescimento no meio de cultura ou quando estes estão em quantidades que não afetem a taxa de crescimento celular.

A taxa específica de crescimento pode ser afetada pela presença de inibidores no meio de cultura, como substratos ou produtos.

Equações que levam em conta a inibição pelo substrato foram proposta por diversos autores (Bailey e Ollis, 1986).

$$\mu = \mu_{\max} \left( 1 - \exp\left(\frac{-S}{K_S}\right) \right) \quad \text{Teissier}$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{\left( K_S + S + \frac{S^2}{K_I} \right)} \quad \text{Dourado (1987)}$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} \quad \text{Aiba, Shoda e Nagatani (1968)}$$

onde  $K_p$  e  $K_S$  são constantes cinéticas

O fenômeno de inibição pelo substrato geralmente é menos importante do que a inibição pelo produto. Para descrever a inibição pelo produto alguns autores desenvolveram as seguintes equações:

$$\mu_i = \mu_{\max} K_a P = \mu_{\max} \left( 1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) \quad \text{Goose e Tyagi (1979)}$$

onde  $\mu_i$  é a velocidade específica máxima de crescimento na presença de etanol e P a concentração deste produto

$$r_x = \mu X = \mu_{\max} \left( 1 - \frac{P}{P_m} \right)^n \left( \frac{S}{K_S + S} \right) X \quad \text{Levenspiel (1980)}$$

onde  $P_m$  é a concentração limite do produto inibidor

$$\mu_i = \mu_{\max} \left[ 1 - \left( \frac{P}{P_m} \right)^n \right] \quad \text{Luong (1985)}$$

### 3.5. FERMENTAÇÃO POR CÉLULAS IMOBILIZADAS

Imobilização celular consiste no confinamento de células em uma determinada região do espaço com a preservação de suas atividades catalíticas de maneira que possam ser separadas do meio fermentativo e reutilizadas.(Karel et al., 1985). A tecnologia de imobilização celular já é conhecida por mais de 25 anos. Atualmente, com os avanços em engenharia genética, seu uso está se tornando mais comum (Bickerstaff, 1995).

Muitos microrganismos possuem a capacidade de aderir a diferentes tipos de superfície na natureza de maneira que possam ficar próximos aos nutrientes necessários à sua sobrevivência. Podemos dizer que estes sistemas biológicos no seu estado natural são imobilizados. Entretanto, para a utilização comercial foram desenvolvidas técnicas de imobilização em diferentes suportes com a finalidade de conseguir o aproveitamento de características inerentes ao metabolismo destes microrganismos.

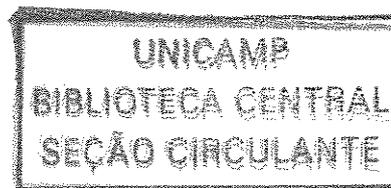
Como suporte para imobilização celular são utilizados vários materiais, como polímeros sintéticos: gel de poliacrilamida, polipropileno, resinas epóxi; polissacarídeos naturais: alginato de cálcio, k-carragena, pectina cítrica, agar; minerais: crisotila, alumina, terra diatomácea, rocha vulcânica, sílica porosa; vegetais: madeira, fibras de algodão; metais: aço inoxidável; os quais retêm as células dentro de suas estruturas, aprisionando-as.

#### 3.5.1. Escolha do suporte para imobilização

As células em solução se comportam como outro soluto qualquer, tendo total liberdade de movimento, mas quando imobilizadas sua liberdade é altamente restringida.

As considerações fundamentais para a escolha do suporte e método de imobilização são (Bickerstaff, 1995):

- Propriedades físicas: Estabilidade mecânica, área da superfície disponível, formato (esfera, placa, fibras), grau de porosidade, volume dos poros, permeabilidade, densidade, espaço para aumento da biomassa, fluxo, e queda de pressão.
- Propriedades químicas: Ligação de água ao suporte, não haver reação com as células ou enzimas, grupos funcionais disponíveis para modificação, regeneração e reuso do suporte.
- Estabilidade: Armazenamento, atividade enzimática residual, produtividade celular, regeneração da atividade enzimática, manutenção da viabilidade celular, estabilidade mecânica do suporte.
- Resistência: Ataque de bactérias e fungos, destruição por agentes químicos, solventes orgânicos, pH, temperatura e mecanismos de defesa da célula.
- Segurança: Toxicidade dos componentes do suporte, segurança do processo de imobilização para os trabalhadores.
- Economia: Disponibilidade e custo do suporte, reagentes, equipamentos, habilidades técnicas requeridas, impacto ambiental, preparação para uso em escala industrial, facilidade de scale-up, processamento contínuo, tempo de vida, reutilização.
- Reações: Taxa, produtividade, cinética da reação, sistemas com células ou enzimas múltiplas, configuração do reator, limitações na transferência de massa de cofatores, substratos e produtos.



Bucke (1983) relacionou diversos métodos de imobilização para a transformação de sacarose em isomaltose por células de *Erwinia rhapontici* para demonstrar que diversos tipos de imobilização podem influenciar na produtividade e tempo de vida do suporte (Tabela 3).

Tabela 3 - Influência do método de imobilização na transformação de sacarose em isomaltose

Tipo de Imobilização	Produtividade (g/g célula/h)	Tempo de meia vida (h)
Células Livres	0,600	36
<b>Método de Imobilização</b>		
Entrelaçamento em alginato de cálcio	0,325	8500
Entrelaçamento em poliacrilamida	0,130	570
Adsorção em DEAE celulose	0,583	400
Ligação cruzada com glutaraldeído	0,153	40
Entrelaçamento em K-carragena	0,263	38
Entrelaçamento em agar	0,340	27
Adsorção em carvão	0,100	25

Nedovic (1997) cita as seguintes características e vantagens do processo fermentativo utilizando células imobilizadas:

- Alta densidade celular
- Aumento da produtividade volumétrica
- Diminuição do tempo de reação
- Redução das dimensões dos fermentadores
- Utilização do biocatalizador por longos períodos de tempo
- Aumento na utilização do substrato
- Processos contínuos com vazões acima do ponto de washout
- Redução do risco de contaminação bacteriana

- Diminuição das inibições pelo substrato e produto
- Qualidade constante dos produtos

Roukas (1993) utilizou *Saccharomyces cerevisiae* na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio para a fermentação de melão de beterraba. Como processo fermentativo utilizou a batelada e a batelada alimentada, verificando que a maior concentração de etanol foi obtida no processo batelada alimentada com células imobilizadas, e que a habilidade de produção de etanol se manteve constante por oito dias.

Riordan et al. (1995) utilizando uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* para produção de etanol a partir de sacarose, determinou que após 22 dias usando células livres o rendimento foi reduzido para 59% do rendimento teórico máximo, enquanto que com o uso das mesmas células imobilizadas em alginato de cálcio o rendimento ficou em 98% do máximo teórico (Eq. De Gay-Lussac: 51,1 g de etanol/100 g de glicose).

Monisha et al. (1995) realizou fermentações de xilose e palha de arroz hidrolisada com células de *Candida shehatae*, livres e imobilizadas em alginato de cálcio, utilizando os processos batelada, batelada alimentada e contínuo em um reator de leito empacotado. Eles verificaram que as maiores produtividades de etanol, para os dois substratos foram alcançadas com a utilização de células imobilizadas e processos contínuos e batelada alimentada. Concluíram que isso possivelmente ocorreu devido à proteção do suporte dado à levedura dos agentes inibidores (furfural e compostos fenólicos).

### 3.5.2. Métodos de Imobilização

Existem cinco principais métodos para imobilização de enzimas e células, baseados em mecanismos físicos e químicos: adsorção, ligação covalente, oclusão em géis, encapsulamento e ligações cruzadas (Figura 4). Todos estes métodos têm o mesmo propósito: reter altas concentrações de enzimas e/ou células em uma determinada região do espaço (Bickerstaff, 1995).



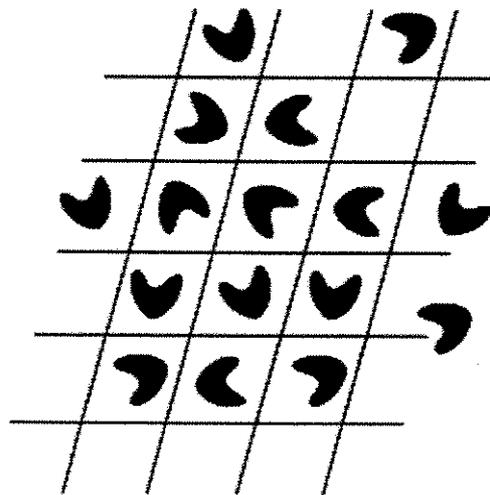
Adsorção



Ligação covalente



Encapsulamento



Oclusão



Ligações cruzadas (floculação)

Figura 4 - Principais métodos de imobilização (Bickerstaff, 1995).

### 3.5.2.1. Adsorção

Imobilização por adsorção é um método simples que envolve interações reversíveis entre a superfície do suporte e as células e enzimas. As forças envolvidas geralmente são eletrostáticas, como a força de van der Waals e pontes de hidrogênio. Estas forças são muito fracas, mas suficientemente grandes em número para garantir razoáveis ligações. Por exemplo, é sabido que as leveduras possuem uma superfície química substancialmente carregada negativamente; portanto o uso de suportes carregados com cargas positivas possibilita a imobilização (Woodward, 1985).

O procedimento consiste em misturar o componente biológico com um suporte com propriedades de adsorção, sob determinadas condições de pH, força iônica e por um período de incubação, seguida da coleta do material imobilizado e posterior lavagem para remoção dos componentes não adsorvidos.

Como vantagens deste método temos a pequena ou nenhuma alteração nas células ou enzimas, simplicidade, baixo custo, rapidez, não ocorrência de mudanças químicas no suporte ou células e enzimas e reversibilidade, que permite a regeneração com novas células ou enzimas. A principal desvantagem é a perda de biocatalizador do suporte. A desorção pode ocorrer devido a mudanças de pH, temperatura e força iônica. Algumas vezes, as células ou enzimas firmemente adsorvidas são rapidamente desadsorvidas como resultado de ligações do substrato, contaminantes e produtos de reação com o suporte. Fatores físicos como taxa de alimentação do reator, agitação, abrasão e impacto das partículas com a superfície do reator também levam a desorção (Toher, 1990).

### 3.5.2.2. Ligação Covalente

Este método envolve a formação de uma ligação covalente entre a enzima ou célula e o suporte material. As ligações são normalmente formadas entre os grupos

funcionais presentes na superfície do suporte e grupos pertencentes a resíduos de aminoácidos da superfície da enzima. Os grupos funcionais de aminoácidos mais freqüentes envolvidos são o grupo amino ( $\text{NH}_2$ ), o grupo carboxila ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), a hidroxila ( $\text{OH}$ ), e o sulfeto ( $\text{SO}$ ) (Srere, 1976). Dentre os materiais usados como suporte temos a celulose, dextrana (Sephadex), amido e agarose (Sephарose). O açúcar residual destes polímeros contém grupos hidroxila, que são grupos funcionais ideais para a formação de ligações covalentes. Estes polissacarídeos são suscetíveis ao ataque de micróbios e fungos e solventes orgânicos, que podem causar encolhimento do gel (Gemeneiner, 1992).

Para a imobilização inicialmente os grupos funcionais do suporte são ativados por um reagente e posteriormente as enzimas e células são adicionadas para ocorrer à ligação covalente.

### 3.5.2.3. *Oclusão em Géis*

Consiste no aprisionamento das células entre as malhas de um polímero sintético ou polissacarídeo. A porosidade é controlada para garantir uma estrutura rígida suficiente para prevenir perda de células ou enzimas e ao mesmo tempo permitir o livre movimento de substrato e produto pelo interior do gel. O suporte age como uma barreira à transferência de massa, e embora isto possa ser uma implicação em relação à cinética da reação, isto pode trazer algumas vantagens como a prevenção da interação do biocatalizador com contaminantes (O "Driscoll, 1976).

O entrelaçamento pode ser obtido misturando-se o biocatalizador com um polímero poliônico e então submetendo esta mistura a cátions multivalentes, em uma reação de troca iônica, que forma uma malha polimérica com o biocatalizador no interior dos espaços vazios. Os géis alginato de cálcio e K-carragena e pectina cítrica são os polímeros mais utilizados para entrelaçamento, entretanto o entrelaçamento em alginato de cálcio insolúvel é reconhecidamente o mais rápido, não tóxico, de baixo

custo e versátil método de imobilização de células (mais de 80% dos processos são feitos utilizando alginato) (Nedovic, 1997).

O alginato é extraído de algas marrom como *Laminaria digitata* e *Macrocystis pyrifera*. É uma goma formada por unidades de ácidos D-manurônico e L-gulurônico ligadas em 1-4, formando o ácido algínico que não é solúvel em água, mas cujos sais de sódio, potássio e amônio o são, enquanto que os de cálcio não. É um polissacarídeo autodegradável quando aquecido por tempo prolongado. A viscosidade aumenta a pH abaixo de 4 e também pela presença de íons de cálcio ou cátions polivalentes, com os quais pode formar géis ou filmes (Bobbio, 1995). Esta propriedade é usada para o entrelaçamento de células vivas na sua matriz. O procedimento consiste na mistura das células com uma suspensão de alginato de sódio e posterior mistura com uma solução de cátions divalentes como  $\text{Ca}^{++}$ . Através de uma reação de troca iônica é formado o alginato de cálcio, um gel que retém as células ou enzimas em seu interior.

#### 3.5.2.4. Encapsulamento

A célula encontra-se fisicamente separada do meio de reação através de uma membrana semipermeável. Isto é obtido por microencapsulamento, que consiste na preparação de um sistema emulsionado, onde a enzima ou célula fica aprisionada no interior das micelas, ou ainda através de uma membrana fibrosa semipermeável; neste caso a célula é confinada numa dada região da solução, retida pela membrana. Células e enzimas não passam pela membrana, enquanto pequenas quantidades de produto e substrato passam livremente. Muitos materiais variando de 10-100  $\mu\text{m}$  de diâmetro são usados como o nylon e o nitrato de celulose. Problemas relacionados com a difusão são maiores neste processo, podendo até ocorrer ruptura da membrana se houver acúmulo de produto devido a uma reação rápida (Kierstan, 1991).

#### 3.5.2.4. *Ligação Cruzada (Floculação)*

Este método consiste na união das células ou enzimas entre si sem a necessidade de um suporte, para formar uma estrutura grande e tridimensional, através de métodos físicos ou químicos. Os métodos químicos envolvem a formação de uma ligação covalente com um reagente bi ou multifuncional como o glutaraldeído e o tolueno diisocianato. Métodos físicos utilizam agentes de floculação como poliamidas, poliestireno sulfonado e vários fosfatos, mas não levam a altas densidades celulares (Broun, 1976).

Existem linhagens de levedura que floculam naturalmente durante o processo fermentativo. A floculação ainda pode ocorrer devido ao contato com gomas sintetizadas pelas bactérias ou pelo contato de bactérias indutoras da floculação e leveduras (Ludwig et al., 2001).

#### 3.5.3. *Produção de Bebidas Alcoólicas*

Células imobilizadas são freqüentemente utilizadas para a produção de metabólicos específicos tais como enzimas e aminoácidos, álcoois, compostos aromáticos, polissacarídeos, pigmentos, produtos fermentados como cerveja, vinho, sidra, vinagre, sake, e molho de soja.

Nedovik (1997) relata que o processo tradicional para produção de cerveja requer aproximadamente 6 a 7 dias. Aumentando-se a concentração de células no reator é possível diminuir o tempo de fermentação e conseqüentemente aumentar a produtividade volumétrica com a diminuição significativa do custo de produção. Utilizando células imobilizadas em alginato de cálcio e um reator "air-lift", que permite trabalhar com alta densidade celular e boa homogeneização para maximizar a transferência de massa, o tempo de fermentação foi drasticamente reduzido para 16 horas, sem diferenças sensoriais significantes da cerveja obtida pelo processo

tradicional. O reator trabalhou por um período de 5 meses com as mesmas células sem mudanças na viabilidade e produtividade. Este tipo de reator se mostrou mais eficiente que os de leito expandido e leito fluidizado devido ao maior contato do substrato com as células.

Bardi et al. (1996) imobilizou uma linhagem de *Saccharomyces* tolerante ao frio em pellets de glúten e realizou fermentação de suco de uva e glicose em fermentações batelada a 30, 15, 10, 5 e 0°C. A produtividade de etanol obtida a 15°C foi metade da obtida a 30°C; a 10°C foi de aproximadamente 30% do que a 30°C, entretanto, para cada temperatura as produtividades utilizando-se células imobilizadas foram bem maiores que para as células livres. A temperatura de 10°C a produtividade do sistema imobilizado foi sete vezes maior que a do sistema livre. O vinho obtido com as células imobilizadas possuiu um maior teor alcoólico e uma menor acidez volátil; os preparados a 10°C ficaram muito claros, não necessitando nenhum tratamento posterior de clarificação.

Ferraro (2000) realizou fermentações seqüenciais de suco de uva não esterilizado inicialmente com *Candida stellata* imobilizada em alginato de cálcio e posteriormente com *Saccharomyces cerevisiae* livre em escala piloto para determinar a dinâmica da microflora de leveduras e sua influência no perfil sensorial do vinho. As leveduras não-*Saccharomyces* foram controladas pela adição de SO<sub>2</sub> ao meio enquanto as linhagens selvagens de *Saccharomyces* se mostraram presentes após 3 dias de fermentação e puderam competir com a linhagem inoculada. O metabolismo da levedura *C. stellata* influenciou bastante o perfil analítico do vinho, levando a um aumento do teor de glicerol (70%) e ácido succínico em comparação com o processo tradicional.

Para a produção de sidra, Nedovic et al. (1999) utilizaram a levedura *Saccharomyces bayanus* e a bactéria *Leuconostoc oenos*, imobilizadas conjuntamente em alginato de cálcio em um reator contínuo de leito empacotado. Estes microrganismos realizam as fermentações alcoólica e malo láctica respectivamente do suco de maçã. O processo contínuo permitiu uma fermentação mais rápida em

comparação ao processo batelada. Pelo ajuste do tempo de retenção foi possível obter um produto "seco" (sem açúcar residual) ou "doce". O perfil de compostos voláteis do produto final foi modificado em relação ao processo batelada, especialmente em relação aos teores de álcoois superiores, acetato de isoamila e diacetil.

Bardi et al. (1997) realizou 43 fermentações batelada de mosto de uva utilizando uma levedura tolerante ao frio imobilizada em celulose e 29 fermentações batelada a várias temperaturas com leveduras imobilizadas em pellets de glúten. Também foi realizada fermentação contínua para este último caso. No mosto fermentado foram determinados os componentes voláteis e os resultados comparados ao sistema com células livres. A levedura imobilizada levou a um aumento do teor de acetato de etila e diminuição do teor de álcool amílico, quando a fermentação foi realizada a baixas temperaturas em relação às células livres, contribuindo para um aroma suave e frutado. O teor de acetaldeído aumentou para as células imobilizadas, enquanto o de metanol não foi afetado, já que sua formação não está correlacionada com o metabolismo da levedura.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO

#### 4.1.1. Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram obtidos na Destilaria de Aguardente Ipê, município de São João da Boa Vista - SP. Foram retiradas amostras do caldo em fermentação após 3 e 20 horas do carregamento da dorna. O processo de fermentação usado nesta destilaria é a batelada e as leveduras utilizadas são "selvagens", isto é, provenientes da própria cana de açúcar.

A separação e isolamento das leveduras foram realizados pelo CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Analíticas da Unicamp. Foram isoladas seis linhagens principais, identificadas pela letra A, B, C, D, E, F, sendo três da fase inicial da fermentação e 3 da fase final, as quais foram mantidas em agar inclinado YPDA (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar) e repicadas periodicamente.

Para efeito comparativo utilizou-se a levedura comercial liofilizada Maury Y 904, linhagem única, especialmente isolada para a produção de etanol, mantida sob refrigeração a 5°C.

#### 4.1.2. Matéria Prima

O caldo de cana de açúcar (*Saccharum officinarum L.*) utilizado nos ensaios de fermentação foi proveniente da variedade SP 813250, variedade esta que atinge seu ponto de ótima maturação entre os meses de julho a setembro, oriundo da Destilaria de Aguardente Ipê, São João da Boa Vista - SP. O caldo de cana foi extraído em um único

terno de moenda, filtrado em um coador de malha para remoção de bagacilhos, utilizado puro ou diluído convenientemente para utilização como substrato.

### 4.1.3. Fermentações

No início do trabalho, devido a ausência de informações a respeito de suplementação para fermentações com caldo de cana esterilizado, optou-se por usar a mesma suplementação. Devido a experimentos realizados pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB – UNICAMP, - de fermentação de melaço de cana de açúcar para produção de etanol suplementado somente com extrato de levedura e sulfato de amônio, onde obteve-se bons resultados, decidiu-se realizar o restante dos experimentos com a mesma suplementação. As concentrações de açúcares redutores totais variaram de um experimento para o outro devido a cana de açúcar ser colhida em diversas épocas do ano.

#### 4.1.3.1. Preparo do Inóculo

O meio de cultura utilizado para o preparo do inóculo utilizou os compostos mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Meio de cultura para preparo do inóculo

Reagente	Concentração (g/L)
Caldo de cana	8 Brix
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7
KCl	1,2
Extrato de levedura	5

O pH foi ajustado para 4,5 com ácido sulfúrico concentrado.

O inóculo foi preparado para cada uma das 7 leveduras em erlenmeyres aletados de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C. A inoculação com as leveduras se deu em câmara de fluxo laminar (ambiente estéril) e os frascos foram colocados em um incubador rotativo a 150 rpm durante 24 horas a 32°C.

#### *4.1.3.2. Determinação dos parâmetros de fermentação para células livres*

Devido a falta de informações a respeito de meios fermentativos para caldo de cana esterilizado, as fermentações com células livres foram realizadas utilizando-se a mesma suplementação do inóculo. Devido a experimentos realizados pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB – UNICAMP, - de fermentação de melaço de cana de açúcar para produção de etanol suplementado somente com extrato de levedura e sulfato de amônio, onde obtiveram-se bons resultados, decidiu-se realizar o restante dos experimentos com a mesma suplementação. As concentrações de açúcares redutores totais variaram de um experimento para o outro devido a cana de açúcar ser colhida em diversas épocas do ano.

O meio de cultura utilizado para a determinação dos parâmetros de fermentação utilizou os compostos mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Meio de fermentação para determinação dos parâmetros cinéticos para células livres

Reagente	Concentração (g/L)
Caldo de cana	18 Brix
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7
KCl	1,2
Extrato de levedura	5

As fermentações para a determinação dos parâmetros de fermentação foram realizadas para cada levedura separadamente, utilizando-se 7 erlenmeyers aletados com volume de 1 litro, contendo 400 mL do meio de cultura esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C. O pH foi ajustado para 4,5 com ácido sulfúrico concentrado. Adicionaram-se 40 mL de inóculo para as leveduras isoladas na destilaria, 1 g/L para a levedura Maury e mantiveram-se os frascos sob agitação de 150 rpm a 32 °C. Foram retiradas amostras periódicas até 36 horas de fermentação para a determinação de sacarose, glicose, frutose, glicerol, etanol e massa celular.

#### 4.1.3.3. Determinação dos componentes voláteis

O meio de cultura utilizados para a determinação dos componentes voláteis para células imobilizadas apresentou a composição mostrada na Tabela 6.

Tabela 6 – Meio de fermentação para determinação dos componentes voláteis

Componente	Concentração (g/L)
Caldo de cana	16 Brix
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,4
Extrato de levedura	1
CaCl <sub>2</sub>	0,5

As fermentações para determinação dos componentes voláteis utilizando células imobilizadas foram realizadas para as seis leveduras isoladas separadamente, para uma mistura das seis (Mix) e para a levedura de referência Maury, em erlenmeyers não aletados de 500 mL, contendo 200 mL do meio de cultura esterilizado mais 20 mL de células imobilizadas no suporte. A quantidade de células imobilizadas foi obtida com o auxílio de uma proveta contendo água, através do volume de líquido deslocado. O cloreto de cálcio na concentração 0,5 g/L adicionado ao meio foi para evitar que as esferas se desfizessem. Os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 32 °C. Após 24 horas de fermentação foram retiradas amostras de 100 mL de cada frasco para determinação de acetaldeído, acetato de etila, metanol, n-propanol, isobutanol (2-metil-propanol), álcool isoamílico (3 metil-1-butanol) e acidez volátil.

#### 4.1.3.4. *Determinação da temperatura de processo para as células imobilizadas*

Para a definição da temperatura escolheram-se 3 leveduras: a levedura B, que apresenta características de floculação, a levedura C, não-floculante e a levedura de referência Maury. Foram realizadas fermentações utilizando o meio de cultura mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 – Meio de cultura para determinação da temperatura de processo

Componente	Concentração (g/L)
Caldo de cana	16 Brix
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,4
Extrato de levedura	1
CaCl <sub>2</sub>	0,5

O meio foi esterilizado, o pH ajustado para 4,5 com ácido sulfúrico concentrado. Utilizaram-se erlenmeyers de 1 litro contendo 400 mL do meio de cultura e 40 mL de células imobilizadas. As temperaturas de estudo foram 30°C, 32°C, 34°C e 36°C.

Amostras foram retiradas de 2 em 2 horas até 24 horas para as determinações de sacarose, glicose, frutose, glicerol e etanol.

#### 4.1.3.5. Fermentação contínua e cultura de células para imobilização

Os experimentos de fermentação para a obtenção de massa celular para imobilização utilizaram o meio mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Meio de cultura para obtenção de massa celular

Componente	Concentração (g/L)
Caldo de cana	18 Brix
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,4
Extrato de levedura	1

O pH foi ajustado com ácido sulfúrico p.a. e o meio esterilizado a 121°C por 15 minutos.

Nos ensaios de fermentação contínua a este meio foi adicionado  $\text{CaCl}_2$  na concentração de 0,5 g/L para que as esferas não se desfizessem.

## 4.2. ESCOLHA DO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR

O método de imobilização por oclusão em géis é um dos mais usados por ser simples, barato e de fácil reprodutibilidade. Polissacarídeos como a K-carragena, pectina cítrica e alginato de cálcio são amplamente usados, sendo que este último polímero é usado em cerca de 80 % dos processos de imobilização (Nedovic, 1997).

Com a finalidade de se obter um suporte estável, resistente e que não flutuasse no meio fermentativo foram testados vários géis e combinações deles.

Utilizou-se como fonte de levedura a levedura comercial Maury, proveniente de um mesmo lote, devido a sua fácil disponibilidade e ser uma levedura especialmente isolada para produção de etanol.

### 4.2.1. Estudos de Imobilização em Alginato de Cálcio

O entrelaçamento em alginato de cálcio é rápido, atóxico de baixo custo e versátil. Na presença de cátions monovalentes o alginato forma sais solúveis em água, mas na presença de cátions polivalentes como  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$ , é formado um polímero inerte, propriedade esta usada para a oclusão de células vivas na matriz do alginato.

Foram preparadas 4 frações de alginato de sódio de 100 mL nas concentrações 1%, 2%, 3% e 4% a quente. Após resfriamento a estas soluções foi adicionado sob



intensa agitação 9 g da levedura comercial Maury dissolvidas em 50 ml de água destilada, levando a uma concentração final de 60 g/L de células no gel.

A mistura foi então extrusada com o auxílio de uma bomba peristáltica Masterflex, utilizando uma mangueira de silicone nº 16 (diâmetro interno de 0,8 mm), através de um pequeno orifício dentro de uma solução de cloreto de cálcio 2% para promover o endurecimento do gel. O tamanho e a forma esférica das partículas formadas foi regulado pela vazão da bomba e pela altura do orifício de saída do gel em relação ao nível da solução de cloreto de cálcio. Foi utilizado um agitador magnético para manter a mistura gel + células homogênea e outro para dispersar as esferas formadas dentro da solução de cloreto de cálcio, conforme mostra a Figura 5.

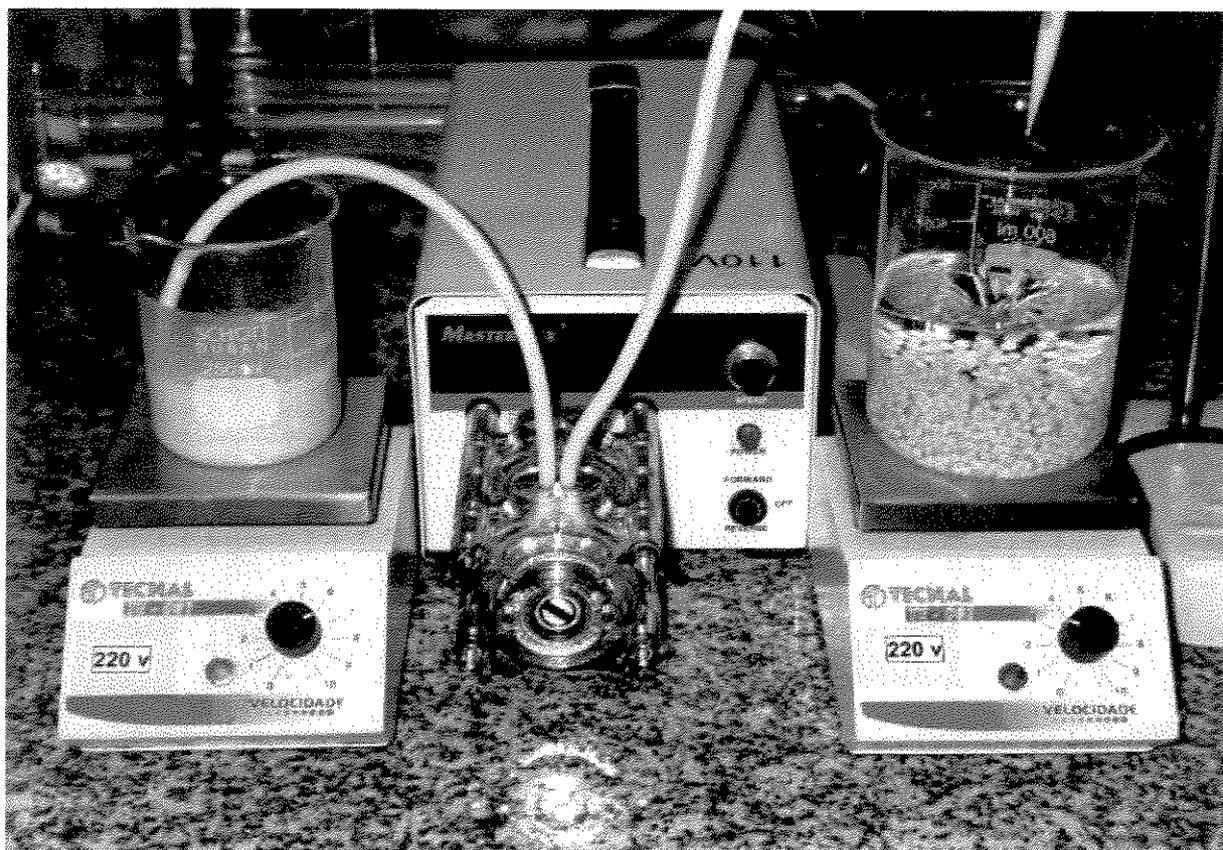


Figura 5 - Imobilização celular por oclusão em géis

As esferas formadas foram lavadas com água destilada para remoção das células não entrelaçadas, e mantidas por 24 horas a 4 °C em cloreto de cálcio 2% para sua estabilização antes de serem usadas na fermentação.

#### 4.2.2. Estudos de Imobilização em K-carragena

A solução de K-carragena possui a propriedade de se transformar em um gel estável sob determinadas condições na presença de cátions como  $K^+$ . Esta propriedade faz com que ela seja utilizada como suporte para células e enzimas.

Novamente prepararam-se frações de 100 mL de K-carragena nas concentrações 1%, 2%, 3%, 4%, e 5%. Também foram preparadas 9 g de células dissolvidas em 50 mL de água como feito para o alginato.

A mistura foi então extrusada em uma solução de cloreto de potássio 20 g/L e cloreto de cálcio 0,2 g/L com o auxílio do mesmo dispositivo utilizado para o alginato. Utilizamos o cloreto de cálcio juntamente com o cloreto de potássio pois a presença de íons cálcio no meio de fermentação pode causar o encolhimento dos géis se estes cátions não estiverem presentes durante o processo de imobilização (Bickerstaff, 1995).

#### 4.2.3. Estudos de Imobilização em Pectina Cítrica

A imobilização em pectina foi realizada de maneira idêntica ao alginato; porém as concentrações de pectina utilizadas foram 2%, 3%, 4%, e 5%.

#### 4.2.4. Estudos de Imobilização em Alginato de Cálcio + Dióxido de Titânio

Com a finalidade de se obter um suporte com densidade superior ao alginato puro foi adicionado dióxido de titânio ao alginato para imobilização. Kesava et al. (1996) verificou que a adição de 4% de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  à solução de pectina 4% e o uso de bórax juntamente com a solução de cloreto de cálcio no processo de cura do gel reduziu drasticamente a quantidade de esferas que flutuavam durante a fermentação de glicose em um reator de leito expandido. Em nossos testes optamos pelo dióxido de titânio devido a seu custo ser bem inferior ao óxido de ferro.

As concentrações de alginato foram de 1%, 2%, 3% e 4%. Para todas as concentrações de alginato foi utilizado 4% de  $\text{TiO}_2$ . Foram preparadas 4 frações de 150 mL utilizando-se a mesma quantidade de leveduras usadas para o alginato puro. O processo de extrusão foi idêntico ao do alginato puro.

#### 4.2.5. Estudos de Imobilização em Alginato de Cálcio + K-carragena

Gardin (2001) utilizou K-carragena conjuntamente com gelatina para imobilização de comunidades de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos para a degradação de 2,4,6-triclorofenol em condições de limitação de ar. A gelatina foi consumida pelos microrganismos, deixando o gel poroso, o que facilitou a saída dos gases formados pela atividade microbiana e evitou a flutuação das esferas.

O alginato de cálcio e a K-carragena foram utilizados conjuntamente com o objetivo de reproduzir o mesmo efeito obtido por Gardin. Utilizaram-se as concentrações expressas na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentrações de alginato de cálcio e K-carragena

Concentrações (%)	
Alginato	K-Carragena
2	0,2
2	0,4
2	0,6
2	0,8
4	0,4
4	0,8

A K-carragena e o alginato foram dissolvidos conjuntamente em água destilada quente e posteriormente foi adicionada a levedura como descrito nos processos anteriores. A extrusão foi realizada dentro de uma solução contendo somente cloreto de cálcio 2%. Após a formação do gel o mesmo foi colocado dentro de erlenmeyers contendo nova solução de cloreto de cálcio 2 % e mantidos sob agitação em Shaker a 150 rpm e 40 °C por 24 e 48 horas. Este processo levou a dissolução da K-carragena contida nas esferas, deixando espaços vazios para facilitar o desprendimento de gases durante o processo de fermentação.

#### 4.2.6. Estudos de Imobilização em Alginato de Cálcio + Óxido de Alumínio

Inicialmente foram dissolvidos 6 g de alginato de sódio em 200 mL de água destilada a quente. Após o resfriamento foi adicionado a esta solução 18 g de leveduras dissolvidas em 100 mL de água destilada para se obter uma solução de alginato de sódio com 60 g/L de leveduras. Foram então tomadas 4 alíquotas de 60 mL e adicionado 3g, 6g, 9g e 12 g de óxido de alumínio para aumentar a densidade das esferas. A mistura foi então extrusada conforme descrito anteriormente para o alginato puro, lavadas com água destilada e armazenadas em solução de cloreto de cálcio 2% a 4°C até serem usadas nas fermentações.

#### 4.2.7. Fermentações Utilizando os Diferentes Suportes

Após a imobilização nos diferentes suportes foram realizadas fermentações para verificar se as esferas formadas flutuavam no meio de cultura. As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 500 mL não aletados, contendo 200 mL do meio de cultura descrito na Tabela 8, esterilizado a 121°C por 15 minutos. Para a pectina cítrica e alginato de cálcio foi adicionado ao meio de fermentação 0,5 g/L de cloreto de cálcio e para os géis de K-carragena, 0,5 g/L de cloreto de potássio para evitar que as esferas se desintegrassem. Em cada erlenmeyer foram adicionados 20 mL de células aderidas ao suporte e mantidos a 150 rpm e 32°C por 24 horas.

#### 4.3. OBTENÇÃO DE CÉLULAS PARA IMOBILIZAÇÃO

Para a obtenção das células a serem imobilizadas adotou-se o seguinte procedimento:

##### a) Inóculo

O inóculo foi preparado da mesma forma que no item 4.1.3.1

##### b) Meio de fermentação

O meio de fermentação consistiu em caldo de cana 18 Brix enriquecido com 1g/L de extrato de levedura e 2,4 g/L de sulfato de amônia esterilizado a 121°C por 15 minutos em autoclave. A inoculação seguiu o mesmo procedimento utilizado nas fermentações para obtenção dos parâmetros cinéticos. O volume de meio fermentativo utilizado foi definido em função da quantidade de massa celular que se desejava obter, levando em conta os resultados obtidos na análise dos parâmetros cinéticos. A fermentação foi realizada em erlenmeyers de 1 litro com 400 mL de meio fermentativo em cada um, a 150 rpm e 32°C por 30 horas.

### c) Separação das células

O caldo fermentado foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a uma temperatura de 5°C em centrífuga Sorvall modelo RC-5C para a separação das células.

Após esta centrifugação as células foram ressuspendidas em água destilada para retirar os açúcares não convertidos e centrifugadas novamente por 10 minutos. O material obtido foi imediatamente utilizado para imobilização.

## 4.4. REATORES UTILIZADOS

### 4.4.1. Fermentação Batelada

A fermentação batelada se deu em erlenmeyers de volume 1 litro contendo 400 mL de meio e 40 mL de esferas a 34°C e 125 rpm por 24 horas. Usaram-se erlenmeyers em quantidade suficiente para se obter 8 litros de caldo fermentado.

#### 4.4.2. Reator tubular de Leito Empacotado

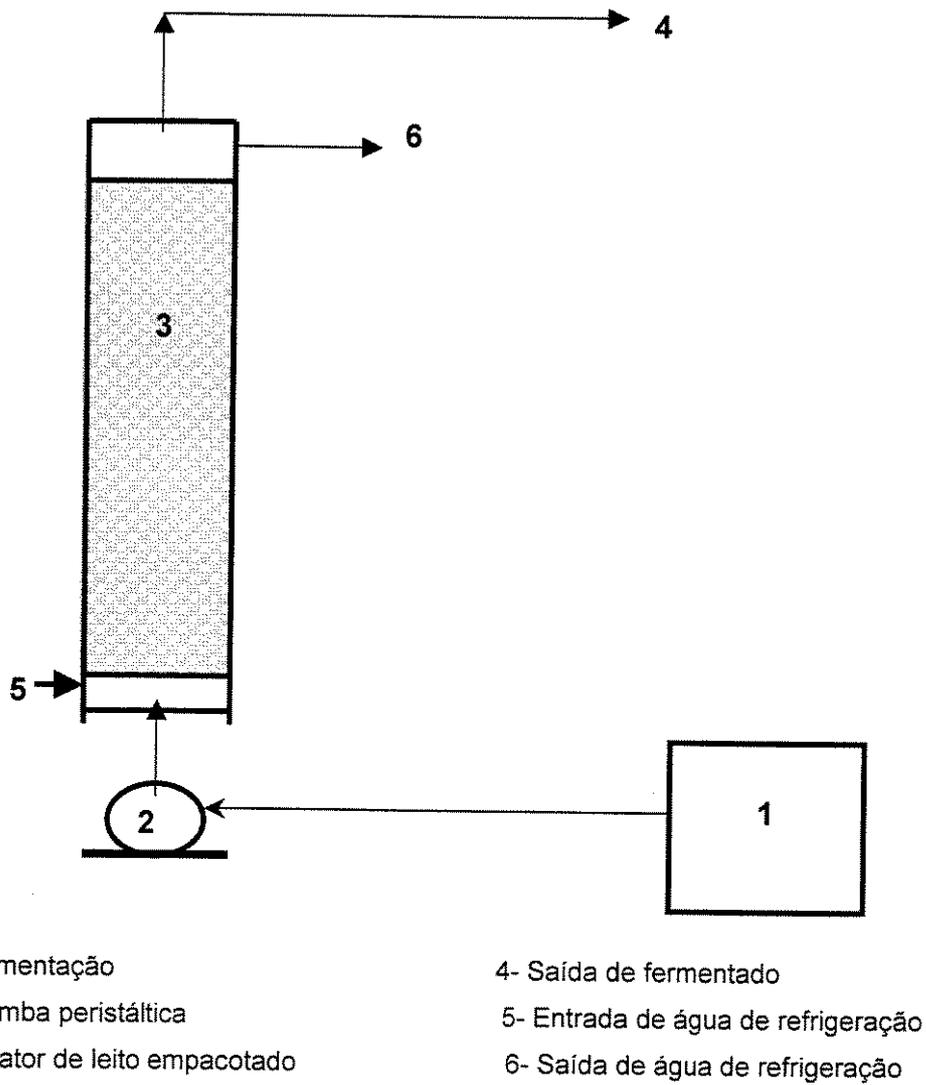


Figura 6 – Esquema do processo utilizando um reator tubular de leito empacotado

### 4.4.3. Reator Tubular de Leito Fluidizado

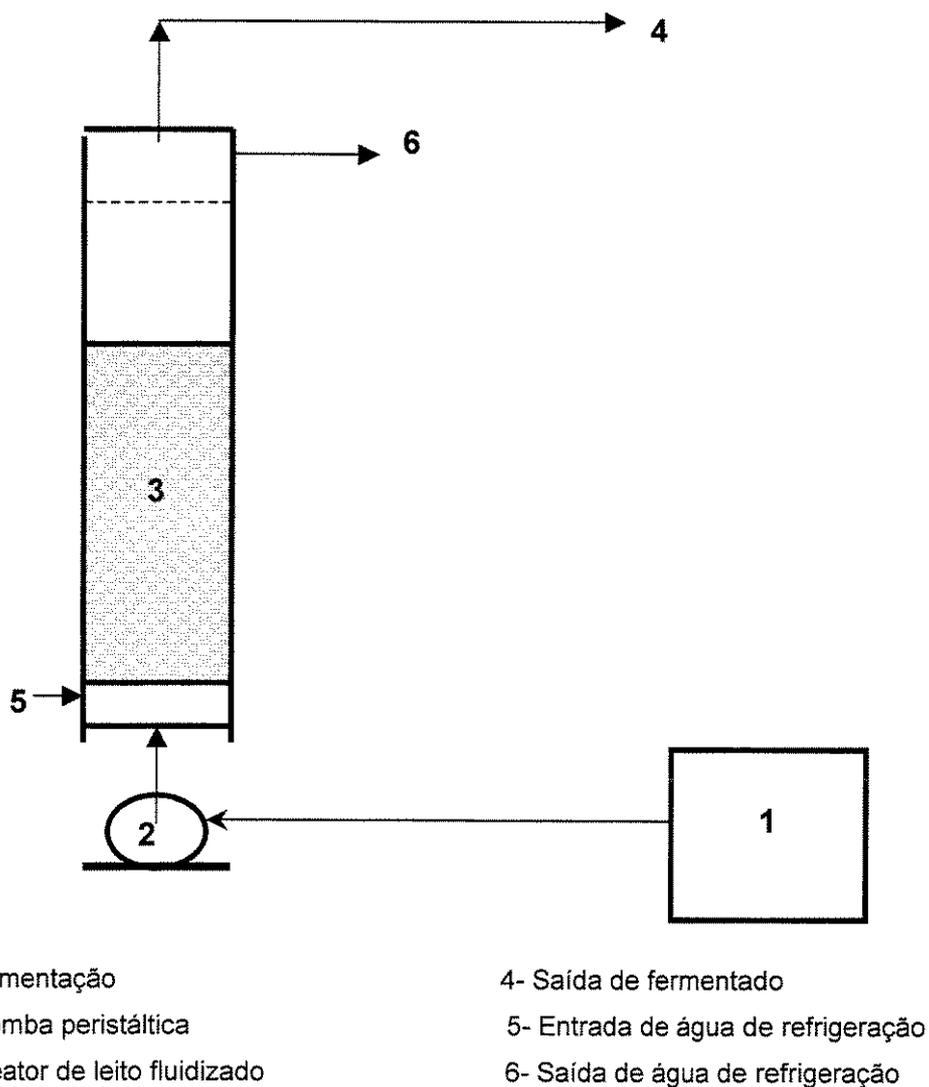
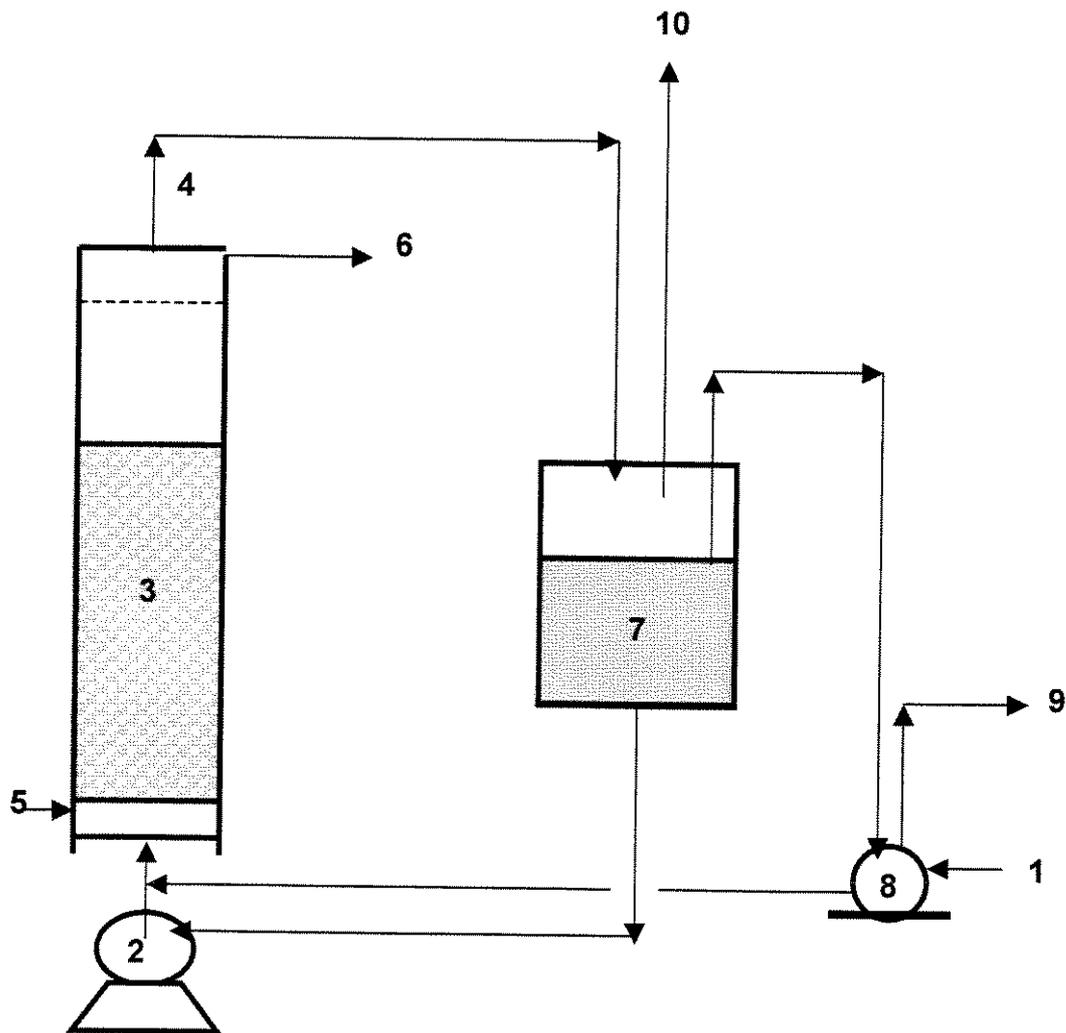


Figura 7 – Esquema do processo utilizando um reator tubular de leito fluidizado

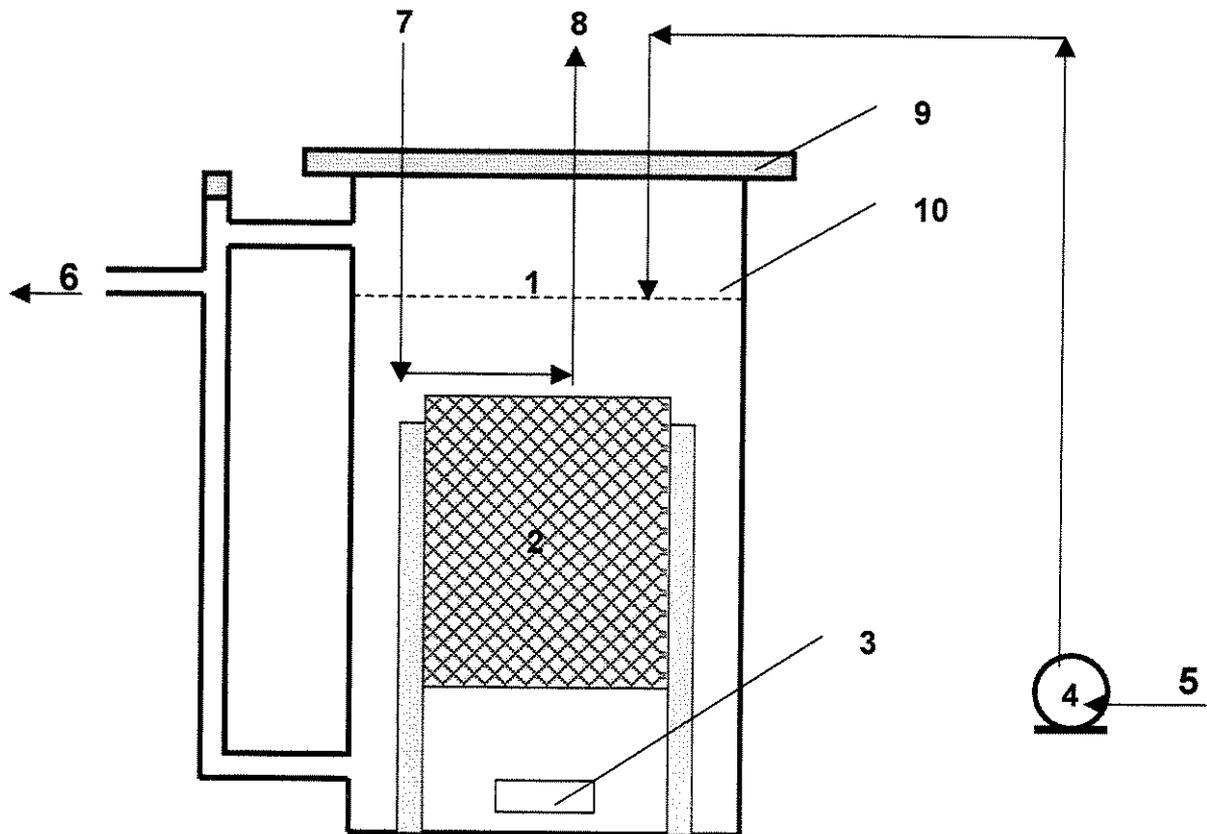
#### 4.4.4. Reator Tubular de Leito Fluidizado com Reciclo



- |                                    |                                         |
|------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1- Alimentação                     | 6- Saída de água de refrigeração        |
| 2- Bomba centrífuga                | 7- Tanque pulmão                        |
| 3- Reator de leito fluidizado      | 8- Bomba peristáltica de duplo cabeçote |
| 4- Saída de fermentado             | 9- Saída de fermentado                  |
| 5- Entrada de água de refrigeração | 10- Saída de gases                      |

Figura 8 – Esquema do processo utilizando um reator tubular de leito fluidizado com reciclo

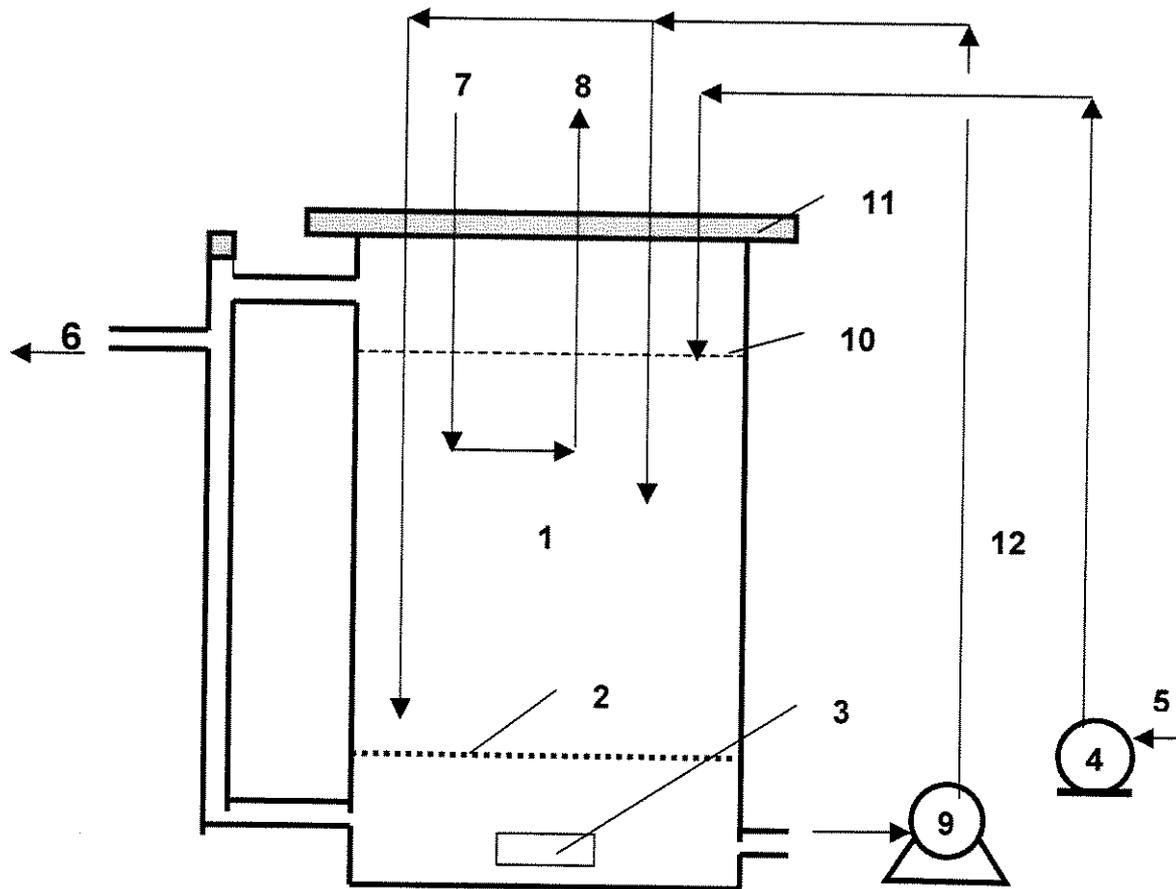
#### 4.4.5. Reator de Mistura Contínuo de Cesto



- |                                 |                                    |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 1- Reator de vidro              | 6- Saída do fermentado             |
| 2- Cesto de aço inox com aletas | 7- Entrada da água de refrigeração |
| 3- Agitador magnético           | 8- Saída da água de refrigeração   |
| 4- Bomba peristáltica           | 9- Tampa de borracha               |
| 5- Alimentação                  | 10- Nível de líquido               |

Figura 9 – Esquema do processo utilizando um reator de Mistura Contínuo com as células imobilizadas retidas no interior do cesto

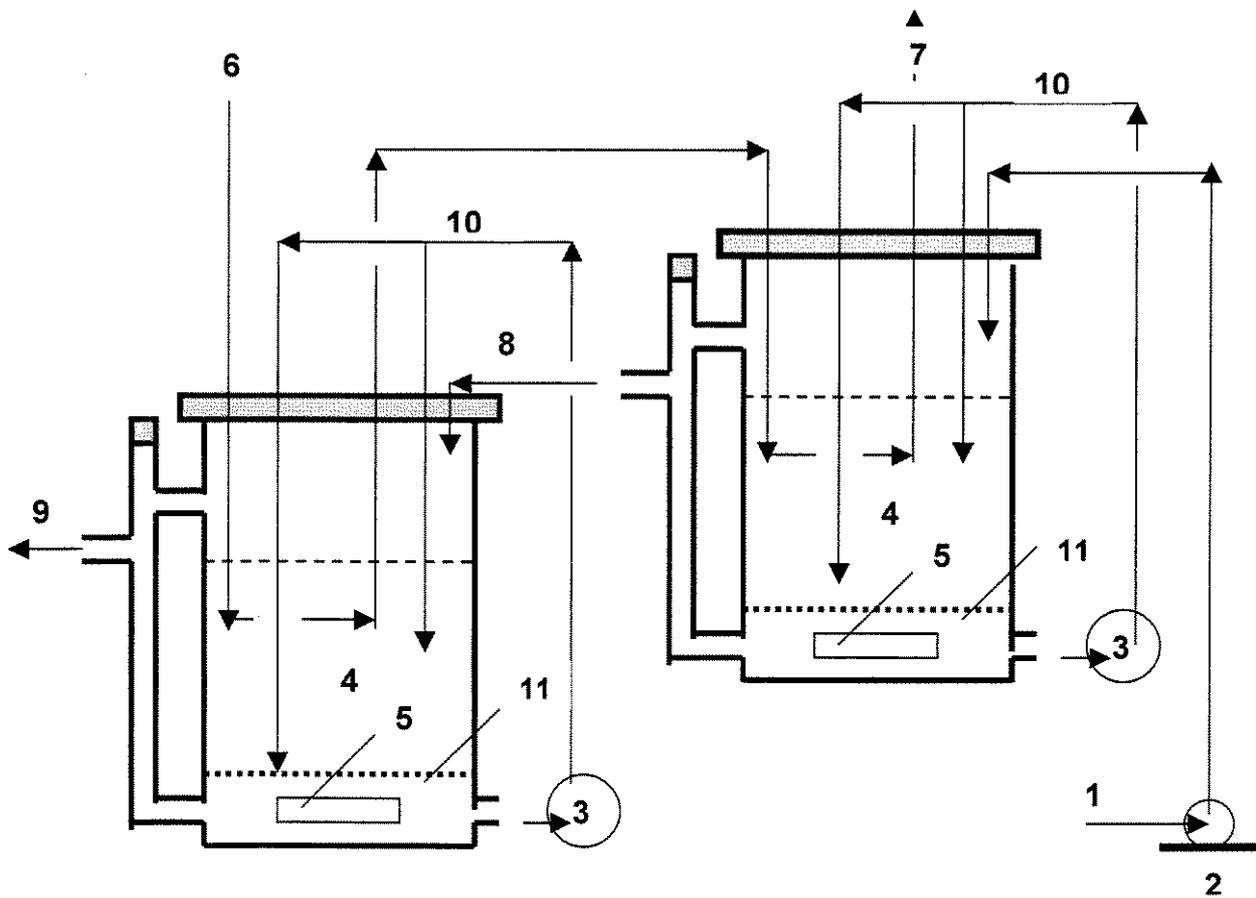
#### 4.4.6. Reator de Mistura Contínuo com Reciclo



- |                           |                                    |
|---------------------------|------------------------------------|
| 1- Reator de vidro        | 7- Entrada da água de refrigeração |
| 2- Tela de aço inoxidável | 8- Saída da água de refrigeração   |
| 3- Agitador magnético     | 9- Bomba centrífuga                |
| 4- Bomba peristáltica     | 10- Nível de líquido               |
| 5- Alimentação            | 11- Tampa de borracha              |
| 6- Saída do fermentado    | 12- Vazão de recirculação          |

Figura 10 – Esquema do processo utilizando um reator de mistura contínuo com reciclo. As células imobilizadas ficam livres no meio e separadas do agitador por uma tela de aço inoxidável.

#### 4.4.7. Reatores de Mistura Contínuos com Reciclo em Série



- |                                    |                                    |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 1- Alimentação                     | 7- Saída da água de refrigeração   |
| 2- Bomba peristáltica              | 8- Saída de fermentado – 1° reator |
| 3- Bombas centrífugas              | 9- Saída fermentado – 2° reator    |
| 4- Reatores de vidro               | 10- Recirculação de meio           |
| 5- Agitador magnético              | 11- Tela de aço inoxidável         |
| 6- Entrada da água de refrigeração |                                    |

Figura 11 – Esquema do processo utilizando 2 reatores de mistura contínuos com reciclo em série. As células imobilizadas ficam livres no meio e separadas do agitador por uma tela de aço inoxidável.

## 4.5. DESTILAÇÃO

A destilação do caldo fermentado foi realizada em um destilador similar ao utilizados nas destilarias de cachaça artesanal. O equipamento é inteiramente construído em cobre, volume útil de 8 litros, aquecido com fogo direto e condensador em forma de espiral refrigerada com água corrente (Figura 12).

Na determinação dos componentes voláteis não foi separada a fração “cabeça” do destilado. Estabeleceu-se que os produtos finais obtidos em todos os processos deveriam apresentar um teor alcoólico da ordem de  $44 \pm 1\%$  em volume, a  $20^{\circ}\text{C}$ . Para isto o destilado foi recolhido até que o teor alcoólico atingisse  $48 \pm 1\%$  e posteriormente foi realizada a diluição com água destilada até o valor desejado. A verificação dos teores alcoólicos durante o processo de destilação foi efetuada com a ajuda de um refratômetro.

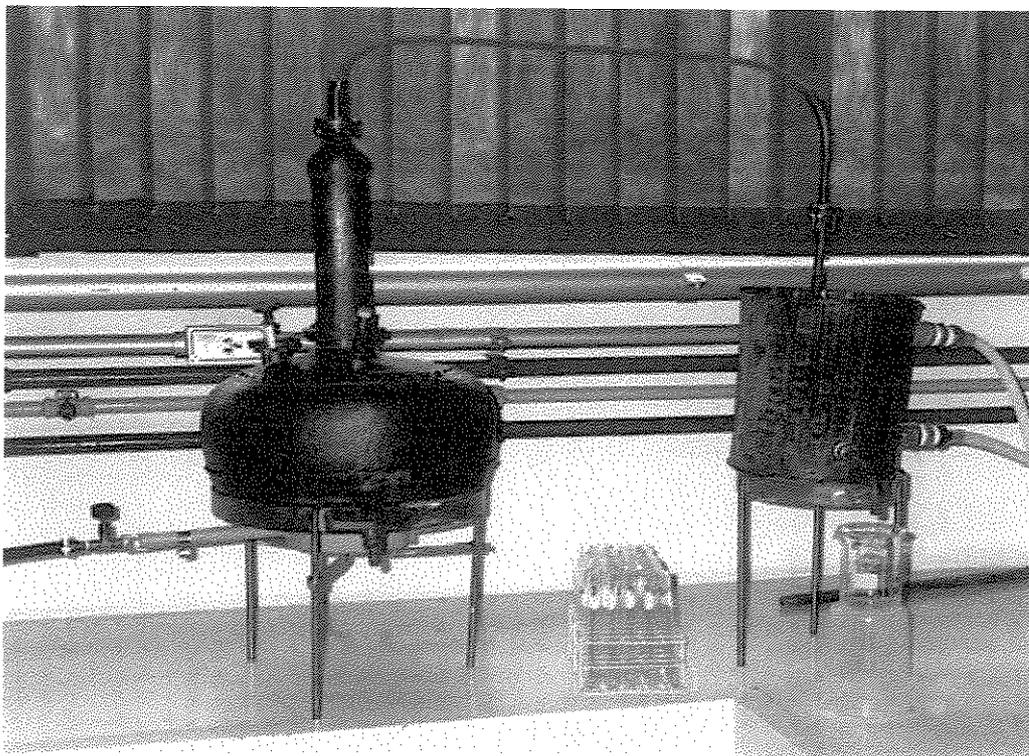


Figura 12 – Destilador (alambique) utilizado para produção da aguardente.

## 4.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.6.1. Concentração de Células Totais e Viáveis

A concentração de células totais em base seca foi realizada por gravimetria. Frações de 10 mL do meio fermentado foram retiradas e centrifugadas por 15 minutos a 10000 rpm e 5°C. A massa celular decantada foi ressuspensa em água destilada e centrifugada novamente por 10 minutos a 10000 rpm e 5°C. O material sedimentado foi transferido para frascos previamente tarados e secos em estufa a 70°C até peso constante.

A concentração de células viáveis foi determinada através de microscópio ótico e câmara de Neubauer. O corante utilizado foi o azul de metileno.

### 4.6.2. Concentrações de Sacarose, Glicose, Frutose, Glicerol e Etanol

As concentrações de açúcares redutores, glicerol e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), composta pelos seguintes equipamentos:

- Um injetor automático Varian 9095
- Uma bomba ternária VARIAN 9010
- Um forno Spark Holland 99
- Um detector de índice de refração R14
- Software para aquisição e processamento de dados Millennium Chromatography Manager v. 2.1
- Coluna marca Aminex modelo HPX 80 H

Como eluente foi utilizada água ultrapura obtida de um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus com pH ajustado a 1,6 com ácido sulfúrico p.a.. Esta água foi degaseificada durante 20 minutos num banho ultra-som Eurosonics modelo SX-20. A vazão de eluente foi de 0,7 mL/minuto e a coluna mantida a 30°C.

Foram utilizados como padrões soluções coquetel de sacarose, glicose, frutose, glicerol e etanol nas concentrações de 0,01% a 0,4%. As amostras foram convenientemente diluídas com água Milli-Q e filtradas em filtro de diâmetro 0.22 $\mu$  antes de serem injetadas no sistema. O volume injetado foi de 0,98  $\mu$ L.

#### 4.6.3. Componentes Voláteis

Para a determinação da acidez volátil as amostras foram destiladas por arraste a vapor em um destilador marca Gilbertini e tituladas com solução 0,1 N de hidróxido de sódio e fenolftaleína como indicador.

A determinação do grau alcoólico foi realizada em um densímetro digital A.Paar modelo DMA 48.

O acetaldeído, acetato de etila, metanol, n-propanol, iso-butanol e álcool isoamílico foram quantificados por cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo a gás marca Shimadzu modelo CG-17-A, com auto injetor modelo AOC – 20i, detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar DB-WAX (30m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m). As seguintes condições analíticas foram utilizadas:

- Temperatura do injetor: 180°C
- Temperatura do detector: 190°C
- Programa de temperatura: 40°C 4 minutos  
32°C/min. até 120°C (0,6 min.)  
25°C/min. até 180°C (0,5 min.)

- Tempo total da corrida: 10 minutos
- Gás de arraste: Nitrogênio e ar sintético a vazão de 1,4 mL/min
- Divisão de fluxo (split): 1:15
- Volume injetado: 1,0  $\mu$ L

Os compostos foram quantificados utilizando a técnica do padrão externo; os padrões foram preparados em solução de etanol 4% e 40% v/v, utilizando-se 5 valores para cada componente.

#### 4.6.4. Açúcares Redutores Totais (DNS) (Miller, 1959).

Durante as fermentações contínuas o teor de ART foi monitorado pelo método do DNS, devido a sua rapidez.

A reação de DNS com açúcares redutores produz uma coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de açúcares redutores presentes na amostra.

Para determinar os açúcares redutores totais, faz-se a inversão da sacarose por hidrólise ácida. Adiciona-se 1 mL de HCl 2N a 1 mL da amostra convenientemente diluída, coloca-se em banho em ebulição por cinco minutos, e após o resfriamento em banho de gelo adiciona-se 1 mL de NaOH 2N (para neutralizar a amostra) e determinam-se os açúcares redutores totais da amostra.

O método consiste na reação de 0,5 mL de amostra diluída (concentração de açúcares redutores deve ser entre 0,3 e 3 g/L) com 0,5 mL de reagente DNS (Tabela 10), aquecendo-se em banho a 100°C por 5 minutos. Resfria-se imediatamente em banho de gelo e adicionam-se 8 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio (11,25 g/L), para estabilizar a cor. Agita-se bem o tubo para homogeneizar o conteúdo

e faz-se a leitura da absorbância a 540 nm. O branco é feito pela substituição da amostra por água destilada.

Tabela 10 – Componentes do reagente DNS

Componente	Quantidade
Água destilada	1416 ml
Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	10,16 g
NaOH	19,80 g
Fenol (fundido a 50°C)	7,60 ml
Metabissulfito de sódio	8,32 g

A curva padrão é obtida aplicando-se o método em amostras de sacarose com concentrações entre 0,3 e 3 g/l.

## 4.7. PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO

### 4.7.1. Velocidades:

As velocidades de consumo de substrato, formação de produto e produção de biomassa podem ser descritas pelas seguintes equações:

- Velocidade de consumo de substrato ( $r_s$ ):

$$r_s = \frac{dS}{dt} \quad (1)$$

- Velocidade de formação de produto ( $r_p$ ):

$$r_P = \frac{dP}{dt} \quad (2)$$

- Velocidade de produção de biomassa ( $r_X$ ):

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) é descrita como:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{r_X}{X} \quad (4)$$

Integrando-se a equação acima e assumindo-se que quando  $\mu = \mu_{\max}$ ,  $\mu$  é constante, obtemos:

$$\mu_{\max} \cdot t = \text{Ln} \frac{X}{X_0} \quad (5)$$

A equação acima é similar a equação de uma reta ( $y = ax + b$ ). Portanto plotando-se  $\text{Ln } X/X_0$  em função do tempo obtemos o coeficiente angular  $b = \mu_{\max}$ .

#### 4.7.2. Parâmetros estequiométricos

- Rendimento de substrato em biomassa:

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{dS} \quad (6)$$

ou, para intervalos de tempo definidos, tem-se:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (7)$$

- Rendimento de produto em biomassa

$$Y_{X/P} = \frac{dX}{dP} \quad (8)$$

ou, para intervalos de tempo definidos, tem-se:

$$Y_{X/P} = \frac{\Delta X}{\Delta P} = \frac{X_f - X_i}{P_f - P_i} \quad (9)$$

- Rendimento de substrato em produto

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} \quad (10)$$

ou, para intervalos de tempo definidos, tem-se:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (11)$$

Onde  $S_i$ ,  $S_f$ ,  $P_i$ ,  $P_f$ ,  $X_i$ ,  $X_f$  são as concentrações iniciais e finais de substrato, produto e biomassa respectivamente

#### 4.7.3. Produtividade

A produtividade é definida como a quantidade de etanol produzido por unidade de volume por unidade de tempo:

$$Pr = \frac{F}{V} \cdot P = D \cdot P \quad (12)$$

onde  $D$  é a taxa de diluição e  $P$  a concentração final de produto.

#### 4.7.4. Rendimento

O rendimento pode ser definido como a quantidade de etanol produzida pela fermentação alcoólica em relação à quantidade que pode ser convertido em álcool pela multiplicação do valor estequiométrico de 0,511 g/g (Eq. De Gay-Lussac: 51,1 g de etanol/100 g de glicose).

$$Rend = \frac{P}{S_0 \cdot 0,511} \quad (13)$$

$P$  = concentração final de produto

$S_0$  = concentração inicial de substrato

#### 4.7.5. Conversão

A conversão é definida como a quantidade de substrato consumida em relação à quantidade de substrato inicial presente no meio de fermentação:

$$C = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad (14)$$

Onde  $S_0$  e  $S$  são as concentrações iniciais e finais de substrato respectivamente.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. FERMENTAÇÃO COM CÉLULAS LIVRES**

A seguir estão apresentados os resultados obtidos através de experimentos realizados em sistema batelada para células livres na temperatura de 32°C, na forma de tabelas e na forma gráfica. As amostras foram retiradas periodicamente de duas em duas horas até o tempo total de 36 horas para determinação do consumo de açúcares redutores totais (sacarose, glicose e frutose), da formação de etanol e glicerol, de massa seca e do acompanhamento da viabilidade celular.

Tabela 11 – Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura A

Tempo (h)	Xt	Viab.							
		(%)	Xv	S	P	Sac.	Glic.	Frut.	Gli.
0	0,44	100,00	0,44	174,82	3,68	94,14	44,04	36,64	0,00
2	2,39	100,00	2,39	154,52	7,11	65,69	44,19	44,64	0,00
4	3,25	100,00	3,25	135,22	16,42	50,39	42,76	42,07	0,00
6	4,18	100,00	4,18	114,52	23,28	42,69	29,91	41,92	0,00
8	4,62	100,00	4,62	95,15	37,44	49,82	15,68	29,66	0,00
10	4,97	100,00	4,97	67,16	54,67	47,44	4,80	14,93	1,27
12	6,71	100,00	6,71	43,37	62,45	37,56	1,65	4,17	2,97
14	7,00	99,60	6,97	34,67	64,91	30,19	1,22	3,26	3,40
16	9,83	99,40	9,77	22,08	69,34	19,15	0,57	2,36	3,45
18	9,95	99,40	9,89	13,81	76,57	12,70	0,00	1,12	3,58
20	10,15	99,30	10,08	9,00	78,07	8,55	0,00	0,45	4,18
22	10,86	99,20	10,78	5,23	82,63	5,23	0,00	0,00	3,85
24	10,91	98,50	10,75	4,30	83,32	4,30	0,00	0,00	3,65
27	10,98	98,50	10,82	2,40	81,24	2,40	0,00	0,00	3,58
30	10,88	98,10	10,67	1,60	82,93	1,60	0,00	0,00	3,57
33	10,54	97,90	10,32	0,98	82,01	0,98	0,00	0,00	4,21
36	10,74	98,00	10,53	0,00	81,60	0,00	0,00	0,00	4,04

Xt – Células totais; Viab. – viabilidade celular; Xv Células viáveis totais; S – Açúcares Redutores Totais; P – Etanol; S – Sacarose; Glic. – Glicose; Frut. – Frutose; Gli – Glicerol.

Concentrações em g/L

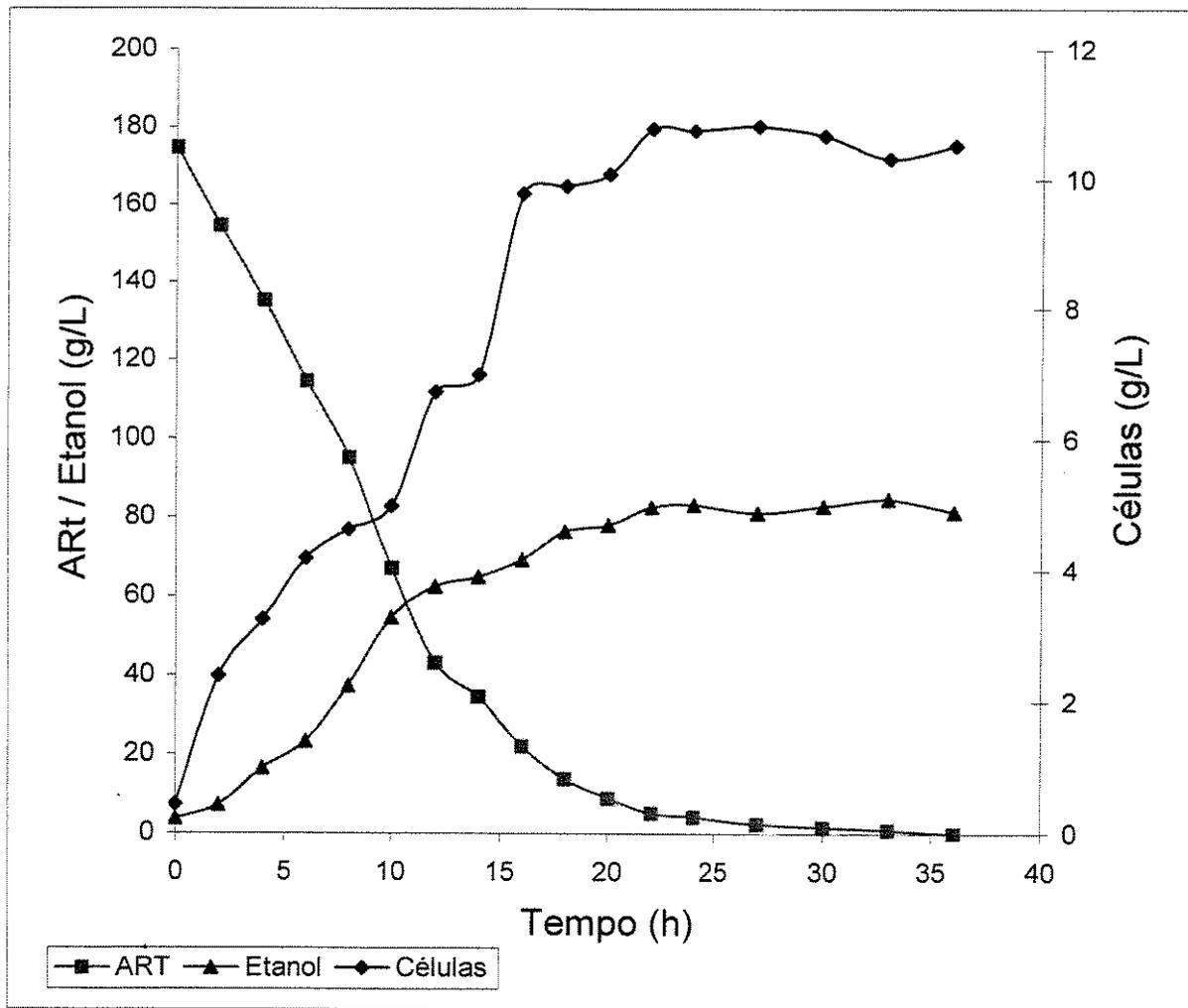


Figura 13 – Comportamento do sistema fermentativo para a levedura A

Tabela 12 – Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura B

Tempo (h)	Viab.								
	Xt	(%)	Xv	S	P	Sac.	Glic.	Frut.	Gli.
0	0,73	100	0,73	172,88	1,92	85,56	45,69	41,63	0,00
2	2,44	100	2,44	148,10	7,37	67,34	40,55	40,21	0,00
4	4,01	100	4,01	133,25	13,69	57,71	35,52	40,02	0,00
6	3,74	100	3,74	111,12	21,64	44,51	27,28	39,33	0,00
8	4,51	100	4,51	89,74	38,19	48,07	14,02	27,65	1,51
10	5,54	100	5,54	61,97	52,33	44,37	4,63	12,70	3,14
12	5,86	100	5,86	41,84	64,74	37,20	1,01	3,63	3,73
14	6,59	100	6,59	30,48	66,71	26,57	0,95	2,96	3,25
16	8,46	100	8,46	19,88	73,66	17,21	0,43	2,24	3,85
18	9,36	99,6	9,32	11,67	77,12	10,96	0,00	0,71	3,89
20	9,4	99,6	9,36	7,76	80,15	7,57	0,00	0,19	3,89
22	10,27	99,5	10,22	5,14	79,95	5,14	0,00	0,00	3,72
24	10,28	98,9	10,16	3,53	83,60	3,53	0,00	0,00	3,74
27	10,28	98,5	10,13	2,03	82,83	2,03	0,00	0,00	3,90
30	10,32	98,5	10,17	1,21	83,60	1,21	0,00	0,00	4,38
33	10,35	98,1	10,15	0,64	79,92	0,64	0,00	0,00	4,55
36	10,35	98,1	10,15	0,89	79,92	0,89	0,00	0,00	4,89

Xt – Células totais; Viab. – viabilidade celular; Xv Células viáveis totais; S – Açúcares Redutores Totais; P – Etanol; S – Sacarose; Glic. – Glicose; Frut. – Frutose; Gli – Glicerol.  
Concentrações em g/L

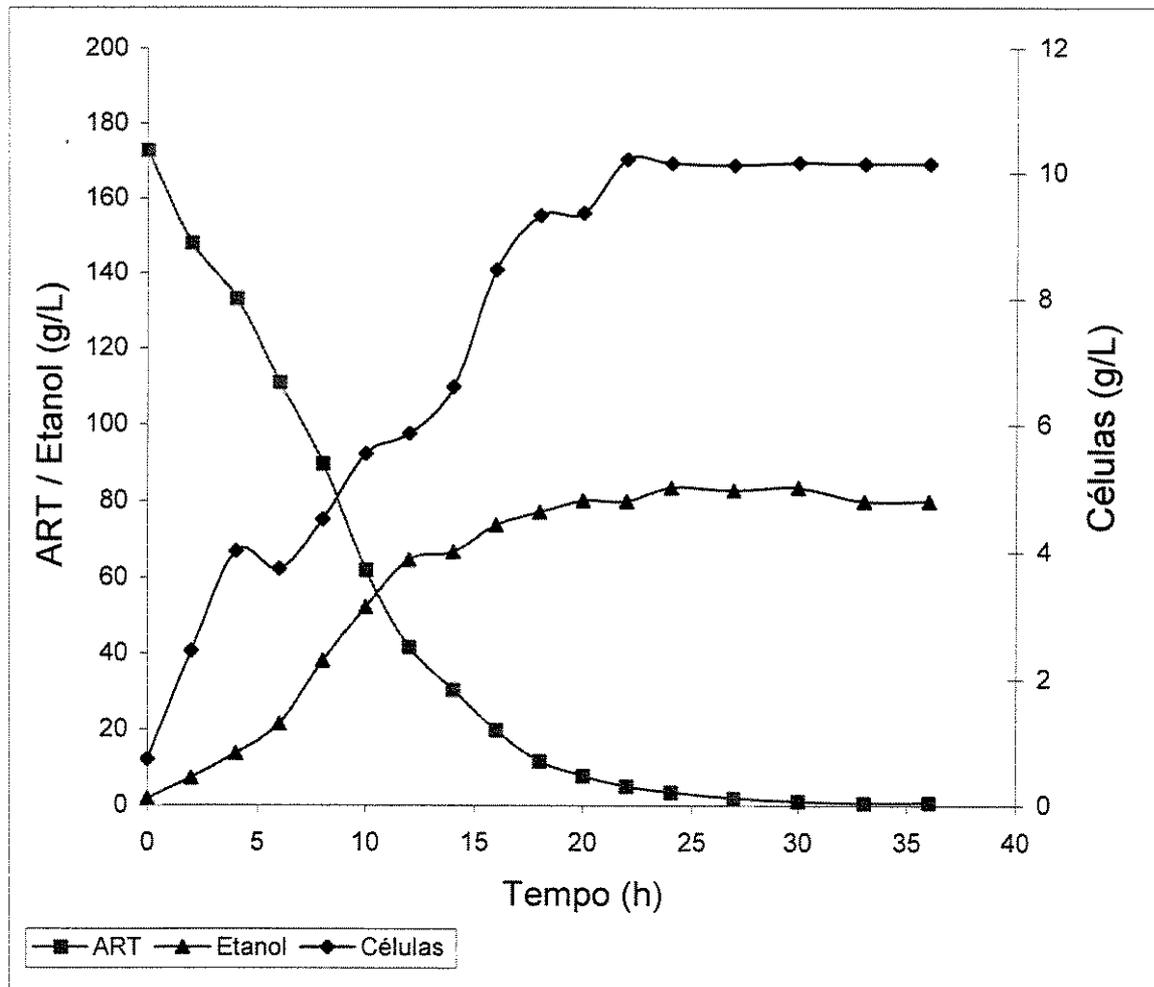


Figura 14– Comportamento do sistema fermentativo para a levedura B

Tabela 13 – Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura C

Tempo (h)	Viab.		Xv	S	P	Sac.	Glic.	Frut.	Glic
	Xt	(%)							
0	0,57	100	0,57	175,60	3,49	92,24	41,42	41,94	0,00
2	0,99	100	0,99	169,05	6,42	91,38	38,23	39,44	0,00
4	1,93	100	1,93	162,61	6,27	86,01	36,54	40,06	0,00
6	1,94	100	1,94	127,73	22,91	80,94	19,63	27,16	0,00
8	2,57	100	2,57	105,83	34,88	79,78	13,17	12,89	1,78
10	3,28	100	3,28	80,25	40,93	59,53	9,77	10,91	2,39
12	3,92	100	3,92	64,08	52,71	41,52	9,92	12,64	3,46
14	5,2	100	5,20	42,38	56,57	27,62	6,26	8,51	3,87
16	5,35	100	5,35	38,08	63,03	25,50	4,86	7,72	3,91
18	7,13	100	7,13	26,09	70,59	14,71	3,86	7,53	4,00
20	7,58	100	7,58	19,01	73,73	12,45	1,57	4,99	3,79
22	8,03	99,6	8,00	12,88	75,82	9,96	0,00	2,93	4,08
24	8,39	99,1	8,31	8,96	77,58	7,22	0,00	1,75	4,16
27	8,57	99,1	8,50	4,28	75,69	3,95	0,00	0,33	4,02
30	8,87	98,8	8,76	2,37	82,28	2,37	0,00	0,00	3,89
33	9,06	98,8	8,95	1,13	82,15	1,13	0,00	0,00	4,29
36	9,16	98,6	9,04	1,28	82,20	1,28	0,00	0,00	4,70

Xt – Células totais; Viab. – viabilidade celular; Xv Células viáveis totais; S – Açúcares Redutores Totais; P – Etanol; S – Sacarose; Glic. – Glicose; Frut. – Frutose; Gli – Glicerol.  
Concentrações em g/L

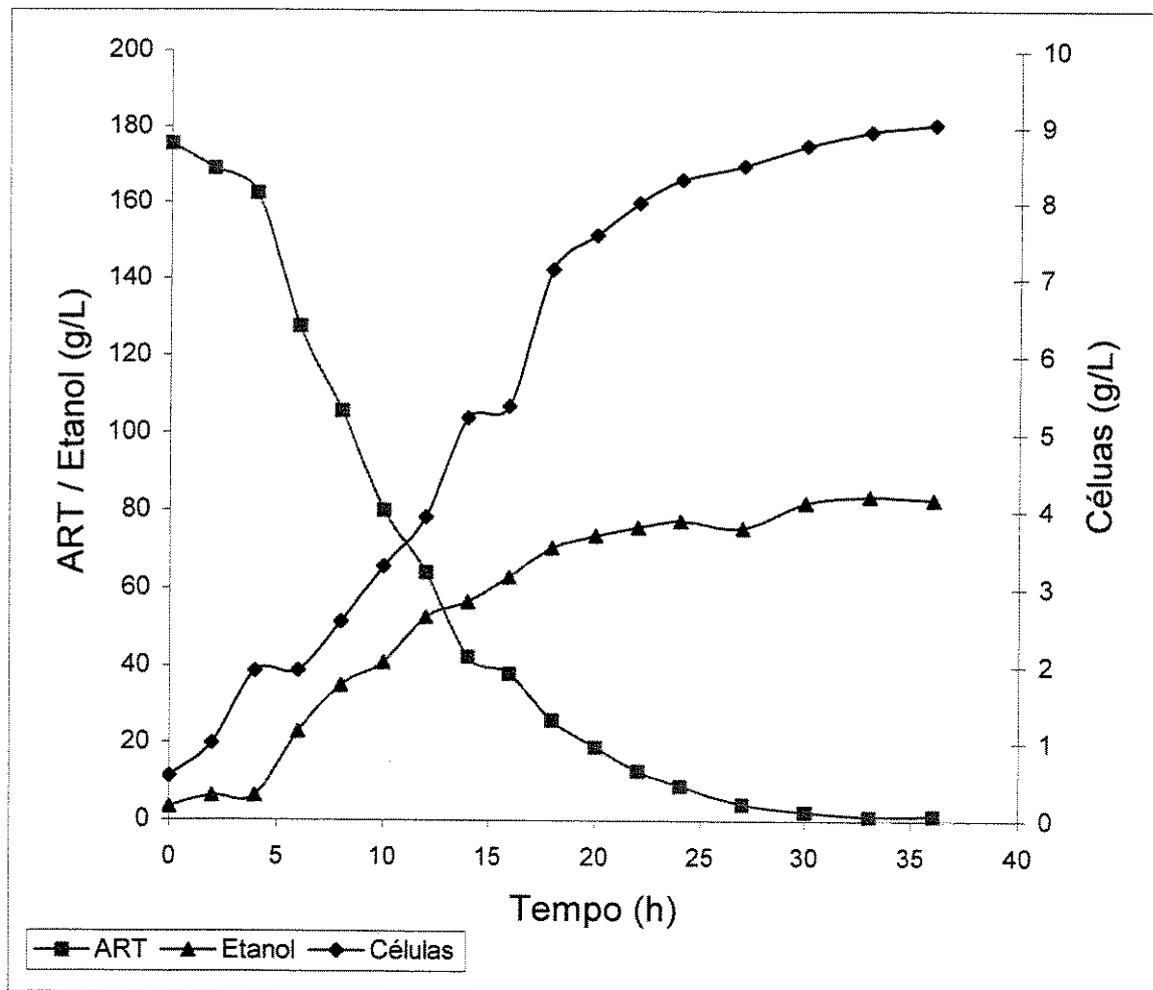


Figura 15- Comportamento do sistema fermentativo para a levedura C

Tabela 14 – Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura D

Tempo (h)	Viab.		Xv	S	P	Sac.	Glic.	Frut.	Glic
	Xt	(%)							
0	0,76	100	0,76	173,99	3,98	66,64	52,47	54,88	0,00
2	1,96	100	1,96	156,56	7,21	51,60	51,47	53,49	0,00
4	3,05	100	3,05	138,20	15,01	33,58	49,61	55,01	0,00
6	3,26	100	3,26	110,06	22,88	25,55	34,61	49,90	0,00
8	4,06	100	4,06	80,62	42,77	22,89	18,44	39,30	1,78
10	4,65	100	4,65	50,66	57,24	20,27	5,89	24,51	3,49
12	5,81	100	5,81	25,76	68,62	21,12	0,00	4,65	4,29
14	6,63	100	6,63	22,48	73,57	19,76	0,71	2,01	4,18
16	8,08	100	8,08	20,27	75,59	18,02	0,36	1,89	4,25
18	8,37	100	8,37	15,88	74,00	14,95	0,00	0,93	4,54
20	9,35	99,8	9,33	15,08	73,04	13,87	0,00	1,22	4,30
22	10,02	99,6	9,98	12,53	74,12	12,16	0,00	0,37	4,10
24	10,22	99,5	10,17	11,55	75,68	11,30	0,00	0,26	4,25
27	10,34	99,5	10,29	10,25	76,06	10,03	0,00	0,22	4,61
30	10,56	99,1	10,47	9,67	75,69	9,40	0,00	0,27	4,49
33	10,7	98,8	10,57	9,19	76,09	8,90	0,00	0,29	4,30
36	10,94	98,6	10,79	8,36	76,95	8,30	0,00	0,06	4,51

Xt – Células totais; Viab. – viabilidade celular; Xv Células viáveis totais; S – Açúcares Redutores Totais; P – Etanol; S – Sacarose; Glic. – Glicose; Frut. – Frutose; Gli – Glicerol.

Concentrações em g/L

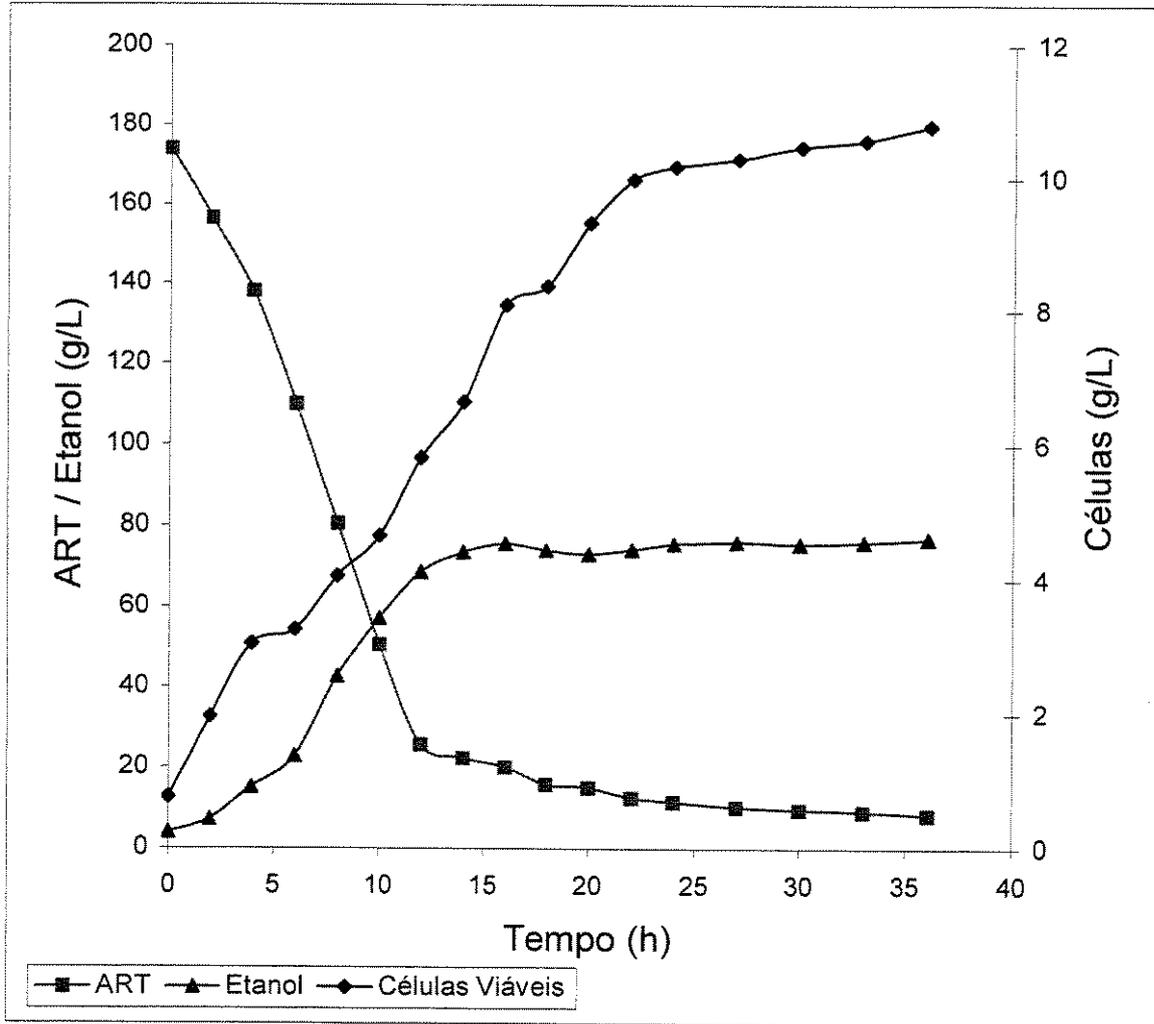


Figura 16– Comportamento do sistema fermentativo para a levedura D

Tabela 15 – Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura E

Tempo (h)	Viab.		Xv	S	P	Sac.	Glic.	Frut.	Gli.
	Xt	(%)							
0	0,50	100,00	0,50	174,12	3,54	107,12	34,68	32,32	0,00
2	1,49	100,00	1,49	156,24	7,20	57,72	31,18	32,73	0,00
4	1,53	100,00	1,53	130,13	11,64	41,86	24,81	28,66	0,00
6	2,12	100,00	2,12	112,50	14,94	45,76	28,23	38,51	0,00
8	2,73	100,00	2,73	95,07	35,09	42,49	18,29	34,30	1,54
10	3,28	100,00	3,28	62,90	44,38	29,35	9,06	24,49	2,76
12	4,00	100,00	4,00	36,45	66,05	28,32	0,57	7,57	4,11
14	4,40	100,00	4,40	23,81	69,10	20,43	0,78	2,60	4,25
16	6,15	100,00	6,15	15,58	74,23	13,46	0,29	1,83	4,43
18	7,12	99,20	7,07	9,35	80,18	8,90	0,00	0,45	4,71
20	7,86	99,20	7,79	5,97	75,75	5,97	0,00	0,00	4,03
22	8,47	99,00	8,38	4,30	79,67	4,30	0,00	0,00	4,65
24	9,03	99,00	8,94	3,33	80,02	3,33	0,00	0,00	4,75
27	8,83	98,70	8,71	1,88	80,62	1,88	0,00	0,00	4,23
30	9,69	98,50	9,55	1,38	81,55	1,38	0,00	0,00	4,83
33	9,67	98,20	9,50	0,48	82,09	0,48	0,00	0,00	4,71
36	10,02	98,20	9,84	0,42	81,73	0,42	0,00	0,00	4,42

Xt – Células totais; Viab. – viabilidade celular; Xv Células viáveis totais; S – Açúcares Redutores Totais; P – Etanol; S – Sacarose; Glic. – Glicose; Frut. – Frutose; Gli – Glicerol.

Concentrações em g/L

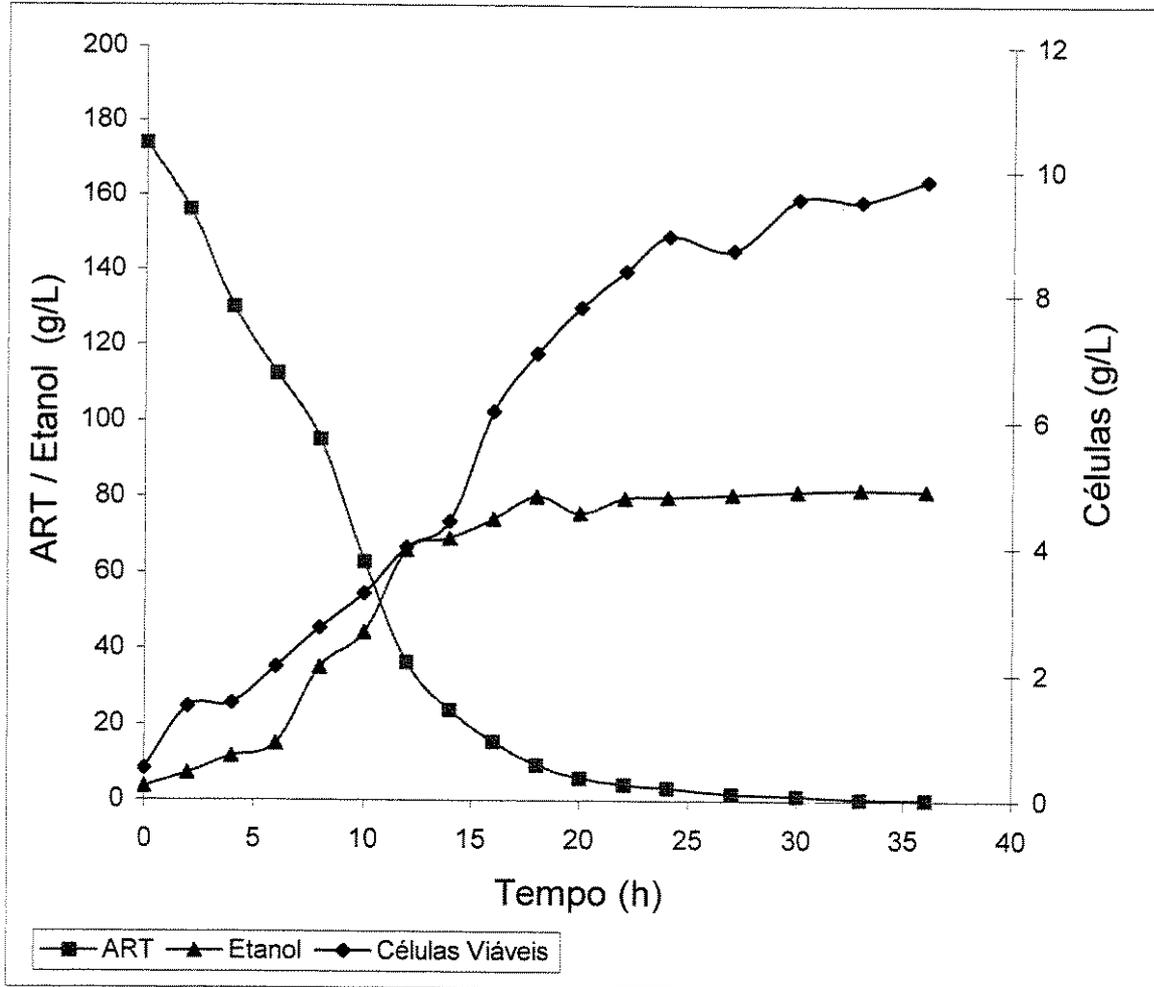


Figura 17 – Comportamento do sistema fermentativo para a levedura E

Tabela 16 – Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura F

Tempo (h)	Viab.		Xv	S	P	Sac.	Glic.	Frut.	Gli.
	Xt	(%)							
0	0,37	100	0,37	173,65	3,65	89,00	41,39	43,26	0,00
2	1,50	100	1,50	156,34	6,33	83,49	37,20	35,65	0,00
4	1,75	100	1,75	147,03	10,93	64,15	40,35	42,53	0,00
6	2,04	100	2,04	133,90	17,43	50,65	32,64	36,64	0,00
8	2,66	100	2,66	126,28	20,92	49,25	33,38	43,65	0,32
10	2,97	100	2,97	103,96	28,65	33,50	27,96	42,51	1,17
12	3,41	100	3,41	83,80	40,86	26,73	19,33	37,74	2,36
14	3,76	100	3,76	63,18	45,70	20,87	12,34	29,97	3,39
16	4,51	100	4,51	29,17	64,56	11,89	3,54	13,74	3,18
18	5,30	100	5,30	25,55	71,87	12,70	2,29	10,56	3,08
20	5,61	100	5,61	12,84	71,10	9,09	0,26	3,49	3,49
22	5,72	99,9	5,72	9,74	77,99	7,10	0,00	2,65	5,02
24	6,70	99,7	6,68	6,23	79,48	4,99	0,00	1,24	5,58
27	7,03	99,7	7,01	2,64	81,22	2,45	0,00	0,19	5,53
30	7,55	99,5	7,51	1,21	82,06	1,21	0,00	0,00	5,68
33	7,75	99,2	7,68	0,00	82,25	0,00	0,00	0,00	5,51
36	7,84	99,2	7,77	0,00	82,35	0,00	0,00	0,00	5,57

Xt – Células totais; Viab. – viabilidade celular; Xv Células viáveis totais; S – Açúcares Redutores Totais; P – Etanol; S – Sacarose; Glic. – Glicose; Frut. – Frutose; Gli – Glicerol.  
Concentrações em g/L

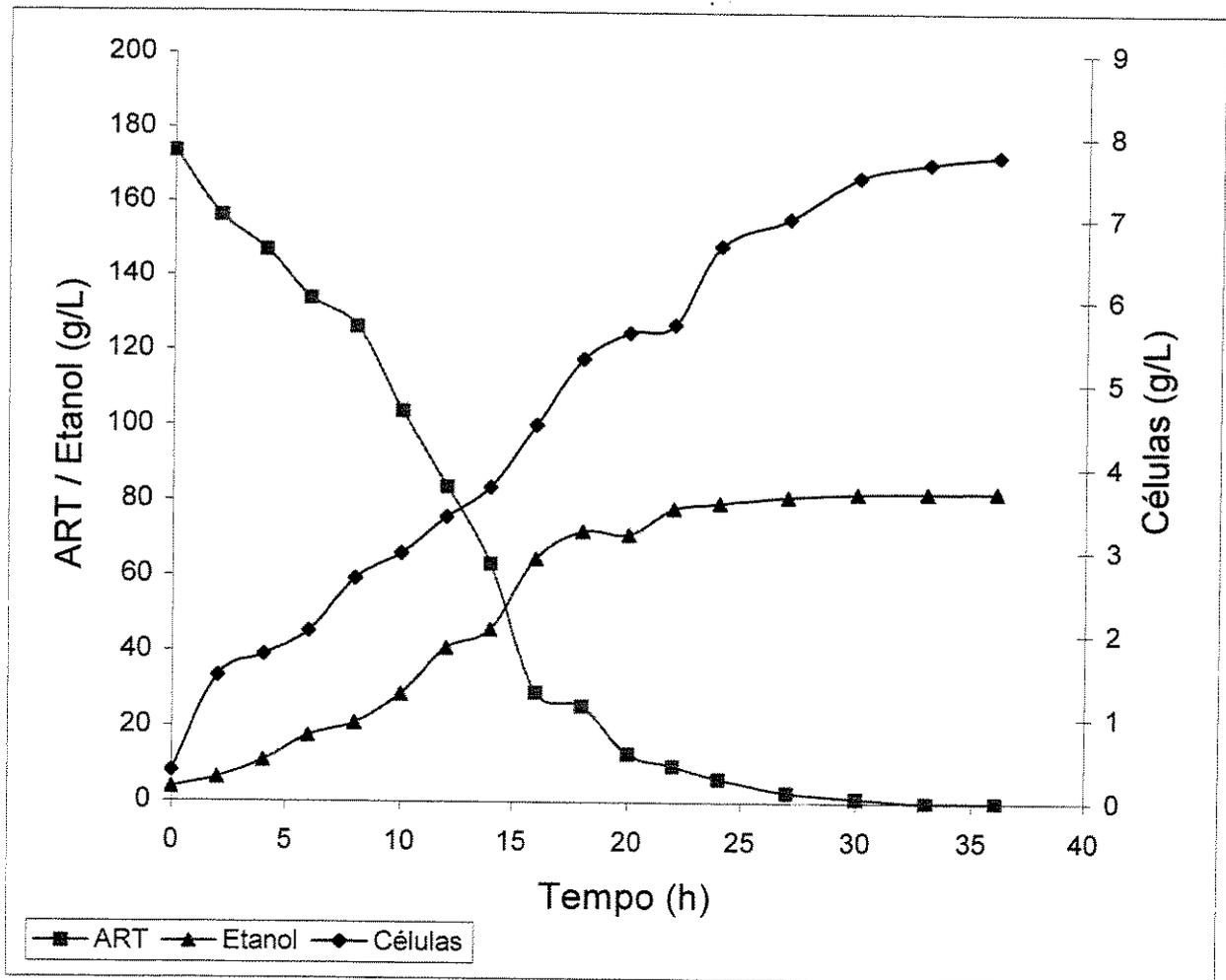


Figura 18 – Comportamento do sistema fermentativo para a levedura F

Tabela 17 – Dados experimentais do processo batelada com células livres para a levedura Maury

Tempo (h)	Viab.		Xv	S	P	Sac.	Glic.	Frut.	Gli.
	Xt	(%)							
0	1,00	100,00	1,00	190,50	0,00	161,75	17,19	11,56	0,00
2	2,12	100,00	2,12	155,81	11,78	37,32	58,38	60,11	0,00
4	2,95	100,00	2,95	134,86	20,62	0,00	62,34	72,52	0,00
6	3,56	100,00	3,56	104,17	30,17	0,00	43,83	60,34	0,00
8	4,80	100,00	4,80	94,26	41,81	0,00	34,66	59,60	1,15
10	5,33	100,00	5,33	68,56	52,16	0,06	19,79	48,72	2,37
12	5,95	100,00	5,95	43,62	68,85	0,13	7,38	36,12	3,24
14	6,49	99,80	6,48	27,15	74,96	0,39	2,39	24,37	3,28
16	7,73	99,40	7,68	20,98	79,30	0,70	3,20	17,09	3,46
18	8,52	99,40	8,47	3,75	89,96	0,16	0,00	3,59	3,68
20	9,91	99,10	9,82	1,33	91,22	0,52	0,00	0,81	3,51
22	9,91	99,10	9,82	0,41	93,32	0,41	0,00	0,00	3,51
24	9,95	98,10	9,76	0,24	93,81	0,24	0,00	0,00	3,40
27	9,97	97,90	9,76	0,20	95,19	0,20	0,00	0,00	3,64
30	9,97	97,90	9,76	0,23	91,33	0,23	0,00	0,00	3,46
33	9,98	97,50	9,73	0,29	91,22	0,29	0,00	0,00	3,35
36	10,01	97,80	9,79	0,00	91,30	0,00	0,00	0,00	3,65

Xt – Células totais; Viab. – viabilidade celular; Xv Células viáveis totais; S – Açúcares Redutores Totais; P – Etanol; S – Sacarose; Glic. – Glicose; Frut. – Frutose; Gli – Glicerol.  
Concentrações em g/L

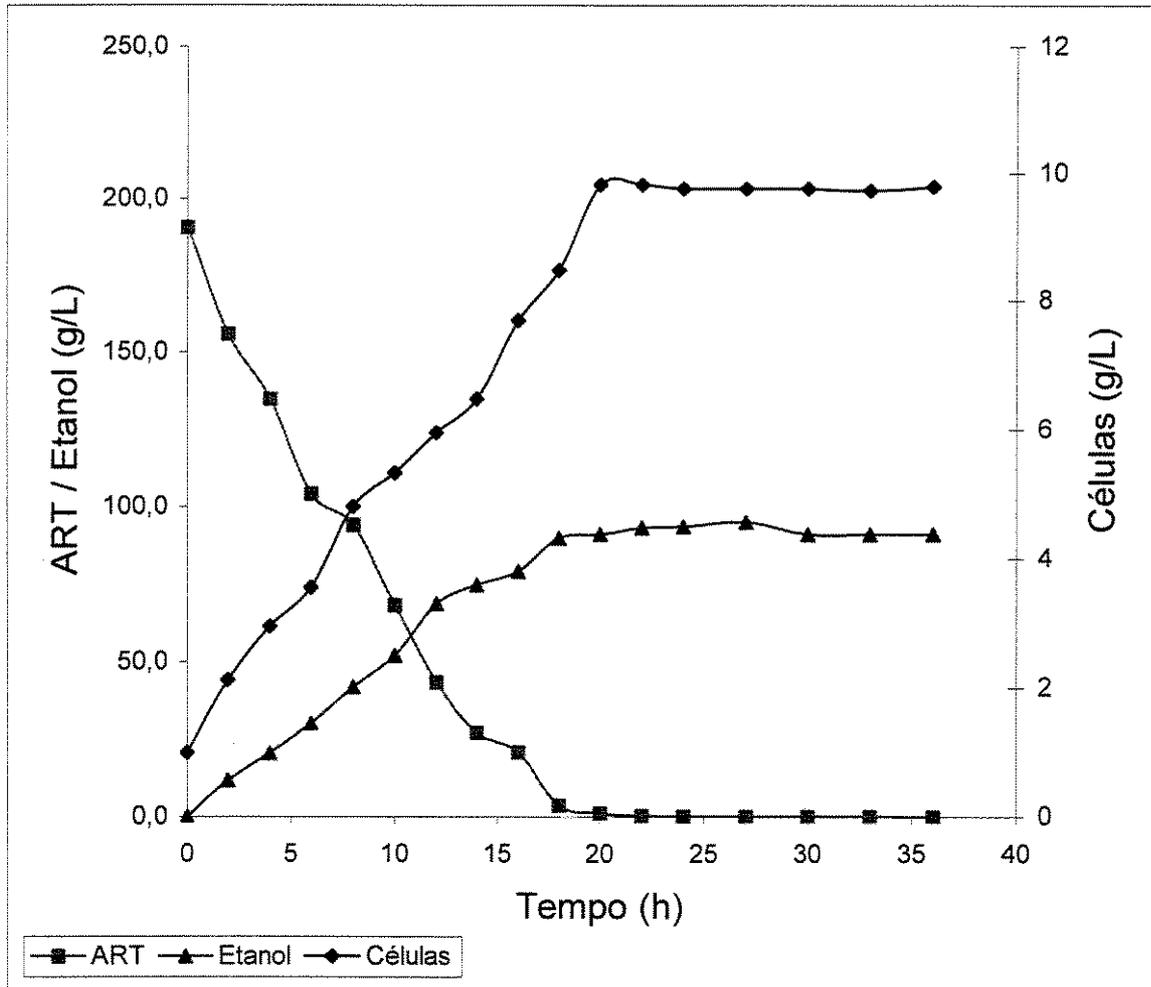


Figura 19 – Comportamento do sistema fermentativo para a levedura Maury

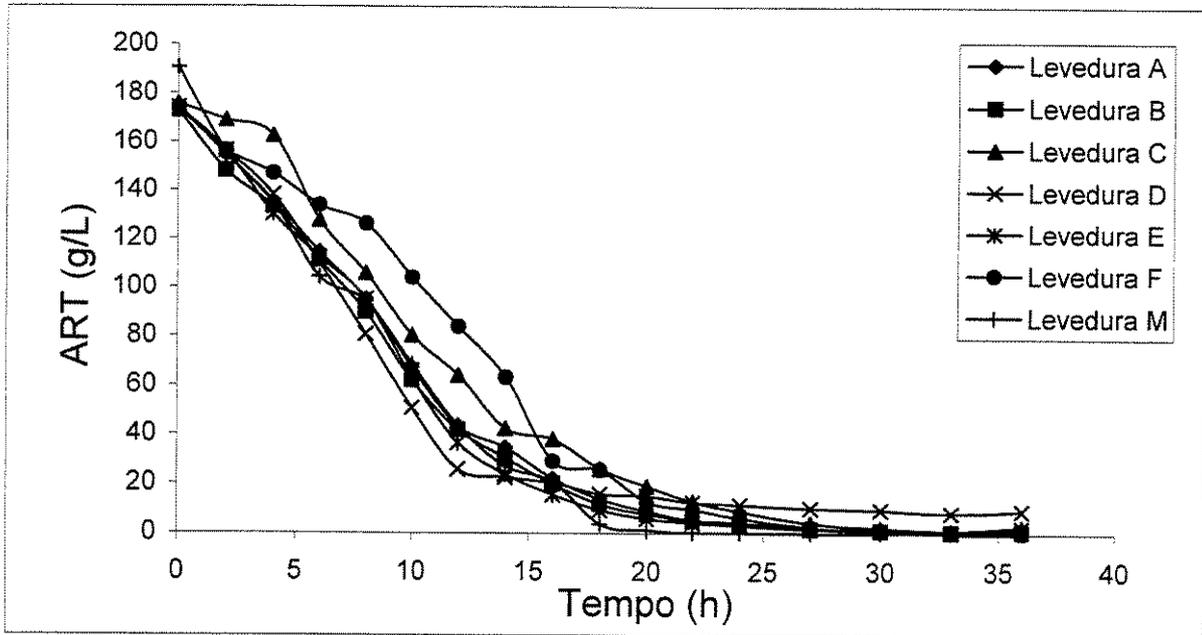


Figura 20 – Comportamento da concentração de ART para células livres

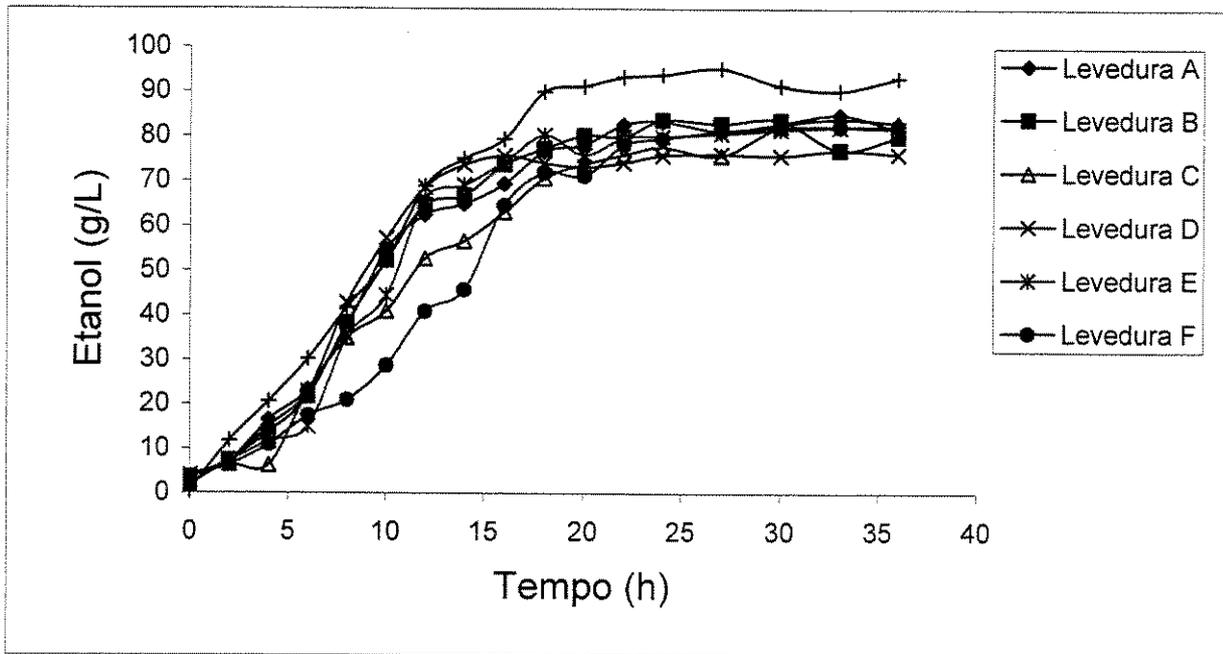


Figura 21 – Comportamento da produção de Etanol para células livres.

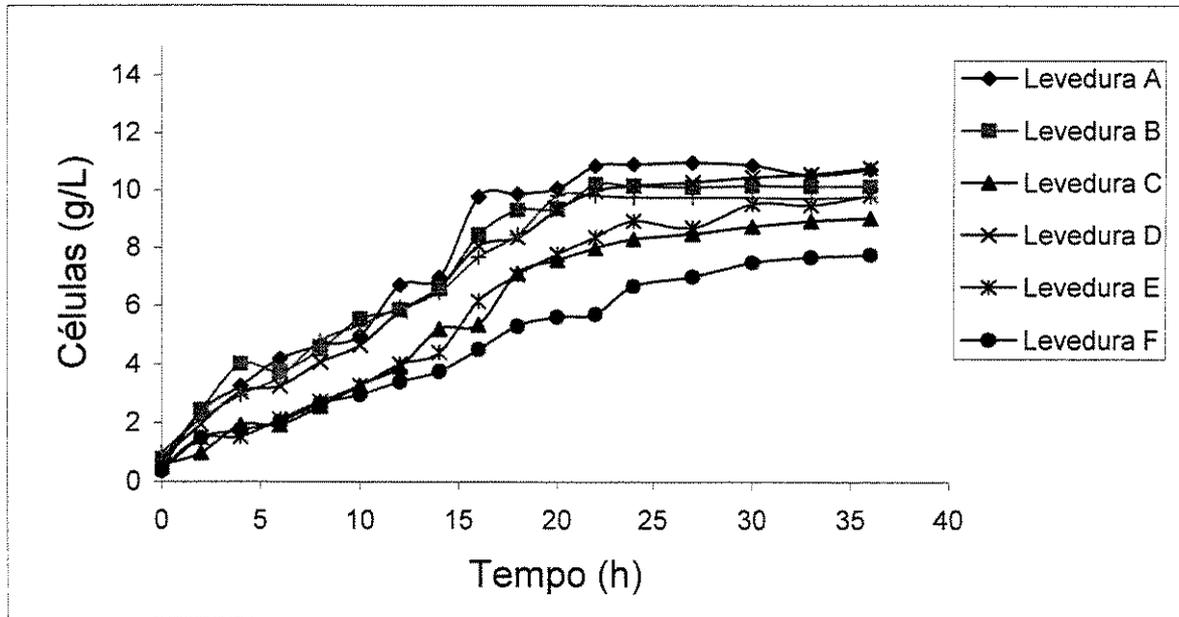


Figura 22 – Comportamento da concentração de Biomassa Viável para células livres

Com o auxílio das figuras 13 a 23 e das tabelas 10 a 16 pode-se verificar que o processo fermentativo batelada com células livres tem um tempo de duração médio de aproximadamente 30 horas, e que durante este processo, ocorre o consumo de substrato para a formação de produto e biomassa. As exceções são as leveduras Maury, que apresentou um residual de açúcar de 1,33 g/L com apenas 20 horas de processo, e a levedura D que apresentou um residual de açúcar de 9,19 g/L com 36 horas de fermentação. Isto ocorre pois a levedura D foi isolada aleatoriamente do caldo em fermentação da destilaria de aguardente e a levedura comercial Maury é especialmente selecionada para a produção de etanol.

Com relação à produção de etanol destacamos também as duas leveduras como maiores e menores produtoras. A viabilidade celular alcançada nos processos permanece quase que 100% durante toda a fermentação tendo uma ligeira queda ao final do processo, não ficando inferior a 97%

### 5.1.1. Parâmetros de Fermentação

Na tabela 18 são apresentados os valores das condições iniciais e finais de concentração de biomassa total e viável, concentração de açúcares e etanol para as sete leveduras estudadas.

Tabela 18 – Quadro geral do processo batelada para células livres

Levedura	Condição Inicial			Condição Final		
	So	Po	Xov	S	P	Xv
A	174,82	3,68	0,44	0,00	81,60	10,74
B	172,88	1,92	0,73	0,89	79,92	10,15
C	175,60	3,49	0,57	1,28	82,20	9,04
D	173,99	3,98	0,76	8,36	76,95	10,79
E	174,12	3,54	0,50	0,42	81,73	9,84
F	173,65	3,65	0,37	0,00	82,35	7,77
M	190,50	0,00	1,00	0,00	91,30	9,80

$S_0, P_0, X_{ov}$ : concentrações em g/L iniciais de ART, Etanol e Células Viáveis

$S, P, X_v$ : concentrações em g/L finais de ART, Etanol e Células Viáveis

Pela análise da tabela 18 verificamos que as leveduras A, F, e M consumiram todo o açúcar presente no meio fermentativo. A levedura D foi a que apresentou menor consumo de substrato e também menor quantidade de etanol produzida (76,09 g/L). A quantidade de etanol inicial é devido a parte deste composto estar presente no inóculo que foi utilizado para as fermentações. A concentração inicial de ART é maior para a levedura M pois o caldo foi inoculado com esta levedura na forma liofilizada.

A tabela 19 apresenta os resultados dos parâmetros fermentativos para as sete leveduras.

Tabela 19 – Parâmetros fermentativos para obtidos com a fermentação utilizando células livres

Levedura	Y p/s (g/g)	Yx/s (g/g)	Yx/p (g/g)	Pr.(g/L.h)	Rend.(%)	Conv.(%)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )
A	0,446	0,059	0,123	2,164	87,4	100,0	0,081
B	0,454	0,055	0,124	2,167	88,5	99,5	0,082
C	0,451	0,049	0,109	2,186	87,7	99,2	0,105
D	0,440	0,061	0,140	2,003	82,1	95,2	0,083
E	0,450	0,055	0,122	2,171	87,8	99,7	0,099
F	0,453	0,043	0,094	2,186	88,9	100,0	0,075
M	0,476	0,047	0,099	2,522	93,2	100,0	0,084

Pr.: Produtividade; Rend.: Rendimento; Conv.: Conversão

As leveduras A, B, C, E e F apresentaram valores de Yp/s muito próximos, da ordem de 0,45 g/g. A levedura D, que teve o valor mais baixo para conversão apresentou um valor de Yp/s de 0,440 g/g. A levedura Maury apresentou o maior valor de Yp/s, 0,476 g/g. Os valores de Yx/s variaram de 0,043 g/g (levedura F) a 0,061 g/g (levedura D), enquanto os valores de Yx/p variaram de 0,094 g/g (levedura F) a 0,140 (levedura D).

Com relação a produtividade todas as leveduras isoladas da destilaria de aguardente apresentaram valores próximos a 2,1 g/L.h, enquanto a Levedura Maury aprsentou uma produtividade de 2,522 g/L.h. A levedura Maury também se destacou no rendimento (93,2%) enquanto as demais apresentaram rendimentos variando de 82,1% (levedura D) a 88,9% (levedura F). As leveduras A, F e M apresentaram 100% de conversão, enquanto as demais ficaram entre 94,7% a 99,5%. O valor de  $\mu_{max}$  se situou entre 0,081 h<sup>-1</sup> e 0,105 h<sup>-1</sup>.

Andrietta et all. (1999), propos uma classificação que agrupa as leveduras utilizadas na produção industrial de álcool etílico segundo os parâmetros fermentativos. Utilizou os níveis “Baixo e Alto” de acordo com as seguintes faixas: conversão de substrato, < 90,0 e > 98,5; fator de conversão de substrato em etanol (Yp/s), < 0,42 e >

0,45; fator de conversão de substrato em células ( $Yx/s$ ),  $< 0,041$  e  $> 0,044$ ; velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ),  $< 0,45$  e  $> 0,55$ .

As leveduras A, E, F e M apresentaram um nível “Alto” para a conversão de substrato, enquanto as leveduras B, C e D situaram-se em um nível médio.

Com relação ao fator de conversão de substrato em etanol –  $Yp/s$  (g etanol/g de substrato consumido), verifica-se que as leveduras A e D classificam-se entre “Baixo” e “Alto”, enquanto as demais se classificam como “Alto”. Com relação ao fator de conversão de substrato em biomassa –  $Yx/s$  (g de biomassa/g de substrato consumido), todas as leveduras classificaram-se com nível “Alto”.

Os resultados de velocidade máxima específica de crescimento mostram que todas as leveduras possuem valores no nível “Baixo”.

Ribeiro (1999) avaliou a potencialidade de 3 linhagens de leveduras encontrando valores de produtividade entre 2,88 e 3,40 g/L.h; valores de  $Yp/s$  entre 0,43 e 0,46 g/g; eficiência de fermentação entre 83,2 e 89,9 %; valores de  $Yx/s$  entre 0,07 e 0,09 e valores de  $\mu_{max}$  entre 0,07 e 0,1 h<sup>-1</sup>.

Parazzi (1995) em seu ensaio com quatro linhagens de leveduras encontrou valores de produtividade que variaram entre 2,85 a 4,16 g/L e para a velocidade específica de crescimento valores em torno de 0,03 h<sup>-1</sup> (levedura não floculante) e 0,13 h<sup>-1</sup> (levedura floculante), em caldo clarificado contendo 100 g de glicose/L e 10 g/L de inoculo.

O rendimento da fermentação está diretamente relacionado ao custo de produção da aguardente. Maiores quantidades de etanol produzidas levam a um aumento da produtividade e diminuição do custo. A qualidade também está diretamente relacionada com o rendimento, já que uma diminuição no rendimento pode ocorrer devido a parte do substrato ser desviada para produção de compostos indesejáveis com o ácido

acético e n-propanol. Vinhos com teores alcoólicos padronizados, oriundos de mostos e condições de fermentação também padronizadas originam destilados igualmente mais padronizados. É importante que o produtor conheça o desempenho de seu processo ao longo da safra e entre safras. Estas avaliações de desempenho são importantes para o planejamento e controle das operações e na composição do custo de produção (Chaves & Pova, 1992).

O  $\mu_{\max}$  fornece um indicativo da capacidade que uma dada linhagem de levedura possui de dominar o processo. Quanto maior for seu valor maior será a possibilidade desta linhagem permanecer no processo ao longo da safra. Isto pode não ocorrer se alguma condição operacional ou de instalação como temperatura de processo, pH ou menor resistência a condições adversas não favorecer sua permanência.

## 5.2. DETERMINAÇÃO DO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO

O principal problema na utilização de células imobilizadas em polissacarídeos é a transferência do dióxido de carbono produzido pelo processo fermentativo do interior para o exterior das esferas. O acúmulo deste gás dentro das esferas faz com que as mesmas flutuem no meio fermentativo, diminuindo a transferência de massa de substrato e produto, reduzindo assim a eficiência do processo fermentativo. As Figuras 23 a e 23 b mostram esferas de alginato de cálcio seccionadas ao meio antes e após a fermentação, onde ocorreu a formação de cavidades pelo desprendimento e acúmulo de CO<sub>2</sub>.

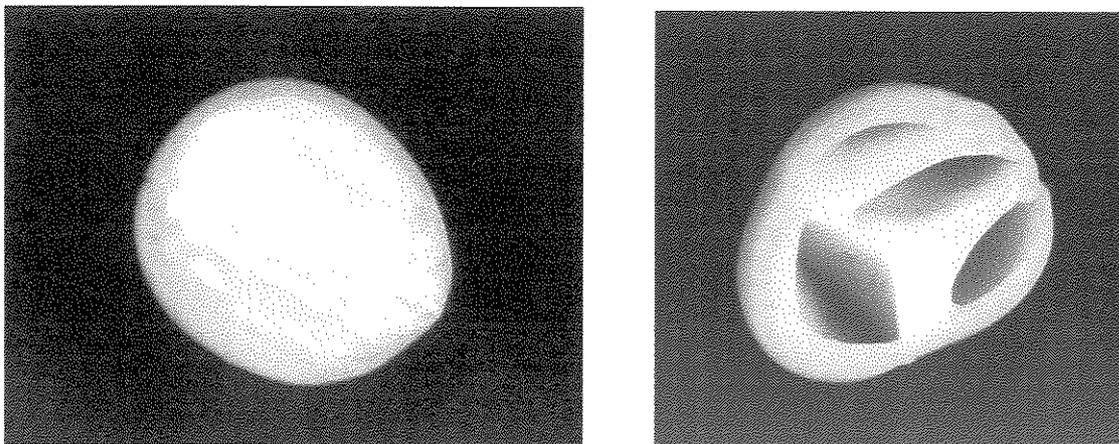


Figura 23 a e 23 b – Esfera de Alginato de Calcio seccionada antes e após a fermentação.

Com a finalidade de se obter um suporte que permitisse uma boa transferência de  $\text{CO}_2$  para o exterior, foram realizadas fermentações com células imobilizadas em diversos polissacarídeos e em diversas concentrações. As fermentações foram realizadas em agitador rotativo tipo Shaker, em erlenmeyers não aletados de 1 litro, contendo 300 ml de meio de cultura e 30 ml de células imobilizadas no polissacarídeo. A concentração de células imobilizadas no polisacarídeo foi de 60 g/L e o volume de 30 mL foi obtido através do volume de água deslocado quando se adicionava as esferas a uma proveta. As condições operacionais foram 32°C e 150 rpm.

### 5.2.1. Imobilização em Alginato de Cálcio

Inicialmente, quando as esferas são adicionadas ao meio, elas permanecem na superfície por possuírem uma menor densidade. Após aproximadamente 5 minutos, com a entrada de meio no seu interior, as esferas se depositam no fundo do frasco. Com o início da fermentação e desprendimento de  $\text{CO}_2$ , ocorre o acúmulo deste gás no interior das esferas e conseqüente flutuação das mesmas até o consumo total dos açúcares. Com o final da fermentação e saída do gás do interior, as esferas se depositam novamente no fundo do frasco.

Para todas as concentrações foi verificado que houve deformação e rompimento do gel devido à produção de CO<sub>2</sub> (Figura 24).

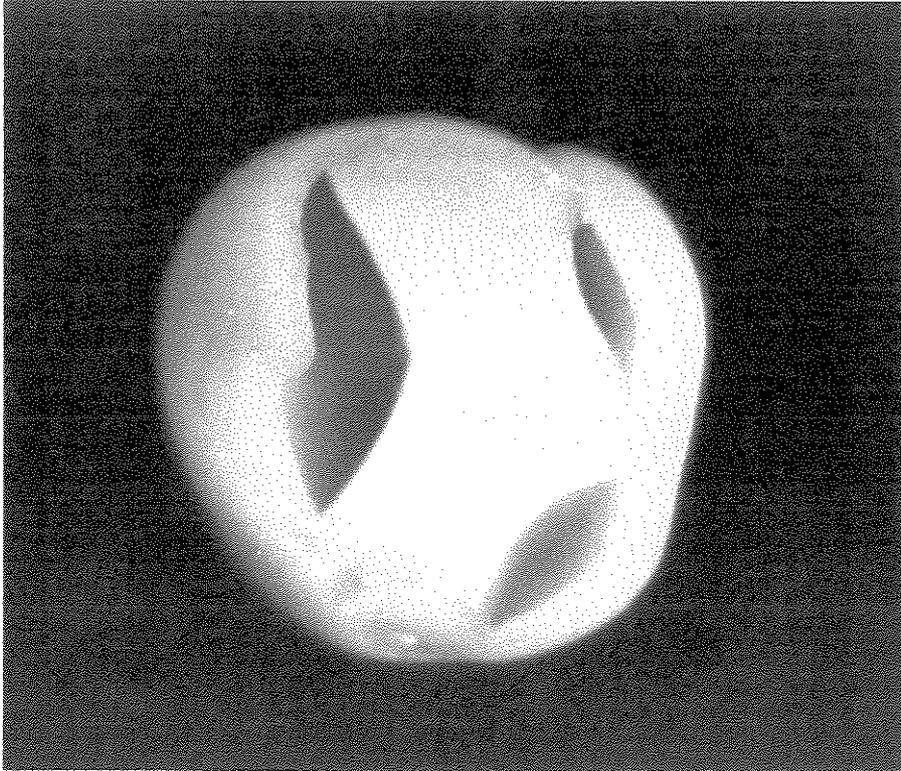


Figura 24 – Cavidades causadas pelo desprendimento e acúmulo de CO<sub>2</sub> durante a fermentação

### 5.2.2. Imobilização em K-Carragena

Os testes de fermentação foram realizados somente para as concentrações 1% e 2% pois para concentrações mais altas a K-carragena formou um gel sólido a temperatura ambiente, impossibilitando a adição das leveduras ao mesmo. As esferas formadas com o gel na concentração 1% não tinham rigidez suficiente para que fosse realizada a fermentação. Com o gel na concentração 2% ocorreram os mesmos problemas de flutuação e rompimento que no alginato de cálcio.

### 5.2.3 . Imobilização em Pectina Cítrica

A Pectina disponível apresentou o inconveniente de fermentar após a adição das leveduras. O processo de imobilização foi então realizado após a fermentação da Pectina. Para todas as concentrações ocorreu o mesmo problema de flutuação e rompimento como no Alginato de Cálcio. Para a Pectina ocorreu uma deformação maior das esferas devido a produção do  $\text{CO}_2$  (figura 25).

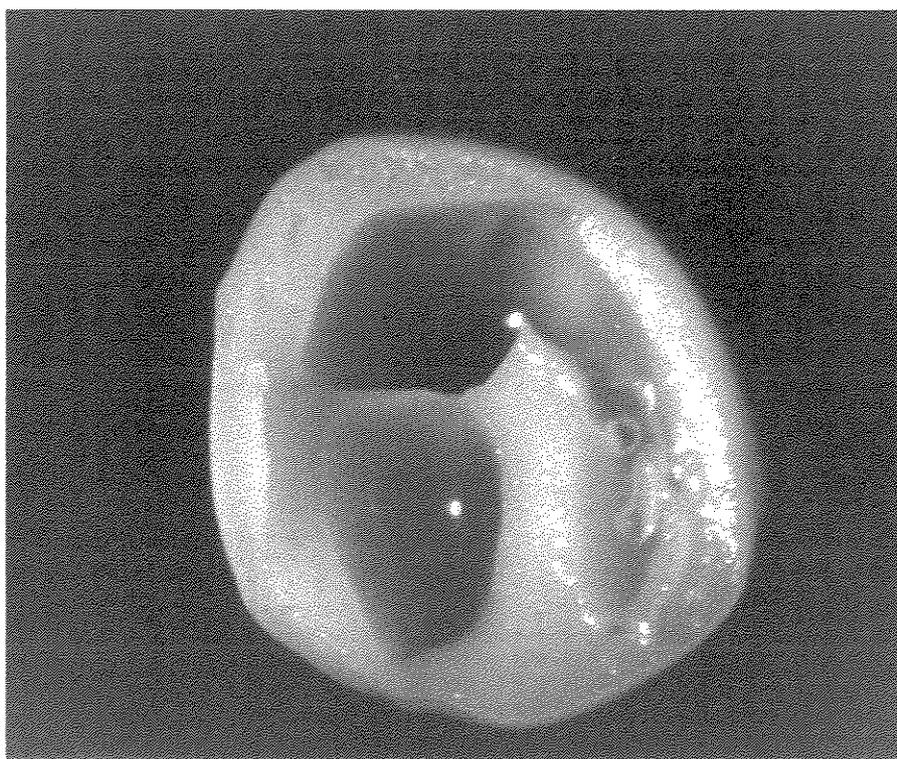


Figura 25 – Esfera seccionada de Pectina Cítrica após a fermentação

#### 5.2.4. Imobilização em Alginato de Cálcio + Dióxido de Titânio

O Dióxido de titânio foi utilizado na tentativa de aumentar a densidade do gel para manter as esferas no fundo do recipiente. Após a adição no meio fermentativo as esferas foram imediatamente para o fundo do frasco, mas com o início do desprendimento do  $\text{CO}_2$  ocorreram os mesmos problemas de flutuação e rompimento descritos anteriormente como mostra a figura 26.

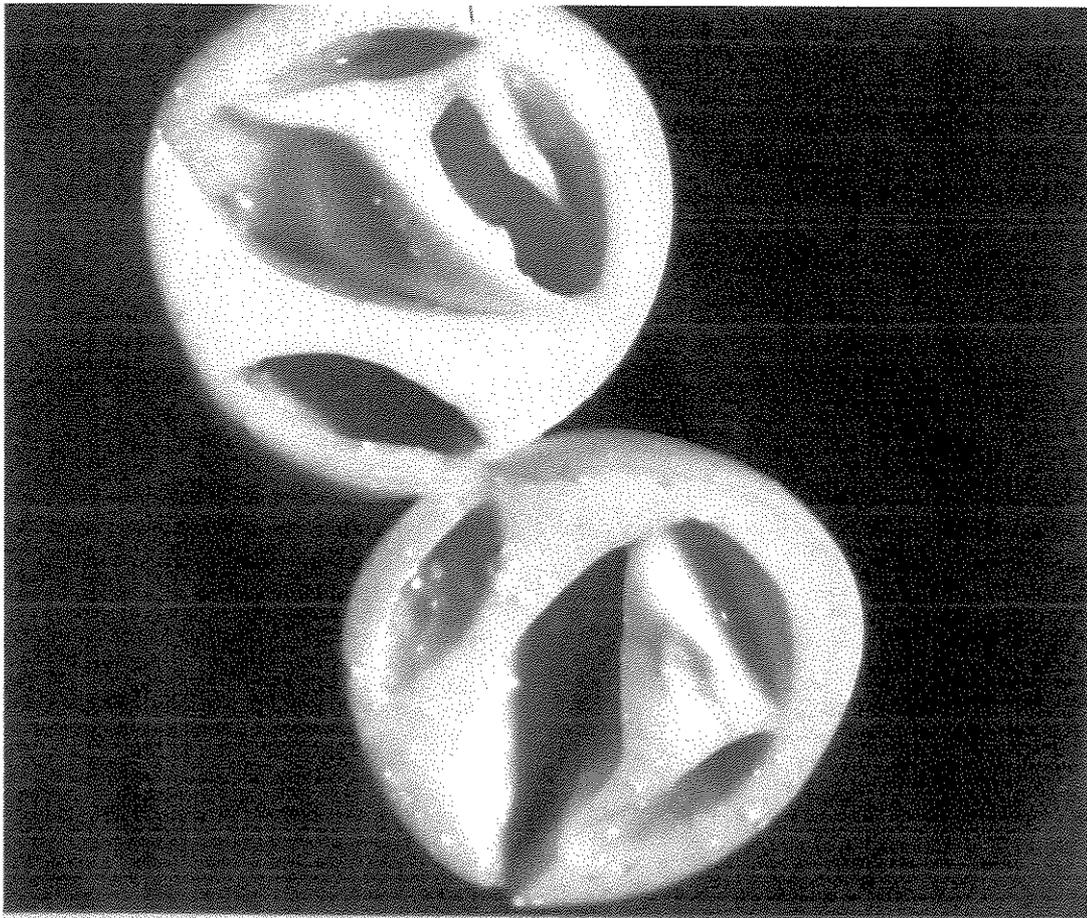
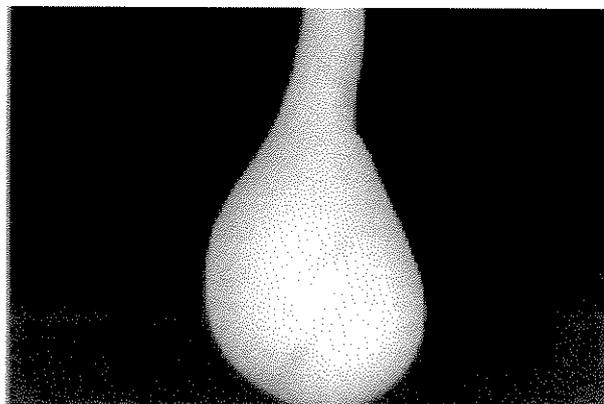
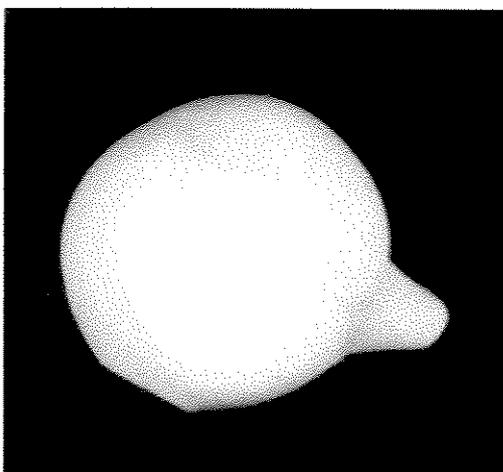


Figura 26 – Esferas de alginato com  $\text{TiO}_2$  contendo células imobilizadas e rompidas após a fermentação

### 5.2.5. Imobilização em Alginato de Cálcio + K-carragena

Após a imobilização dos geis nas diferentes concentrações, os mesmos foram adicionados separadamente a uma solução de cloreto de cálcio 2 % e mantidos sob agitação em Shaker a 150 rpm e 40°C por 24 e 48 horas. Este procedimento teve a finalidade de dissolver a K-carragena presente nas esferas para deixar espaços vazios nas mesmas e com isto facilitar a saída do CO<sub>2</sub> formado durante a fermentação. Foi observado novamente o mesmo comportamento anterior, com flutuação e rompimento das esferas. Para as concentrações maiores de K-carragena ocorreu um acentuado aumento da viscosidade da mistura células + polímero mesmo trabalhando com a temperatura de 45°C durante o processo de imobilização. Isto provocou a formação de géis disformes como mostram as figuras 27 a e 27b.



Figuras 27a e 27b – Formas não esféricas devido a alta viscosidade da solução gel + leveduras durante o processo de imobilização.

### 5.2.6. Imobilização em Alginato de Cálcio + Óxido de Alumínio

O Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi utilizado para um aumento na densidade do gel, porém em concentrações bem maiores que as de TiO<sub>2</sub>. Apesar de utilizarmos até 20% (20g/100ml) de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> os problemas de flutuação e rompimento também ocorreram.

Como todos os polímeros, combinados ou não, e nas diversas concentrações apresentaram flutuação e rompimento devido a produção e acúmulo de CO<sub>2</sub> durante a fermentação, o alginato de cálcio foi escolhido como suporte para imobilização neste trabalho por ser reconhecidamente o mais rápido, não tóxico, de baixo custo e versátil método de imobilização de células (mais de 80% dos processos são feitos utilizando alginato). (Nedovic, 1997).

### 5.3. DEFINIÇÃO DA LEVEDURA A SER IMOBILIZADA

De acordo com Korhola (1989) as leveduras utilizadas na produção de bebidas alcoólicas devem apresentar as seguintes características: alta tolerância ao álcool, bom rendimento, fermentar rapidamente o meio e, portanto, minimizar o risco de contaminações, e produzir a melhor concentração e balanço de compostos secundários desejáveis. A aguardente de cana é composta principalmente de água, etanol, e vários componentes secundários que conferem aroma e sabor. Estes compostos pertencem as seguintes classes: aldeídos, ácidos orgânicos, álcoois superiores, ésteres, furfural, terpenos, lactonas, furanos, pirazinas, dentre outros (Lima, 1964). Os teores destes compostos secundários na fermentação alcoólica são geralmente inferiores a 0,1 % (Maia 1994).

Almeida & Barreto (1971) observaram a correlação entre os teores de n-propanol e a qualidade sensorial das aguardentes relatando a ocorrência de maiores teores de n-propanol em aguardentes de qualidade inferior. O baixo conteúdo de acetaldeído nas bebidas é freqüentemente associado a uma melhora da qualidade (Nykanen & Suomalainen, 1983). O acetaldeído e outros aldeídos alifáticos de cadeia curta possuem odor pungente o que pode aumentar o sabor picante das bebidas (Nykanen, 1986). Boza (1988) analisando sensorialmente a qualidade de 16 amostras de aguardente verificou que a qualidade sensorial é inversamente proporcional a acidez volátil.

Os critérios acima foram utilizados na seleção da levedura a ser imobilizada, procurando-se minimizar principalmente os teores de n-propanol e ácido acético. O acetaldeído é facilmente eliminado pela separação da fração “cabeça” do destilado, enquanto o n-propanol e o ácido acético estão presentes nas três frações do destilado (cabeça, coração e cauda) (Ribeiro, 1999).

### 5.3.1. Componentes voláteis no caldo fermentado

Ensaio fermentativos foram realizados com a finalidade de se obter massa celular das leveduras A, B, C, D, E e F para a imobilização em alginato de cálcio 2 %. Após a imobilização foram realizadas fermentações e o vinho obtido submetido a análise por cromatografia gasosa para a determinação dos componentes voláteis formados.

A tabela 20 mostra os valores das concentrações dos componentes voláteis para a fermentação com células imobilizadas:

Tabela 20 – Componentes voláteis no vinho (Etanol, %v/v; demais compostos mg/100 ml de álcool anidro)

Levedura	Etn.	Acet.	Ac. Et.	Met.	n-prop.	i-but.	i-amil	Ac.Vol.
A	7,77	59,09	24,30	0,01	73,07	66,94	98,96	678,02
B	7,78	51,34	21,39	0,00	73,53	68,79	101,11	601,91
C	7,66	466,56	29,91	0,01	107,01	90,77	148,53	1127,16
D	7,56	45,32	21,54	0,00	83,21	62,90	100,92	638,79
E	7,46	45,99	28,60	0,00	110,56	87,35	121,57	686,58
F	7,50	34,10	13,11	0,00	182,78	68,70	144,45	390,24
MIX	7,70	56,95	22,47	0,01	91,96	77,16	104,55	817,22
Maury	7,12	862,14	26,80	0,01	89,16	59,60	69,30	1007,12

MIX – Mistura das leveduras A,B,C,D,E e F; Etn = Etanol; Acet. = acetaldeído; Ac. Et. = acetato de Etila; Met = Metanol; n-prop. = n-propanol; i-but. = álcool isobutílico; i-amil. = álcool isoamílico; Ac. Vol. = acides volátil

Observando-se a tabela 20 verificamos que as quantidades de etanol produzidas não foram muito diferentes para todas as leveduras estudadas. As concentrações de acetaldeído formadas pelas leveduras C e M foram bem superiores às demais. As concentrações de acetato de etila variaram entre os valores 20 e 30 mg/100 mL de álcool anidro, com exceção da levedura F, cujo valor foi da ordem de 13 mg/100 mL de álcool anidro. Com relação ao n-propanol, suas concentrações ficaram entre 83 e 110 mg/100 mL de álcool anidro, exceto para a levedura F, cujo valor ficou 66 % acima do valor máximo das demais leveduras. As concentrações de isobutanol se situaram entre 66 e 91 mg/100 mL de álcool anidro as de álcool isoamílico entre 69 e 149 mg/100 mL de álcool anidro.

A acidez volátil para as leveduras C e M também foram superiores as demais, ficando suas concentrações acima de 1000 mg/100 mL de álcool anidro.

O metanol presente pode ser derivado da cana de açúcar, que contém matérias pécticas em pequenas quantidades, que quando hidrolisadas dão origem a este álcool.

Bardi (1997), estudou a formação dos mesmos compostos voláteis na fermentação de suco de uva para a produção de vinho, utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em pellets de glúten encontrando valores para acetaldeído entre 7 e 57; acetato de etila entre 15 e 103; n-propanol entre 26 e 57; iso-butanol entre 19 e 50 e álcool isoamílico entre 56 e 162 mg/100 mL de álcool anidro.

Na escolha da levedura a ser imobilizada e utilizada na fermentação contínua optamos pela levedura B, que produziu vinhos com baixos teores de acetaldeído, n-propanol e acides volátil e o mais alto teor de etanol em relação às demais. A levedura F, apesar de produzir vinho com baixo teor de acetaldeído e acides volátil, produziu uma grande quantidade de n-propanol, que é um composto que influencia negativamente a qualidade sensorial da aguardente. Cabe lembrar também que esta levedura na forma livre apresentou um valor de  $Y_{p/s}$  de 0,454 g/g; um rendimento de 88,5 % e conversão de 99,5 %.

#### 5.4. ESTUDO DA TEMPERATURA PARA FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

A fermentação artesanal de aguardente é conduzida por uma microbiota mista de leveduras que estão em constante sucessão devido às condições de processo. As leveduras isoladas utilizadas neste trabalho foram obtidas no mês de dezembro, tradicionalmente um mês de altas temperaturas. Como as dornas da destilaria não possuem refrigeração provavelmente estas leveduras estão adaptadas a temperaturas mais altas de fermentação, fazendo-se portanto necessário um estudo para verificar qual a melhor condição de processo a ser utilizada durante a fermentação contínua.

Os ensaios para a determinação da temperatura foram realizados para a levedura B e duas de referencia: C e Maury. As temperaturas estudadas foram 30° C, 32 °C, 34 °C e 36 °C.

Nas tabelas 21,22 e 23 são apresentados os valores das condições iniciais e finais de concentração de açúcares (So, S), etanol (Po,P) e células livres totais (Xot,Xt) para as 3 leveduras estudadas nas diversas temperaturas:

Tabela 21 – Valores das condições iniciais e finais para a levedura B

Levedura B						
Temperatura (°C)	Condição Inicial			Condição Final		
	So	Po	Xot	S	P	Xt
30	152,59	0,00	0,00	14,93	54,50	0,11
32	152,59	0,00	0,00	7,70	59,28	0,15
34	152,59	0,00	0,00	2,94	70,24	0,13
36	152,59	0,00	0,00	1,71	71,50	0,12

Concentrações em g/L

Tabela 22 – Valores das condições iniciais e finais para a levedura M

Levedura M						
Temperatura (°C)	Condição Inicial			Condição Final		
	So	Po	Xot	S	P	Xt
30	152,59	0,00	0,00	0,00	70,50	0,33
32	152,59	0,00	0,00	0,00	71,35	0,33
34	152,59	0,00	0,00	0,00	68,67	0,34
36	152,59	0,00	0,00	0,00	69,95	0,34

Concentrações em g/L

Tabela 23 – Valores das condições iniciais e finais para a levedura C

Levedura C						
Temperatura (°C)	Condição Inicial			Condição Final		
	So	Po	Xot	S	P	Xt
30	152,59	0,00	0,00	3,09	60,45	0,16
32	152,59	0,00	0,00	2,01	62,50	0,15
34	152,59	0,00	0,00	0,00	69,12	0,14
36	152,59	0,00	0,00	0,00	68,67	0,18

Concentrações em g/L

Nas tabelas 24,25 e 26 são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos para as 3 leveduras nas várias temperaturas:

Tabela 24 – Valores dos parâmetros de fermentação para a levedura B

Levedura B				
Temperatura (°C)	Y p/s (g/g)	Pr.(g/L.h)	Rend.(%)	Conv.(%)
30	0,396	2,271	69,9	90,2
32	0,409	2,470	76,0	95,0
34	0,469	2,927	90,1	98,1
36	0,474	2,979	91,7	98,9

Tabela 25 – Valores dos parâmetros de fermentação para a levedura M

Levedura M				
Temperatura (°C)	Y p/s (g/g)	Pr.(g/L.h)	Rend.(%)	Conv.(%)
30	0,462	2,938	90,4	100,0
32	0,468	2,973	91,5	100,0
34	0,450	2,861	88,1	100,0
36	0,458	2,915	89,7	100,0

Tabela 26 – Valores dos parâmetros de fermentação para a levedura C

Levedura C				
Temperatura (°C)	Y p/s (g/g)	Pr.(g/L.h)	Rend.(%)	Conv.(%)
30	0,404	2,519	77,5	98,0
32	0,415	2,604	80,2	98,7
34	0,453	2,880	88,6	100,0
36	0,450	2,861	88,1	100,0

Analisando as tabelas 24 e 26, que indicam os valores dos parâmetros de fermentação para as leveduras B e C notamos que estes valores aumentam com o aumento da temperatura. Isto se deve ao fato desta levedura ter sido isolada no final da safra, época de temperatura ambiente mais altas e estarem adaptadas a temperaturas de fermentação mais altas.

Em termos de rendimento a levedura B apresentou seu ótimo a 36°C (0,474 g/g). O valor para 34°C foi apenas 1,06 % menor (0,469 g/g); o que nos levou a escolher o valor de 34°C para a realização dos testes de fermentação contínua. O menor valor da temperatura leva a uma economia no dimensionamento dos sistemas de controle de temperatura e a uma menor perda de componentes voláteis por evaporação.

## 5.5. FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

Para a realização da fermentação contínua objetivou-se a utilização de um reator simples, de fácil operação e baixo custo, condizente com a realidade dos produtores de aguardente de cana artesanal. Foram utilizadas 6 configurações de reatores:

1. Reator tubular de leito empacotado
2. Reator tubular de leito fluidizado
3. Reator tubular de leito fluidizado com recirculação

4. Reator de mistura contínuo de cesto
5. Reator de mistura contínuo de um estágio com reciclo
6. Reator de mistura contínuo de dois estágios com reciclo

A levedura selecionada para as fermentações contínuas foi a levedura B, imobilizada em alginato de cálcio 2 % e a temperatura de processo 34°C. Com a finalidade de aumentar a produtividade do etanol procurou-se imobilizar a maior quantidade possível de células no gel, respeitando as limitações físicas do processo de imobilização. Uma suspensão de 350 g/L de células foi adicionada a uma solução de 60 g/L de alginato de cálcio e então imobilizadas com o auxílio de uma bomba peristáltica dentro de uma solução de cloreto de cálcio 2 %. A quantidade de células utilizadas foi a maior que permitiu a formação de partículas esféricas, mesmo utilizando temperaturas acima da ambiente no processo de imobilização.

#### 5.5.1. Reator Tubular de Leito Empacotado

O reator consiste de um tubo de vidro com diâmetro interno 2,5 cm e comprimento 25 cm, perfazendo um volume aproximado total de 100 cm<sup>3</sup>. Este reator é encamisado para a manutenção da temperatura de fermentação através da recirculação de água. O fundo do reator foi preenchido com pérolas de vidro para uma melhor distribuição do fluxo e assim evitar zonas mortas. Acima das pérolas de vidro e no seu topo foram colocadas telas de aço inoxidável para evitar que as esferas escapassem do reator (Figura 6).

As células imobilizadas foram adicionadas assepticamente até o preenchimento total do volume do reator. O sistema foi mantido a 34°C e preenchido com meio de fermentação. Após o final da fermentação do meio, verificada pela ausência de desprendimento de CO<sub>2</sub>, iniciou-se a adição contínua de meio em fluxo ascendente com o auxílio de uma bomba peristáltica na vazão de 0,5 mL/min (tempo de retenção aproximado de 6 horas). Com o início do desprendimento de gases houve acúmulo do

mesmo intra e entre as esferas, formando assim canais preferenciais ("chaneling"), o que contribui para a diminuição da eficiência do sistema.

Roca (1996) relata que reatores de leito empacotado utilizando microrganismos imobilizados por oclusão em géis são de fácil dimensionamento e operação, mas possuem como desvantagem as limitações de transferência de massa causadas pelo acúmulo de gás intra e inter partículas, a compactação das esferas e a desintegração das biopartículas. No seu estudo acoplou ao reator um dispositivo que possuía uma membrana elástica para provocar uma onda de distúrbio no sistema para eliminar estes problemas.

### 5.5.2. Reator Tubular de Leito Fluidizado

O reator utilizado foi o mesmo que no item anterior, mas foi preenchido com apenas 65 % de seu volume total com células imobilizadas (80 mL) (Figura 7). As condições de operação (temperatura, tempo de residência) foram mantidas inalteradas. Com o início da fermentação e desprendimento de CO<sub>2</sub> as esferas passaram a ocupar as partes superiores do reator, ocorrendo novamente à formação de canais preferenciais.

Nigam (2000), utilizou um reator de leito fluidizado para produção de etanol a partir de resíduos de um indústria de processamento de abacaxi. Utilizou um reator tubular de leito fluidizado com volume de 385 mL. Nitrogênio gasoso a taxa de 1L/h foi insuflado pelo fundo do reator para a remoção do CO<sub>2</sub> acumulado e com isto aumentar a produtividade de etanol.

### 5.5.3. Reator Tubular de Leito Fluidizado com Recirculação

Na tentativa de se eliminar os canais preferenciais formados acoplou-se ao reator um tanque pulmão e uma bomba centrífuga, para realizar o reciclo do meio dentro do reator e assim arrastar o CO<sub>2</sub> formado (Figura 8). As condições de operação foram:

Volume total de meio no sistema: 350 mL

Volume total da coluna: 100 mL

Volume de esferas: 65 mL

Vazão de alimentação: 0,97 mL/min. (Tempo de residência: 6 horas)

Temperatura: 34°C

Vazão de recirculação: 1350 mL/min

A alimentação do meio e sua retirada do sistema foram realizadas simultaneamente com o auxílio de uma bomba peristáltica. A alimentação foi feita na entrada do reator tubular, juntamente com o fluxo de recirculação e a retirada feita no tanque pulmão. O CO<sub>2</sub> produzido foi eliminado no tanque pulmão, já que este era aberto para a atmosfera.

No primeiro teste com o sistema, os fluxos de alimentação e recirculação foram colocados no sentido ascendente. Com ao início do desprendimento de gases as esferas flutuaram e se depositaram no topo do reator, sendo amparadas pela tela metálica. Gradativamente o fluxo de recirculação provocou a compactação das esferas contra a tela e após 18 horas de operação a vazão ficou completamente nula. O sistema foi então interrompido e a alimentação e recirculação colocadas no sentido descendente. As esferas se depositaram no fundo do reator devido ao efeito do fluxo de recirculação, ficando amparadas pela tela metálica. O CO<sub>2</sub> formado não conseguiu escapar do sistema, ficando alojado no topo do reator, elevando a pressão dentro do mesmo. Após 12 horas de funcionamento o fluxo de recirculação caiu próximo de zero e o sistema foi interrompido.

#### 5.5.4. Reator de Mistura Contínuo de Cesto

Como não conseguimos resolver os problemas de flutuação das esferas e formação de canais preferenciais, passamos a utilizar um reator de mistura contínuo de cesto (Figura 9).

O reator é construído em vidro, possui volume total de 1 litro e volume útil de 700 mL. Dentro do mesmo foi colocado um cilindro aletado, construído com tela de aço inoxidável, para manter as esferas confinadas durante a fermentação. As dimensões do cilindro são: diâmetro: 6 cm; altura: 9 cm, perfazendo um volume total de  $250 \text{ cm}^3$ . As aletas são em número de 4, possuindo 0,9 cm de largura por 11 cm de comprimento. A parte superior do reator é fechada hermeticamente por uma tampa de borracha, com tubulações para entrada e saída de fluidos, gases e controle de temperatura. A agitação do meio de fermentação foi realizada por um agitador magnético marca Tecnal ajustado para a velocidade máxima. A figura 28 mostra um detalhe deste reator:

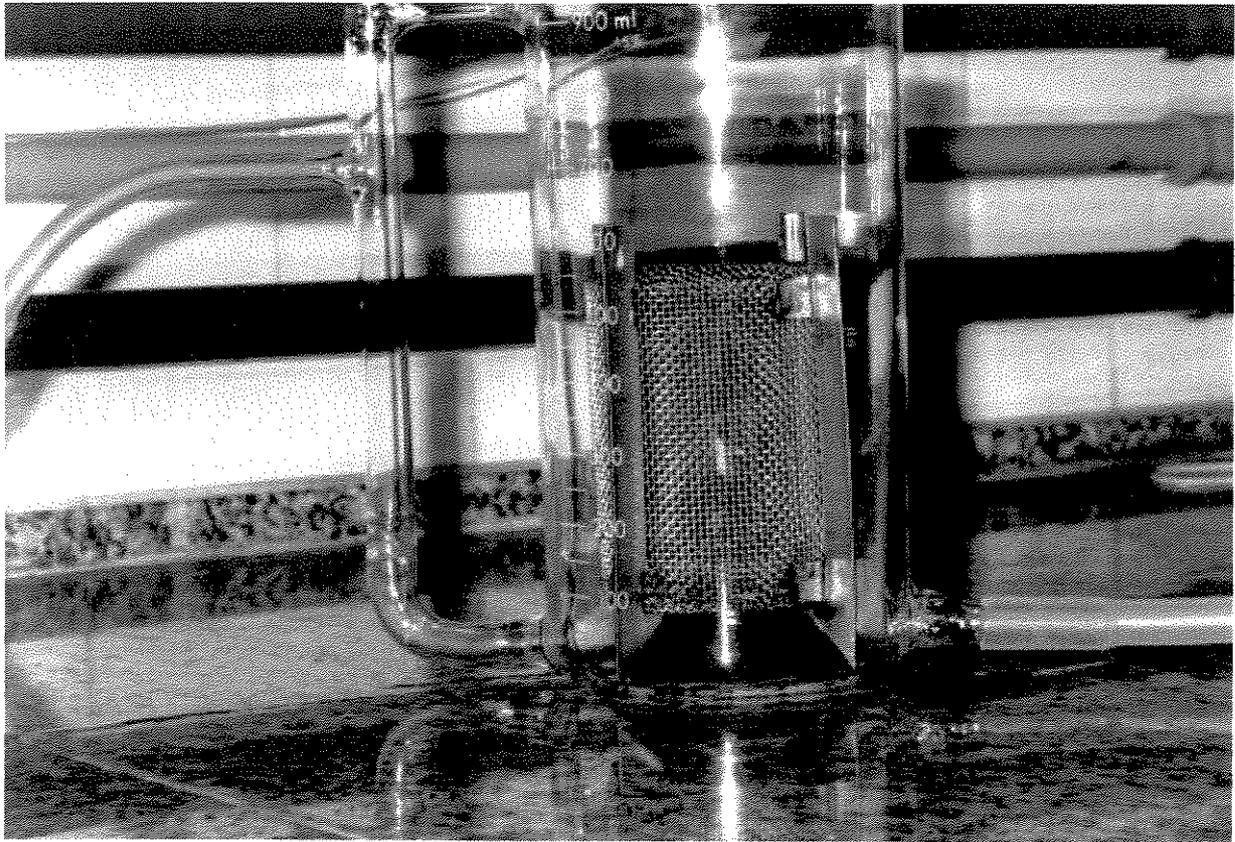


Figura 28 – Detalhe do Reator de Cesto

O reator foi preenchido com 700 ml de meio esterilizado a 121 °C por 15 minutos. 150 mL de células imobilizadas (60 g/L de células totais) foram transferidas assepticamente para dentro do cesto e o reator foi acoplado ao sistema de controle de temperatura para mantê-lo a 34°C. Após 24 horas de fermentação, com o final do desprendimento de CO<sub>2</sub>, iniciou-se a alimentação contínua com o auxílio de uma bomba peristáltica.

Os tempos de residência utilizados e as respectivas concentrações de açúcares residuais e conversão são mostrados na tabela 27.

Tabela 27 – Açúcares residuais e conversão para o reator de cesto

Tempo de Residência (h)	Sf (g/L)	Conversão (%)
10	101,17	44,48
15	59,65	62,29
22	n.d.	n.d.

S<sub>r</sub> = açúcares residuais; n.d = não determinado.

As amostras foram retiradas após o sistema atingir o regime, isto é, após transcorrer 3 tempos de residência. Os valores para o tempo de residência 22 horas não foram determinados, pois para uma vazão muito baixa da bomba peristáltica ocorria o entupimento da mangueira, devido à composição do meio de alimentação.

Após a parada do reator e abertura do cesto foi observado que as esferas aumentaram de tamanho e se compactaram devido ao acúmulo de CO<sub>2</sub>, e perderam a mobilidade dentro do cesto. Isto provocou uma deficiência no contato entre o meio e as esferas, o que levou a baixa conversão (Figura 29)

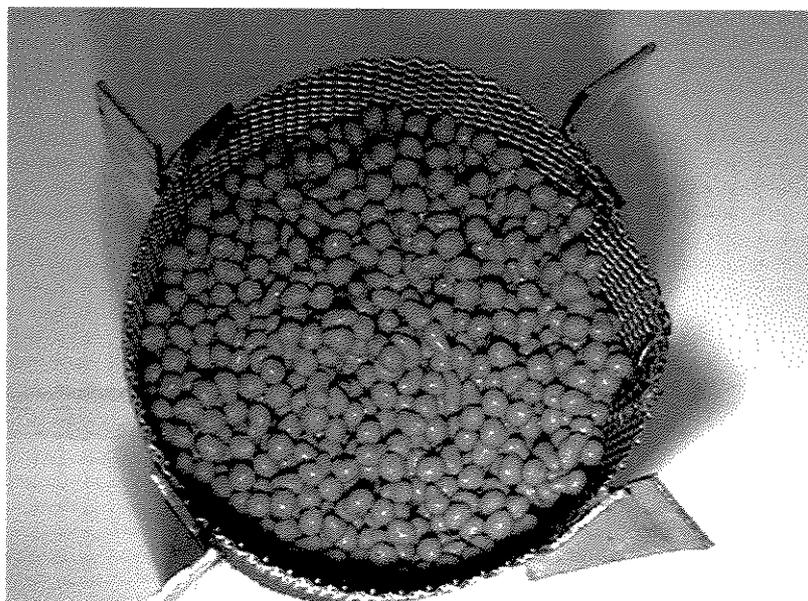


Figura 29 – Esferas dentro do cesto após o final da fermentação

### 5.5.5 – Reator de Mistura Contínuo de um Estágio com Reciclo

Este reator foi desenvolvido procurando-se maximizar o contato do meio com as esferas. Para realizar a agitação foi utilizados um agitador magnético e uma bomba centrífuga que fazia o reciclo do meio dentro do reator. Uma tela de aço inox foi colocada no fundo do reator para isolar as esferas do agitador e da sucção da bomba. O topo do reator é fechado hermeticamente por uma tampa de borracha que possui tubos para entrada da alimentação, saída de gases, água de recirculação para controle de temperatura e orifício para colocação de termômetro. O fluxo de recalque foi dividido em dois e direcionados no sentido da rotação do agitador visando uma maior homogeneização. A figura 30 mostra o reator usado.

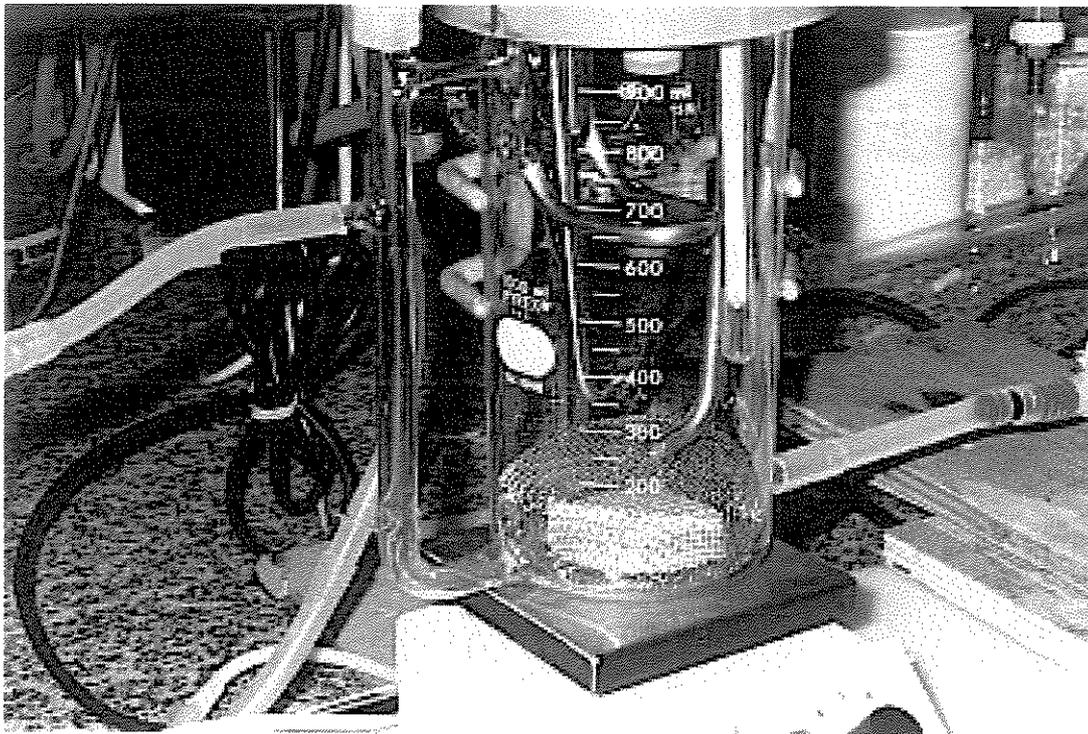


Figura 30 – Reator de mistura contínuo de um estágio com reciclo.

O volume total do reator foi de 730 mL. O meio foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos. 200 mL de células imobilizadas (80 g/L de células totais) foram transferidas

asépticamente para dentro do reator e este foi acoplado ao sistema de controle de temperatura para mantê-lo a 34°C. Após 24 horas de fermentação, com o final do desprendimento de CO<sub>2</sub>, iniciou-se a alimentação contínua com o auxílio de uma bomba peristáltica. A saída de gases pelo topo do reator foi fechada para que a pressão deste gás formada no interior do mesmo direcionasse o meio fermentado pelo orifício de saída.

Os tempos de residência utilizados e as respectivas concentrações de açúcares residuais e conversão são descritos na Tabela 28.

Tabela 28 – Açúcares residuais e conversão para o reator com recirculação

Tempo de Residência (h)	Sf (g/L)	Conversão (%)
17	18,19	89,89
20	21,15	88,25

Não foi utilizado um tempo de residência maior devido ao problema de entupimento da mangueira da bomba peristáltica pelo meio de alimentação. A maior conversão com menor tempo de residência se deve provavelmente a uma maior disponibilidade de nutrientes para a levedura. A figura 31 mostra o reator em funcionamento:

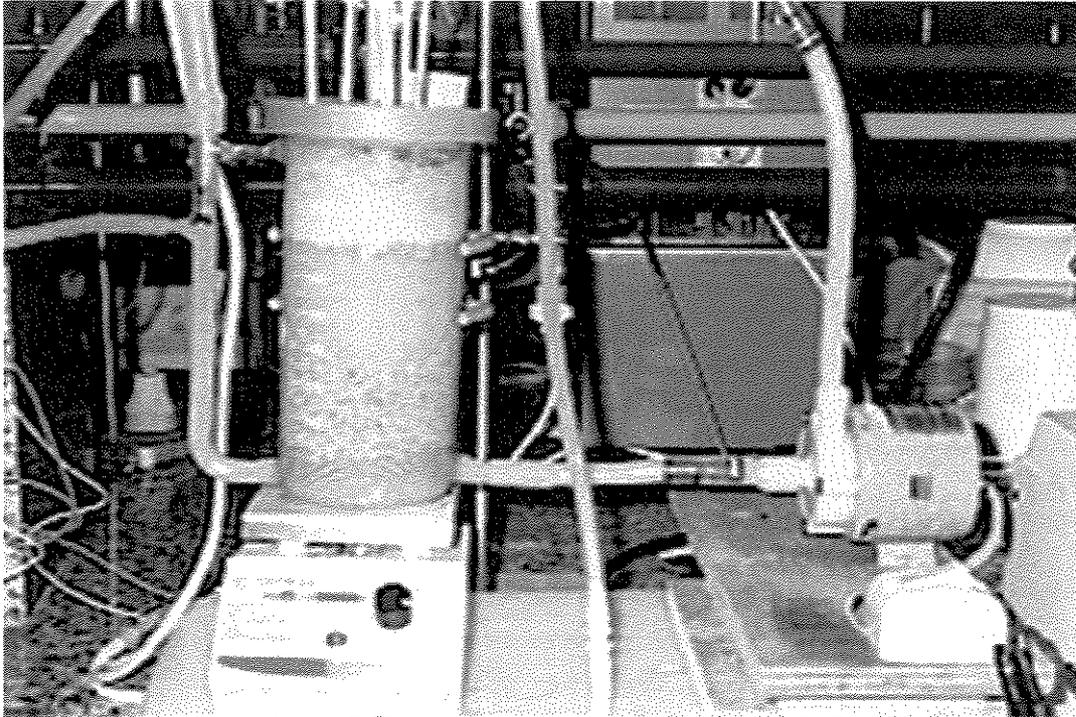


Figura 31 – Reator de mistura contínuo de um estágio com reciclo em funcionamento

#### 5.5.6. Reator de Mistura Contínuo de Dois Estágios com Reciclo

Apesar das conversões obtidas com o reator de um estágio com recirculação serem bem superiores quando comparadas às obtidas com o reator de cesto, com a utilização de somente um estágio do reator com recirculação ainda não foi possível converter todo o açúcar presente no meio. Para resolver este problema utilizamos 2 reatores de mistura contínuos com reciclo em série, como mostra a figura 32:

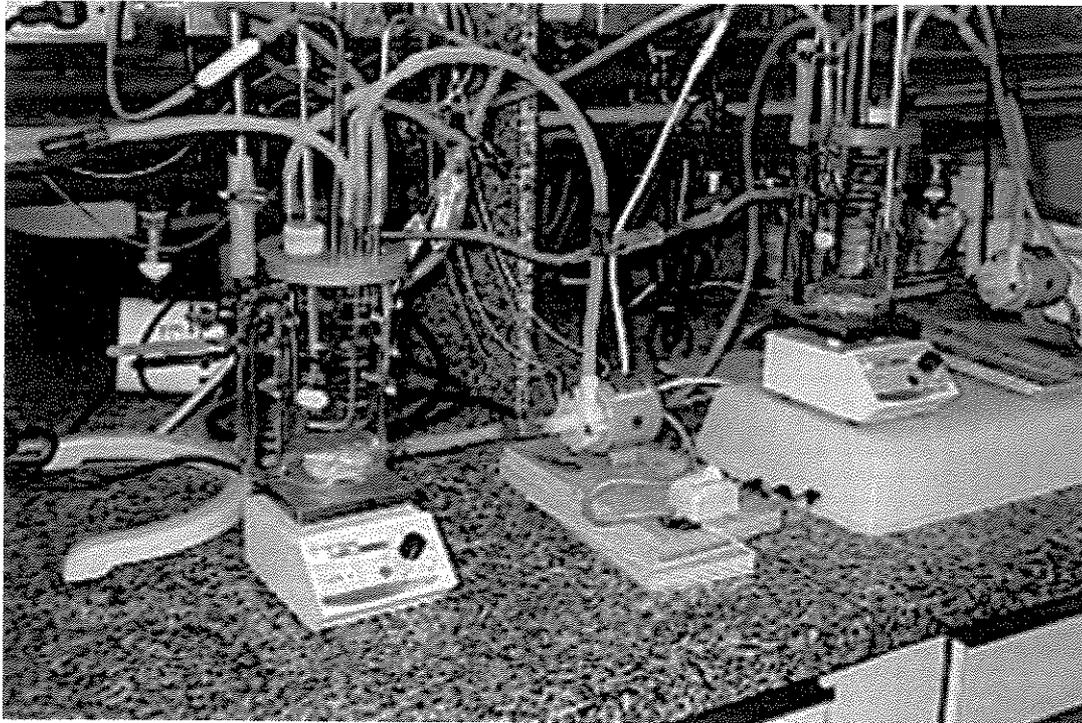


Figura 32 – Reator de mistura contínuo em série com reciclo

O volume total dos dois reatores foi de 1460 mL. O meio foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos. 280 mL de células imobilizadas (112 g/L de células/reator) foram transferidas assepticamente para dentro de cada reator e este foi acoplado ao sistema de controle de temperatura para mantê-lo a 34°C . Após 24 horas de fermentação, com o final do desprendimento de CO<sub>2</sub> , iniciou-se a alimentação contínua com o auxílio de uma bomba peristáltica. As saídas de gases pelo topo de ambos os reatores foram fechadas para que a pressão deste gás, formado nos seus interiores, auxiliasse a saída do meio fermentado pelos orifícios de saída.

Como já foi dito, as esferas flutuam no meio de fermentação devido à formação e acúmulo do CO<sub>2</sub> formado em seu interior. No decorrer do experimento, devido à agitação do meio provocada pelo agitador magnético e pela vazão de recirculação, houve intenso contato das esferas com as paredes do reator, tela metálica, tubulações de recalque, controle de temperatura e entre as próprias esferas, levando ao rompimento das mesmas, facilitando assim a saída dos gases formados. Devido a isto,

parte delas passaram a não mais flutuar, ficando aderidas à tela metálica devido à sucção da bomba centrífuga. A restrição do fluxo pela aderência das esferas à tela metálica provocou uma diferença de nível entre o interior do reator e a saída de fermentado. Isto provocou a interrupção da saída do meio fermentado dos dois reatores e o enchimento do 1º reator devido à adição de meio pela bomba peristáltica.

Para eliminarmos este problema utilizamos um timer para manter a bomba de recirculação ligada por 2 minutos e desligada por mais 2 minutos. Na posição ligada o meio era agitado e na posição desligada os níveis se igualavam e o meio era transferido do primeiro para o segundo reator e do segundo reator para o Becker de coleta, com ao auxílio da pressão do CO<sub>2</sub> formado no interior dos reatores.

A figura 33 ilustra a diferença de nível em um dos reatores:



Figura 33 – Detalhe da diferença de nível entre a saída de fermentado e o interior do reator

A figura 34 ilustra os sistema com 2 reatores de mistura contínuos com reciclo em série em funcionamento:

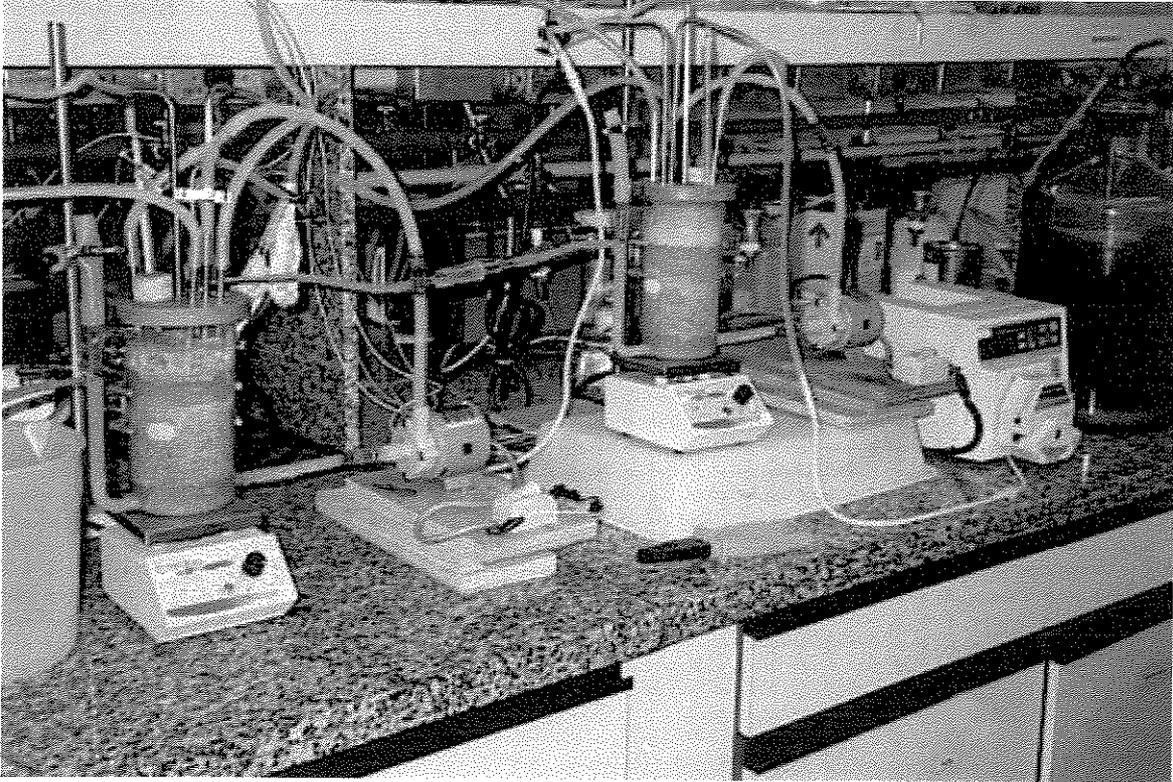


Figura 34– Reatores de mistura contínuos com reciclo em série em funcionamento

As amostras de caldo fermentado foram recolhidas na saída do segundo reator em um Becker dentro de um banho de gelo, para evitar a evaporação dos componentes voláteis. Após a retirada da amostra, um novo tempo de residência foi ajustado e novas amostras foram retiradas após o sistema atingir o regime.

As tabelas 29 e 30 a seguir mostram os valores das condições iniciais e finais e parâmetros cinéticos para a fermentação contínua:

Tabela 29 – Condições iniciais e finais para a fermentação contínua

Tempo de Residência (h)	Condição Inicial		Condição Final	
	So (g/L)	Po (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
8	178,85	0,00	30,20	59,92
12	178,85	0,00	12,07	72,32
16	178,85	0,00	6,23	78,16
18	178,85	0,00	2,28	79,60
20	178,85	0,00	1,70	71,12
24	178,85	0,00	0,91	78,40

Tabela 30 – Parâmetros de conversão e produção para os vários tempos de residência

Tempo Resid. (h)	Y p/s (g/g)	Pr.(g/L.h)	Rend.(%)	Conv.(%)
8	0,403	7,49	65,56	83,11
12	0,434	6,03	79,13	93,25
16	0,453	4,89	85,52	96,51
18	0,451	4,42	87,10	98,72
20	0,401	3,56	77,82	99,05
24	0,441	3,27	85,78	99,49

Pelas tabelas 29 e 30 verificamos que quanto maior o tempo de residência, menores são as concentrações de açúcares residuais e que a maior concentração de etanol foi produzida foi no tempo de residência de 18 horas. O maior rendimento de etanol em substrato foi com o tempo de 16 horas, pouco superior ao de 18 horas. Tivemos uma maior produtividade para o tempo de 8 horas, porém com um baixo rendimento e conversão. O maior rendimento se situou no tempo de 18 horas e a maior conversão para 24 horas.

Tomando-se como base o tempo de residência de 18 horas e comparando-se os valores da produtividade entre o processo contínuo com células imobilizadas e a

fermentação com células livres para a mesma levedura (Tabela 19), verificamos que a produtividade do processo contínuo é mais que o dobro do batelada. (4,42 g/L.h para o contínuo contra 2,167 g/L.h para o batelada) O rendimento de substrato em etanol praticamente é o mesmo, o rendimento e conversão são pouco inferiores (87,1 % e 98,72 % para o processo contínuo contra 88,5 % e 99,5 % para o batelada respectivamente), porém na fermentação batelada o meio continha mais nutrientes que no processo contínuo. A alta produtividade de etanol está ligada a alta quantidade de células no interior do reator e ao tamanho das esferas. Esferas pequenas possuem áreas interfaciais por unidade de volume do reator maiores, minimizando assim os problemas de transferência de massa de açúcar, etanol e CO<sub>2</sub>. A rápida formação de etanol também faz com que haja um efeito inibitório em possíveis microrganismos contaminantes presentes no meio.

Roca et al. (1996) utilizando um reator tubular de leito expandido, com um sistema de pulsos e meio sintético obteve valores de  $Y_p/s$  entre 0,412 e 0,466 g/g para diversos tempos de residência.

Bardi (1997) obteve uma produtividade de etanol de 1,69 g/L.h em um reator de leito expandido com células imobilizadas em pellets de glúten trabalhando na temperatura de 15 °C. O mesmo autor, realizando fermentações do suco de uva para produção de vinho, obteve uma produtividade máxima de 3,33 g/L.h de etanol, porém realizando fermentações pelo processo batelada com células imobilizadas.

Kesava et al. (1996) utilizou o microorganismo *Zimomonas mobilis* imobilizado em pellets de glúten na produção contínua de etanol em um reator de leito expandido. O meio de fermentação utilizado foi a glicose na concentração 150 g/L enriquecido com nutrientes. O valor encontrado para  $Y_p/s$  foi de 0,43 g/g e o rendimento de 84,5 %.

A tabela 31 mostra os valores dos componentes voláteis presentes no meio fermentado em função do tempo de residência.

Tabela 31 – Componentes voláteis no vinho para os diversos tempos de residência (Etanol, %v/v; demais compostos mg/100 ml de álcool anidro)

Tem. Res. (h)	Etn.	Acet.	Ac. Et.	Met.	n-prop.	i-but.	i-amil	Ac.Vol.
8	7,49	210,32	49,43	0,01	71,46	33,11	149,16	163,42
12	9,04	182,95	35,04	0,02	58,98	24,43	112,02	135,40
16	9,77	94,16	33,24	0,01	55,19	27,11	104,54	172,26
18	9,95	80,73	34,97	0,01	70,46	34,98	145,45	124,90
20	8,89	201,72	35,56	0,02	40,65	29,16	119,95	123,02
24	9,80	173,23	38,11	0,02	45,54	44,88	185,28	189,31

Etn = Etanol; Acet. = acetaldeído; Etn = Etanol; Acet. = acetaldeído; Ac. Et. = acetato de Etila; Met = Metanol; n-prop. = n-propanol; i-but. = álcool isobutílico; i-amil. = álcool isoamílico; Ac. Vol. = acides volátil

Para uma melhor análise da variação dos componentes volateis, as figuras 35 a 38 mostram a variação das concentrações de acetaldeído, acetato de etlia, álcoois superiores e acides volátil em função dos diversos tempos de residência:

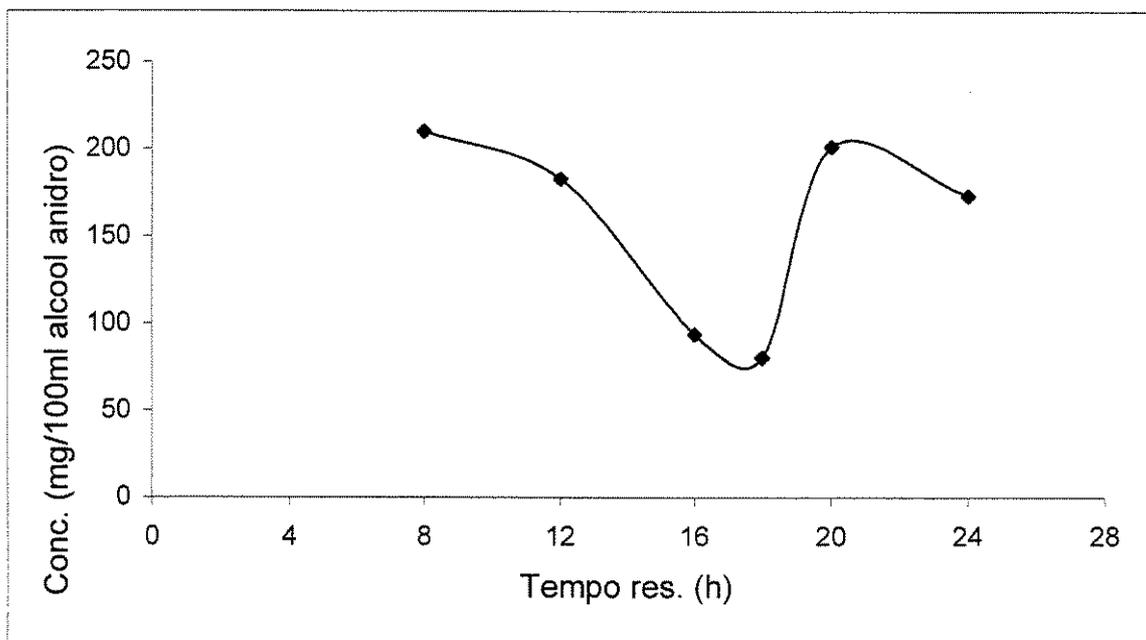


Figura 35 – Variação da concentração de acetaldeído no fermentado em função do tempo de residência

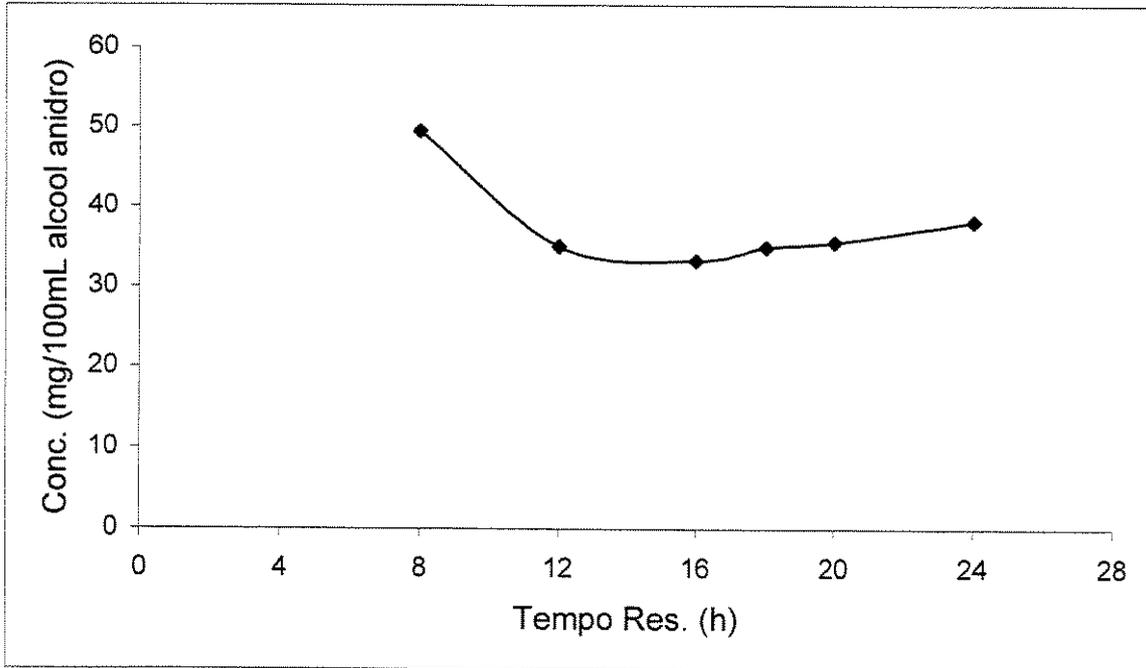


Figura 36 – Variação da concentração de acetato de etila no fermentado em função do tempo de residência

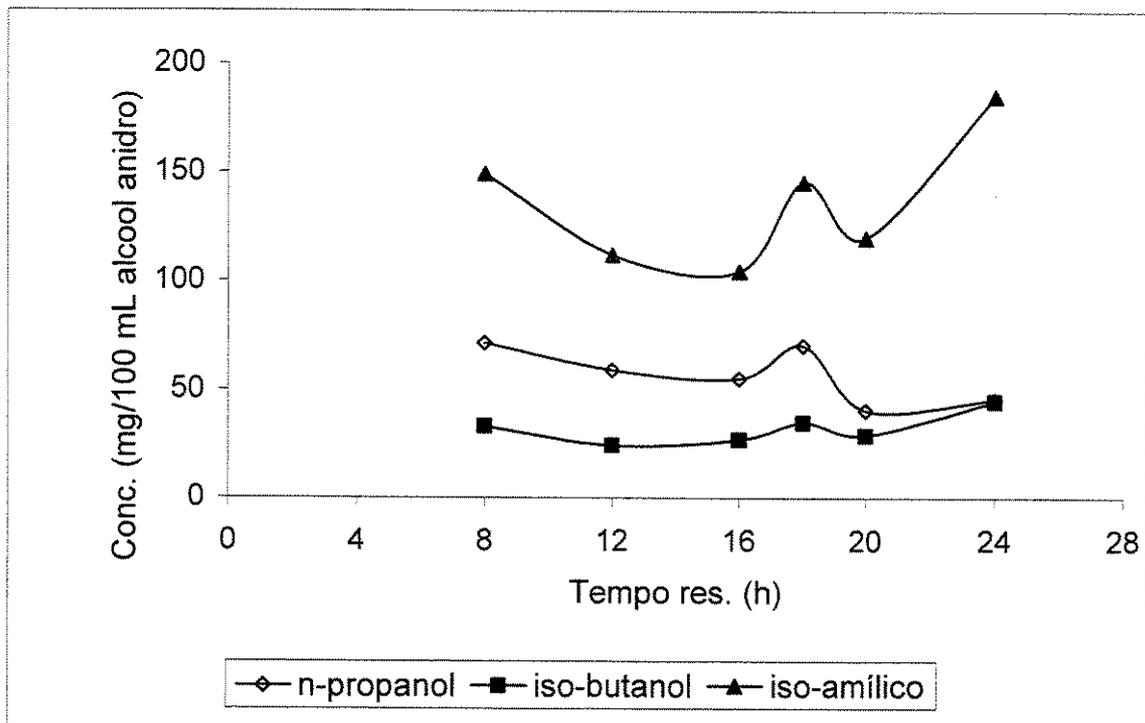


Figura 37 – Variação da concentração dos álcoois superiores no fermentado em função do tempo de residência

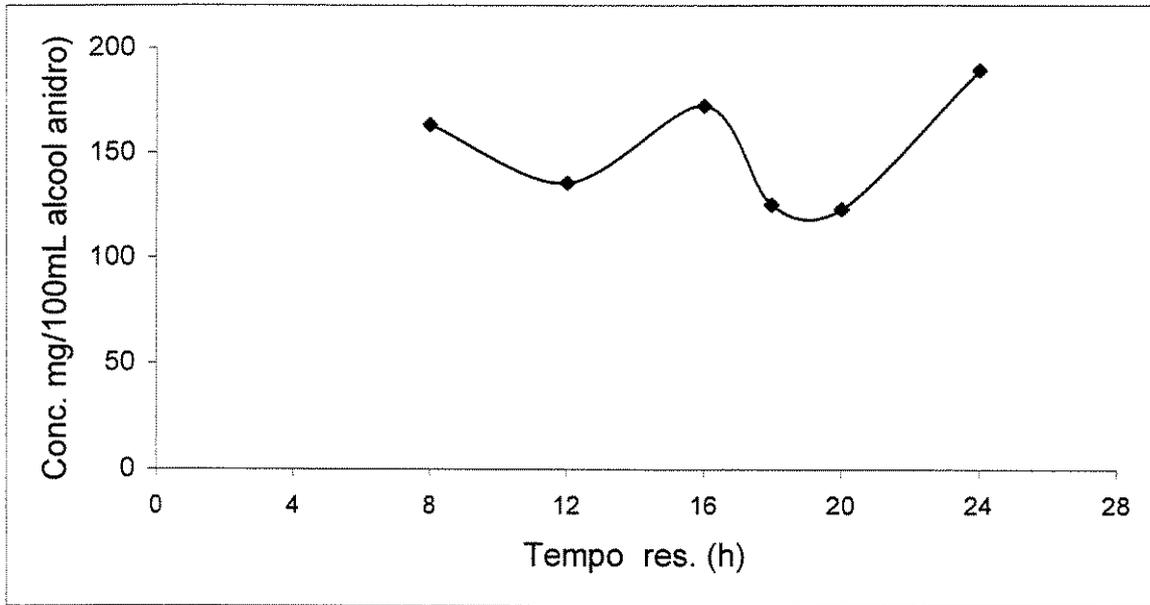


Figura 38 – Variação da acides volátil no fermentado em função do tempo de residência

O acetaldeído apresentou valores menores para os tempos de residência de 16 e 18 horas. Para tempos maiores e menores os valores se situaram entre 170 e 210 mg/100 ml álcool anidro. O acetato de etila não apresentou variações significativas, ficando sua concentração entre os valores 33,24 e 38,11 mg/100 mL álcool anidro, exceto para o tempo de residência de 8 horas que apresentou uma concentração de 49,43 mg/100 mL álcool anidro. Quanto aos alcoois superiores, pelo comportamento das curvas, verificamos que são produzidos de maneira idêntica pela levedura, pelo mesmo mecanismo de formação, exceto pelas quantidades relativas de cada um deles. Os teores de n-propanol variaram de 40,65 a 71,46 mg/100 mL álcool anidro; os teores de isobutanol de 24,43 a 44,88 mg/100 mL álcool anidro e os teores de álcool isoamílico de 104,54 a 185,28 mg/100 mL álcool anidro em função dos vários tempos de residência. A acides volátil apresentou valores entre 123,02 e 189,31 mg/100 mL álcool anidro. As concentrações de metanol foram muito baixas para os diversos tempos de residência, sendo a maior concentração de 0,02 mg/100 mL álcool anidro.

Os valores acima mostram o quanto as condições de fermentação influenciam na formação dos componentes voláteis, já que em função dos tempos de residência, há uma grande variação dos teores de açúcares e nutrientes disponíveis para o

metabolismo das leveduras. A variação do tempo de residência portanto nos permite manipular as concentrações dos componentes voláteis.

Bekatorou et al. (2001), utilizando meio sintético para a comparação dos processos fermentativos a várias temperaturas envolvendo células livres e imobilizadas em pellets de glútem, encontrou valores de acetaldeído variando entre 32 e 240 mg/100 mL de álcool anidro; acetato de etila entre 24 e 64 mg/100 mL de álcool anidro, n-propanol entre 6 e 44 mg/100 mL de álcool anidro; iso-butanol entre 22 e 104 mg/100 mL de álcool anidro e alcool isoamilico entre 50 e 314 mg/100 mL de álcool anidro.

## 5.6. PRODUÇÃO DA AGUARDENTE

O caldo fermentado no processo contínuo foi recolhido e posteriormente destilado para a produção da aguardente. Para efeito comparativo foram utilizados caldos fermentados provenientes de fermentações utilizando as leveduras B e MiX na forma livre; caldo proveniente da fermentação contínua com tempo de residência 18 horas e caldo fermentado pelo processo batelada com células imobilizadas da levedura B.

A destilação do caldo fermentado foi realizada em alambique de cobre de capacidade útil 8 litros com condensador refrigerado a água e aquecido a gás. A vazão de destilação foi ajustada para 30 mL/min. pela quantidade de calor fornecida ao sistema. Para efeito comparativo, não foi retirada a fração “cabeça” do destilado. A fração “cauda” foi eliminada quando o destilado recolhido apresentou uma graduação alcoólica de  $48 \pm 1\%$  (%v/v) . Posteriormente a aguardente obtida foi diluída a  $44 \pm 1\%$  com água destilada para análise dos componentes voláteis.

A tabela 31 mostra os resultados das análises dos compostos voláteis das aguardentes de cana.

Tabela 31 – Componentes voláteis na aguardente de cana (Etanol, %v/v; demais compostos mg/100 mL de álcool anidro).

Aguardente	Etn.	Acet.	Ac. Et.	Met.	n-prop.	i-but.	i-amil	Ac.Vol.
B células livres	43,55	158,47	96,27	0,00	119,82	66,48	171,54	196,04
MIX células livres	44,40	112,07	84,98	0,00	102,52	48,96	315,92	194,46
B Imobilizada Batelada	44,90	74,84	69,09	0,00	50,11	72,96	184,07	32,59
B Imobiliz.. Cont. TR 18h	44,89	97,35	59,25	0,00	67,99	57,57	153,93	16,30

Etn = Etanol; Acet. = acetaldeído; Ac. Et. = acetato de Etila; Met = Metanol; n-prop. = n-propanol; i-but. = álcool isobutílico; i-amil. = álcool isoamílico; Ac. Vol. = acides volátil

O grau alcoólico (% em volume) variou entre 43,55 e 44,89 %; o acetaldeído entre 74,84 e 158,47 mg/100 mL álcool anidro; o acetato de etila entre 59,25 e 96,27 mg/100 mL álcool anidro; o n-propanol entre 50,11 e 119,82 mg/100 mL álcool anidro; o iso butanol entre 48,96 e 72,96 mg/100 mL álcool anidro; o álcool isoamílico entre 153,93 e 315,92 mg/100 mL álcool anidro; e a acides volátil entre 16,13 e 196,04 mg/100 mL álcool anidro. Em nenhuma das amostras foi detectado metanol.

Vargas (1995), citado por Oliveira (2001), analisou 683 laudos de análise de aguardente comercializada no estado de Minas Gerais, emitidos pelo Laboratório Vegetal do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária de Minas Gerais no período de 1989 a 1994 e verificou que os valores dos componentes voláteis apresentavam altos coeficientes de variação, com excessão do grau alcoólico. Os álcoois superiores apresentaram valores entre 6 e 490 mg/100 mL de álcool anidro; a acides volátil variou de 0 a 587 mg/100 mL de álcool anidro; o acetato de etila variou de 2 a 484 mg/100 mL de álcool anidro; o acetaldeído variou de 1 a 282 mg/100 mL de álcool anidro.

Analisando as Tabela 31 verificamos que as aguardentes produzidas com vinhos provenientes das fermentações utilizando as leveduras B e Mix na forma livre apresentaram maiores concentrações de acetaldeído, n-propanol e acides volátil

quando comparadas com as aguardentes produzidas com vinhos provenientes de fermentação com células da levedura B imobilizadas.

Na composição final da aguardente Yokaya (1995), relata que a volatilidade dos compostos secundários pode ser comparada com a volatilidade do etanol pela relação:

$$K_{REL} = \frac{\text{Fração molar do composto secundário no vapor}}{\text{Fração molar do álcool no vapor}}$$

O comportamento destes compostos secundários na destilação depende de suas propriedades termodinâmicas. Os diversos compostos secundários no vinho podem ser agrupados em 3 categorias:

1. Componentes mais voláteis que o álcool ( $K_{REL} > 1$ ): representado por ésteres e muitos aldeídos; mais frequentes na fração "cabeça".
2. Compostos menos voláteis que o álcool ( $K_{REL} < 1$ ): representados por compostos fenólicos e muitos ácidos orgânicos; mais frequentes na fração "cauda".
3. Compostos que são mais voláteis que o álcool nas soluções alcoólicas de baixa concentração e menos voláteis nas soluções alcoólicas concentradas. alcoois amílico, butílico, propílico e outros possuem esse comportamento e são conhecidos como óleo fúsel.

Teores elevados de acetaldeído, n-propanol e acidez volátil contribuem para uma má qualidade da aguardente (Almeida & Barreto 1971; Amerine, 1972; Boza, 1988). A composição das aguardentes produzidas com vinho proveniente de células imobilizadas forneceu valores para estes 3 componentes inferiores comparados as fermentações realizadas com células livres.

Os elevados teores de acetaldeído presentes nas aguardentes nos leva a uma não obediência a legislação em relação a este componente. Este elevado teor pode ser explicado devida a não retirada da fração “cabeça” do destilado para a obtenção da aguardente, fração esta rica em componentes mais voláteis que o etanol, que é o caso do acetaldeído. Como esta fração não foi retirada, para obtermos uma aguardente com um teor alcoólico de 48° G (%v/v) foi necessário a inclusão da parte da fração “cauda” do destilado na aguardente, o que influenciou sua composição final

## 6. CONCLUSÕES

Através da análise dos dados experimentais obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

- O processo de imobilização fornece uma alta densidade celular.
- Utilizando-se alginato de cálcio na concentração 2% obtivemos um suporte que atendeu as necessidades do nosso reator, apesar dos problemas de acúmulo de CO<sub>2</sub> no interior das esferas.
- A levedura é um importante fator na formação dos componentes voláteis. O caldo fermentado da levedura B imobilizada em alginato de cálcio 2% apresentou menores teores de n-propanol, acetaldeído e acidez volátil, fazendo com que a mesma fosse escolhida para os testes de fermentação contínua.
- A temperatura de 34 °C levou a bons rendimento, produtividade e conversão, para a fermentação batelada, sendo este resultado estendido para a fermentação contínua.
- O reator de mistura contínuo com reciclo de duplo estágio foi eficiente na conversão de substrato em etanol.
- A produtividade do sistema contínuo com células imobilizadas foi de 4,42 g/L.h ao passo que a produtividade com as mesmas células na forma livre foi de 2,17 g/L.h, portanto superior ao dobro.
- As condições de fermentação são um outro fator que influenciam na formação dos componentes voláteis no caldo fermentado, já que tivemos uma ampla variação no teores destes componentes em função do tempo de residência. Pela

manipulação dos tempos de residência podemos alterar as concentrações de componentes voláteis no vinho.

- O reator utilizado é de simples construção, operação e baixo custo. Em termos de escala industrial o mesmo pode ser construído a partir das dornas de fermentação batelada existentes nas diversas destilarias de aguardente artesanal.
- A fermentação utilizando células imobilizadas permitiu a redução dos teores de acetaldeído, n-propanol e ácidos voláteis no produto destilado.
- Os componentes voláteis devem ser monitorados através da otimização das condições de fermentação, bem como as de destilação, ou seja, separando as frações mais voláteis denominada “cabeça” e separando a fração menos volátil denominada “cauda” do corpo do destilado.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em consequencia das observações e conclusões deste trabalho torna-se oportuno sugerir alguns tópicos para trabalhos futuros.

- Estudar o emprego de outros suportes para imobilização,visando a eliminação dos problemas de flutuação.
- Estudar a influencia da composição do meio na formação dos componentes voláteis.
- Otimizar o funcionamento do reator,dando ênfase à agitação.
- Estender o processo para a produção outros tipos de bebidas alcoolicas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. ALMEIDA, M.E.; BARRETO, H.C. Álcoois superiores em aguardente de cana por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 31, p. 117 - 123, 1972.
2. AMERINE, M.A.; BERG, H.W.; CRUESS, W.V. **The technology of wine making**. 3.ed. Westport: The Avi Publishing Company Inc., cap 5: Chemistry of Fermentation and Composition of Wines: p. 177 – 244, 1972.
3. ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação das cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, V. 17, n. 5, p. 54-59, 1999.
4. BARDI, E.; KOUTINAS, A. A.; PSARIANOS, C.; KANELLAKI, M. Volatile by-products formed in low temperature wine making using immobilized yeast cells. **Process Biochemistry**, vol. 32, n. 7, p. 578-584, 1997.
5. BARDI, E.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAK, M. Room temperature and low temperature wine making using yeast immobilized on gluten pellets. **Process Biochemistry**, vol 31, n.5, p. 425-430, 1996.
6. BAYLEY, E. J. AND OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. Singapore: Mc Graw-Hill International Edition, 984p., 1986.
7. BEKATOROU, A.; KOUTINAS, A.A.; KALIAFAS, A.; KANELLAKI, M. Freeze dried *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on gluten pellets for glucose fermentation. **Process biochemistry**, 36, p. 549-557, 2001.

8. BERRY, D. R. AND WATSON, D. C. Production of organoleptic compounds, In **Yeast Biotechnology**, (eds) Berry, D. R.; Russell, I. And Stewart, G.G. Allen and Unwin, London, p. 345-368, 1987.
9. BERRY, D.R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A.G.H.; PIGGOT, J.R. **Fermented Beverage Production**. 1 ed. London: Blockie Academic & Professional. Cap 2, p. 32-34, 1995.
10. BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of enzymes and cells**, Ed. Humana Press, New Jersey, p. 1-11, 1997.
11. BIZELLI, L.C.; RIBEIRO, C.A.F., NOVAES, F.V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agrícola**, vol. 57, n. 4, Piracicaba, Oct./Dec. 2000.
12. BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2. ed., Livraria Varela, p. 51-79, 1995.
13. BOZA, Y.; HORII, J. Influencia da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana de açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.18, n. 4, Campinas Oct./Dec. 1998.
14. BROUN, G.B. Chemically aggregated enzymes, In: **Methods in Enzymology**, vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, p. 263-280, 1976.
15. BUCKE, C. Immobilized cells. **Phil. Trans. R. Soc. B** 300, 368-389, 1983.

16. CHAVES, J.B.; POVOA, M.E.B. A qualidade da aguardente de cana de açúcar. In: MUTTON, M.J.R., MUTTON, M.A. **Aguardente de cana: Produção e Qualidade**. Jaboticabal: Finep, p. 93-132, 1993.
  
17. CLETO, F.V.G. **Influencia da adição de ácido sulfúrico e fubá de milho no processo fermentativo, rendimento e composição da aguardente de cana**. Jaboticabal - SP, 1997, 109 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
  
18. COLE, V. C.; NOBLE, A. C.. Flavor chemistry and assessment. In: LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented Beverage Production**. Cap 14, p. 361-385, 1995.
  
19. DE RIJKE AND TER HEIDE, Flavor compounds in rum, cognac and whisky. In **Flavor of Distilled Beverages: Origin and Development**, (ed) PIGGOTT, J.R. Ellis Horwood, Chichester, UK, p. 192-202, 1983.
  
20. DIAS, S.; MAIA, A.; NELSON, D. Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 18 n. 3, Campinas Aug./Oct. 1998.
  
21. FERRARO, L.; FATICHENTI, F.; CIANI, M. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**. 35, p. 1125-1129, 2000.
  
22. GARDIN, H.; PAUSS, A. K-carrageen/gelatin gel beads for the co-immobilization of aerobic and anaerobic microbial communities degrading 2,4,6 trichlorophenol under air limited conditions. **Appl. Microbial Biotechnol.** 56: 512-523, 2001.

23. GEMENEINER, P. Materials for enzyme engineering, In: **Enzyme Engineering** (GEMENEINER, P. ed.) Ellis Horwood, Ney York, p. 13-119 1992.
24. GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C.; KUNKEE, R.E. Increased production of n-propanol in wine by yeasts strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide . **American Journal of Enology and Viticulture**, 44 (1): p. 17-21, 1993.
25. GUYMON, J.F. Higher alcohols in beverage brandy . Feasibility of control of levels. **Wines and Vines**, 53, 37-40, 1972.
26. GUYMON, J.F. Chemical aspects of distilling wines into brandy. In **Chemistry of Winemaking**, (ed) Webb, A.D. American Chemical Society Washington, DC, p. 232-253, 1974.
27. GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba**, v. 48, p. 55-69, 1991.
28. ISIQUE, D. W.; CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Teores de enxofre e aceitabilidade de aguardentes de cana brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. vol. 18 n. 3, Campinas Aug./Oct. 1998.
29. KAREL, S.F., LIBICKI, S.B., AND ROBERTSON, C.R., **Chemical Engineering Science**, 40, 1321-1354, 1985.
30. KESAVA, S.S.; PANDA, T.; RAKSHIT, S.K. Production of ethanol by immobilized whole cells of *Zimomonas mobilis* in an expanded bed bioreactor. **Process Biochemistry**, vol. 31, n. 5, p. 449-456, 1996.

31. KIERSAN, M.P.J.; COUGHALAN, M.P. Immobilization of proteins by noncovalent procedures: principles and applications, In: **Protein Immobilization** (Taylor, R.F. ed.), Marcel Dekker, New York, p. 13-71, 1991.
32. KORHOLA, M.; HARJU, K. & LEHTONEN, M. Fermentation. In PIGGOT, J.R.; SHARP, R.; DUNCAN, R.B. **The Science and Technology of Whiskies**. London: Longman Scientific & Technical, cap. 4, p. 89 – 117, 1989.
33. KRAUSS G., FORCH, M. Influence on different fermentation methods on the formation of lower free fatty acids. **Proceedings of the American Society of Brewing Chemistry**. 33: 37-41, 1975.
34. LIMA, U.A. **Estudo dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, 141p. , 1964.
35. LUDWIG, K.M.; NETO, P.O. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21 (1): 63-68, Jan./Abr. 2001.
36. MAIA, A.B.R. Componentes secundários da aguardente. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.12, n. 6, p 29-34, 1994.
37. MONISHA, A.; KUAD, R.C.; SINGH, A. Bioconversion of pentose sugars to ethanol by free and immobilized cells of *Candida shehatae* (NCL-3501): fermentation behavior. **Process Biochemistry**, vol. 31, n. 6, p. 555-560, 1996.
38. MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A.B.R.A. Short Communication: Characterization and succession of yeast populations associates with spontaneous fermentation during the production of brasilian

- sugar cane aguardente. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 13, p. 214-243, 1997.
39. NASCIMENTO, R. F.; CARDOSO, D.R.; NETO, B.S.L., FRANCO, W.F. Influencia do material do alambique na composição química das aguardentes de cana de açúcar. **Química Nova**, vol. 21, n. 6, São Paulo Nov./Dec. 1998.
40. NEDOVIC, V.A.; CUKALOVIB, I.L.; NOVAKOVIC, G.V. Immobilized cell technology (ICT) in beer fermentation – a possibility for environmentally sustainable cost-effective process. **Institute of Food Technology and Biochemistry**, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, 1997.
41. NEDOVIC, V.A.; DURIEUX, A.; NEDERVELDE, L.V.; ROSSELS, P.; VANDEGENS, J. Continuous cider fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, p. 834-839, 2000.
42. NIGAM, J.N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. **Journal of Biotechnology** , 80, p. 189-193, 2000.
43. NISHIMURA, K., MATSUYAMA, R. Maturation and maturation chemistry. In: PIGGOTT, J.R.; SHARP, P.; DUNCAN, R.E.B. (Eds) **The Science and Technology of Whiskies**. New York: Longman Scientific & Technical, p.235-63, 1989.
44. NYKANEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and alcoholic beverages. **Am. J. Enol. Vitic.** 37, p. 84-96, 1986.

45. NYKANEN, L. & NYKANEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H. (Ed). **Volatile Compounds in Food Beverages**. New York: Marcel Dekker. INC., p. 548-580, 1991.
46. NYKANEN, L. & SUOMALAINENE, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages**. Berlin: Akademik-Verlag, 413p, 1983.
47. O'DRISCOLL, K.F. Techniques of enzyme entrapment in gels, In: **Methods in Enzymology**. Vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, p. 169-183, 1976.
48. OLIVEIRA, E. S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. Campinas, 2001 . Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
49. PARAZZI, C. **Fermentação alcoólica com leveduras floculantes**. Rio Claro, SP, 1996, 164 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.
50. PERFAIT, A.; JOURET, C. Formation of Higher alcohols in rum. **Annales de Technologie Agricole** 24: 421-436, 1975.
51. RANSAY, C. M. AND BERRY, D. R. The effect of inoculum level on the formation of higher alcohol, fatty acids and esters in malt whisky fermentation. **Food Microbiology**, London, vi., p. 111-115, 1984a.
52. RANSAY, C. M. AND BERRY, D. R. Effect of temperature and pH on the formation of higher alcohol, fatty acids and esters in malt whisky fermentation. **Food Microbiology**, London, vi., p. 117-121, 1984b.

53. RIBEIRO, C.A.F.; HORRI, J. – Potencialidades de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, vol. 56, n.2, Piracicaba, 1999.
54. RIORDAN, C.; LOVE, G.; BARRON N.; NIGAN, P.; MARCHANT, R.; MCHALE A.P. Production of ethanol from sucrose at 45 °C by alginate immobilized preparations of thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3 - **Bioresource Technology**, 55, p. 171-173, 1996.
55. ROCA, E.; FLORES, J.; NUNEZ, M.J.; LEMA, J.M. Ethanol fermentation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a semi pilot pulsing packed bed bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**. 19: p. 123-139, 1996.
56. ROUKAS, T. Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. **Journal of Food Engineering**, 27, p. 87-96, 1996.
57. RUSSEL, I. ; JONES, R.; GRAHAM, G.. Yeast - The primary industrial microorganism. In: STEWART, G.; RUSSEL, I.; KLEIN,R.; HIESBSCH. R. **Biological Research on Industrial Yeasts**. v .1, CRC Press, Inc, 1987.
58. SIMPSON A.C., 1971 Manufactured of brandy. **Process Biochemistry**. p. 25-27, Feb. 1971.
59. SRERE, P.A.; UYEDA, K. Functional groups in enzymes suitable for binding to matrices, In: **Methods in Enzymology**, vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, p. 11-19, 1976.

60. STUPIELLO, J.P. **Cana de açúcar – Cultivo e utilização**. Vol.2, Ed. Fundação Cargill, 1987.
61. STUPIELLO, J.P. Produção de aguardente: qualidade da matéria prima. In MUTTON, M.J.R. E MUTTON, M.A. (Eds) "**Aguardente de Cana – Produção e Qualidade**". FUNEP – Jaboticabal, SP. p. 9-20; p. 67 – 68, 1992.
62. STRAUSS C.R., WILLIAMS P.J., The effect of distillation on grape flavor compounds. In: **Flavor of Distilled Beverage: Origin and Development**. (ed) PIGGOT, J.R. Ellis Horwood, Chichester, UK, pp 120-133, 1983.
63. SUOMALAINEN, H. Yeast and its effects on the flavor of alcoholic beverages. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 76, p.244-425, 1970.
64. SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.85, p. 149 - 156, 1979.
65. TOHER, J.; KELLY, A.M., BICKERSTAFF, G.F. Stability properties of two supports for immobilization of enzymes. **Biochemical Soc. Trans.** 18, p. 313-314, 1976.
66. WATSON, D.C. Factors influencing the congener composition of malt whisky new spirit. In: PIGGOTT, J.R. (Ed) **Flavor of Distillated Beverages : Origin and Development**. Florida: Verlag Chemie International, INC., p. 79-92, 1983.
67. WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages – a review. **Journal of Institute of Brewing**, London, v. 82, p. 84-92, 1976.

68. WILLIAMS, A.A. Flavor effects of ethanol in alcoholic beverages. **Flavor Industry**, London, v.3, p.604-607, 1972.
69. WOODWARD, J. Immobilizes enzymes: adsorption and covalent coupling, In: **Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach** (Woodward, J., ed.), IRL, Oxford, 3-17, 1985.
70. YOKOYA, F. **Fabricação de Aguardente de Cana – Série fermentações Industriais nº 2**. Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello – Campinas – SP. 1995.
71. YOSHIOKA, K.; HASHIMOTO, N. Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewer' yeast. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, n. 10, p. 2183-2190, 1981
72. Yuri Vasconcelos - Revista **Pesquisa Fapesp** - Ciência e Tecnologia no Brasil - maio de 2003