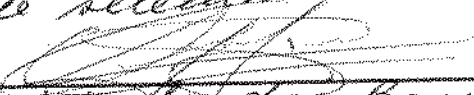


ASPECTOS CINÉTICOS E OPERACIONAIS DA  
FERMENTAÇÃO ALCÓLICA CONTÍNUA EM  
FERMENTADOR CASCATA COM CÉLULAS  
LIVRES E IMOBILIZADAS.

12/84

Parcer  
Este exemplar corresponde a redaçãõ final da Tese  
defendida por Aldo Alessandro Milanese Rubilar e aprovada  
da pela Comissão Julgadora em 04.09.87.  
Campinas, 04 de setembro de 1987.

  
Presidente da Banca

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"ASPECTOS CINÉTICOS E OPERACIONAIS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA  
CONTÍNUA EM FERMENTADOR CASCATA COM CÉLULAS LIVRES E IMOBILI-  
LIZADAS".

ALDO ALESSANDRO MILANESE RUBILAR

Orientador: Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO

Tese apresentada à Faculdade de  
Engenharia de Alimentos da Uni-  
versidade Estadual de Campinas  
para obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia de Alimentos.

BIBLIOTECA CENTRAL

A mi esposa, Ivonne,  
A nuestros hijos, Paulita y Aldito,  
A mis padres, Aldo e Isabel (in memoriam),  
A mis hermanos, Franco y Bruno (in memoriam),

Con cariño y gratitud.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO, pela orientação, estímulo e amizade recebidos ao longo deste trabalho.
- A FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS e particularmente ao Departamento de ENGENHARIA, por possibilitar o desenvolvimento desta pesquisa.
- A UNIVERSIDAD DE CONCEPCION, pela concessão da licença e manutenção dos proventos.
- A Associação Brasileira de Industrias de Alimentos (ABIA) pelo custeio da confecção desta tese.
- A todo pessoal do Laboratório de Bioengenharia pelo companheirismo e amizade, especialmente a MARIA ISABEL e FATIMA pelo carinho e afeição.
- Aos funcionários da Biblioteca da FEA pela simpatia e trabalhos prestados.
- A FATIMA DE ALMEIDA COSTA, pela valiosa colaboração na fase computacional.
- Aos meus amigos, BENJAMIM e HELOISA, e seus filhos MARCO AURELIO e BRUNO, pela ajuda em todos os momentos.

- Ao meu amigo HUMBERTO, pela sua simpatia e colaboração.
- A minha esposa, IVONNE, pelo amor, paciência e estímulo em todos os momentos.
- Aos meus filhos, ALDITO e PAULITA, pela ternura e inspiração.
- Ao meu pai, ALDO, pelo estímulo e apoio financeiro.
- A todos aqueles que contribufram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	11
NOMENCLATURA .....	vi
RESUMO .....	viii
SUMMARY .....	xi
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
1. BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA .....	3
1.1. Aspectos gerais .....	3
1.2. Efeito do oxigênio .....	5
1.3. Efeito da glicose .....	7
1.4. Inibição pelo etanol .....	7
1.5. Viabilidade celular .....	9
2. IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS .....	10
2.1. Aspectos gerais .....	10
2.2. Técnicas de imobilização .....	12
3. FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA CONTÍNUA .....	15

III. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
1. MATERIAL .....	17
1.1. Microrganismo .....	17
1.2. Condições da cultura .....	17
1.3. Meios de culturas .....	18
1.4. Suportes para imobilização de células .....	21
1.5. Fermentadores .....	23
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	27
2.1. Preparo do inóculo .....	27
2.2. Fermentações descontínuas .....	27
2.3. Esterilização dos equipamentos .....	28
2.4. Fermentação contínua multiestágio .....	28
3. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	34
3.1. Concentração de massa celular livre .....	34
3.2. Concentração de substrato .....	35
3.3. Concentração de etanol .....	36
3.4. Vazão de CO <sub>2</sub> .....	36
3.5. Massa celular retida no suporte .....	37
3.6. Viabilidade celular .....	38
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
1. FERMENTAÇÃO MULTIESTÁGIO USANDO CÉLULAS	
LIVRES COM RECICLO .....	40
1.1. Influência da taxa de diluição .....	40
1.2. Influência da taxa de reciclo .....	50

2. FERMENTAÇÃO MULTISTAGIO USANDO CÉLULAS	
IMOBILIZADAS SEM RECICLO .....	56
2.1. Influência da taxa de diluição .....	56
3. FERMENTAÇÃO MULTISTAGIO USANDO CÉLULAS	
IMOBILIZADAS COM RECICLO .....	66
3.1. Influência da taxa de diluição .....	66
3.2. Influência da taxa de reciclo .....	73
3.3. Influência da taxa de aeracão .....	79
3.4. Massa celular retida em cada reator .....	85
4. ANÁLISE COMPARATIVA DAS CARACTERÍSTICAS	
OPERACIONAIS DOS SISTEMAS USADOS .....	88
4.1. Produtividades de etanol e porcentagem	
de conversão de substrato .....	88
4.2. Taxas específicas de produção de etanol .....	92
4.3. Rendimentos celular e de etanol .....	94
5. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS	
PARA CÉLULAS LIVRES .....	96
5.1. Taxa específica de morte celular e	
rendimento celular .....	96
5.2. Taxa específica máxima de crescimento,	
poder tóxico e concentração máxima de etanol ....	99
6. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS PARA	
CÉLULAS IMOBILIZADAS .....	105
7. DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE VIABILIDADE CÉLULAR	
PARA SISTEMAS SEM RECICLAGEM DE CÉLULAS .....	113



V. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES ..... 118

VI. BIBLIOGRAFIA ..... 122

VII. ANEXOS ..... 134

1. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA

HIDRÁULICO REAL ..... 134

2. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA ..... 140

3. ESTABELECIMENTO DO ESTADO ESTACIONÁRIO ..... 145

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Efeito da taxa de diluição nas características do sistema para células livres com reciclo .....	48
TABELA 2. Efeito da taxa de reciclo nas características do sistema para células livres .....	53
TABELA 3. Efeito da taxa de diluição nas características do sistema para células imobilizadas sem reciclo .....	63
TABELA 4. Efeito da taxa de diluição nas características do sistema para células imobilizadas com reciclo .....	71
TABELA 5. Efeito da taxa de reciclo nas características do sistema para células imobilizadas .....	76
TABELA 6. Efeito da taxa de aeração nas características do sistema para células imobilizadas com reciclo .....	83
TABELA 7. Valores experimentais para obtenção dos parâmetros do modelo de viabilidade celular .....	115
TABELA 8. Efeito da concentração de extrato de levedura na fermentação alcoólica descontínua .....	141
TABELA 9. Efeito da concentração dos sais minerais na fermentação alcoólica descontínua .....	143
TABELA 10. Estabelecimento do estado estacionário .....	147

## INDICE DE FIGURAS

FIG. 1. Esquema do mini-fermentador M-1000 .....	23
FIG. 2. Sistema de fermentadores usados para fermentação contínua com células imobilizadas sem reciclagem ...	24
FIG. 3. Sistema de fermentadores usados para fermentação contínua com células imobilizadas com reciclagem ...	25
FIG. 4. Fermentador contínuo multiestágio .....	26
FIG. 5. Detalhes e fotografia de um fermentador com células imobilizadas .....	31
FIG. 6. Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizadas em suporte poroso .....	32
FIG. 7. Decantador usado para reciclagem de células .....	33
FIG. 8. Curva padrão de concentração de massa celular seca em função da absorbância .....	35
FIG. 9. Sistema usado para medir a vazão de CO <sub>2</sub> .....	37
FIG.10. Perfis de concentrações de massa seca, substrato e etanol para diversas taxas de diluição. Células livres com reciclo .....	41
FIG.11. Efeito da taxa de diluição nas concentrações de massa seca, substrato e etanol em cada fermentador. Células livres com reciclo .....	44
FIG.12. Efeito da taxa de diluição na fermentação alcoólica, usando células livres .....	49
FIG.13. Efeito da taxa de reciclo nas concentrações de massa seca, substrato e etanol .Células livres com reciclo .....	52

FIG.14. Efeito da taxa de reciclo na fermentação alcoólica usando células livres .....	54
FIG.15. Perfís de viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol para taxas de diluição diferentes. Células imobilizadas sem reciclo .....	57
FIG.16. Efeito da taxa de diluição na viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol para cada fermentador. Células imobilizadas sem reciclo .....	60
FIG.17. Efeito da taxa de diluição na fermentação alcoólica para células imobilizadas sem reciclo ....	64
FIG.18. Perfís de viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol para taxas de diluição diferentes. Células imobilizadas com reciclo .....	67
FIG.19. Efeito da taxa de diluição na viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol para cada fermentador. Células imobilizadas com reciclo .....	69
FIG.20. Efeito da taxa de diluição na fermentação alcoólica para células imobilizadas com reciclo ....	72
FIG.21. Efeito da taxa de reciclo na viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol para cada fermentador. Células imobilizadas com reciclo .....	74

FIG.22. Efeito da taxa de reciclo na fermentação alcoólica usando células imobilizadas .....	77
FIG.23. Efeito da taxa de aeracão na viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol para cada fermentador. Células imobilizadas com reciclo .....	81
FIG.24. Efeito da taxa de aeracão na fermentação alcoólica com células imobilizadas com reciclo .....	84
FIG.25. Perfil de concentração de massa celular retida no sistema. Células imobilizadas .....	86
FIG.26. Efeito da taxa de diluição do sistema na produtividade e porcentagem de conversão .....	89
FIG.27. Efeito da taxa de reciclo na mudança de produtividade para os sistemas usados .....	91
FIG.28. Efeito da taxa de diluição nas taxas específicas de produção de etanol no primeiro fermentador .....	92
FIG.29. Efeito da taxa de diluição do sistema nos rendimentos de massa seca e produto para os sistemas usados .....	94
FIG.30. Determinação gráfica do rendimento celular e da taxa específica de morte celular. Células livres com reciclo .....	98
FIG.31. Determinação gráfica dos parâmetros cinéticos para células livres .....	101
FIG.32. Efeito da concentração de etanol na taxa específica de crescimento celular. Células livres .....	102

FIG.33. Representação gráfica do modelo cinético e das concentrações experimentais de etanol, substrato e massa seca. Células livres .....	104
FIG.34. Determinação gráfica dos parâmetros cinéticos para células imobilizadas .....	110
FIG.35. Concentrações de etanol, substrato e massa seca experimentais e previstas pelo modelo cinético em função da taxa específica de crescimento celular. Células imobilizadas .....	112
FIG.36. Obtenção dos parâmetros do modelo de viabilidade celular para células imobilizadas sem reciclo .....	116
FIG:37. Reator CSTR .....	135
FIG.38. Avaliação do comportamento hidrodinâmico do reator de leito empacotado .....	138
FIG.39. Modelo hidrodinâmico do fermentador de leito empacotado .....	139
FIG.40. Porcentagem de mudança da vazão de CO <sub>2</sub> do sistema em função do tempo adimensional .....	148
FIG.41. Obtenção gráfica dos parâmetros da equação de estado transiente .....	148

## NOMENCLATURA

- D = Taxa de diluição do reator (eq. 4.1),  $T^{-1}$
- D<sub>s</sub> = Taxa de diluição do sistema (eq. 4.3),  $T^{-1}$
- d = Constante empírica (eq. 4.43)
- F = Vazão volumétrica no reator,  $L^3T^{-1}$
- F<sub>ar</sub> = Vazão de ar esteril,  $L^3T^{-1}$
- F<sub>f</sub> = Vazão de alimentação de meio,  $L^3T^{-1}$
- F<sub>r</sub> = Vazão de reciclo,  $L^3T^{-1}$
- I = Propriedade característica do sistema (eq. 7.5)
- K = Constante de heterogeneidade (eq. 4.36),  $T^{-1}$
- K<sub>s</sub> = Constante de saturação (eq. 4.21),  $ML^{-3}$
- k = Constante empírica (eq. 7.5),  $T^{-1}$
- k<sub>d</sub> = Taxa específica de morte celular,  $T^{-1}$
- M% = Porcentagem de mudança (eq. 7.9)
- m = Constante empírica (eq. 4.43)
- n = Poder tóxico (eq. 4.21)
- n\* = Constante empírica (eq. 4.36)
- P = Concentração de etanol  $ML^{-3}$
- P<sub>máx</sub> = Concentração máxima de etanol,  $ML^{-3}$
- P<sub>r</sub> = Produtividade de etanol (eq. 4.6),  $ML^{-3}T^{-1}$
- P<sub>s</sub> = Concentração de etanol no efluente,  $ML^{-3}$
- Q = Taxa de produção de CO<sub>2</sub>,  $L^3T^{-1}$
- q<sub>p</sub> = Taxa específica de produção de etanol (eq. 4.8),  $T^{-1}$
- S = Concentração de substrato,  $ML^{-3}$
- S<sub>f</sub> = Concentração de substrato na alimentação,  $ML^{-3}$
- S<sub>s</sub> = Concentração de substrato no efluente,  $ML^{-3}$

$T.A.$  = Taxa de aeração (eq. 4.12),  $T^{-1}$   
 $t$  = tempo, T.  
 $t_x$  = tempo adimensional (eq. 7.6)  
 $V$  = Volume do reator,  $L^3$   
 $V_x$  = Volume útil do reator (eq. 7.1),  $L^3$   
 $V_s$  = Volume do sistema,  $L^3$   
 $V\%$  = Porcentagem de viabilidade celular (eq. 4.43)  
 $X$  = Concentração de massa seca,  $ML^{-3}$   
 $X_s$  = Concentração de massa seca no efluente,  $ML^{-3}$   
 $Y_{p/s}$  = Rendimento de etanol (eq. 4.10)  
 $Y_{x/s}$  = Rendimento de massa seca (eq. 4.9)

$\alpha$  = Taxa de reciclo (eq. 4.11)  
 $\mu$  = Taxa específica de crescimento celular,  $T^{-1}$   
 $\mu_{obs}$  = Taxa específica de crescimento celular observada,  $T^{-1}$   
 $\mu_{m\acute{a}x}^*$  = Taxa específica máxima de crescimento celular,  $T^{-1}$   
 $\phi\%$  = Porcentagem de conversão de substrato (eq. 4.7)  
 $\tau$  = Tempo de residência hidráulico teórico do reator, T.  
 $\tau^*$  = Tempo de residência hidráulico real do reator, T.  
 $\tau_c$  = Tempo de residência celular do sistema (eq. 4.5), T.  
 $\tau_s$  = Tempo de residência hidráulico do sistema (eq. 4.4), T.



## RESUMO

Foram realizadas fermentações contínuas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* IZ 888 num reator multiestágio com células imobilizadas, operando a 33°C e pH entre 2,5 - 3,0. Foi utilizada a técnica de imobilização por adsorção, usando como suporte cubos de 5x5x5 mm. de esponja de polietileno de alta densidade, em leito empacotado. A fim de conseguir características tipo CSTR, cada reator foi dotado de uma bomba centrífuga para circulação interna. O sistema consta de 6 reatores em série, um decantador estagiado e de uma bomba peristáltica que permite a reciclagem de células do decantador ao primeiro reator, numa vazão controlada.

Foi estudado o comportamento hidrodinâmico das diversas configurações dos reatores através da técnica de injeção de traçador na forma de pulso e degrau, resultando uma configuração final dos reatores, com volume útil equivalente a 89% do volume do reator. Para avaliar o tempo necessário para o estabelecimento do regime estacionário, usou-se a técnica de medição de CO<sub>2</sub> gerado, resultando num tempo de operação equivalente a 1,075 vezes o tempo de residência hidráulico do sistema.

Nas fermentações contínuas utilizou-se meio semi-sintético, contendo sacarose comercial como fonte de carbono e energia, em concentração de 150 g/l.

Foram estudadas os efeitos exercidos pela taxa de diluição, taxa de reciclo e taxa de aeração nos parâmetros fermentativos para células livres e imobilizadas, observando-se que os

aumentos da taxa de diluição e da taxa de reciclo resultaram em aumento da produtividade de etanol, atingindo o maior valor, 5,35 (g/L-h), para o caso de células imobilizadas, com uma taxa de reciclo de 0,116 e uma taxa de diluição de  $0,882 \text{ h}^{-1}$ .

A taxa de aeração mostrou-se benéfica somente no intervalo de 0,01 a 0,02 VVM, no qual a produtividade aumentou 7,5%, a conversão 5,6% e o rendimento de etanol 6,5%. Valores superiores da taxa de aeração prejudicaram o processo.

Os rendimentos alcoólicos obtidos na quase totalidade dos experimentos foram altos, chegando-se a obter o máximo teórico possível no caso de células imobilizadas sem reciclo, em altas taxas de diluição.

Foi verificada uma forte inibição pelo etanol nas taxas específicas de crescimento celular, observando-se um ajuste satisfatório do modelo de LEVENSPIEL (eq. 4.21) para o caso de células livres, resultando numa cinética exclusivamente inibitória com os parâmetros  $\mu_{\text{máx}}^* = 0,254 \text{ h}^{-1}$ ,  $n = 2,054$  e  $P_{\text{máx}} = 56 \text{ g/L}$ .

Foi desenvolvido um modelo cinético para sistemas heterogêneos (eq. 4.36), sendo aplicado satisfatoriamente às fermentações com células imobilizadas, com os parâmetros  $K = 0,0757 \text{ h}^{-1}$  e  $n^* = 1,270$ .

Os efeitos do tempo de residência celular, concentração de etanol e taxa de aeração na viabilidade celular foram examinados, concluindo-se que a viabilidade diminui com o tempo de residência celular e com a concentração de etanol. A aeração não mostrou-se benéfica no sentido de aumentar a viabilidade celular. Foi proposto um modelo matemático (eq. 4.43) que permite

relacionar satisfatoriamente a viabilidade celular com o tempo de residencia e a concentração de etanol, com os parâmetros  $d = 0,0047$  e  $m = 0,953$ . Observou-se que a imobilização passiva de células de levedura em esponja de polietileno ocorre de forma preferencial nos primeiros estágios, atingindo uma concentração de 55 g/L de massa seca no primeiro reator.

## SUMMARY

The continuous fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* IZ 888 was performed in a multi-stage reactor system (6 stages) using immobilized cells. The conditions of temperature and pH were 33°C and 2.5 - 3.0 respectively. The cells were immobilized in 5 mm cubes on high density reticulated polyethylene foam. The reactors were typically packed beds with recirculation of the medium by means of a centrifugal pump, in order to produce CSTR - type characteristics. The system was provided with a biomass separator to return concentrated biomass to the first stage.

The hydrodynamic performance of the reactors was studied by stimulus-response techniques. The reacting volume was 89% of the total volume. The time required to establish a steady state was estimated by measuring the CO<sub>2</sub> produced, requiring a time equivalent to 1.075 times the hydraulic residence time of the system.

Continuous fermentations were carried out using a semi-synthetic medium containing 150 g/L of sucrose as the carbon source. The effects of dilution, recycling and aeration rates on the fermentation parameters were studied, both in the free and immobilized cell procedures. Ethanol productivity increased with increasing dilution and recycling rates. With immobilized cells, a maximum productivity of about 5.35 (g/L-h) was achieved with recycling and dilution rates of 0.116 and 0.882 h<sup>-1</sup> respectively.

The aeration rate was only beneficial in the range from 0.01 to 0.02 VVM, within which increases of 7.5% in ethanol productivity, 5.6% in substrate conversion and 6.5% in product yield were observed.

The ethanol yields were nearly always very high. The maximum theoretical ethanol yield was obtained at high dilution rates using immobilized cells with no feed-back.

Ethanol was shown to exert a highly inhibitive effect on the cellular growth rate. The process with free cells satisfactorily fitted the LEVENSPIEL model (eq. 4.21), the parameters obtained being  $\mu_{\max}^* = 0,254 \text{ h}^{-1}$ ,  $n = 2.054$  and  $P_{\max} = 56 \text{ g/L}$ .

A kinetic model for heterogeneous systems was developed (eq. 4.36), which could be used for fermentations with immobilized cells. The parameters obtained were:  $K = 0,0757 \text{ h}^{-1}$  and  $n^* = 1.270$ .

The effects of residence time in the system, ethanol concentration and aeration rate on cell viability were also studied. Viability decreased with residence time and ethanol concentration, and aeration rate was not shown to improve it. A mathematical model (eq. 4.43) was developed relating viability, residence time and ethanol concentration.

The passive immobilization of cells in polyethylene foam was shown to be greater during the first stage, where the cell concentration reached 55 g/L of dried biomass.

## I. INTRODUÇÃO.

Depois da crise provocada pelo brusco aumento do preço do petróleo, têm ocorrido uma multiplicação de estudos sobre fermentação alcoólica, uma vez que o etanol é uma fonte alternativa de energia viável e renovável, podendo ser usado não somente como combustível, mas também como matéria prima para a indústria alcoólquímica.

Na fermentação alcoólica, duas características do processo utilizado são da maior relevância econômica: rendimento e produtividade de etanol. A fermentação alcoólica realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* caracteriza-se pela forte inibição produzida pelo etanol na sua produção e de forma menos marcante por uma alta concentração de substrato, limitando desta forma o crescimento celular, produtividade e rendimento do processo. O processo convencional (em batelada) inicia-se em baixas concentrações de material celular e altas concentrações de substrato, resultando num prolongado período de latência de baixa produtividade e rendimento. No processo Melle-Boinot, o material celular é reciclado, permitindo iniciar a fermentação com altas concentrações de massa celular, resultando em produtividades e rendimentos mais elevados que no caso convencional, mas o processo de separação da massa celular é caro e apresenta problemas de assepsia. Desta forma foram desenvolvidos processos contínuos não extrativos que permitem eliminar o período de latência e diminuir o efeito inibitorio do etanol e do substrato, como fermentação contínua em reatores separados (cascata) com células

imobilizadas, resultando em maiores produtividades e rendimentos de etanol devido à utilização repetida do material celular, altas taxas de diluição e diminuição dos efeitos inibitórios do substrato e etanol.

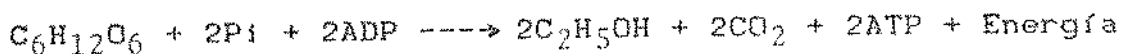
Este trabalho permite visualizar os efeitos produzidos por diversas variáveis de operação (taxa de diluição, taxa de reciclo, aeração) nas características do processo de fermentação contínua com células livres e immobilizadas. Por outro lado, foram desenvolvidos um modelo cinético apropriado para reatores heterogeneos e um modelo de viabilidade celular para sistemas sem reciclagem de células.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

### 1. BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.

#### 1.1. ASPECTOS GERAIS.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na fermentação alcoólica é anaeróbia facultativa. Em condições de anaerobiose, a glicose sofre metabolismo fermentativo sendo catabolizada essencialmente pela via de Embden-Meyerhof, o piruvato (58) e em seguida transformado em acetaldeído e  $\text{CO}_2$  e finalmente a redução do etanal pela álcool-desidrogenase na presença de  $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$  conduzindo ao etanol. A reação total é a seguinte:



A equação anterior mostra que 1 mol (180 g) de glicose produz 2 moles (92 g) de etanol, 2 moles de  $\text{CO}_2$  (88 g) e 2 moles de ATP que podem ser utilizados para a síntese de componentes celulares, além de energia (57 Kcal/mol glicose). Desta forma o rendimento teórico de etanol a partir de glicose é de 0,511 gramas de etanol produzido por grama de glicose consumida. De forma geral os rendimentos reais observados atingem somente 90-95 % do rendimento teórico uma vez que parte da glicose é utilizada para síntese de material celular e para reações de manutenção. Assim, se a taxa de crescimento celular é alta, a taxa de produção de etanol também deverá ser alta, a fim de fornecer a energia necessária para a produção de biomassa. Nestas condições o rendimento celular é muito baixo, atingindo valores de 0,05-0,12 gra-



mas de células por grama de glicose (69,73).

A presença de reações paralelas consome uma parte da glicose, resultando em outros metabólitos como glicerol, ácido succínico e alcoóis superiores permitindo a regeneração do NAD (61,71).

Tem sido encontrado para fermentações em batelada, uma excreção de glicerol de 0,3 (g/L) independente da concentração inicial de glicose (46). Por outro lado a glicose pode igualmente ser metabolizada pela via das hexoses monofosfato, produzindo  $\text{CO}_2$  e  $\text{NADPH}_2$  necessário para síntese de constituintes celulares e compostos de reserva (69,71).

Em condições de aerobiose e baixas concentrações de glicose (menor que 1,5 g/L) a célula de levedura apresenta metabolismo respiratório produzindo essencialmente  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e biomassa pela via da glicólise, ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ciclo de KREBS) e a cadeia respiratória. Uma molécula de glicose libera neste caso 38 moles de ATP que são utilizáveis para síntese de material celular. Como resultado desta alta produção de ATP o rendimento celular é muito elevado, atingindo valores de 0,40-0,47 (g/g), fenômeno conhecido como efeito PASTEUR (26,73).

Por outro lado, concentrações de glicose na faixa de 0,2-1,0 (g/L) ou superiores (32) implicam na repressão da síntese de enzimas respiratórias e conseqüentemente a célula produzirá principalmente etanol e  $\text{CO}_2$  através do metabolismo fermentativo, independentemente da concentração de oxigênio no meio, resultando numa elevada diminuição do rendimento celular, fenômeno conhecido como efeito CRABTREE (14,48,73).

Assim para uma fermentação não existe uma fronteira definida entre catabolismo aeróbico ou anaeróbico uma vez que ela depende das concentrações de oxigênio, glicose, etanol e da composição do meio.

## 1.2.- EFEITO DO OXIGENIO.

Durante a fermentação alcoólica realizada pelas linhagens de *Saccharomyces* sp. uma parte do oxigênio serve como receptor de elétrons para a cadeia respiratória e por outro lado é necessário para a indução das enzimas respiratórias (61).

OURA (60,61) estudando as atividades das enzimas oxidativas e das enzimas da glicólise sob aeração controlada na ausência de repressão catabólica (efeito CRABTREE) demonstrou que a atividade das enzimas oxidativas aumenta quando o gas de aeração é enriquecido com oxigênio (61) e pelo contrario, a atividade das enzimas fermentativas diminui (62). Desta forma a repressão da hexoquinase e álcool-desidrogenase (46) pelo oxigênio ou a sua indução pela glicose determinam a orientação do metabolismo das leveduras.

Uma outra parte do oxigênio serve para síntese de elementos estruturais. Embora a fermentação alcoólica seja considerada como estritamente anaeróbica, traços de oxigênio (0,05-0,10 mm. Hg) estimulam a taxa de fermentação (34) e para algumas linhagens de *Saccharomyces* sp. o oxigênio é um fator de crescimento (16,65). O oxigênio é usado para a síntese de ácidos graxos poli insaturados, esteróis e seus precursores, compostos necessários

para a biosíntese dos lipídeos constitutivos das membranas plasmáticas e mitocondriais (27,65). ROGERS e STEWART (65) obtiveram em condições de anaerobiose estrita uma relação entre os ácidos graxos insaturados e totais de 18%, mas na presença de uma concentração de oxigênio de 2,8  $\mu\text{M}$  esta relação passa a 82%. CYSEWSKI (15) demonstrou que a adição de ácidos graxos insaturados ou seus derivados no meio de cultura aumenta a velocidade de crescimento e diminui a necessidade de oxigênio. HAUKELI e LIE (27) observaram que a composição da célula em lipídeos, ácidos graxos insaturados e ergosterol é função da concentração de oxigênio no meio de crescimento e que uma diminuição da quantidade de lipídeos insaturados nas células leva ao debilitamento da membrana plasmática.

CYSEWSKI (15) demonstrou que uma concentração de 7 (mg/L) de ergosterol permite dispensar em fermentações descontínuas a necessidade em oxigênio das células. Em aerobiose o ergosterol constitui 10% da massa seca das células de *Saccharomyces* sp., mas em células de levedura cultivadas em anaerobiose o ergosterol constitui somente 0,15% da massa seca (60 vezes a menos) da célula (27). Durante a fase aeróbica as células produzem ergosterol que é armazenado podendo ser usado numa eventual fase anaeróbica para síntese de outros lipídeos insaturados e de ácidos graxos.

Em relação à concentração ótima de oxigênio para produção contínua de etanol CYSEWSKI e WILKE (16) conseguiram determinar os valores das concentrações ótimas, mas posteriormente demonstraram que este valor não é uma constante, senão que depende da

velocidade específica de crescimento celular e da concentração de substrato. DURA (60) demonstrou que a presença de altas concentrações de oxigênio inibe as vias fermentativas e respiratórias. Tensões de oxigênio superiores a 300 mm. de Hg inibem tanto o crescimento celular quanto a produção de etanol.

### 1.3. EFEITO DA GLICOSE.

A glicose, dependendo da sua concentração pode ser um elemento limitante ou inibidor. Em concentrações superiores a 150 (g/L) inibe tanto as enzimas oxidativas e fermentativas devido à desidratação das células de levedura (32,77). Concentrações de glicose na faixa de 3-100 (g/L) inibem seletivamente o metabolismo respiratório resultando num catabolismo unicamente fermentativo (repressão catabólica ou efeito CRABTREE) independente da concentração de oxigênio (62) até uma concentração de glicose na faixa de 0,3-0,5 (g/L) na qual desaparece a repressão catabólica e o catabolismo pode ser fermentativo ou respiratório dependendo da concentração de oxigênio (48,60).

### 1.4. INIBIÇÃO PELO ETANOL.

HOLZBERG e col. (29) demonstraram que o crescimento celular não é inibido em concentrações de etanol inferiores a 26 (g/L) mas ele é inibido totalmente quando a concentração de etanol atinge 68,5 (g/L) no meio de cultura. Outros pesquisadores (65) argumentam, numa forma mais geral, que concentrações de

etanol de 70-80 (g/L) inibem completamente o crescimento celular e que teores de etanol de 87-115 (g/L) provocam a total inibição da produção de etanol. BAZUA e WILKE (7) argumentam que a inibição produzida pelo etanol seria do tipo não-competitivo. NAGODA-WITHANA e col. (52) determinaram a importância do efeito inibidor do etanol sobre as enzimas da glicólise, hexoquinase e  $\alpha$ -glicerofosfato-desidrogenase ( $\alpha$ -GDP). A afinidade do etanol é maior para a  $\alpha$ -GDP que para a hexoquinase. Desta forma a produção do glicerol está relacionada à concentração do etanol no meio sendo sintetizado somente nas primeiras etapas de uma fermentação em batelada quando a concentração de etanol é baixa.

No interior das células da levedura *S. cerevisiae* a concentração de etanol é superior à existente no meio (51). O etanol intracelular pode atingir concentrações de 300 (g/L) durante uma fermentação (55) mas este valor aumenta com a temperatura de fermentação. Estes pesquisadores demonstraram que o acúmulo de etanol no interior da célula é devido à resistência existente para o transporte do etanol desde a célula até o meio de cultura. MORENO (46) constatou que quando a concentração de etanol no interior da célula atinge a 130 (g/L), ela é ainda desprezível no meio de cultura. No curso da primeira parte da fermentação a excreção de etanol é controlada por um regime de difusão simples mas quando o teor de etanol intracelular for inferior ao teor do meio, o processo de transporte seria ativo, uma vez que aparentemente a permeabilidade da membrana celular é modificada no curso do crescimento.

### 1.5. VIABILIDADE CELULAR.

De forma geral a viabilidade celular é influenciada pela quantidade de oxigênio dissolvido, a temperatura da fermentação, a quantidade de inóculo, a concentração de substrato e a velocidade de produção de etanol (50,51). CYSEWSKI e WILKE (17) observaram que a viabilidade celular diminui continuamente em anaerobiose, mas ela permanece acima de 95% em aerobiose num sistema de fermentação a vácuo. As leveduras utilizam o oxigênio para produzir ácidos graxos poli-insaturados e seus precursores, compostos necessários para a biosíntese de lipídeos constitutivos das membranas plasmáticas e mitocondriais (27,65). A complementação do meio de cultura com ácidos graxos insaturados ou esteróis permite aumentar a quantidade de ácidos graxos presentes nas células e conseqüentemente na membrana plasmática, aumentando também a viabilidade celular, o que provaria que o efeito tóxico primário do etanol seria a nível da membrana plasmática uma vez que ela é a primeira em contato com o etanol (72). Desta forma pode ser suposto que a presença de ácidos graxos insaturados na membrana interior facilita a solubilidade do etanol nela.

Aumentos da temperatura de fermentação produzem uma forte diminuição da viabilidade celular, devido ao aumento das taxas de produção e acúmulo de etanol no meio e nas células (50,55), ficando as mesmas mais empobrecidas em lipídeos insaturados. A viabilidade celular está influenciada essencialmente pela concentração de etanol intracelular e no meio, pelo tempo de contato entre as células e o etanol e pelas condições de cultura (iluminação, concentração de oxigênio e substrato, temperatura, etc.)

## 2. IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS.

### 2.1. ASPECTOS GERAIS.

Nos últimos anos ocorreu um alto interesse na produção de etanol por fermentação para uso como combustível. As técnicas de cultura convencionais em batelada ou contínua não são economicamente muito atrativas para este processo, devido ao que muito esforço tem sido feito a fim de se desenvolver novas configurações de fermentadores, com maiores produtividades volumétricas. Uma forma de conseguir este aumento baseia-se no incremento da massa celular dentro do fermentador para o qual temos três técnicas disponíveis:

-Evitar a saída de células do fermentador mediante a filtração do efluente (37,42). Esta técnica apresenta serios problemas de implementação devido à redução contínua das taxas de filtração.

-A recuperação do material celular por decantação ou centrifugação (18,19) e a posterior reciclagem no fermentador. A centrifugação é uma técnica cara e apresenta problemas em operações asséticas.

-A imobilização das células no interior do fermentador usando técnicas de imobilização ativas ou passivas a fim de evitar sua perda junto ao efluente (6,9,20,31,40).

As técnicas de imobilização de células visam a agregação destas para formar uma estrutura definida, geralmente com o propósito de reter esta estrutura no interior do reator, aumentando grandemente a quantidade de massa celular presente no seu inte-

rior. Na fermentação convencional as células estão livremente suspensas e saem do fermentador junto com o efluente líquido; a técnica de imobilização impede que isto ocorra, uma vez que as partículas de biomassa imobilizadas são estacionárias, como num leite empacotado (33,78). A experiência demonstra que alguns microrganismos podem aderir-se espontaneamente sobre as superfícies a que estão em contato. Na escala industrial esta característica é aplicada na fabricação de vinagre e no tratamento biológico de águas residuárias. Em escala de laboratório e piloto tem sido estudado a produção contínua de cerveja, produção contínua de etanol, produção de ácidos cítrico e acético e desacidificação contínua de sucos de uva (10,24,26,53,56,69).

Em relação às aplicações existentes e potenciais dos sistemas com células imobilizadas podemos destacar as seguintes: tratamento de água e resíduos líquidos usando suportes como areia ou as chamadas "partículas de suporte de biomassa" (B.S.P.) (28); produção de etanol usando praticamente todas as técnicas conhecidas, incluindo B.S.P., suportes sólidos e diversos geis (9,45,59,78); inversão de açúcar; produção de ácido cítrico; produção de celulase usando K-carragena como suporte e produção de proteases e penicilina usando geis de poliácridamida (4,22,36).

A tecnologia de produção de células imobilizadas é mais cara do que a produção de células livres e por outro lado a agregação de células à forma de partículas de tamanhos de 3-6 mm resulta em serias limitações difusionais (8) mas apesar disto existem grandes vantagens no uso de células imobilizadas, como



grandes aumentos na produtividade dos reatores devido à alta concentração de massa celular, redução dos custos de produção, operação contínua com taxas de diluição superiores à taxa de lavagem (washout), produção contínua de metabólitos secundários (ácido cítrico, penicilina), rendimentos de produto superiores e de separação mais fácil, operação ininterrupta por longo tempo, e, finalmente, permite a operação não esteril devido às altas taxas de diluição que podem ser usadas (59).

Nos últimos 10 anos tem ocorrido a expansão e o melhoramento da tecnologia de imobilização de microrganismos através de 2 vias principais (8):

-Modificação dos reatores existentes visando melhorar seu desempenho pela aplicação de princípios da engenharia. Entre eles temos reatores de leito empacotado, leito fluidizado, reatores de mistura de ar e reatores de lamínas.

-Desenvolvimento de técnicas que permitem a imobilização de qualquer microrganismo (ou células de plantas), não somente aqueles que naturalmente formam filmes.

## 2.2. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO.

As principais técnicas de imobilização propostas para microrganismos podem ser divididas em duas categorias (8): ativas e passivas.

As técnicas ativas compreendem a aplicação de algum processo químico a fim de imobilizar as células. Como exemplo podem ser citadas as seguintes técnicas: tratamento prévio das células e utilização sem suporte, inclusão em gel (principalmente polia-

crilamida), fixação em suporte sólido tanto por ligações covalentes como por adsorção em superfícies modificadas, sendo esta última a técnica mais fácil para ser implementada (1,2,12,21,24,30,74).

O uso destas técnicas permite reduzir grandemente os custos de produção em relação aos processos com células livres. NAVARRO e DURAND (54) trabalhando em fermentação alcoólica conseguiram fixar células de *Saccharomyces uvarum* usando a técnica de ligação covalente em esferas de sílica aminadas. Embora a maioria das técnicas ativas de imobilização sejam usadas em escala de laboratório, existem duas grandes plantas piloto (59) em funcionamento para produção de etanol a partir de melaço. Elas são a KYOWA HAKKO KOGYO que usa células de *S. cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato e a JGC CORPORATION que usa células de *Saccharomyces* sp. imobilizadas em lâminas de resinas foto reticuláveis (5) empacotadas num reator de fluxo paralelo, resultando numa concentração de levedura de 40-50 (g/L) e produtividades de 12-18 (g/L-h).

As técnicas passivas promovem a formação espontânea de filmes ou flocos de microrganismos uma vez que somente alguns microrganismos tem a propriedade de formar filmes estáveis como *Acetobacter* na produção de ácido acético ou culturas mistas no tratamento biológico de resíduos. Suportes comuns para eles são materiais inorgânicos, serragem de madeira e material plástico. A fim de melhorar a taxa volumétrica de reação química destes fermentadores, recentemente vem sendo desenvolvidos suportes de tamanho menor, conseguindo um aumento na superfície específica e

consequentemente um aumento na area total disponivel para crescimento de filmes. Esta técnica está sendo usada com sucesso em reatores fluidizados para tratamento de residuos, usando como suporte partículas de areia de 0,6-1,0 mm de diâmetro, conseguindo-se areas específicas de até 3000 (m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>) e concentrações de biomassa de até 27 (Kg/m<sup>3</sup>) (13).

Recentes desenvolvimentos visam a produção de novos suportes (6,9) que permitem ser ocupados por uma grande variedade de microrganismos, com controle da espessura da camada biológica, um parâmetro importante para a quantificação ou predição do comportamento do fermentador. Estas "partículas de suporte de biomassa" (B.S.P.) são estruturas porosas de tamanho selecionado atingindo até 97% de porosidade (8). Os poros estão intercomunicados devido ao processo de fabricação diminuindo assim as resistencias difusionais. Estes suportes são normalmente fabricados de espuma de poliuretano ou esponjas elaboradas a partir de fios de aço inox, que podem ser ocupadas por uma ampla variedade de células, caso notável das células de levedura que ocupam rapidamente o interior destas partículas porosas. Para cubos de espuma de poliuretano e para esponjas de aço inox são conseguidas retenções de leveduras de 39,1 e 63,6 gramas de materia seca por litro respectivamente (8).

NAVARRO (53) estudou para diversos suportes naturais e sintéticos a massa seca retida da levedura *Saccharomyces uvarum* obtendo os melhores resultados com aparas de madeira e de PVC, atingindo valores de 248 e 80 mg/g de suporte respectivamente. Nestes processos com células imobilizadas pode-se atingir a fer-

mentação do meio a 12<sup>o</sup> Plato num tempo de residência de 90 minutos, resultando numa capacidade de produção de três volumes de reator por dia, em contraste com os processos utilizados tradicionalmente cuja produção diária é de 1/4 de volume de reator.

### 3. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTÍNUA.

A fermentação alcoólica contínua permite o controle eficiente do metabolismo dos microrganismos, assim como melhor produtividade uma vez que a duração total da fermentação é reduzida pela supressão do tempo de latência e também porque segundo MORENO (46) na operação em regime estacionário, a taxa de síntese de compostos celulares é regulada. Estes resultados não podem ser obtidos em regime descontínuo devido às mudanças fisiológicas das células. O reator tubular é mais eficiente que o quimostato (CSTR) para os mesmos tempos de residência, devido ao elevado poder inibitório do etanol na sua própria produção. Com uma cascata de reatores CSTR pode-se separar as diferentes etapas fisiológicas da fermentação alcoólica e conseqüentemente simular o funcionamento de um reator tubular, otimizando a utilização do equipamento e diminuindo o tempo necessário para o estabelecimento do regime permanente.

As novas tecnologias visam aumentar a concentração de massa celular no reator e diminuir o efeito inibitório do etanol a fim de conseguir maiores rendimentos de etanol e produtividade do sistema (17,35,41,50,67,68).

Para aumentar a concentração de massa celular existem

processos de reciclagem de células por centrifugação ou decantação, separação no interior do reator por filtração em membranas e retenção do material celular por imobilização ou decantação interna (23,25,42,49,57,70,75,76). Existem em operação processos contínuos usando a técnica de centrifugação como o desenvolvido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (11) e o desenvolvido pelas empresas Vogelbush e Speichem (5), que atingem produtividades de 4-6 e 3-8 (g/L-h) respectivamente. Baseados na técnica de imobilização celular existem dois processos, o desenvolvido pela empresa KYOWA HAKKO KOGYO Co. (49) em escala piloto e o processo da JGC em escala industrial, que atingem produtividades de 20 e 12-18 (g/L-h) respectivamente.

A fim de minimizar o poder inibitório do etanol foram desenvolvidos processos extrativos que visam retirar o etanol na medida que é produzido, como fermentação a vácuo, extração por solvente e destilação contínua a vácuo (5,17,41,63) destacando-se o processo Biostil desenvolvido pela empresa ALFA LAVAL que atinge produtividades de 8-10 (g/L-h). A inibição do etanol pode também ser diminuída usando uma série de reatores a fim de realizar uma parte da fermentação em presença de baixas concentrações de etanol, resultando em aumentos da produtividade e rendimento em sistemas de reatores múltiplos. GHOSE e TYAGI (25) encontraram que usando 2 reatores iguais em série, o volume total de reatores é 58% menor que usando um reator.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. MATERIAL

##### 1.1. MICROORGANISMO

Foi usada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* IZ 888 fornecido pelo Instituto Zimotécnico da ESALQ de Piracicaba conservada em câmara fria à 5°C em meio PDA (Potato-dextrose-agar) inclinado em tubo de ensaio, sendo periodicamente repicado.

##### 1.2. CONDIÇÕES DA CULTURA

Baseado em resultados preliminares, foram seleccionadas as seguintes condições de cultura:

Temperatura ótima de fermentação: 33-34°C.

pH ótimo do meio de cultura: 4,0-5,0.

### 1.3. MEIOS DE CULTURAS

#### 1.3.1. Meio de cultura usado para preparo dos inóculos.

O meio usado para preparação dos inóculos foi o seguinte:

Glicose -----	20,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ -----	5,0 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$ -----	1,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,7 g
KCl -----	1,2 g
Extrato levedura -----	5,0 g
Água de torneira q.s.p. --	1,0 L
pH -----	6,0

O pH do meio de cultura para os inóculos foi ajustado com ácido fosfórico concentrado.

#### 1.3.2. Meio de cultura usado para estudar o efeito da concentração de extrato de levedura da BIOBRAS (MEIO 1).

O meio de cultura usado para as diversas fermentações em batelada tinha a seguinte formulação:

##### MEIO 1.

Sacarose comercial -----	200,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ -----	5,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -----	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0,4 g
Extrato de levedura -----	variável
Água de torneira q.s.p. --	1,0 L
pH -----	5,0

A concentração de extrato de levedura foi variada entre 0,5 e 5,0 g/L e o pH inicial dos meios foi ajustado a 5,0 usando ácido fosfórico concentrado.

1.3.3. Meios de cultura usados para estudar o efeito da concentração dos sais minerais (MEIOS 2,3,4).

Os meios 2,3,4 foram formulados sucessivamente com teores maiores de fosfato e nitrogênio, a fim de estudar o efeito na fermentação alcoólica.

#### MEIO 2.

Sacarose comercial	-----	200,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-----	3,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-----	14,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-----	2,0 g
Extrato de levedura	-----	1,0 g
Água de torneira q.s.p.	---	1,0 L
pH	-----	5,0

Este meio foi formulado através de cálculos estequiométricos baseados na composição média de células de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas por RIVIERE (64) assumindo um rendimento celular Y<sub>x/s</sub> de 0,2 (g/g). A composição das células de levedura em base seca é a seguinte:

Carbono	-----	47,0 %
Nitrogênio	-----	7,5 %
Fósforo	-----	1,5 %
Magnésio	-----	0,5 %



### MEIO 3.

Sacarose comercial	-----	200,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	-----	10,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-----	25,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-----	2,0 g
Extrato de levedura	-----	1,0 g
Água de torneira q.s.p.--		1,0 L
pH	-----	5,0

### MEIO 4.

Sacarose comercial	-----	200,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	-----	20,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-----	50,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-----	2,0 g
Extrato de levedura	-----	1,0 g
Água de torneira q.s.p.--		1,0 L
pH	-----	5,0

1.3.4. Meio de cultura usado para fermentação contínua.

### MEIO 5.

Sacarose comercial	-----	150,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ comercial	-----	2,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ comercial	-----	10,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-----	1,5 g
Extrato de levedura	-----	1,0 g
Água de torneira q.s.p.--		1,0 L
pH	-----	5,0

A este meio foi acrescentado antiespumante da CARLO ERBA (silicone) numa dosagem de 3 gramas para 1000 litros de meio de cultura. Também foi adicionado o bactericida comercial BUSAN 887 (Buckman Laboratórios Ltda.) derivado do tiazol e de baixa toxicidade a fim de evitar a proliferação de bactérias durante a fermentação contínua. Usou-se uma dose de 30 ppm repartida em duas aplicações, 15 ppm logo após o resfriamento do meio e 15 ppm no frasco de alimentação do fermentador contínuo.

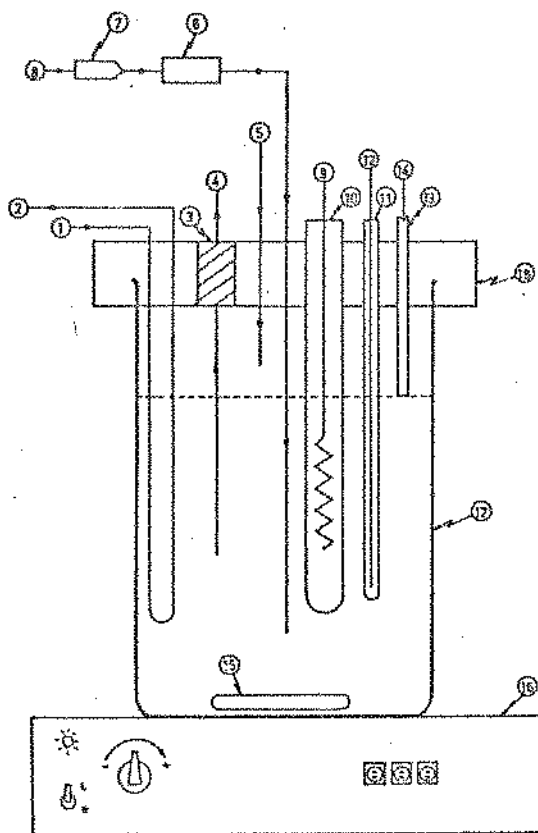
#### 1.4. SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS.

Trabalhos prévios realizados no Laboratório de Bioengenharia (FEA-UNICAMP) permitiram selecionar entre 12 tipos diferentes de material de suporte, a esponja de polietileno uma vez que ela apresentou as melhores características de retenção celular, aliadas ao baixo volume ocupado no interior do reator e à facilidade de manuseio. Inicialmente foram testados blocos de esponja maciça para a imobilização das células, mas o arraste provocado pelo funcionamento das bombas de recirculação interna impediram uma boa retenção celular. Alguns pesquisadores (6,9) usaram leitos empacotados de cubos de material poroso (poliuretano, polietileno, etc) ou esferas porosas de aço inox com a finalidade de fornecer às células um ambiente permeável e protegido do atrito provocado pelo escoamento, a fim de que elas possam se desenvolver, ocupando o interior dos cubos. Assim sendo, neste trabalho foram usados cubos de 5x5x5 milímetros cortados a partir de esponja de polietileno comercial de alta densidade (35,3 g/L), como material de empacotamento dos reatores. Para

cada fermentador usou-se 24,7 gramas (700 mL) de esponja de polietileno em forma de cubos (1350 mL) compactados entre duas placas perfuradas, espaçadas 21 cm uma da outra, o que corresponde a um volume de leite de 1 litro. Esta configuração está representada na figura 5. A porosidade resultante do leite (voldage) foi de 30%. Os 70% restantes correspondem ao volume ocupado pelos cubos de polietileno. Esta porosidade de leite permitiu regular as bombas de recirculação interna, a fim de obter uma velocidade de escoamento intersticial de 1-2 (cm/s), suficiente para o reator apresentar bom comportamento hidrodinâmico sem comprometer a retenção celular.

## 1.5. FERMENTADORES

### 1.5.1. Mini fermentadores modelo M-1000 da New Brunswick de 1 L.



1. Entrada de água para resfriamento
2. Saída de água do resfriamento
3. Diafragma de borracha para introdução de seringas: inoculação, controle de pH, espuma, retirada de amostra
4. Retirada de amostra através de seringa
5. Entrada de meio (alimentação)
6. Filtro de ar com leito de lã de vidro
7. Rotâmetro
8. Linha de entrada de ar
9. Termostato
10. Tubo pirex para termostato
11. Falso pirex para termômetro
12. Termômetro
13. Falso pirex para saída de meio fermentado
14. Linha de saída de meio fermentado
15. Agitador magnético
16. Base do fermentador
17. Vaso pirex 1000 ml
18. Tampa

Fig. 1. Esquema do mini-fermentador modelo M-1000.

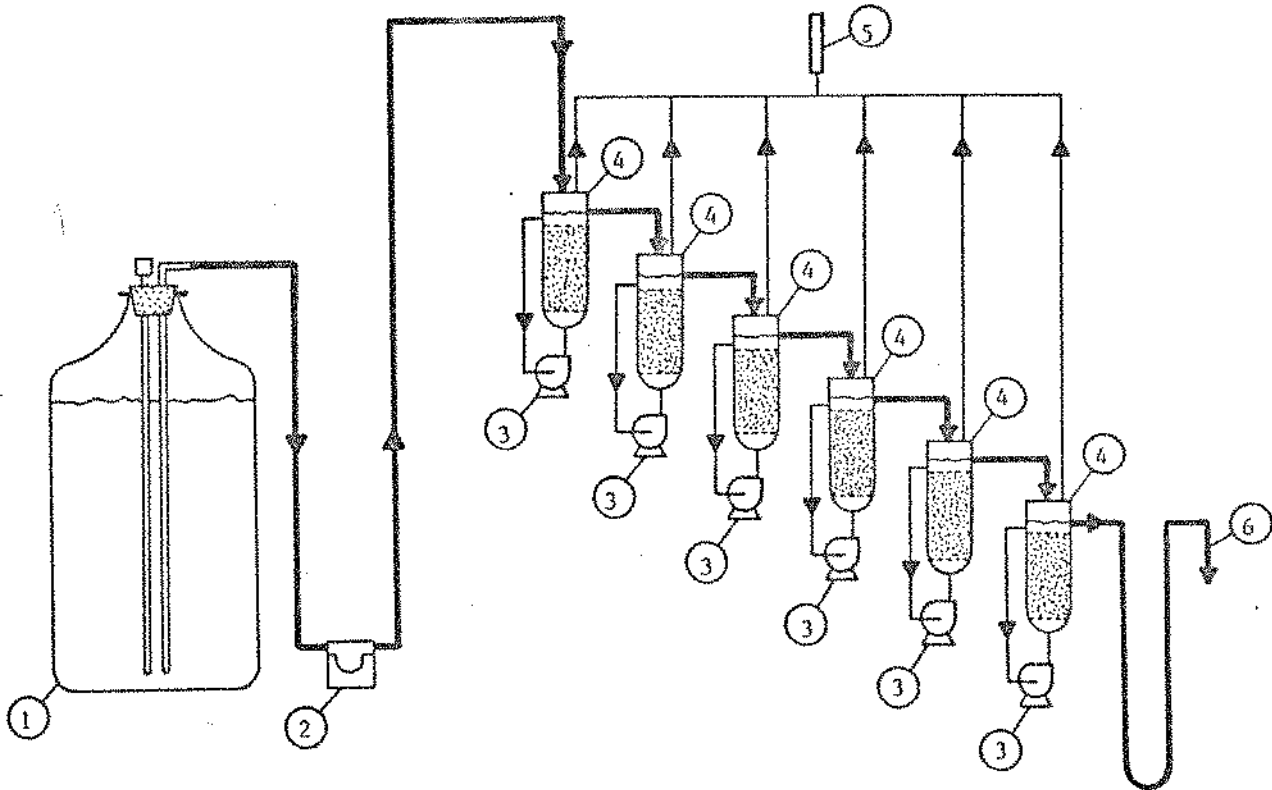
1.5.2. Fermentador piloto de 250 L da Fermentation Design.

1.5.3. Fermentador Chemap de 15 L.

1.5.4. Fermentador múltiplo-estagio.

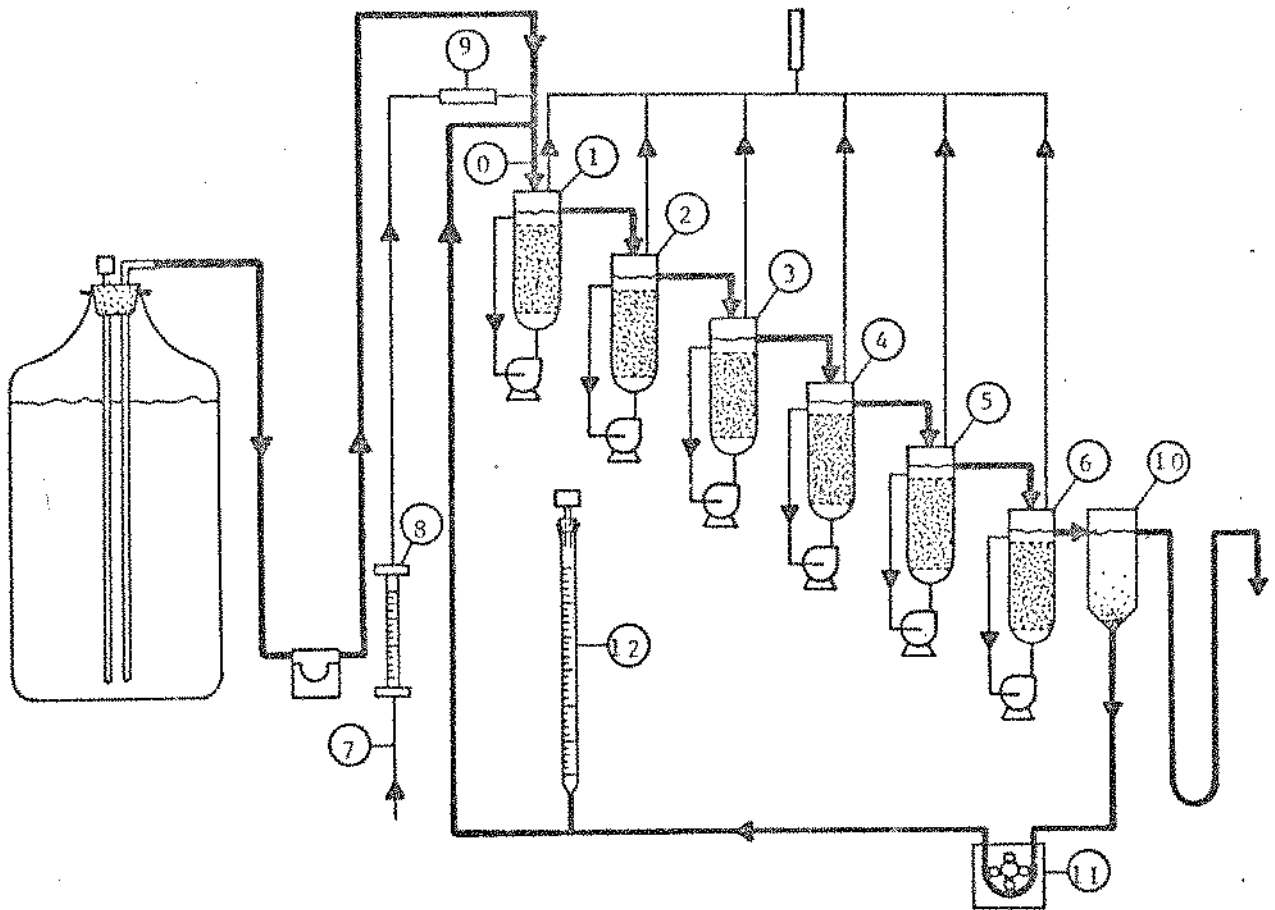
A primeira fermentação contínua foi realizada no fermentador apresentado na figura 2 que corresponde ao caso de células imobilizadas sem reciclo. As fermentações contínuas posteriores foram realizadas no fermentador representado nas figuras 3 e 4 que correspondem aos casos de células imobilizadas com reciclo.

Detalhes de um fermentador estão representados na figura 5, e na figura 6 está representada uma vista detalhada do material celular retido no interior do fermentador. O decantador usado para reciclagem do material celular está representado na figura 7.



- 1.- Reservatório.
- 2.- Bomba de alimentação (diafragma).
- 3.- Bombas de reciclo de meio (centrífugas).
- 4.- Reatores.
- 5.- Saída de gas.
- 6.- Saída de meio.

**Fig. 2. Sistema de fermentadores usados para fermentação contínua com células imobilizadas sem reciclagem.**



- 0.- Alimentação do primeiro reator.
- 1,2,3,4,5,6.- Reactores.
- 7.- Entrada de ar.
- 8.- Rotâmetro.
- 9.- Filtro de ar.
- 10.- Decantador.
- 11.- Bomba de reciclo de células (peristáltica).
- 12.- Bureta.

Fig. 3. Sistema de fermentadores usados para fermentação contfua com células imobilizadas com reciclagem.

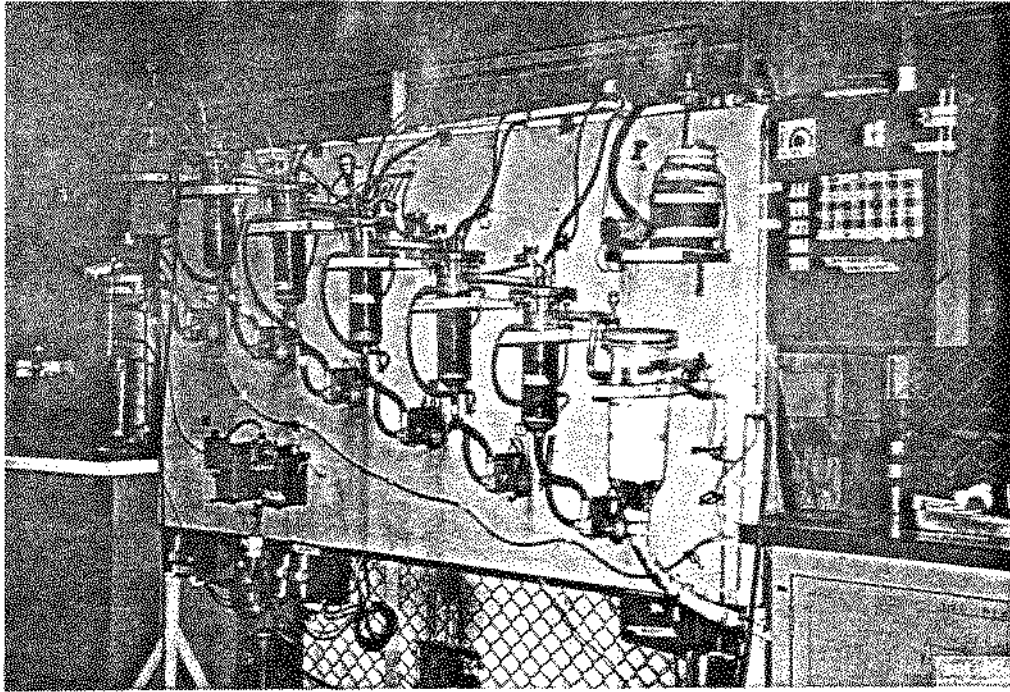


Fig. 4. Fermentador contínuo multiestagio.

## 2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.

### 2.1. PREPARO DO INÓCULO

Erlenmeyers de 250 mL aletados contendo 100 mL de meio para preparo do inóculo, foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos, resfriados a 30°C, inoculados com uma alçada da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* IZ 888 e incubados a 33°C por 24 horas. Estes inóculos foram usados nas fermentações contínuas e descontínuas.

### 2.2. FERMENTAÇÕES DESCONTÍNUAS.

Foram usados mini-fermentadores contendo 700 mL dos diversos meios de cultura. Foram esterilizados, resfriados e inoculados com um volume de inóculo previamente preparado, equivalente a 5% do volume do meio de cultura. As fermentações foram mantidas a 33°C, sob agitação por barra magnética e sem aeração.

Para o estudo do efeito do extrato de levedura foram preparados 5 mini-fermentadores contendo o meio 1 com concentrações de extrato de levedura variando entre 0,5 e 5,0 g/L. Para o estudo do efeito da concentração dos sais minerais foram usados os meios 2,3,4.



### 2.3. ESTERILIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS USADOS PARA FERMENTAÇÃO CONTÍNUA.

A esterilização de todos os equipamentos do sistema (frasco Mariotte, mangueiras, bombas, filtros, reatores, etc.) foi feita com gás esterilizante (mistura de monóxido de etileno 20% + dióxido de carbono 80%). O processo iniciou-se com aplicação de vácuo no sistema (25-40 cm. de Hg) para logo injetar o gás esterilizante até atingir a pressão atmosférica, tomando especial cuidado para que entrasse em contato com todas as partes do sistema. Este processo foi repetido varias vezes, fazendo-o borbulhar intensamente, antes da entrada na bomba de vácuo, numa solução concentrada (4M) de ácido sulfúrico a fim de eliminar o seu elevado poder tóxico. Deixou-se o gás escoar durante 3 horas no interior do fermentador, fechou-se então o sistema e deixado em contato com o gás por 24 horas. Finalmente injetou-se ar filtrado durante 1 hora, fazendo borbulhar o gas de saída na solução de ácido sulfúrico.

### 2.4. FERMENTAÇÃO CONTÍNUA MULTIESTAGIO.

Foram feitos 2 estagios de pré-fermentação na preparação do inóculo para a operação contínua. A primeira pré-fermentação foi realizada nos mini-fermentadores contendo 600 mL do seguinte meio de cultura, previamente esterilizado a 120°C por 15 minutos em autoclave, resfriado e inoculado num volume equivalente a 10% do volume de meio.

Glicose -----	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	3 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	14 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O -----	2 g
Extrato levedura -----	5 g
Água torneira q.s.p. ----	1 L
pH -----	5

Foi adicionado antiespumante (3g/1000 L) e submetido a aeração de 0,5 VVM durante 24 horas a 33°C.

A segunda pré-fermentação foi realizada diretamente no fermentador multiestagio previamente esterilizado com monóxido de etileno. Continha 7500 mL do seguinte meio de cultura:

Sacarose -----	150,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	5,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	26,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O -----	3,8 g
Extrato levedura -----	5,0 g
Água torneira q.s.p. ----	1,0 L
pH -----	5,0

Este meio foi previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos num fermentador Chemap, resfriado, transferido asseticamente ao fermentador multiestagio, para logo ser inoculado com a totalidade do volume obtido na primeira pre-fermentação (600 mL). Foi adicionado antiespumante e submetido a aeração de 0,25

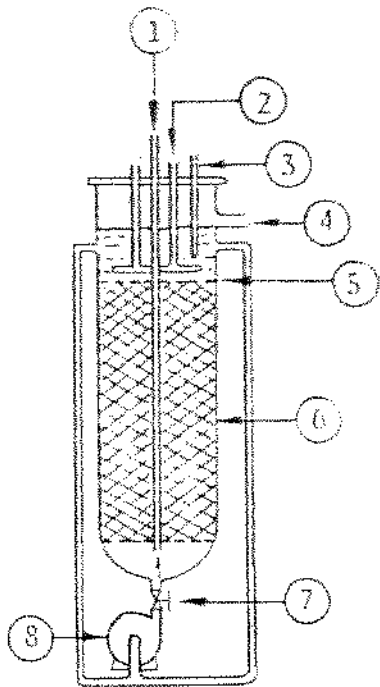
VVM por 12 horas durante um período total de fermentação de 24 horas. A temperatura do sistema foi 33°C. Após o término desta segunda pré-fermentação deu-se início à fermentação contínua, usando o meio 5 previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos num fermentador piloto da Fermentation Design de volume 200 litros.

A temperatura de operação para todos os casos foi de 33 ± 1°C, controlada mediante o uso de serpentinas de aquecimento ou resfriamento comandadas por um sistema automático de controle. Os fermentadores estiveram submetidos a uma ligeira pressão interna variando entre 5 e 30 cm de coluna de água, como consequência da geração de CO<sub>2</sub>. Esta leve pressurização teve como objetivo evitar os problemas de contaminação externa.

A primeira fermentação contínua foi realizada no fermentador apresentado na figura 2 que corresponde ao caso de células imobilizadas sem reciclo.

Para o caso de células imobilizadas com reciclo (com ou sem aeração) foi usado o sistema apresentado anteriormente adicionado dos dispositivos necessários para aerar o primeiro fermentador e para reciclar as células do último fermentador sendo representado nas figuras 3 e 4.

Os seis fermentadores são idênticos estando um deles representado em detalhes na figura 5a e b.



(a)



(b)

- 1.- Entrada.
- 2.- Serpentina.
- 3.- Sonda para termômetro.
- 4.- Saída.
- 5.- Placa perfurada.
- 6.- Leito de cubos de esponja.
- 7.- Válvula de estrangulamento.
- 8.- Bomba de reciclo interno.

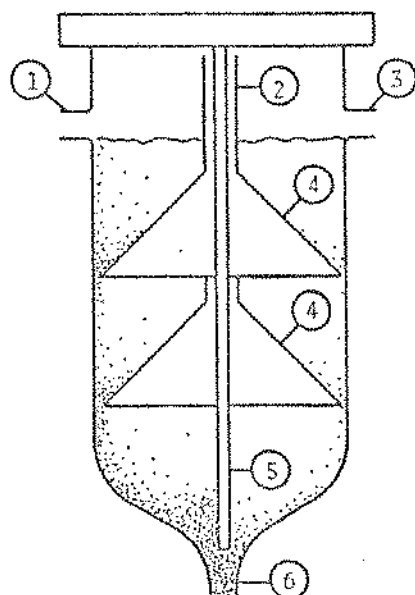
Fig. 5. Detalhes (a) e fotografia (b) de um fermentador com células imobilizadas.

Na figura 6 podemos ver o aspecto apresentado pelo material celular retido no primeiro fermentador.



Fig. 6. Células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em suporte poroso.

O decantador usado foi resfriado externamente por meio de uma serpentina na qual circulava uma mistura hidroalcoólica, numa temperatura de 0-5°C a fim de diminuir a atividade fermentativa. O esquema do decantador está representado na figura 7.



- 1.- Saída reator nº 6.
- 2.- Tubo coletor de CO<sub>2</sub>.
- 3.- Efluente.
- 4.- Decantadores internos.
- 5.- Placa divisória.
- 6.- Linha de reciclo.

Fig. 7. Decantador usado para reciclagem de células.

Para o caso de células livres com reciclo foi usado o mesmo sistema apresentado na figura 3 sendo retirado somente o empacotamento de todos os fermentadores.

### 3. MÉTODOS ANALÍTICOS.

#### 3.1. CONCENTRAÇÃO DE MASSA CELULAR LIVRE.

Nas fermentações contínuas e descontínuas, a concentração de massa celular livre foi determinada mediante leitura da absorbância a 600 nm das amostras convenientemente diluídas, num espectrofotômetro Spectronic 20 da Bausch & Lomb, usando meio de cultura diluído como branco para calibração do aparelho.

Foi construída uma curva padrão de Massa Seca em função da Absorbância, tomando uma amostra de 500 mL do efluente do fermentador, filtrando-a em membrana Millipore de 1,2 microns e levada a secar em estufa a vácuo a 60°C por 24 horas. Obteve-se assim a concentração de massa seca presente no efluente. Paralelamente, preparou-se diluições sucessivas com água destilada (1:100 até 10:100) do mesmo efluente e mediu-se a absorbância de cada uma delas. A partir da concentração de massa seca do efluente obtida por filtração e secagem, foi determinada indiretamente a concentração da massa seca correspondente a cada diluição. Com os valores assim obtidos foi construída a curva padrão (fig. 8) para determinação da concentração de massa seca em função da absorbância, resultando num coeficiente de correlação de 0,999.

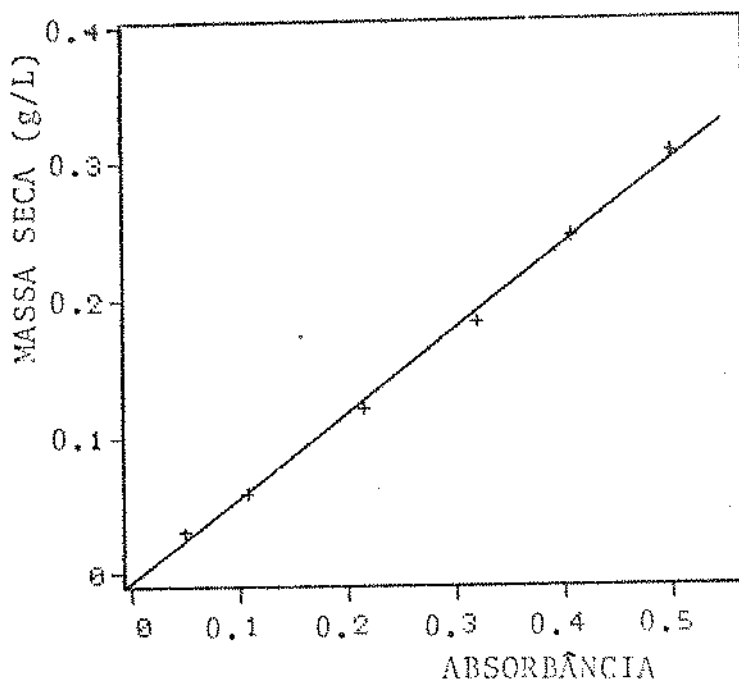


Fig. 8. Curva padrão de concentração de massa celular seca (X) em função da absorbância (A).

### 3.2. CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO.

A concentração de substrato (S) foi avaliada pelo método do Acido Dinitrosalicílico (DNS) (43), após previa centrifugação, hidrólise ácida e diluição adequada das amostras, sendo o substrato expresso na forma de Açúcares Redutores Totais (ART). A partir de soluções de sacarose previamente hidrolizadas e convenientemente diluidas, foram preparadas curvas padrões de concentração de substrato em função da absorbância medida a 540 nm num espectrofotômetro Spectronic 20 da Baush & Lomb.



### 3.3. CONCENTRAÇÃO DE ETANOL.

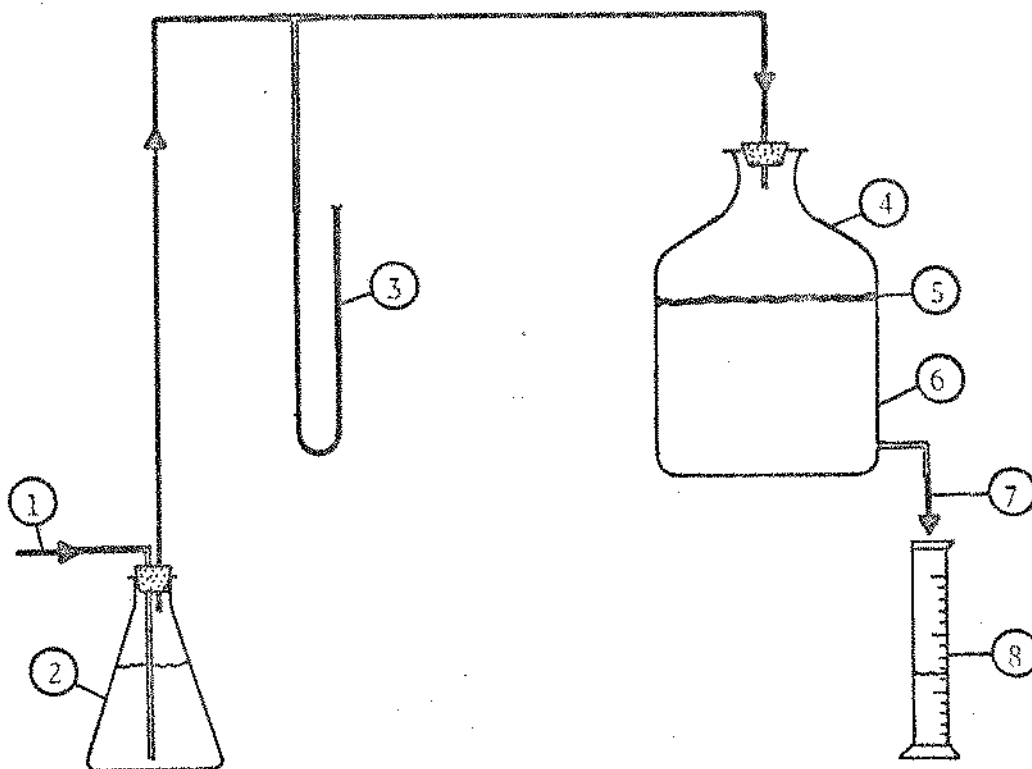
Foi realizada por cromatografia gasosa num cromatógrafo Instrumentos Científicos C.G. Ltda. modelo 37-D provido de detector por ionização de chama. Um volume de 1 mL das amostras previamente centrifugadas foi misturado com 1 mL de uma solução de butanol de 40 g/L (padrão interno) e logo injetadas no cromatógrafo, usando nitrogênio como gas de arraste. As temperaturas de operação do injetor, coluna e detector foram 225°C, 115°C e 175°C respectivamente. Foi utilizada uma pré-coluna em aço inox seguida de uma coluna cromatográfica em aço inox com diâmetro de 1/8" e 3,5 m de comprimento recheada com 6% carbowax 20m sob Chromosorb W. Sil.

Para cada início de operação do cromatógrafo era feita uma curva padrão, usando concentrações conhecidas de etanol e butanol como padrão interno.

### 3.4. VAZÃO DE CO<sub>2</sub>.

O gas gerado pelo sistema foi borbulhado numa solução de ácido sulfúrico concentrado para desumidificá-lo e coletado em seguida num frasco de vidro que, ao mesmo tempo, libera uma quantidade de água correspondente ao volume de CO<sub>2</sub> coletado. Desta forma foi possível determinar o volume de CO<sub>2</sub> produzido. O sistema possui ainda uma compensação manual da pressão interna a fim de não alterar a pressão de armazenamento do CO<sub>2</sub> e consequentemente o volume de água deslocada. Para evitar a difusão do CO<sub>2</sub> na água foi colocado óleo mineral no interior do frasco,

formando um filme impermeabilizante de aproximadamente 1 mm de espessura. Na figura 9 está representado este sistema.



- 1.- Entrada de gás.
- 2.- Solução de ácido sulfúrico.
- 3.- Vacuômetro (tubo em U).
- 4.- Câmara de CO<sub>2</sub>.
- 5.- Filme de óleo mineral.
- 6.- Reservatório com água.
- 7.- Compensador manual.
- 8.- Proveta.

Fig. 9. Sistema usado para medir a vazão de CO<sub>2</sub>.

### 3.5. MASSA CELULAR RETIDA NO SUPORTE.

Após o termino da fermentação contínua com células imobilizadas foram retirados individualmente os suportes de cada fermentador, deixando-os escorrer durante meia hora. Em seguida o

suporte foi colocado cuidadosamente num volume conhecido de água e por compressão manual o material celular foi retirado passando do suporte à solução. Tomou-se um volume conhecido desta solução e filtrou-se através de membrana Millipore de 1,2 microns. A membrana foi secada a vácuo por 24 horas, a 60°C. A partir da massa seca obtida e a relação entre os volumes inicial e volume filtrado determinou-se a massa celular total retida no suporte. Considerando que o volume de leite é de 1 litro, a concentração de massa celular no suporte (g/L) tem o mesmo valor que a massa celular total.

### 3.6. VIABILIDADE CELULAR.

A determinação da viabilidade celular é baseada na adsorção de um corante (no caso azul de metileno) pelas células mortas de levedura. O método baseia-se na contagem de células ao microscópio numa câmara de Neubauer (hemacitômetro) de uma solução convenientemente diluída a fim de que cada quadrado da câmara contenha de 80 a 160 células. Foi utilizado o método microscópico desenvolvido por LEE e col. (38) dada sua rapidez, simplicidade e sobretudo pela boa manutenção da viabilidade celular, devido à formulação da solução de azul de metileno especificamente desenvolvida para células de levedura.

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Preliminarmente aos experimentos de fermentação contínua, foram realizados estudos do comportamento hidrodinâmico do reator, descritos em detalhes no Anexo 1, e de otimização do meio de cultura, Anexo 2. Resumidamente, podemos dizer que a configuração final de cada reator (fig. 5) tem características de um reator de mistura (CSTR), com 89% de volume útil e cujo modelo hidrodinâmico está representado na figura 39. Em relação à otimização do meio de cultura, chegou-se a formulação expressa no item 1.3.4 (meio 5) de Materiais e Métodos. Esta formulação foi obtida após estudos em batelada com os meios 1, 2, 3 e 4 igualmente descritos em Materiais e Métodos.

Um dos principais problemas na fermentação contínua é a verificação do estabelecimento do regime permanente. Neste sentido foi realizado um estudo sistemático de determinação de estado estacionário, usando a produção de  $CO_2$  como parâmetro de avaliação, metodologia descrita em detalhes no Anexo 3 e na figura 9. Concluiu-se que o regime estacionário fica estabelecido após uma operação equivalente a 1,075 vezes o tempo de residência do sistema.

## 1. FERMENTAÇÃO MULTIESTAGIO USANDO CÉLULAS LIVRES COM RECÍCLO.

Como uma etapa preliminar do trabalho, utilizou-se o sistema sem os suportes de imobilização, a fim de se obterem dados que servirão como pontos de referência para o processo com células imobilizadas.

### 1.1. INFLUENCIA DA TAXA DE DILUIÇÃO.

Foi estudado o efeito da taxa de diluição sobre a concentração de massa seca, substrato e etanol, para várias fermentações no sistema multiestagio, usando o esquema representado na figura 3 sem o suporte. A vazão de reciclo foi mantida constante durante o experimento, variando-se somente a vazão de alimentação de meio e conseqüentemente a taxa de diluição.

#### 1.1.1. Condições de operação do sistema.

A taxa de diluição para cada fermentador está definida da seguinte forma:

$$D = \frac{F_f + F_r}{V} = \frac{F}{V} \quad (4.1)$$

Foram usadas 4 taxas de diluição diferentes, variando entre 0,37- 0,953 h<sup>-1</sup>. A vazão de reciclo foi mantida aproximadamente constante, entre valores de 85-100 mL/h e a vazão de alimentação foi variada entre 384 e 1115 mL/h. O volume de cada fermentador é de 1275 mL.

1.1.2. Resultados experimentais.

a) Evolução das concentrações de massa seca, substrato e etanol no sistema para diversas taxas de diluição.

Na figura 10 podemos observar os perfis de massa seca, substrato e etanol gerados no fermentador multiestágio para diferentes taxas de diluição. Nas abcissas estão representados os reatores, sendo que o 0 representa a alimentação do primeiro estágio e o 6 o último estágio.

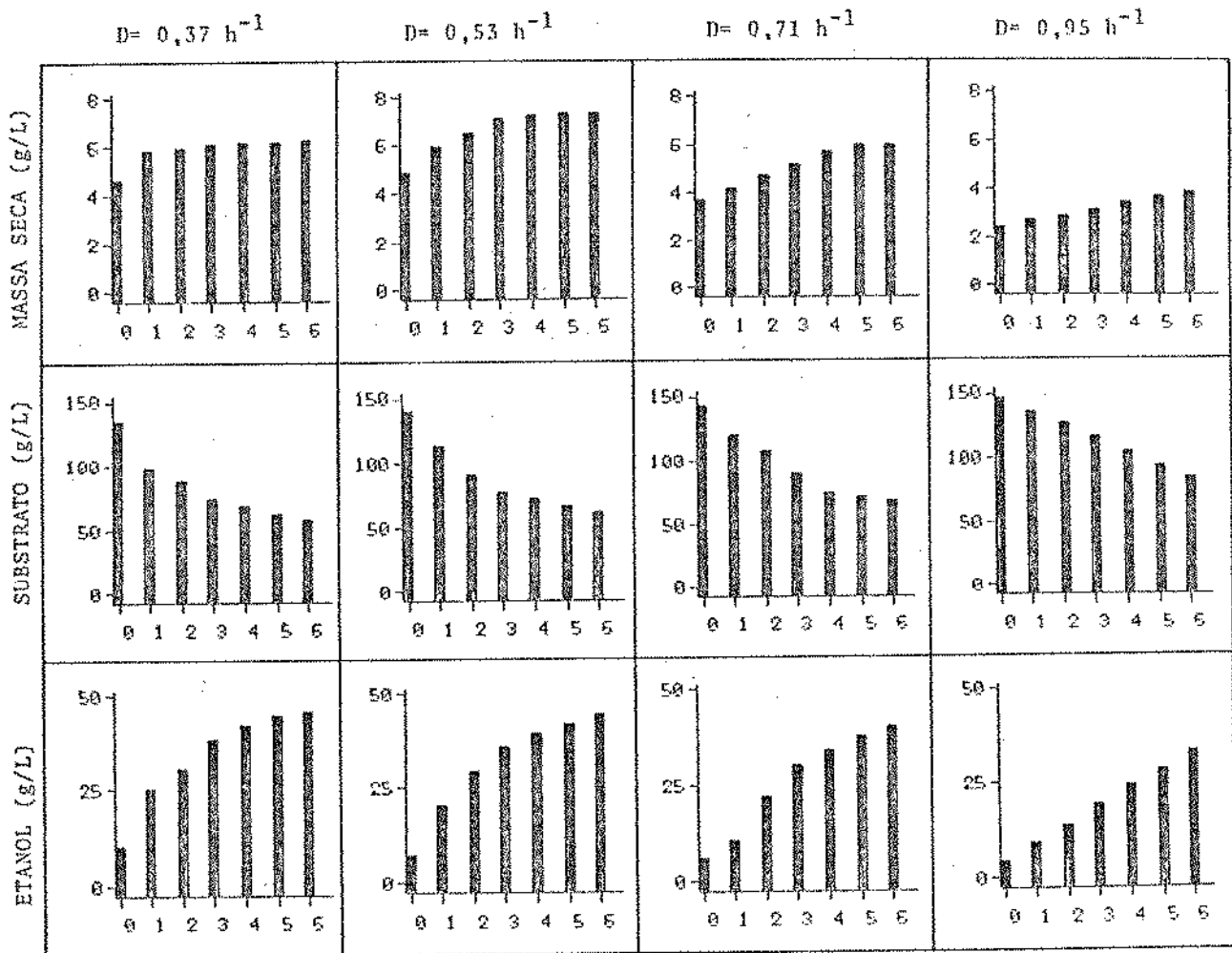


Fig.10. Perfis de concentrações de massa seca, substrato e etanol para diversas taxas de diluição.

Na figura 10 pode-se observar que, de um modo geral, a concentração de massa celular aumenta na medida em que o meio vai passando de um fermentador para outro, sendo este aumento maior nos primeiros estagios, devido à baixa concentração de etanol e conseqüentemente ao leve poder inibitório, favorecendo a taxa específica de crescimento.

Pode ser observado no caso da taxa de diluição menor ( $D= 0,37 \text{ h}^{-1}$ ) que a partir do terceiro fermentador praticamente a massa celular não mais aumenta, implicando nestes casos que a taxa específica de crescimento observado é nula, resultado de uma forte inibição pelo etanol.

Podemos ainda ver na figura 10 que embora tenhamos taxas específicas de crescimento observadas proximas a zero ou negativas, a produtividade de etanol em todos os fermentadores é sempre positiva, o que pode ser visualizado pelo aumento permanente da concentração de etanol na medida que o meio se desloca de um fermentador a outro. Isto denota a presença de células ativas e em reprodução - se se considerar que o álcool só é produzido por células proliferantes - apesar da massa celular estar estacionária. Desta forma um equilíbrio entre células em crescimento e células que morrem deve estar ocorrendo nesses reatores.

Devido à morte celular para baixas taxas de diluição nos últimos fermentadores, podemos esperar valores de rendimento celular decrescentes ao longo dos fermentadores, atingindo valores nulos ou negativos nos últimos estagios do sistema. Também podemos ver que a partir da terceira taxa de diluição ( $D=0,711 \text{ h}^{-1}$ ) temos perfís de massa seca e etanol associados. No caso de  $D=$

$0,953 \text{ h}^{-1}$ , ambos perfis apresentam um comportamento linear o que indica que nestas altas taxas de diluição as taxas específicas de crescimento celular são muito superiores às de morte celular. Isto deverá trazer como consequencia rendimentos celulares maiores e similares em cada fermentador.

Por outro lado, os perfis de substrato e etanol apresentam comportamento mais regular, evidenciando que o etanol é produzido numa proporção constante, na medida que o substrato é consumido. Isto indica que os valores de rendimento alcoólico deverão ser aproximadamente constantes para os diversos fermentadores e taxas de diluição. Também pode ser visto que em todos os casos estudados, as maiores mudanças de concentração de massa seca, substrato e etanol ocorrem no primeiro reator, motivo pelo qual teremos nele as maiores velocidades de reação. Isso se deve principalmente à baixa inibição exercida pelo etanol e em menor grau pela maior disponibilidade de nutrientes.

b) Efeito da taxa de diluição nas concentrações de massa seca, substrato e etanol em cada fermentador.

Para uma melhor visualização colocamos na figura 11 para cada reator em separado, a influencia da taxa de diluição nas variáveis consideradas.



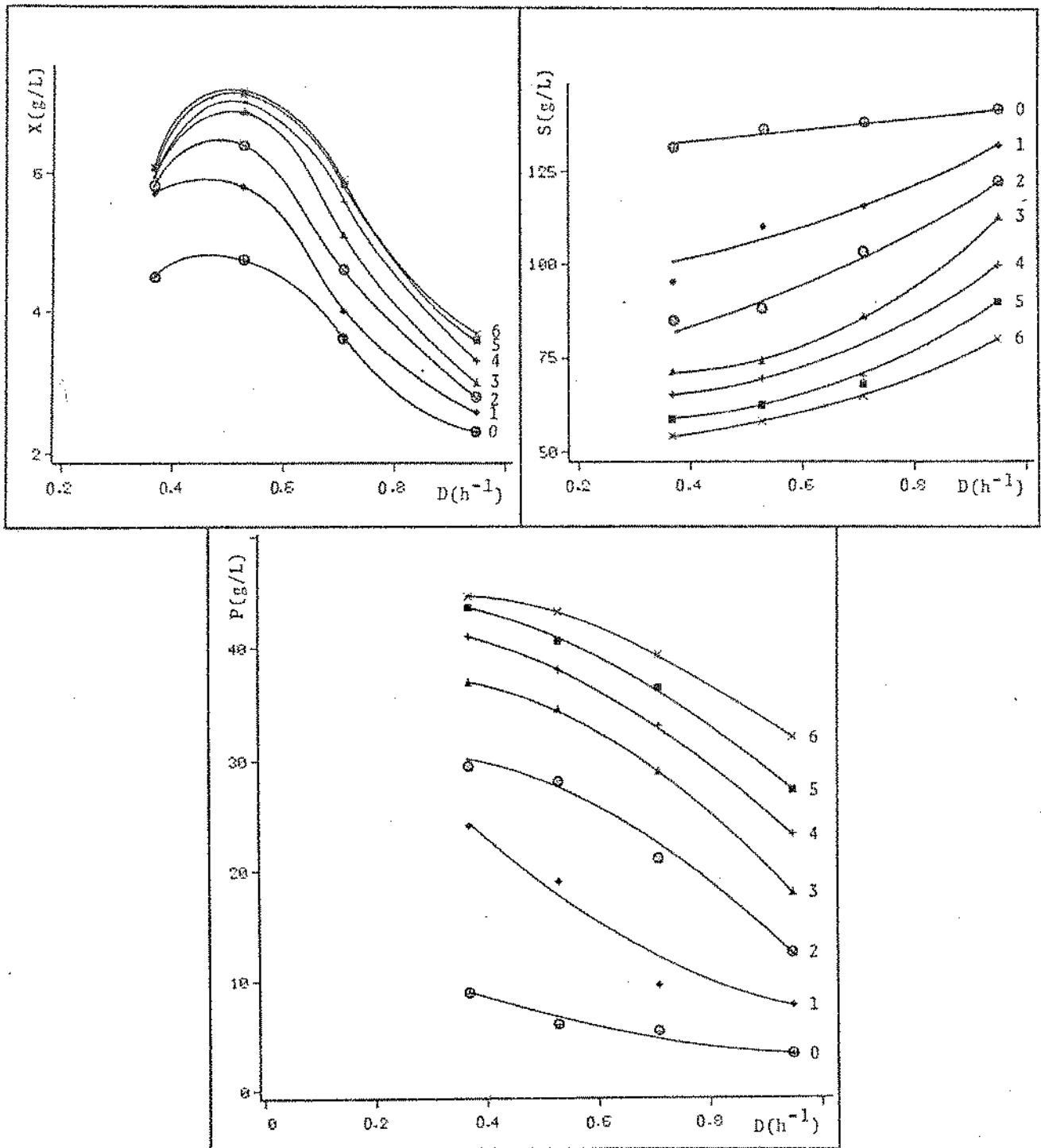


Fig. 11. Efeito da taxa de diluição ( $D$ ) na concentração de massa seca ( $X$ ), substrato ( $S$ ) e etanol ( $P$ ) em cada fermentador. Células livres com reciclo.

Pode-se observar pelo gráfico de massa seca em função da taxa de diluição que para valores de  $D$  menores que  $0,5 \text{ h}^{-1}$  há um processo de limitação nos primeiros estagios e de limitação e inibição pelo etanol nos estagios mais avançados, uma vez que as curvas que deveriam ser obtidas apresentariam comportamento monotônico descendente na medida em que a taxa de diluição aumenta. O que se nota é um aumento da massa celular quando  $D$  passa de  $0,37 \text{ h}^{-1}$  a  $0,53 \text{ h}^{-1}$  sem que isso represente um aumento na produção de etanol. Com taxas de diluição acima de  $0,5 \text{ h}^{-1}$ , um processo de diminuição da concentração celular se instaura no sistema, acompanhado de diminuição da concentração alcoólica e aumento da concentração de substrato.

Em relação às curvas de substrato e etanol, podemos observar em todos os fermentadores, e principalmente nos últimos que estão submetidos a alta concentração de etanol, o efeito inibitório deste, uma vez que estas curvas apresentam para baixas taxas de diluição, uma tendencia assintótica para valores de substrato superiores a zero assim como valores limites máximos de concentração de etanol, o qual é característico de sistemas fortemente inibidos pelo produto (29,39,66).

### 1.1.3. Discussão.

De uma forma geral o comportamento do sistema em cascata será avaliado em base aos seguintes parâmetros: taxa de diluição de um fermentador ( $D$ ), taxa de diluição do sistema ( $D_s$ ), tempo de residência hidráulico do sistema ( $\tau_s$ ), tempo médio de residência celular no sistema ( $\tau_c$ ), produtividade de etanol do sistema ( $P_r$ ), porcentagem de conversão de substrato ( $\phi\%$ ), taxa específica de produção de etanol no primeiro fermentador ( $q_p$ ), e rendimentos de massa seca ( $Y_{x/s}$ ) e de etanol ( $Y_{p/s}$ ) do sistema.

Os parâmetros antes mencionados estão definidos pelas seguintes expressões:

$$D = \frac{F_f + F_r}{V} = \frac{F}{V} \quad (4.2)$$

$$D_s = \frac{F_f}{V_s} \quad (4.3)$$

$$\tau_s = \frac{1}{D_s} = \frac{V_s}{F_f} \quad (4.4)$$

$$\tau_c = \frac{\text{massa celular total}}{\text{taxa retirada}} = \frac{V(X_1 + \dots + X_n)}{F_f X_s} \quad (4.5)$$

$$P_r = \frac{F_f P_s}{V_s} = D_s P_s \quad (4.6)$$

$$\phi\% = \frac{100(S_f - S_s)}{S_f} \quad (4.7)$$

$$q_p = \frac{(dp/dt)_1}{X_1} = \frac{D(P_1 - P_0)}{X_1} \quad (4.8)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X_s}{S_f - S_s} \quad (4.9)$$

$$Y_{p/s} = \frac{P_s}{S_f - S_s} \quad (4.10)$$

$X_s$ ,  $P_s$  e  $S_s$  são as concentrações de massa seca, etanol e substrato no efluente do sistema.  $X_n$  é a concentração de massa seca no fermentador n.  $S_f$  é a concentração de substrato no meio a ser fermentado.

Na tabela 1 estão representados para o sistema com células livres os valores dos parâmetros de avaliação antes definidos.

Tabela 1.

Efeito da taxa de diluição nas características do sistema para células livres com reciclo.

D(h <sup>-1</sup> )	Ds(h <sup>-1</sup> )	τs(h)	τc(h)	Pr(g/L-h)	φ%	q <sub>p</sub> (h <sup>-1</sup> )	Y <sub>x</sub> /s	Y <sub>p</sub> /s
0,370	0,0500	20,0	144,5	2,32	63,8	1,00	0,009	0,49
0,532	0,0775	12,9	44,0	3,41	63,5	1,19	0,021	0,46
0,711	0,106	9,5	28,2	4,33	59,1	0,77	0,020	0,47
0,953	0,146	6,9	14,5	4,94	48,8	1,61	0,021	0,47

Na tabela 1 podemos observar a influência do reciclo nos tempos médios de residência celular que são sempre muito superiores aos tempos de residência hidráulicos do sistema. Na figura 12 podemos ver o efeito da taxa de diluição nos parâmetros de avaliação antes definidos.

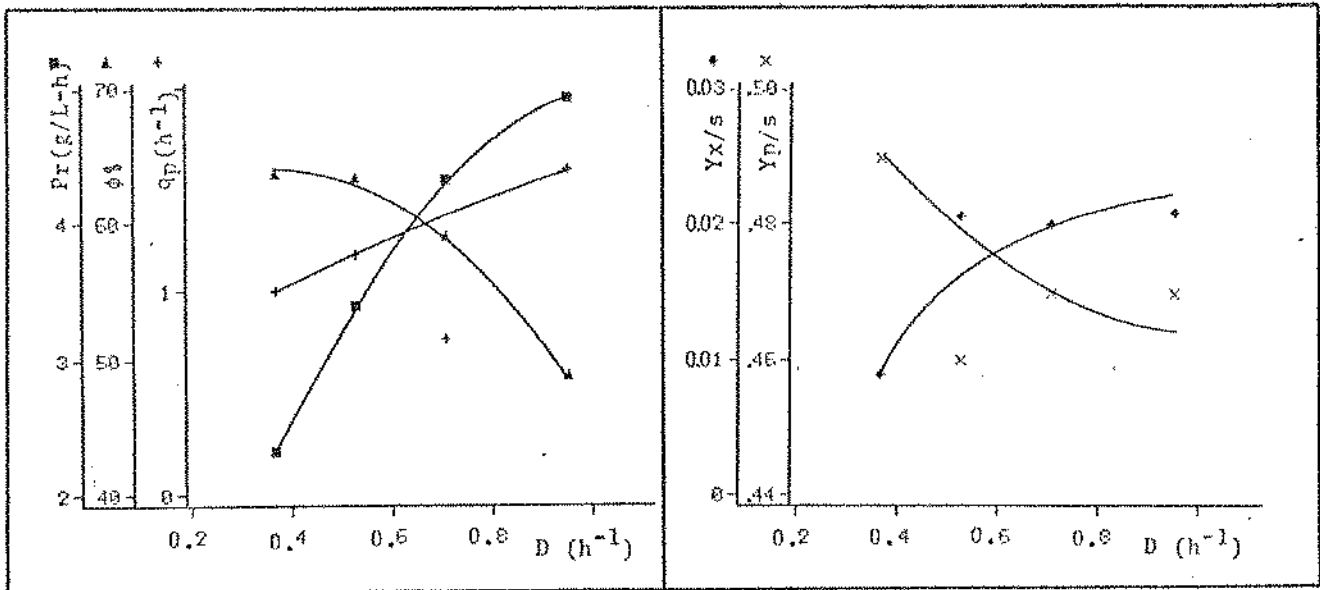


Fig. 12. Efeito da taxa de diluição (D) na fermentação alcoólica, usando células livres.

Na figura 12 observa-se que na medida em que a taxa de diluição aumenta, a produtividade também aumenta. A porcentagem de conversão apresentou uma tendência assintótica para taxas de diluição inferiores a aproximadamente  $0,5 h^{-1}$ , o que evidencia a impossibilidade do microrganismo atingir a conversão total de substrato em baixas taxas de diluição. Na medida em que a taxa de diluição aumentou, a conversão de substrato diminuiu, assim como a massa celular, o que mostra o comportamento diretamente associado existente entre estes parâmetros.

A taxa específica de produção de etanol no primeiro fermentador apresentou tendência a aumentar continuamente, o que evidencia um melhor desempenho da massa celular presente, em termos de produtividade de etanol, devido à diminuição da concentração de etanol e conseqüentemente do seu poder inibitório,

permitindo à célula produzir etanol numa forma muito mais eficiente.

O rendimento celular obtido em baixas taxas de diluição foi muito pequeno, devido provavelmente a limitações do meio, assim como à existência de altas taxas de morte dadas à baixa álcool-tolerância do microrganismo e aos altos tempos medios de residência celular. Por outro lado, para taxas de diluição superiores a  $0,5 \text{ h}^{-1}$  o rendimento celular ficou estabilizado em valores característicos de uma fermentação alcoólica anaeróbica. Em relação aos rendimentos de produto, estes apresentaram valores altos para baixas taxas de diluição, diminuindo gradualmente e estabilizando-se em taxas de diluição maiores. Isto pode ser devido a um enriquecimento do meio com material intracelular proveniente de uma taxa de lise celular que é grande em taxas de diluição pequenas e diminui com o incremento desta. De forma global e considerando o baixo rendimento celular, podemos concluir que o alto rendimento alcoólico é devido a uma proporção alta de substrato utilizada para produzir etanol.

## 1.2. INFLUENCIA DA TAXA DE RECICLO.

Usando o mesmo fermentador anterior, foi estudado o efeito da taxa de reciclo na concentração de massa seca, substrato e etanol. A vazão de alimentação foi mantida constante durante o experimento, variando somente a vazão de reciclo e consequentemente a taxa de reciclo.

### 1.2.1. Condições de operação do sistema.

Para um sistema de fermentadores, a taxa de reciclo está definida da seguinte forma:

$$\alpha = \frac{F_r}{F_f} \quad (4.11)$$

Foram usadas 3 taxas de reciclo diferentes, 0.057, 0.090 e 0.152. A vazão de alimentação foi mantida constante entre 1110-1120 mL/h e variou-se a vazão de reciclo entre 64-169 mL/h.



### 1.2.2. Resultados experimentais.

a) Efeito da taxa de reciclo nas concentrações de massa seca, substrato e etanol em cada fermentador.

Na figura 13 podemos observar para cada fermentador em

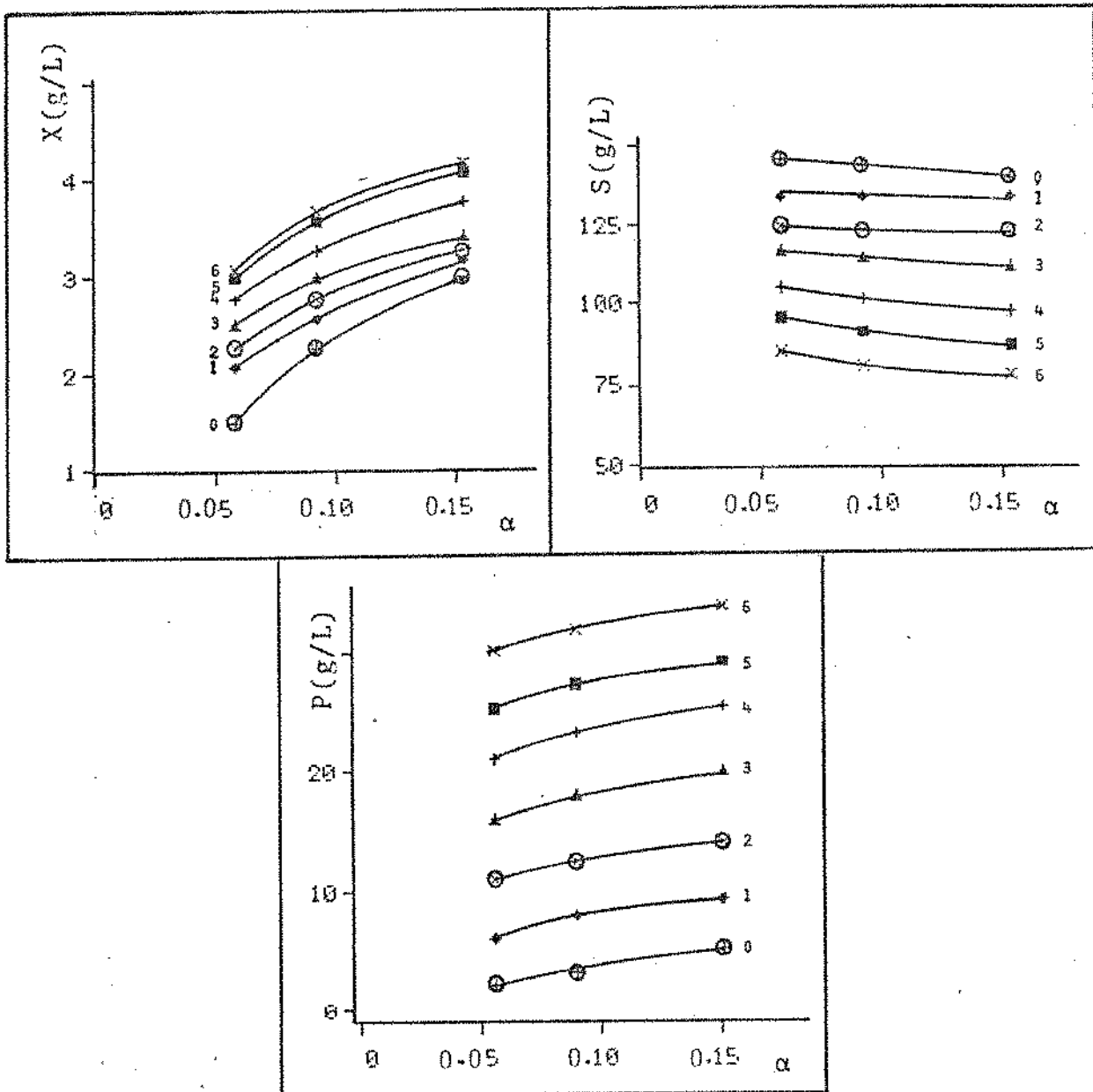


Fig. 13. Efeito da taxa de reciclo ( $\alpha$ ) na concentração de massa seca ( $X$ ), substrato ( $S$ ) e etanol ( $P$ ). Células livres com reciclo.

Na figura 13 pode ser visto que mantendo constante a vazão de alimentação e aumentando a taxa de reciclo, ocorreu um aumento contínuo tanto na massa celular quanto na concentração de etanol para todos os fermentadores, assim como uma diminuição na concentração de substrato, o que trará consequências positivas para o sistema tanto na produtividade quanto na conversão de substrato.

### 1.2.3. Discussão.

Da mesma forma que no caso anterior, a influência da taxa de reciclo no comportamento do sistema de fermentadores será avaliada com base nos mesmos parâmetros antes definidos, e apresentados na tabela 2.

Tabela 2.

Efeito da taxa de reciclo nas características do sistema para células livres com reciclo.

$\alpha$	$D(\text{h}^{-1})$	$D_S(\text{h}^{-1})$	$\tau_S(\text{h})$	$\tau_C(\text{h})$	$Pr(\text{g/L-h})$	$\phi\%$	$q_p(\text{h}^{-1})$	$Y_X/s$	$Y_P/s$
0,057	0,929	0,146	6,85	11,7	4,66	45,9	1,62	0,022	0,46
0,090	0,953	0,146	6,85	14,5	4,94	48,8	1,61	0,021	0,47
0,152	1,003	0,146	6,85	17,4	5,24	51,7	1,36	0,019	0,47

Podemos ver na tabela 2 que os tempos medios de residên-  
cia celular são maiores que o tempo de residência hidráulico do  
sistema, o que é consequência da existência do reciclo. Por ou-  
tro lado, na medida em que a taxa de reciclo aumenta, também au-  
menta o tempo medio de residência celular em proporção decres-  
cente.

Na figura 14 estão locados os parâmetros de avaliação do  
sistema, usando os dados da tabela 2.

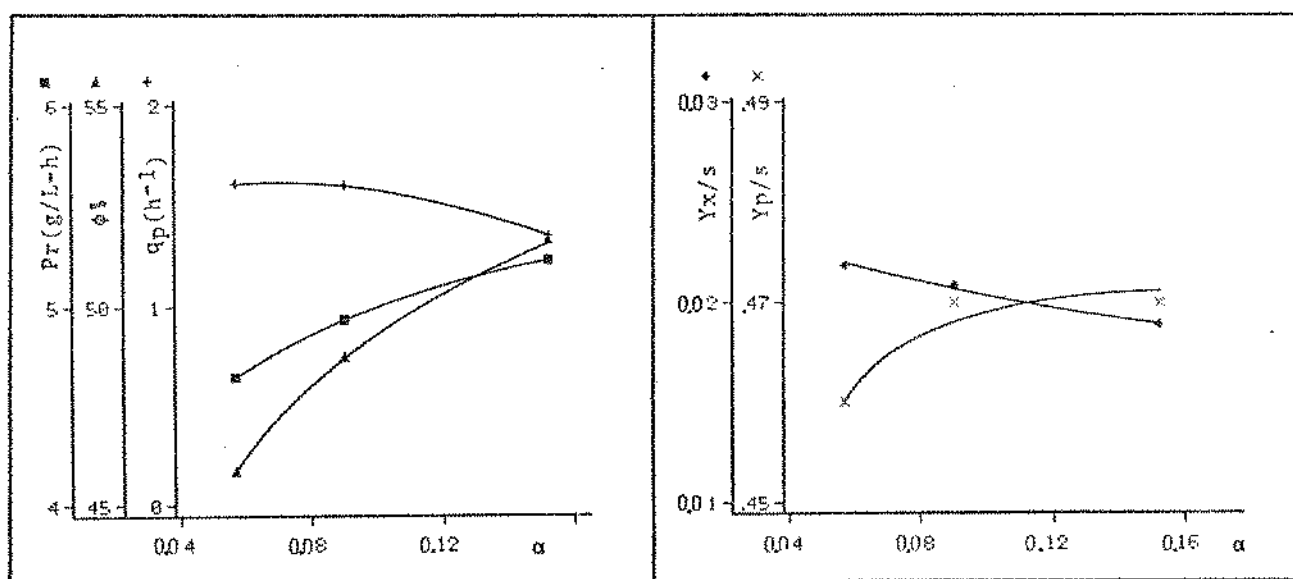


Fig.14. Efeito da taxa de reciclo ( $\alpha$ ) na fermentação al-  
coólica, usando células livres.

Observa-se na figura 14 o efeito positivo do aumento da  
taxa de reciclo na fermentação alcoólica, uma vez que mantendo a  
alimentação de meio constante podemos aumentar significativamen-  
te a produtividade do sistema e consequentemente a porcentagem  
de conversão de substrato, simplesmente aumentando a vazão do  
reciclo. Da mesma forma que no caso anterior, podemos observar a

associação existente entre a conversão de substrato e massa celular presente. No entanto, a eficiência de produção de etanol do microrganismo, em termos de  $q_p$ , diminui com a taxa de reciclo, provavelmente devido ao incremento na concentração de etanol.

O rendimento celular apresentou uma ligeira diminuição devido a uma maior taxa de morte celular provocada tanto pelo aumento nos tempos medios de residência celular quanto pelas maiores concentrações de etanol.

Em relação ao rendimento de etanol, observou-se um leve aumento devido provavelmente ao enriquecimento do meio pelo material intracelular que aumenta na medida do aumento do tempo de residência celular.

## 2. FERMENTAÇÃO MULTIESTAGIO USANDO CÉLULAS IMOBILIZADAS SEM RECICLO.

### 2.1. INFLUENCIA DA TAXA DE DILUIÇÃO.

Usando o sistema multiestagio representado na figura 2 foi estudado o efeito da taxa de diluição sobre a viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol no caso de células imobilizadas sem reciclo.

#### 2.1.1. Condições de operação do sistema.

Devido a vazão de reciclo ser nula, a expressão da taxa de diluição para cada fermentador fica simplesmente como  $D=F_f/V$ . Foram usadas 8 taxas de diluição diferentes, que variaram entre 0,054 e  $0,84 \text{ h}^{-1}$ , o que foi conseguido mudando a vazão de alimentação entre 69 e 1066 mL/h. O volume de cada fermentador é de 1275 mL.

#### 2.1.2. Resultados experimentais.

a) Evolução da viabilidade celular e das concentrações de massa seca, substrato e etanol no sistema para diversas taxas de diluição.

Na figura 15 podemos observar os perfis gerados no fermentador multiestagio após o estabelecimento de estado estacionário, para 4 taxas de diluição diferentes.

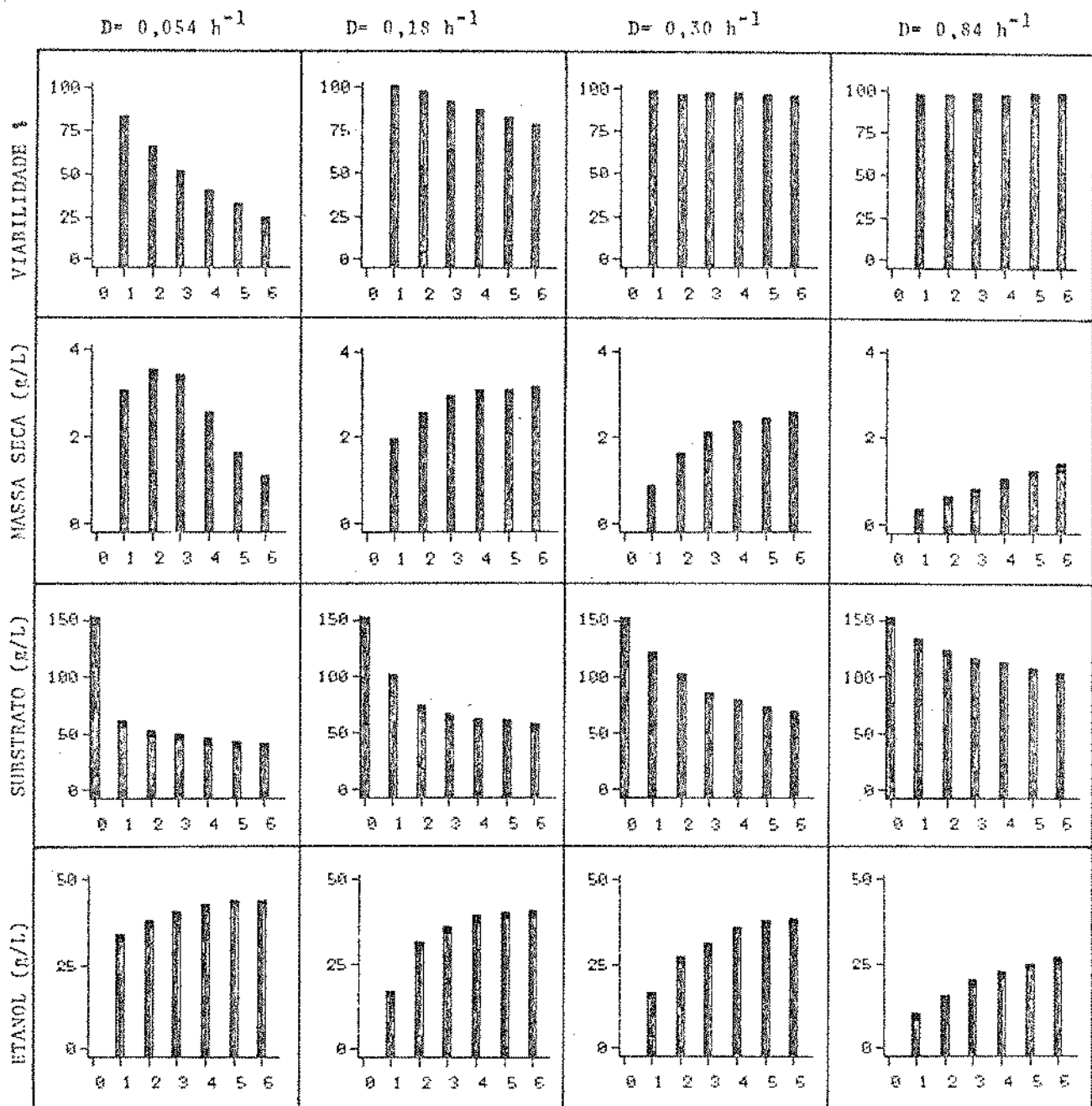


Fig. 15. Perfis estacionários de viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol para taxas de diluição diferentes. Células imobilizadas sem reciclo.

Na figura 15 podemos observar que, de uma forma geral, na medida em que o meio se desloca de um fermentador a outro, a

viabilidade celular vai diminuindo de forma progressiva, devido tanto à maior concentração de etanol, quanto ao maior tempo de permanência da célula no sistema. No caso da menor taxa de diluição usada ( $D = 0,054 \text{ h}^{-1}$ ) a incidência na viabilidade celular é mais acentuada, uma vez que temos associados os efeitos de uma alta concentração de etanol e altos tempos medios de residência celular. Quando foram usadas altas taxas de diluição, a viabilidade atingiu valores próximos a 100% sem apresentar diferenças significativas entre os diversos fermentadores.

Podemos observar que na menor taxa de diluição existe uma alta taxa de morte celular, uma vez que o perfil de massa seca atingiu um valor máximo no fermentador 2 para logo começar a diminuir, resultando a partir do terceiro fermentador em taxas específicas de crescimento observadas de valor negativo. Nesta condição a taxa específica de morte celular é muito superior que a taxa específica de crescimento, resultando num valor de  $\mu_{obs}$  negativo. Por este motivo o crescimento celular para este caso específico, não está diretamente associado à formação de produto como pode ser visto ao comparar os perfis de massa seca e etanol. Por outro lado, teremos rendimentos celulares positivos somente no primeiro e segundo fermentador e já a partir do terceiro fermentador serão negativos, resultando num baixo rendimento celular para o sistema.

Para taxas de diluição um pouco maiores temos comportamentos diferentes, e no caso da massa celular podemos observar aumentos contínuos na medida que o meio se desloca no sistema, indicando um comportamento associado entre crescimento celular e

formação de produto como pode ser visualizado, comparando os perfís de massa seca e etanol para taxas de diluição superiores a  $0,18 \text{ h}^{-1}$ .

Por outro lado é interessante destacar que as maiores mudanças nas concentrações de massa seca, substrato e etanol ocorrem sempre no primeiro fermentador, pondo em evidência que nele temos as mais altas velocidades de reação do sistema com taxas específicas de crescimento maiores e conseqüentemente de consumo de substrato e de produção de etanol.

b) Efeito da taxa de diluição na viabilidade celular e nas concentrações de massa seca, substrato e etanol em cada fermentador.

Na figura 16 podemos observar, para cada fermentador em forma separada, o efeito exercido pela taxa de diluição nas variáveis mencionadas.



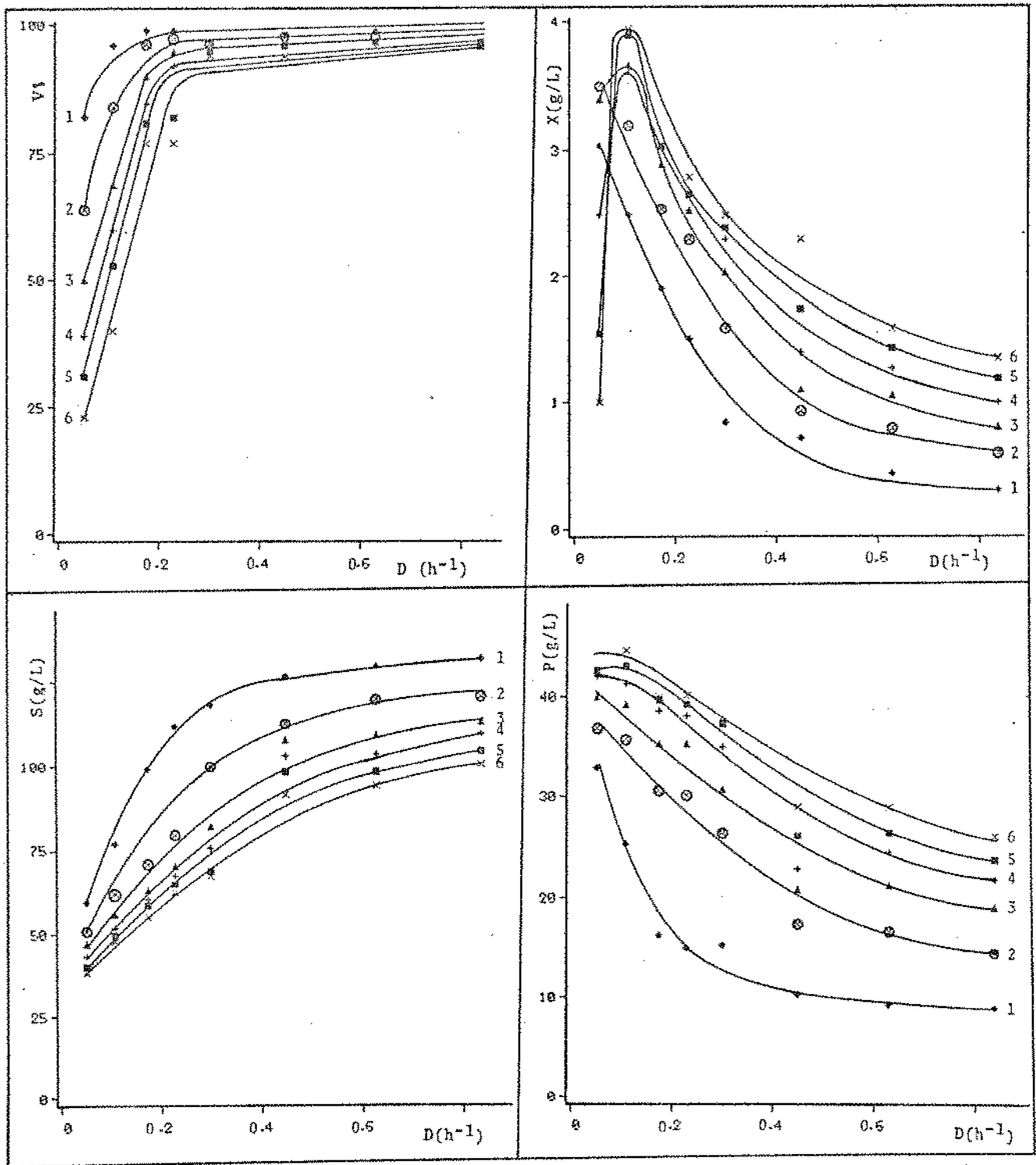


Fig. 16. Efeito da taxa de diluição ( $D$ ) na viabilidade celular ( $V_x$ ) e concentrações de massa seca ( $X$ ), substrato ( $S$ ) e etanol ( $P$ ) para cada fermentador. Células imobilizadas sem reciclo.

Como pode ser visto na figura 16, na medida em que a taxa de diluição aumenta, a viabilidade celular também aumenta para todos os fermentadores em forma assintótica até 100%, mas ela é decrescente para cada estágio. No primeiro fermentador vemos que para uma taxa de diluição de  $0,107 \text{ h}^{-1}$  temos 96% de viabilidade, valor que somente será alcançado no último fermentador para taxas de diluição superiores a  $0,5 \text{ h}^{-1}$ . Também pode ser observado que para taxas de diluição inferiores a aproximadamente  $0,2 \text{ h}^{-1}$  existe uma grande perda de viabilidade celular em todos os fermentadores como consequência dos altos tempos medios de residência celular e alta concentração de etanol.

A concentração de massa seca apresentou comportamento característico descendente no primeiro e segundo reatores, enquanto que, a partir do terceiro fermentador, a massa celular aumentou para baixas taxas de diluição, em seguida atingiu um máximo e então diminuiu de forma característica.

A partir de uma taxa de diluição de aproximadamente  $0,1 \text{ h}^{-1}$  as curvas de massa seca e etanol apresentaram o mesmo comportamento, diminuindo ambas com o aumento da taxa de diluição, o que é característico nas fermentações diretamente associadas ao crescimento celular. Em altas taxas de diluição observa-se concentrações muito baixas de massa celular em todos os fermentadores, o que resultará num elevado valor da taxa específica de produção de etanol.

As concentrações de substrato aumentaram de forma assintótica para uma concentração de 150 g/L em altas taxas de diluição. Por outro lado, em baixas taxas de diluição podemos obser-

var uma tendencia para um valor limite mínimo de concentração de substrato, dependente do máximo de etanol que o microrganismo pode produzir.

A concentração de etanol diminui progressivamente na medida que a taxa de diluição aumenta. Podemos observar que aparentemente as curvas de etanol nos últimos fermentadores tendem a um valor limite de aproximadamente 45 g/L, não considerando o etanol perdido junto com o  $\text{CO}_2$ . A avaliação correta deste valor limite será feita no Capítulo 5 para o caso de células livres.

### 2.1.3. Discussão.

Da mesma forma que no caso de células livres, o comportamento do sistema de fermentadores será avaliado em base aos parâmetros antes definidos. Para os diversos cálculos será usado como volume de cada fermentador o mesmo do caso de células livres (1275 mL). Os resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3.

Efeito da taxa de diluição nas características do sistema para células imobilizadas sem reciclo.

$D(h^{-1})$	$D_s(h^{-1})$	$\tau_s(h)$	$\tau_c(h)$	$P_r(g/L-h)$	$\phi\%$	$q_p(h^{-1})$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0,054	0,0090	111,0	277,5	0,38	74,5	0,58	0,009	0,38
0,107	0,0178	56,2	50,3	0,80	68,0	1,08	0,038	0,44
0,176	0,0293	34,1	30,9	1,17	63,2	1,53	0,032	0,43
0,229	0,0382	26,2	22,4	1,53	58,5	2,30	0,032	0,46
0,303	0,0505	19,8	15,3	1,90	55,0	5,57	0,030	0,46
0,453	0,0755	13,2	7,9	2,20	39,0	6,49	0,039	0,50
0,627	0,105	9,5	6,7	3,04	37,0	13,25	0,028	0,51
0,836	0,139	7,2	4,6	3,65	33,0	23,50	0,028	0,51

Na tabela 3 pode ser observado que na ausência de reciclo, os tempos medios de residência celular são geralmente um pouco menores que os tempos de residência hidráulico do sistema, exceto no caso da taxa de diluição igual a  $0,054 h^{-1}$ , onde o tempo de residência celular é bem maior que o hidráulico, devido à alta taxa de morte e lise celular que ocorre nos últimos fermentadores. Os dados da tabela anterior são representados na figura 17, onde é possível observar o efeito da taxa de diluição nos parâmetros de avaliação antes descritos.

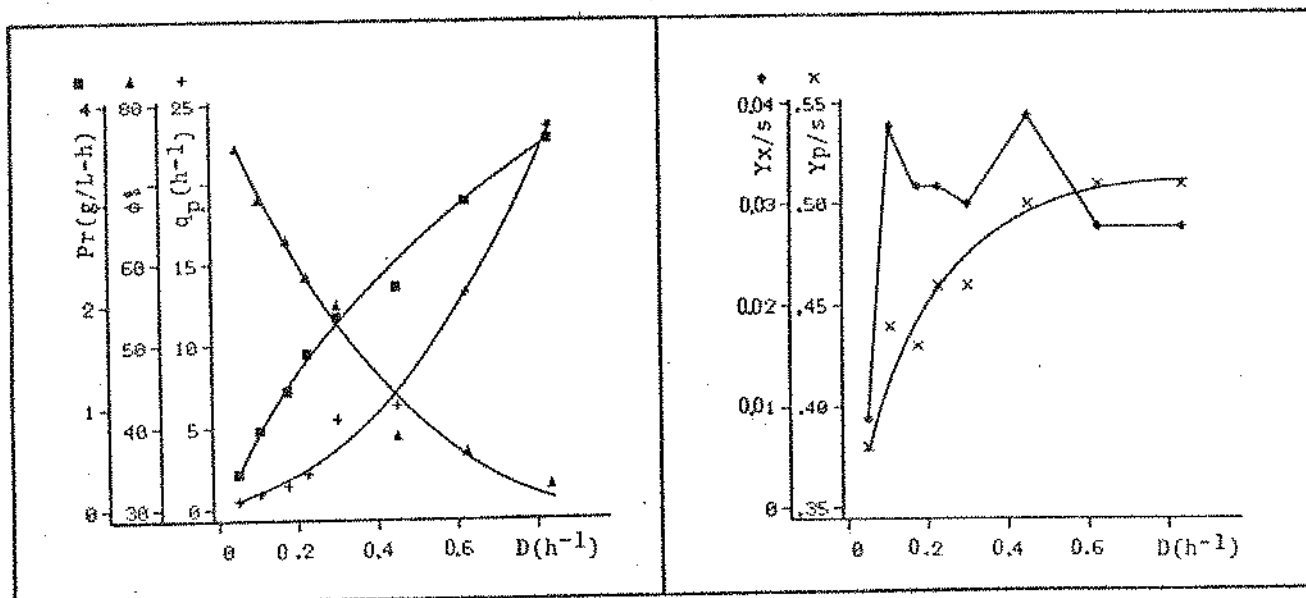


Fig. 17. Efeito da taxa de diluição ( $D$ ) na fermentação alcoólica para células imobilizadas sem reciclo.

Na figura 17 observa-se que quando a taxa de diluição aumenta, tanto a produtividade quanto a taxa específica de produção de etanol aumentam, diminuindo no entanto a porcentagem de conversão, o que põe em evidência o compromisso existente entre produtividade e conversão. Da mesma forma que no caso de células livres, podemos ver que para baixas taxas de diluição a porcentagem de conversão apresentou tendência a um valor limite, evidenciando desta forma a impossibilidade do microrganismo atingir uma conversão total do substrato.

Os altos valores obtidos da taxa específica de produção de etanol no primeiro fermentador em altas taxas de diluição são devidas por um lado às baixas concentrações de massa celular livre e de etanol, e por outro à alta produtividade existente nele como consequência do material celular imobilizado.

No caso do rendimento celular, este apresentou valores muito baixos para taxas de diluição pequenas devido à existência de morte celular, causada pela concentração de etanol e tempos médios de residência celular elevados. Em taxas de diluição superiores a  $0,1 \text{ h}^{-1}$  o rendimento celular estabilizou-se em valores de aproximadamente 0,032, que é 50% superior àquele obtido no caso de células livres com reciclo.

O rendimento de produto apresentou um aumento permanente com a taxa de diluição, alcançando valores aproximadamente iguais ao rendimento teórico máximo. Os baixos rendimentos obtidos inicialmente podem ser devidos as baixas taxas de diluição onde estão associados os efeitos de uma concentração alta de etanol e de um consumo elevado de substrato para manutenção da massa celular imobilizada, o que implicará em baixos valores para o rendimento de produto. Com o aumento da taxa de diluição a manutenção e inibição pelo etanol diminuem, resultando num aumento do rendimento de produto como atestam os valores de  $Y_p/s$  na figura 17.

### 3. FERMENTAÇÃO MULTIESTAGIO USANDO CÉLULAS IMOBILIZADAS COM RECICLO.

#### 3.1. INFLUENCIA DA TAXA DE DILUIÇÃO.

Foi usado nesta fase, o sistema multiestagio representado na figura 3, similar ao sistema usado no caso de células imobilizadas sem reciclo, adicionado na saída do 6º fermentador de um decantador estagiado, resfriado a aprox. 5°C e de uma linha de reciclo à entrada do primeiro fermentador. A vazão de reciclo foi mantida constante durante toda a extensão do experimento, variando somente a vazão de alimentação de meio e conseqüentemente a taxa de diluição de cada fermentador.

##### 3.1.1. Condições de operação do sistema.

De forma idêntica ao caso de células livres com reciclo, a taxa de diluição de cada fermentador está definida pela expressão 4.2. Foram usadas 5 taxas de diluição diferentes, variando entre 0,253 e 0,882 h<sup>-1</sup>, o que foi conseguido variando a vazão de alimentação de meio entre 224 e 1008 mL/h.

A vazão de reciclo foi mantida aproximadamente constante, com valores entre 92 e 117 mL/h. O volume de cada fermentador é de 1275 mL.

##### 3.1.2. Resultados experimentais.

a) Evolução da viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol no sistema para diversas taxas de diluição.

Na figura 18 pode-se ver os perfis gerados no fermentador multiestagio, após o estabelecimento do estado estacionario, para 4 taxas de diluição diferentes.

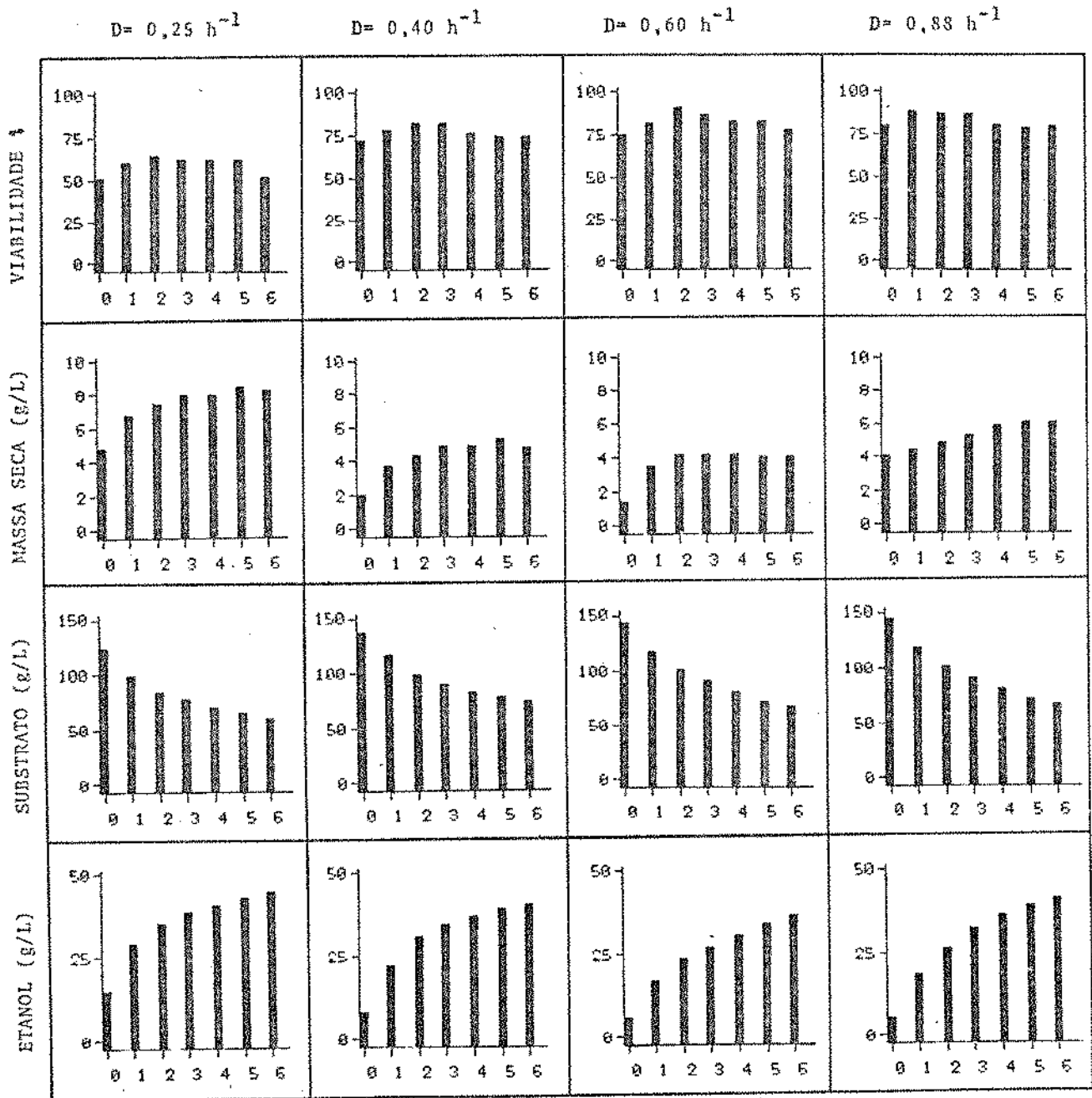


Fig. 18. Perfis estacionarios gerados no sistema para 4 taxas de diluição diferentes. Células imobilizadas com reciclo.



De forma geral, a viabilidade celular aumentou a partir da entrada do primeiro fermentador até a segunda ou terceira unidade, para logo diminuir progressivamente. Este aumento ocorreu porque as células recicladas no primeiro fermentador provêm da saída da última unidade onde existe uma baixa viabilidade celular. Ao serem recicladas as células vivas encontram condições favoráveis para o crescimento dada a baixa concentração de etanol (15-28 g/L) aumentando assim, viabilidade e massa celular. Na medida que o meio se desloca aumentam tanto as concentrações de etanol, quanto os tempos de residência celular, resultando na diminuição observada na viabilidade a partir do terceiro ou quarto fermentador.

A concentração de massa seca e etanol apresentou de forma geral o comportamento esperado, aumentando na medida que o meio se desloca através das diversas unidades.

Em todos os casos estudados as maiores mudanças de concentração de massa seca, substrato e etanol aconteceram na primeira unidade e conseqüentemente ela apresentará as maiores velocidades de reação.

**b) Efeito da taxa de diluição na viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol em cada fermentador.**

Na figura 19 podemos ver para cada fermentador o efeito da taxa de diluição nas variáveis antes mencionadas.

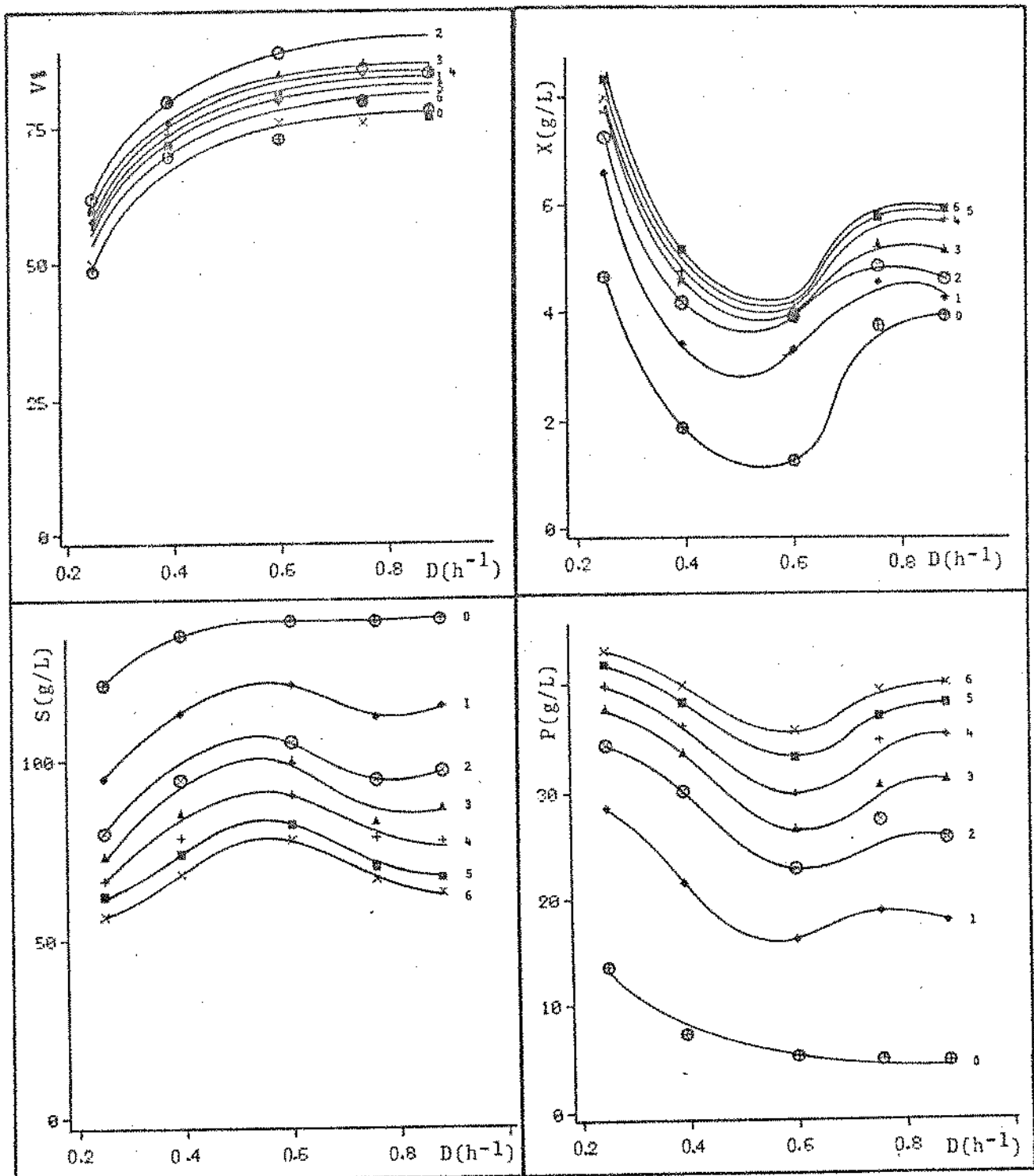


Fig. 19. Efeito da taxa de diluição ( $D$ ) na viabilidade celular ( $Vx$ ) e concentrações de massa seca ( $X$ ), substrato ( $S$ ) e etanol ( $P$ ) para cada fermentador. Células imobilizadas com reciclo.

Da mesma forma que nos casos anteriores, a viabilidade celular aumentou progressivamente em todos os fermentadores quando foi aumentada a taxa de diluição, devido tanto às menores concentrações de etanol existentes quanto aos menores tempos de residência celular. Também foi visto que as menores viabilidades estão sempre na curva de alimentação do primeiro fermentador (curva nº 0) e as mais altas correspondem à segunda unidade como foi explicado anteriormente.

A concentração de massa seca diminuiu progressivamente, apresentando um valor mínimo para todos os fermentadores numa taxa de diluição entre  $0,5-0,6 \text{ h}^{-1}$  para logo aumentar até ficar estabilizada. Esta anormalidade também aconteceu nas curvas de concentração de substrato e etanol, evidenciando assim a associação existente entre elas e a concentração de massa seca. Provavelmente este fenômeno se deve a mudanças nas propriedades de floculação do microrganismo uma vez que foi notório como, a partir de uma taxa de diluição de aproximadamente  $0,6 \text{ h}^{-1}$ , a concentração de massa celular na linha de reciclo apresentou uma elevação brusca, passando de valores de 9 g/L para 32,5-38 g/L. Este fato também ocorreu no processo estudado com células livres.

Da mesma forma que no caso de células livres podemos observar que quando a taxa de diluição tende a zero, o último fermentador apresentou uma tendência assintótica nas concentrações de etanol máximo e substrato mínimo devido principalmente à inibição produzida pelo etanol.

### 3.1.3. Discussão.

O estudo do comportamento do sistema em relação à influência da taxa de diluição será realizado em base aos parâmetros antes definidos que são apresentados na tabela 4.

Tabela 4

Efeito da taxa de diluição nas características do sistema para células imobilizadas com reciclo.

$D(\bar{h}^{-1})$	$D_s(\bar{h}^{-1})$	$\tau_s(h)$	$\tau_c(h)$	$Pr(g/L-h)$	$\phi\%$	$q_p(\bar{h}^{-1})$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0,253	0,029	34,1	82,3	1,28	61,9	0,57	0,034	0,47
0,396	0,054	18,5	30,6	2,18	53,7	1,62	0,034	0,50
0,600	0,086	11,6	26,8	3,10	48,3	1,97	0,023	0,50
0,759	0,111	9,0	32,3	4,40	56,7	2,34	0,018	0,47
0,882	0,132	7,6	23,8	5,35	57,9	2,69	0,019	0,47

Na tabela 4 podemos ver que na presença de reciclagem de células os tempos médios de residência celular são muito superiores aos tempos de residência hidráulico do sistema. Por outro lado para a taxa de diluição de  $0,759 \bar{h}^{-1}$  o tempo médio de residência celular apresentou um aumento para logo diminuir, coincidindo com as maiores altas da concentração celular.

Na figura 20 podemos ver o efeito da taxa de diluição nos parâmetros de avaliação do sistema antes indicados.

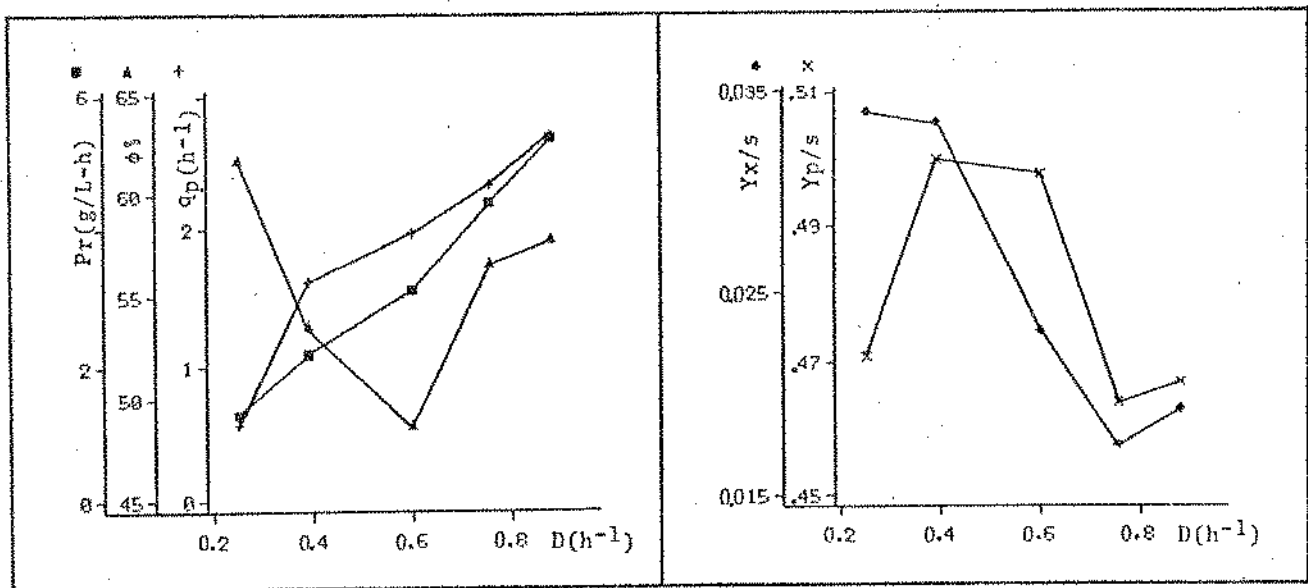


Fig. 20. Efeito da taxa de diluição (D) na fermentação alcoólica para células imobilizadas com reciclo.

Pode-se observar que tanto a taxa específica de produção de etanol quanto a produtividade do sistema aumentaram em forma proporcional ao aumento da taxa de diluição. A porcentagem de conversão diminuiu até uma taxa de diluição de aproximadamente  $0,6 h^{-1}$  para depois aumentar e estabilizar em valores de 57-58% seguindo o mesmo comportamento da massa celular.

O rendimento celular diminuiu bruscamente desde valores de 0,034 para valores de 0,020 em altas taxas de diluição.

O rendimento de etanol aumentou de forma progressiva até taxas de diluição de aproximadamente  $0,6 h^{-1}$  para depois diminuir devido ao aumento significativo na concentração de massa celular em todos os fermentadores provocando um maior consumo de substrato para produção e manutenção da massa celular.

### 3.2. INFLUENCIA DA TAXA DE RECICLO.

Usando o mesmo sistema de fermentadores anterior foi estudado, após o estabelecimento do estado estacionario, o efeito da taxa de reciclo na viabilidade celular e na concentração de massa celular, substrato e etanol nos diversos fermentadores. A vazão de alimentação foi mantida constante durante o experimento, variando somente a vazão de reciclo e conseqüentemente a taxa de reciclo do sistema.

#### 3.2.1. Condições de operação do sistema.

Da mesma forma que no caso do sistema de fermentadores com células livres, a taxa de reciclo do sistema está definida pela equação 4.11. Foram usadas 5 taxas de reciclo diferentes, variando entre 0 e 0,457. A vazão de alimentação de meio foi mantida constante entre 840-855 mL/h e a vazão de reciclo foi variada entre 0 e 386 mL/h.

#### 3.2.2. Resultados experimentais.

a) Efeito da taxa de reciclo na viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol em cada fermentador.

Na figura 21 podemos observar a influência da taxa de reciclo para cada fermentador em forma separada.

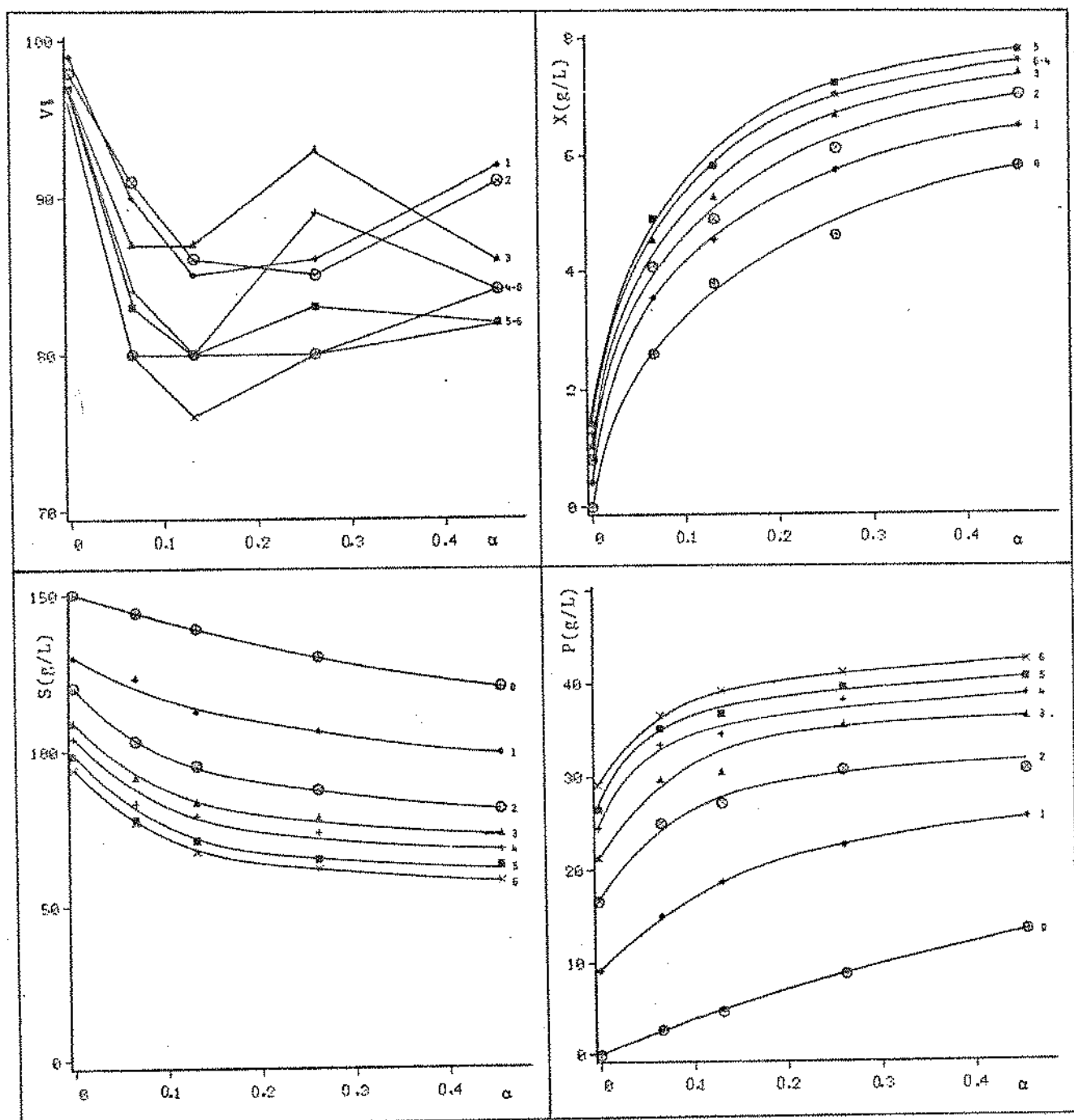


Fig. 21. Efeito da taxa de reciclo ( $\alpha$ ) na viabilidade celular (V%) e concentrações de massa seca (X), substrato (S) e etanol (P) para cada fermentador. Células imobilizadas com reciclo.

Em forma geral a viabilidade celular mudou de valores próximos a 100% na ausência de reciclo para valores de 80-90 % a partir de taxas de reciclo de 0,10 ficando relativamente estabilizada. Esta diminuição na viabilidade está ligada aos aumentos das concentrações de etanol e dos tempos medios de residência celular, na medida em que aumenta a taxa de reciclo. Os mínimos valores da viabilidade celular são sempre no último fermentador e na linha de reciclo (entrada do primeiro fermentador) devido ao maior tempo de residência celular e maior concentração de etanol existente. Como consequência da menor concentração de etanol existente nos primeiros fermentadores, houve uma significativa recuperação da viabilidade celular até o segundo ou terceiro fermentador, para logo diminuir como consequência do aumento do etanol e do tempo de residência celular, alcançando valores mínimos no último fermentador e no reciclo.

O aumento da taxa de reciclo mostrou-se muito efetiva em relação às concentrações de massa celular e etanol uma vez que ambas aumentaram, mas observou-se principalmente para o etanol uma tendência assintótica em altas taxas de reciclo evidenciando assim a incapacidade do microrganismo para atingir valores muito altos de concentração de etanol. Os maiores aumentos de massa celular e de etanol aconteceram sempre no primeiro fermentador devido ao menor teor alcoólico e à maior disponibilidade de nutrientes essenciais. Na medida em que o meio se desloca estes acréscimos vão sendo menores, devido ao esgotamento destes nutrientes e maior inibição pelo etanol. No último fermentador



ocorre uma diminuição da massa celular evidenciando uma alta taxa de morte, devido ao efeito tóxico do etanol e longos tempos de residência.

A concentração de substrato apresentou uma tendência a estabilizar-se no último fermentador num valor limite mínimo em altas taxas de reciclo.

### 3.2.3. Discussão.

A análise do efeito da taxa de reciclo no comportamento dos fermentadores será realizada em base aos parâmetros antes definidos que são apresentados na tabela 5.

Tabela 5

Efeito da taxa de reciclo nas características do sistema para células imobilizadas.

$\alpha$	$D(\bar{h}^{-1})$	$D_s(\bar{h}^{-1})$	$\tau_s(h)$	$\tau_c(h)$	$Pr(g/L-h)$	$\phi\%$	$q_p(\bar{h}^{-1})$	$Y_x/s$	$Y_p/s$
0,0	0,627	0,105	9,52	6,7	3,06	37,3	13,25	0,028	0,51
0,067	0,703	0,110	9,10	23,1	4,09	50,3	2,45	0,023	0,49
0,132	0,759	0,111	9,00	32,3	4,40	56,9	2,34	0,018	0,46
0,262	0,846	0,111	9,00	37,2	4,59	59,3	2,00	0,017	0,47
0,457	0,965	0,111	9,10	39,4	4,74	62,2	1,78	0,018	0,46

Na tabela 5 pode-se ver como na medida em que a taxa de reciclo aumenta os tempos médios de residência celulares também aumentaram, pondo em evidência a importância da reciclagem em relação ao tempo de permanência das células dentro do sistema e à produtividade de etanol. Na figura 22 podemos ver o efeito da taxa de reciclo nos parâmetros de avaliação indicados.

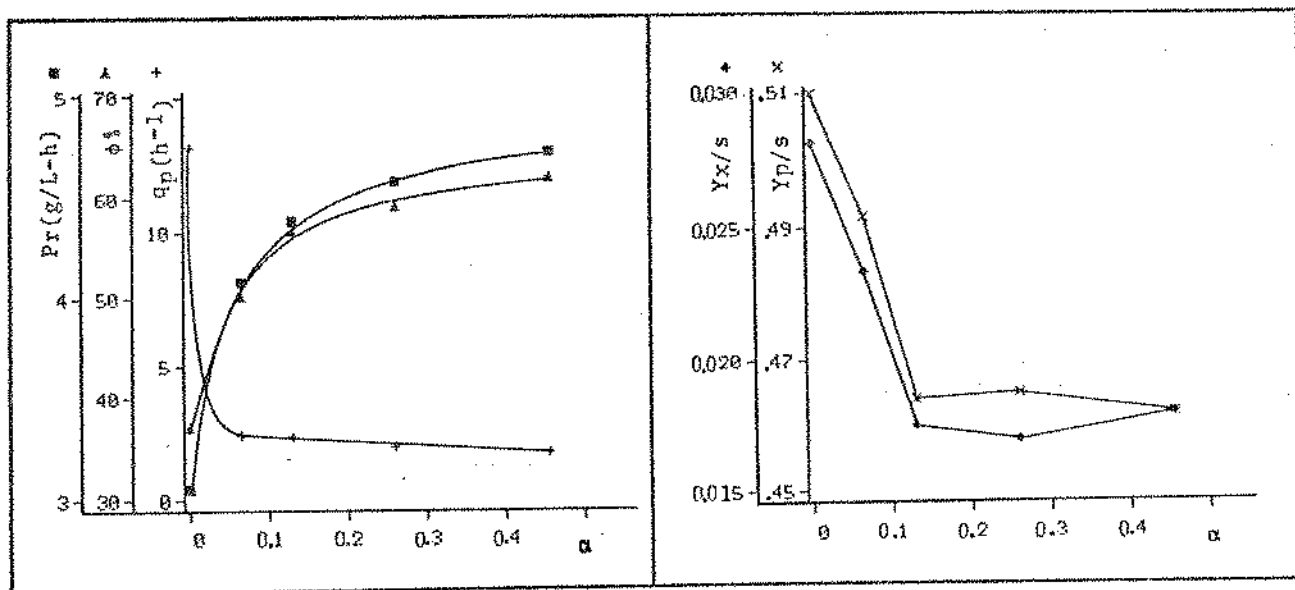


Fig. 22. Efeito da taxa de reciclo ( $\alpha$ ) na fermentação alcoólica usando células imobilizadas.

Observa-se na figura 22 que tanto a produtividade quanto a conversão de substrato sofreram mudanças positivas com a taxa de reciclo. Por outro lado, a taxa específica de produção de etanol no primeiro fermentador diminuiu de forma progressiva, mostrando o efeito inibitório do etanol na eficiência de produção da célula. Embora tenha sido vantajoso uma alta taxa de reciclo em termos de produtividade, observou-se uma apreciável diminuição nos rendimentos de etanol e massa celular. Isto pode

ser devido principalmente a um maior consumo de substrato para manutenção, provocado por maiores concentrações de massa celular e etanol presentes nos fermentadores, assim como por tempos de residência celular maiores em altas taxas de reciclo.

### 3.3. INFLUENCIA DA TAXA DE AERAÇÃO.

Usando o mesmo sistema de fermentadores do caso anterior, adicionado dos dispositivos necessarios para produzir uma micro-aeração como indicado na figura 3, o primeiro fermentador foi submetido a diversas taxas de aeração. A vazão de reciclo, assim como a vazão de alimentação foram mantidas constantes durante toda a extensão do experimento, variando-se somente a vazão de ar estéril no primeiro fermentador e consequentemente a taxa de aeração.

#### 3.3.1. Condições de operação do sistema.

Tanto a taxa de diluição quanto a taxa de reciclo foram mantidas aproximadamente constantes durante toda a extensão do experimento, com valores compreendidos entre 0,707-0,759 h<sup>-1</sup> e 0,111-0,147 respectivamente.

A taxa de aeração de um fermentador está definida como:

$$T.A. (VVM) = \frac{F_{ar}}{V} \quad (4.12)$$

onde:  $F_{ar}$  = vazão ar (L/min)

$V$  = volume reator (L)

VVM = volume de ar por volume de reator por minuto.

Foram usadas 5 taxas de aeração diferentes, variando entre 0 e 0,098 VVM, o que foi conseguido usando vazões de entrada de ar no primeiro fermentador, compreendidas entre 0 e 125 mL/min.

### 3.3.2.- Resultados experimentais.

a) Efeito da taxa de aeração na viabilidade celular e concentrações de massa seca, substrato e etanol em cada fermentador.

Na figura 23 podemos observar, para cada fermentador em forma separada, o efeito da taxa de aeração nas variáveis acima mencionadas.

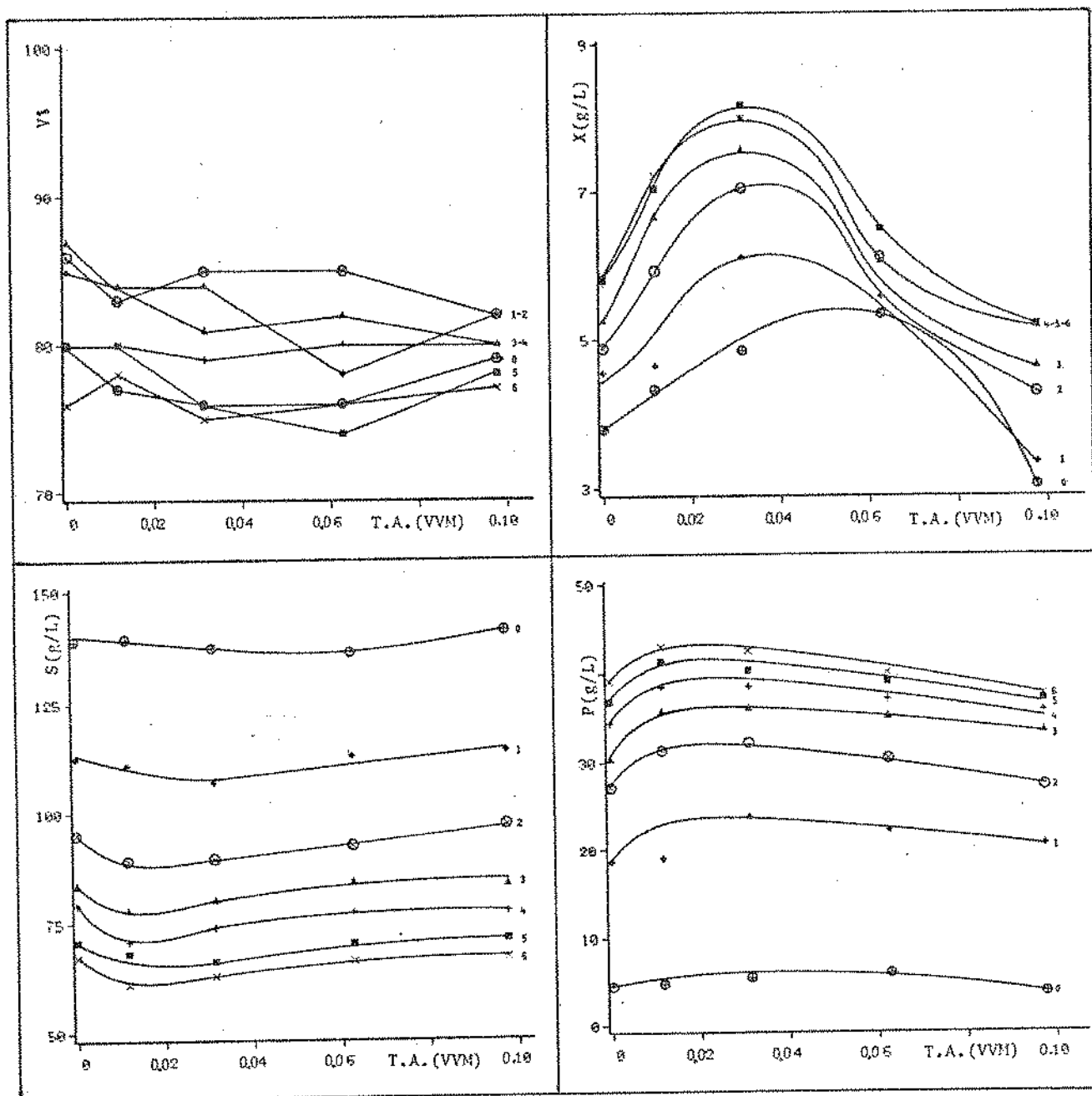


Fig. 23. Efeito da taxa de aeração (T.A.) na viabilidade celular (V%) e concentrações de massa seca (X), substrato (S) e etanol (P) para cada fermentador. Células imobilizadas com reciclo.

Podemos ver na figura 23 que a viabilidade celular apresentou em geral uma leve diminuição com o aumento da taxa de aeração. Da mesma forma que nos casos anteriores, as maiores viabilidades estiveram sempre presentes no segundo estágio para logo diminuir progressivamente até o último fermentador.

A diminuição da viabilidade pode ser explicada se considerarmos que ela depende muito menos da taxa de aeração do que da concentração de etanol e tempo médio de residência celular, sendo que estes aumentaram consideravelmente, atingindo valores máximos para taxas de aeração entre 0,02-0,03 VVM. Os valores de mínima viabilidade, coincidem com os valores de mínima concentração de substrato e máxima concentração de massa celular e etanol.

A massa celular aumentou consideravelmente com a taxa de aeração atingindo um máximo em todos os fermentadores para taxas de aeração entre 0,03-0,04 VVM o que evidencia o papel importantíssimo do oxigênio como elemento estrutural da célula e na formação de esteróis e ácidos graxos insaturados que permitem aumentar a tolerância do microrganismo ao etanol. O aumento da massa celular e do etanol que atingiram um máximo numa taxa de aeração entre 0,02 e 0,04 VVM é evidencia deste fato.

A diminuição que se segue da massa celular e em consequência das concentrações de substrato e etanol para taxas de aeração superiores a 0,03-0,04 VVM, são devidos a que tanto a enzima hexoquinase quanto a álcool-desidrogenase são reprimidas em presença de altos teores de oxigênio, dando origem a metabolismo fermentativo em conjunto com metabolismo respiratório.

### 3.3.3. Discussão.

O efeito da taxa de aeração no comportamento do sistema será analisado usando os parâmetros antes definidos, cujos valores são apresentados na tabela 6.

Tabela 6

Efeito da taxa de aeração nas características do sistema para células imobilizadas com reciclo.

T.A. (VVM)	$D(\bar{h}^{-1})$	$D_s(\bar{h}^{-1})$	$\tau_s(h)$	$\tau_c(h)$	$Pr(g/L-h)$	$\phi\%$	$q_p(\bar{h}^{-1})$	$Y_x/s$	$Y_p/s$
0,0	0,759	0,111	9,00	32,3	4,40	56,7	2,34	0,018	0,46
0,012	0,723	0,108	9,26	45,0	4,73	59,9	2,21	0,015	0,49
0,031	0,745	0,108	9,26	36,8	4,66	59,1	2,20	0,021	0,49
0,063	0,741	0,108	9,26	33,8	4,33	56,3	2,12	0,020	0,48
0,098	0,707	0,108	9,26	25,4	4,28	57,5	3,54	0,020	0,46

Observa-se um aumento no tempo medio de residência celular até uma taxa de aeração de aproximadamente 0,015 VVM para depois começar a diminuir progressivamente; em forma associada com a produtividade do sistema, evidenciando assim a relação existente entre ambos. Na figura 24 podemos observar a influência da taxa de aeração nos parâmetros de avaliação anteriormente calculados.



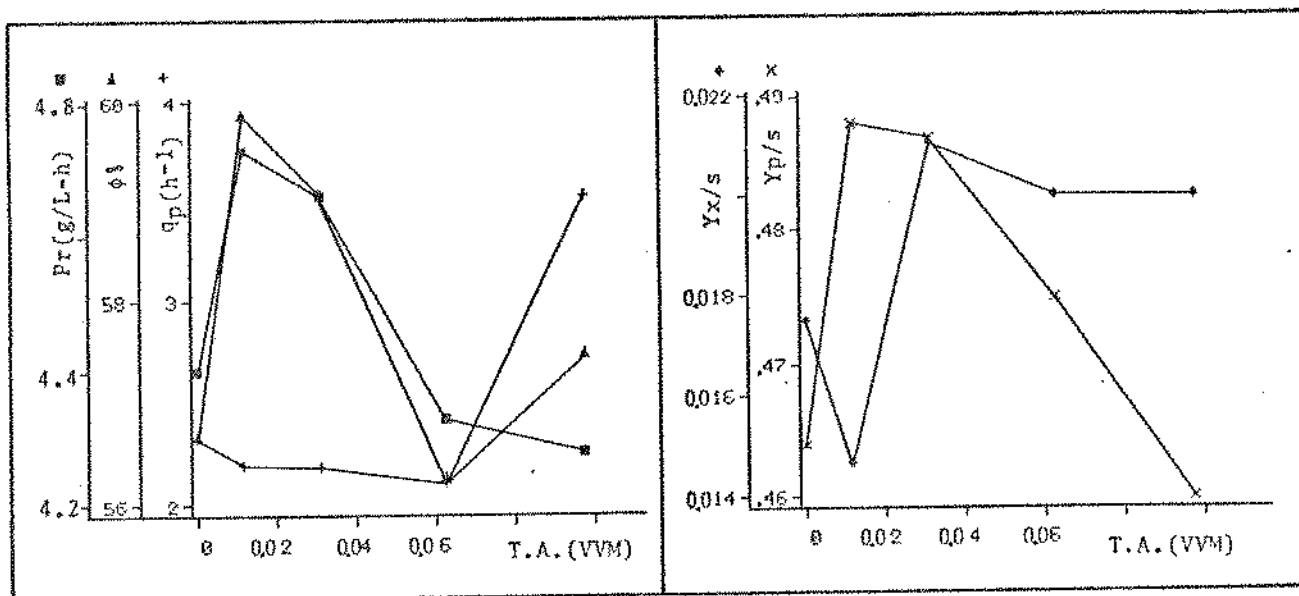


Fig. 24. Efeito da taxa de aeração (T.A.) na fermentação alcoólica usando células imobilizadas com reciclo.

Pode-se ver que a aeração exerce um papel positivo em relação à produtividade e conversão de substrato somente numa faixa de microaeração compreendida entre 0,01-0,02 VVM e logo após começa a ser prejudicial. Apesar do aumento da concentração de etanol, a taxa específica de produção se manteve aproximadamente constante até uma taxa de aeração de 0,06 VVM aumentando em seguida o que confirma o papel protetor do oxigênio em relação à toxicidade do etanol.

O rendimento de etanol também atingiu um máximo na faixa de 0,01-0,03 VVM como consequência de uma menor taxa de consumo de substrato para manutenção neste intervalo de aeração. Para taxas de aeração maiores observou-se uma diminuição no rendimento de produto, o que pode se dever a um aumento do arraste de etanol pelo ar e ao aumento no rendimento celular como consequência

do aumento do metabolismo respiratório. Por outro lado, o rendimento celular apresentou uma leve diminuição em baixas taxas de aeração, devido provavelmente aos aumentos tanto no tempo médio de residência celular, quanto na concentração de etanol provocando uma maior taxa de morte e lise celular.

### **3.4. MASSA CELULAR RETIDA EM CADA FERMENTADOR.**

Logo após o término do experimento anterior foi detida a alimentação, reciclo e aeração dos fermentadores. Os fermentadores foram em seguida esvaziados e o suporte de cada um foi retirado cuidadosamente e procedeu-se então a avaliação do conteúdo de massa seca, usando a técnica de filtração e secagem descrita no item 3.5 de Material e Métodos.

#### **3.4.1.- Resultados experimentais.**

A concentração de massa seca no suporte foi calculada usando como referência o volume de suporte empacotado em cada um dos fermentadores, cujo valor é de 1 L.

A figura 25 mostra o perfil de concentração de massa seca retida nos diversos fermentadores.

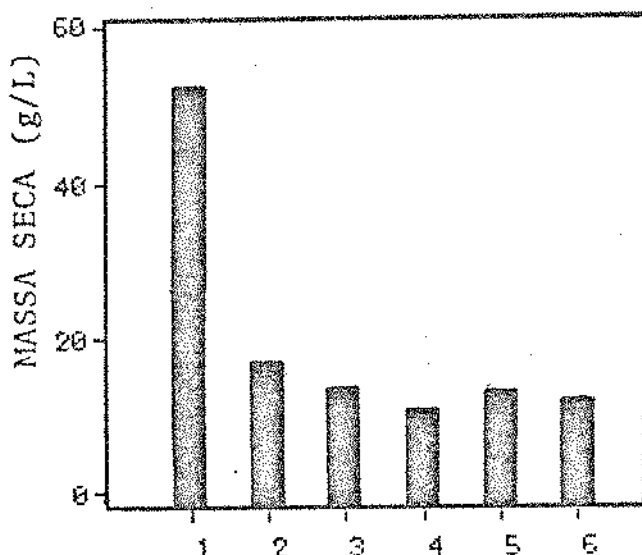


Fig. 25. Perfil de concentração de massa celular retida no sistema. Células imobilizadas.

### 3.4.2. Discussão.

Como pode ser visto na figura 25, o primeiro fermentador, reteve uma massa celular de aproximadamente o triplo do resto dos fermentadores embora os volumes de suporte sejam idênticos, o que revela a dependência da retenção do microrganismo em relação ao estado fisiológico do mesmo e às condições do meio ambiente. Aparentemente, a concentração de etanol e substrato possuem um papel importante na retenção do microrganismo já que em todos os casos estudados o pH apresentou mínimas mudanças entre os diversos fermentadores, variando nos casos extremos entre 3,0 e 2,5 para o primeiro e último fermentador respectivamente, permitindo assim concluir que o efeito do pH é mínimo ou inexistente na retenção celular pelo suporte.

Embora as produtividades no primeiro fermentador sejam muito superiores no caso de células imobilizadas em relação a

células livres, esta vantagem tende a desaparecer na medida em que incluímos um maior número de unidades no sistema devido às menores quantidades de material celular retido nestas unidades. Esta retenção preferencial deve ser estudada numa forma mais aprofundada, visando conseguir uma maior quantidade de massa celular retida nos últimos estagios e consequentemente maior produtividade do sistema.

#### 4. ANÁLISE COMPARATIVA DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DOS SISTEMAS USADOS.

##### 4.1. PRODUTIVIDADES DE ETANOL E PORCENTAGENS DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO.

###### 4.1.1. Efeito da taxa de diluição do sistema ( $D_s$ ).

Serão analisados para os três sistemas usados a influência da taxa de diluição na produtividade de etanol e na conversão de substrato, assumindo para todos os casos um rendimento de produto  $Y_{p/s}=0,48$ . Para um sistema de fermentadores a produtividade de etanol pode ser calculada usando a seguinte expressão:

$$Pr = D_s P_s = D_s Y_{p/s} (S_f - S_s) \quad (4.13)$$

Substituindo-se na expressão anterior a equação de definição da porcentagem de conversão de substrato, obtemos finalmente:

$$Pr = Y_{p/s} S_f \phi D_s = K \phi D_s \quad (4.14)$$

Esta expressão mostra como a produtividade de etanol num sistema está diretamente associada tanto à porcentagem de conversão de substrato quanto à taxa de diluição do sistema. Para o caso em estudo temos:

$$Pr = 0,48 \cdot 150 \phi D_s = 72 \phi D_s \quad (4.15)$$

Usando a equação anterior podemos traçar num único gráfico-

co, tendo como coordenadas a produtividade de etanol e a taxa de diluição do sistema, uma serie de retas para diferentes porcentagens de conversão de substrato. Assim por exemplo para uma conversão de 0% obtemos  $Pr=0$  para todo valor de  $D_s$ , para uma conversão de 50% obtemos a reta  $Pr=36D_s$  e para uma conversão total de substrato temos  $Pr=72D_s$  a qual corresponde à máxima concentração de etanol teóricamente possível (72 g/L).

Na figura 26 estão apresentados em forma resumida os resultados obtidos nos capítulos anteriores.

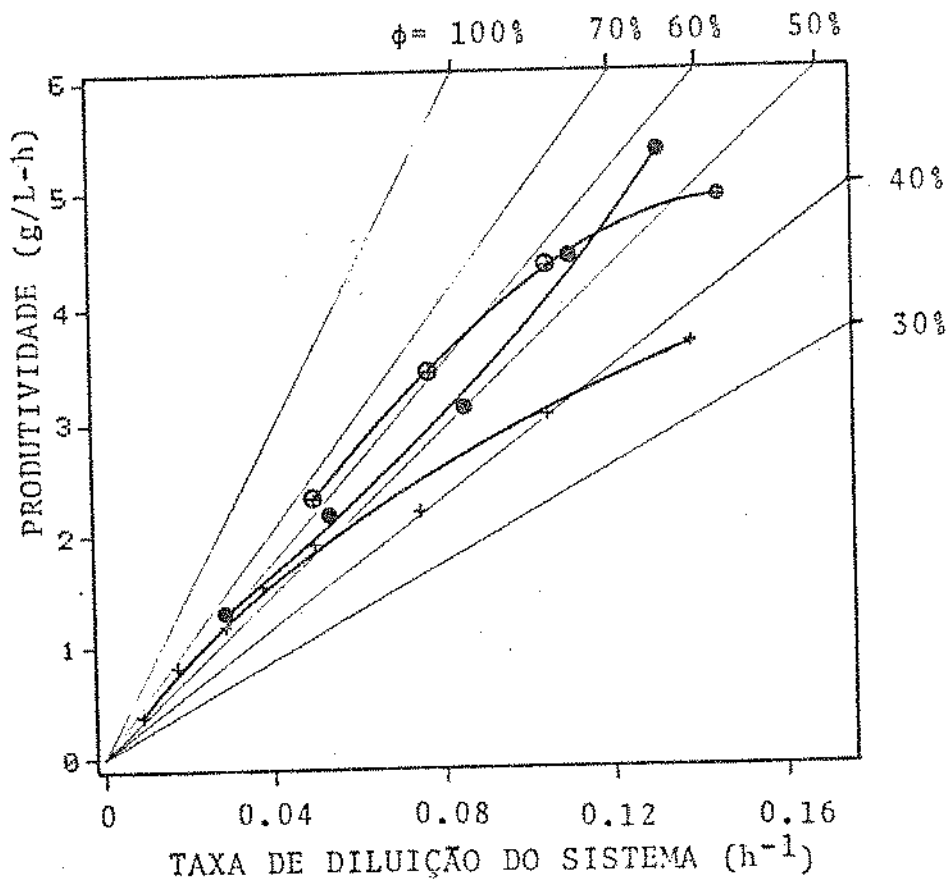


Fig. 26. Efeito da taxa de diluição do sistema na produtividade e porcentagem de conversão para os sistemas usados. Células livres com reciclo (●), immobilizadas sem reciclo (+), immobilizadas com reciclo (⊙).

Na figura 26 pode-se observar que em baixas taxas de diluição os três sistemas apresentaram o mesmo comportamento, mas na medida que a taxa de diluição aumenta os sistemas se diferenciam sendo que o de células imobilizadas sem reciclo apresenta produtividades menores, devido às baixas concentrações de massa celular. Os dois sistemas com reciclo de células têm produtividades maiores. No caso de células livres pode-se constatar que existe um bom desempenho em baixas e medias taxas de diluição mas com uma diminuição contínua da porcentagem de conversão. Por outro lado, o sistema com células imobilizadas teve um comportamento linear nas taxas de diluição usadas, com aumentos contínuos da produtividade e sem diminuição da porcentagem de conversão, superando assim as produtividades do sistema com células livres em altas taxas de diluição e com porcentagens de conversão maiores, o que permite economizar volume de fermentadores.

#### 4.1.2. Efeito da taxa de reciclo.

A partir dos gráficos de produtividade em função da taxa de reciclo para os casos de células livres e células imobilizadas foram obtidos graficamente os valores de  $dPr/da$  para diversos valores da taxa de reciclo e que são apresentados na figura 27.

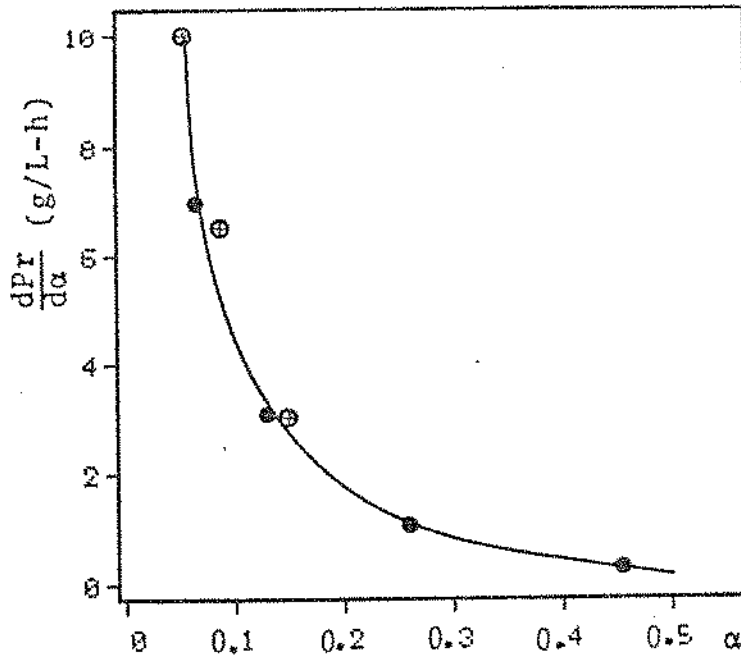


Fig. 27. Efeito da taxa de reciclagem ( $\alpha$ ) na mudança de produtividade ( $dPr/d\alpha$ ) para os sistemas usados. Células livres com reciclagem ( $\oplus$ ), células imobilizadas com reciclagem ( $\odot$ ).

Como pode ser visto na figura 27, a sensibilidade do sistema em relação à taxa de reciclagem, é maior a baixos valores desta, em especial para o caso de células livres. Para taxas de reciclagem um pouco superiores ( $\alpha > 0,1$ ) ambos os sistemas apresentaram os mesmos valores, diminuindo progressivamente com o aumento da taxa de reciclagem, evidenciando assim o compromisso existente entre o aumento da taxa de reciclagem e o aumento da produtividade.



#### 4.2. TAXAS ESPECÍFICAS DE PRODUÇÃO DE ETANOL.

Usando os valores das taxas específicas de produção de etanol calculadas nos capítulos anteriores foi construído a figura 28, na qual podemos ver o efeito da taxa de diluição na taxa específica de produção de etanol do primeiro fermentador para os três sistemas usados.

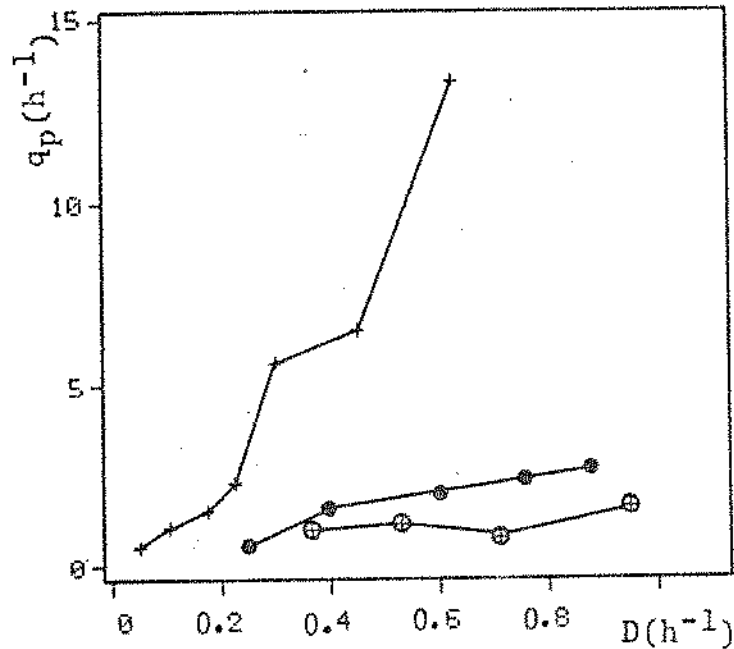


Fig. 28. Efeito da taxa de diluição ( $D$ ) nas taxas específicas de produção de etanol ( $q_p$ ) no primeiro fermentador. Células livres com reciclo ( $\oplus$ ), imobilizadas sem reciclo ( $+$ ), imobilizadas com reciclo ( $\odot$ ).

Podemos ver na figura 28 que o sistema de células imobilizadas sem reciclo apresentou taxas específicas de produção de etanol maiores devido às altas produtividades atingidas no fermentador e à baixa concentração de células livres. Este alto valor de  $q_p$  somente pode ser explicado pela grande quantidade de

material celular imobilizado no primeiro fermentador. A inclusão de reciclagem de células produziu uma diminuição na taxa específica de produção de etanol devido aumento da concentração de massa celular livre e não por uma diminuição da produtividade do primeiro fermentador uma vez que ela aumentou. No sistema de células livres com reciclagem os valores de taxa específica de produção foram menores devido as baixas produtividades obtidas, embora a massa celular tenha diminuído em relação ao caso de células imobilizadas com reciclagem. De forma geral, o sistema de células imobilizadas apresentou no primeiro fermentador produtividades muito superiores que o de células livres com reciclagem, fato este mais nítido quando o sistema operou com reciclo de massa celular.

### 4.3. RENDIMENTOS CELULAR E DE ETANOL.

Os rendimentos celular e de etanol calculados nos capítulos anteriores para diversas taxas de diluição do sistema são apresentados na figura 29 para os três sistemas de fermentação usados.

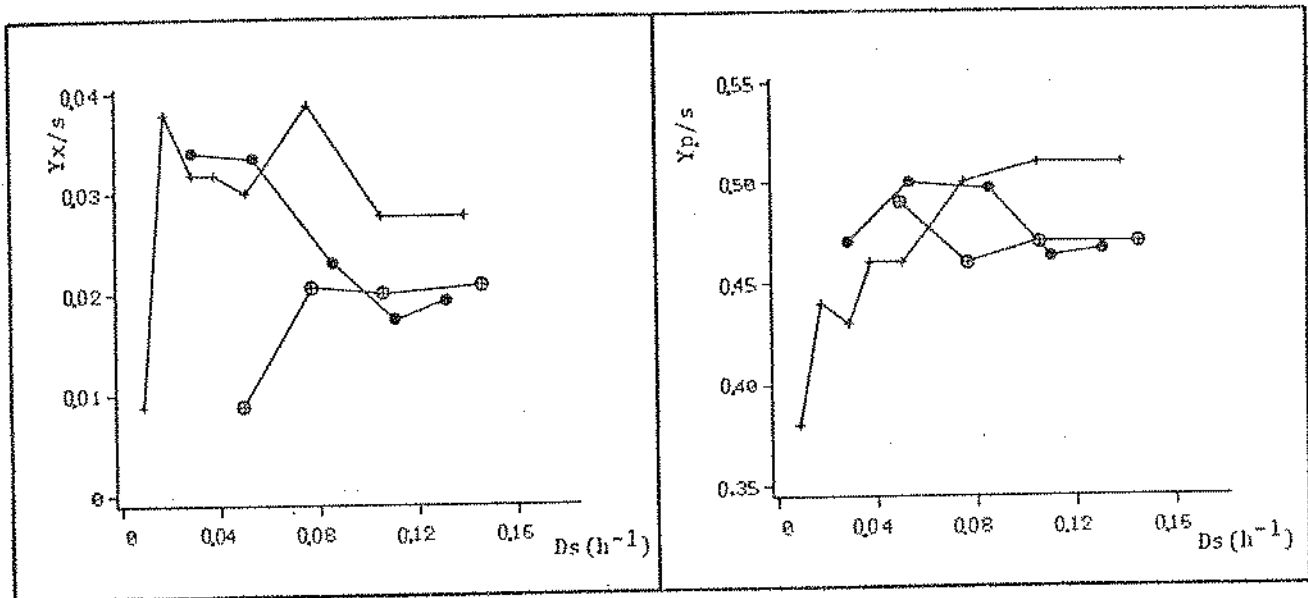


Fig. 29. Efeito da taxa de diluição do sistema. ( $D_s$ ) nos rendimentos de massa seca ( $Y_{x/s}$ ) e produto ( $Y_{p/s}$ ). Células livres com reciclo (⊕), imobilizadas sem reciclo (+) e imobilizadas com reciclo (⊗).

Na figura 29 podemos ver que os maiores rendimentos celulares são obtidos com células imobilizadas sem reciclagem ( $Y_{x/s} = 0,032$ ), exceto para taxas de diluição muito pequenas. Nos casos com reciclagem, os rendimentos celulares foram menores devido às baixas concentrações de massa celular presente no efluente do sistema como consequência da decantação do material celular. Os sistemas com reciclagem apresentaram comportamentos opostos em

relação aos rendimentos celulares, diminuindo no caso de células imobilizadas e aumentando no caso de células livres, atingindo em ambos os casos valores similares de rendimento ( $Y_x/s=0,020$ ) para taxas de diluição do sistema superiores a  $0,1h^{-1}$ .

Em relação aos rendimentos de etanol os dois casos com reciclagem apresentaram comportamento similar, diminuindo levemente na medida que aumenta a taxa de diluição, sendo superior para o caso de células imobilizadas com reciclagem. No caso de células imobilizadas sem reciclagem, o comportamento foi oposto, uma vez que para baixas taxas de diluição o rendimento foi muito baixo, aumentando, porém, de forma contínua com o aumento de  $D_s$ , igualando-se e mesmo ultrapassando os rendimentos dos sistemas com reciclagem alcançando finalmente o rendimento máximo teórico de etanol.

## 5. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS PARA CÉLULAS LIVRES.

### 5.1. TAXA ESPECÍFICA DE MORTE CELULAR E RENDIMENTO CELULAR.

Os modelos cinéticos desenvolvidos estão baseados na determinação de parâmetros experimentais como a taxa específica de crescimento celular observada e concentrações de massa celular, substrato e etanol. Têm-se duas alternativas para avaliar as taxas específicas de crescimento celular:

a) Desprezar o efeito da morte e lise celular e considerar somente os valores altos de  $\mu_{obs}$  a fim de fazer  $\mu_{obs} = \mu - k_d \approx \mu$

b) Considerar o efeito da morte e lise celular e avaliar os valores de  $k_d$  e  $\mu_{obs}$ , ou previa determinação do rendimento celular, usar os valores experimentais de concentração de substrato.

O fundamento teórico desta segunda alternativa será desenvolvido a partir de um balanço de substrato num reator homogêneo perfeitamente agitado (CSTR), que conduz às seguintes expressões:

$$FS_{i-1} = FS_i + (-dS/dt)V \quad (4.16)$$

Dividindo a expressão anterior pelo volume do reator e lembrando que  $D=F/V=(F_f+F_r)/V$  obtemos finalmente:

$$- \frac{dS}{dt} = D(S_{i-1} - S_i) \quad (4.17)$$

Por outro lado o rendimento celular está definido pela seguinte expressão:

$$(Yx/s) = \frac{dX/dt}{-(dS/dt)} = \frac{\mu_i X_i}{-(dS/dt)} \quad (4.18)$$

A partir das expressões 4.17 e 4.18 obtemos:

$$-(dS/dt) = \frac{\mu_i X_i}{(Yx/s)} = D(S_{i-1} - S_i) \quad (4.19)$$

Por outro lado como  $\mu_{obs} = \mu - k_d = D(X_i - X_{i-1})/X_i$ , substituindo na expressão 4.19 obtemos finalmente a expressão:

$$\mu_{obs} = \frac{(Yx/s) D(S_{i-1} - S_i)}{X_i} - k_d \quad (4.20)$$

Observamos que gráficando  $D(S_{i-1} - S_i)/X_i$  em função de  $\mu_{obs}$  obtemos uma reta de inclinação  $Yx/s$  e intercepção  $-k_d$ . Na figura 30 vemos estes valores graficados para as três primeiras taxas de diluição.

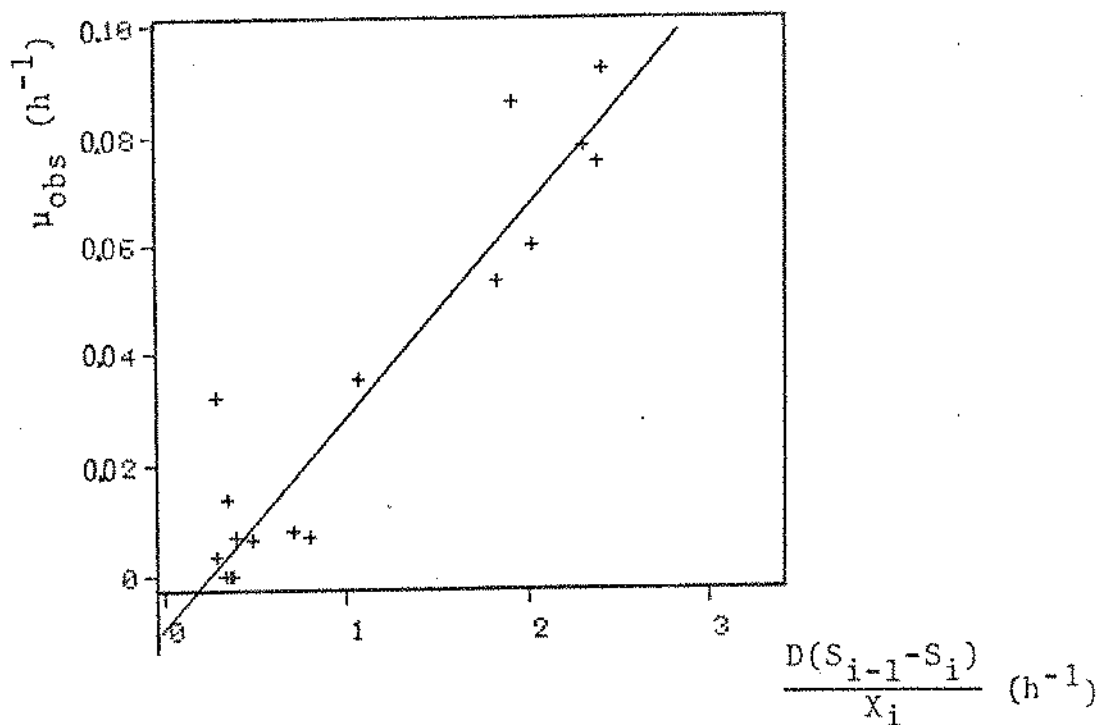


Fig. 30. Determinação gráfica do rendimento celular e da taxa específica de morte celular. Células livres com reciclo.

Através de regressão linear nos pontos experimentais da figura 30 obtivemos os seguintes parâmetros:

coef. de correlação  $r = 0,940$

$Y_x/s = 0,038$

$k_d = 0,0076 \text{ h}^{-1}$

Em geral o rendimento celular determinado a partir da figura 30 foi bastante superior aos rendimentos observados. A interseção com o eixo das ordenadas evidencia matematicamente a morte celular. Por outro lado, quando as taxas específicas de crescimento celular observadas são elevadas, o termo relativo a morte celular pode ser desprezado uma vez que  $\mu = \mu_{\text{obs}} + k_d \approx \mu_{\text{obs}}$ .

## 5.2. TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO, PODER TÓXICO E CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE ETANOL.

Para a avaliação dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo com células livres será usado o modelo de LEVENSPIEL (39) uma vez que ele é o único que apresenta uma relação generalizada e que mostra explicitamente a incapacidade do microrganismo de crescer e atingir concentrações de etanol superiores a um valor limite.

A expressão do modelo de LEVENSPIEL é a seguinte:

$$\mu = \mu_{\text{máx}}^* \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right)^n \quad (4.21)$$

no qual:

$\mu_{\text{máx}}^*$  = taxa específica máxima teórica de crescimento.

$P_{\text{máx}}$  = concentração máxima de etanol.

$n$  = poder tóxico.

Por outro lado a partir da equação 4.19 obtemos:

$$\mu = \mu_{\text{obs}} + k_d = \frac{D(Y_x/s) (S_{i-1} - S_i)}{X_i} \quad (4.22)$$

Podemos observar que existem duas formas para avaliar as taxas específicas de crescimento celular: avaliar as taxas específicas de crescimento observadas e somar a todas elas o valor da taxa específica de morte celular avaliada anteriormente ou, avalia-las usando o valor do rendimento celular anteriormente avaliado e as concentrações de substrato e massa celular presentes nos diversos fermentadores. Este último método foi o utilizado para avaliar a taxa específica de crescimento celular. Por-



tanto, a expressão para o cálculo das taxas específicas de crescimento é a seguinte:

$$\mu = \frac{D(Yx/s) (S_{i-1} - S_i)}{X_i} \quad (4.23)$$

Considerando que a concentração de substrato presente em todos os fermentadores foi sempre muito superior aos valores da constante de saturação  $K_s$  reportados na literatura (15,39,46,69) para fermentação alcoólica, o termo de limitação do crescimento por carência de substrato será considerado com valor unitário, resultando na seguinte expressão:

$$\mu = \mu_{\max}^* \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \quad (4.24)$$

A expressão anterior descreve uma cinética inibitória devida exclusivamente à presença do produto. Tomando logaritmo da expressão anterior obtemos:

$$\log \mu = \log \mu_{\max}^* + n \log \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) \quad (4.25)$$

Podemos observar que graficando  $\log \mu$  vs.  $\log(1 - P/P_{\max})$  para cada reator, obteremos uma reta a partir de cuja inclinação e intercepção tem-se respectivamente o valor do poder tóxico  $n$  e do  $\log \mu_{\max}^*$ .

A avaliação da concentração máxima de etanol ( $P_{\max}$ ), taxa específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}^*$ ) e poder tóxico ( $n$ ) foi realizada em computador mediante a técnica de regressão linear

nas variáveis  $\log \mu$  e  $\log(1-P/P_{\text{máx}})$  para diferentes valores de  $P_{\text{máx}}$ . O critério de convergência usado para o ajuste das variáveis foi a procura do melhor coeficiente de correlação.

Na figura 31 podemos observar a correlação existente entre as variáveis para uma concentração máxima de etanol de 56 g/L que apresentou o melhor coeficiente de correlação.

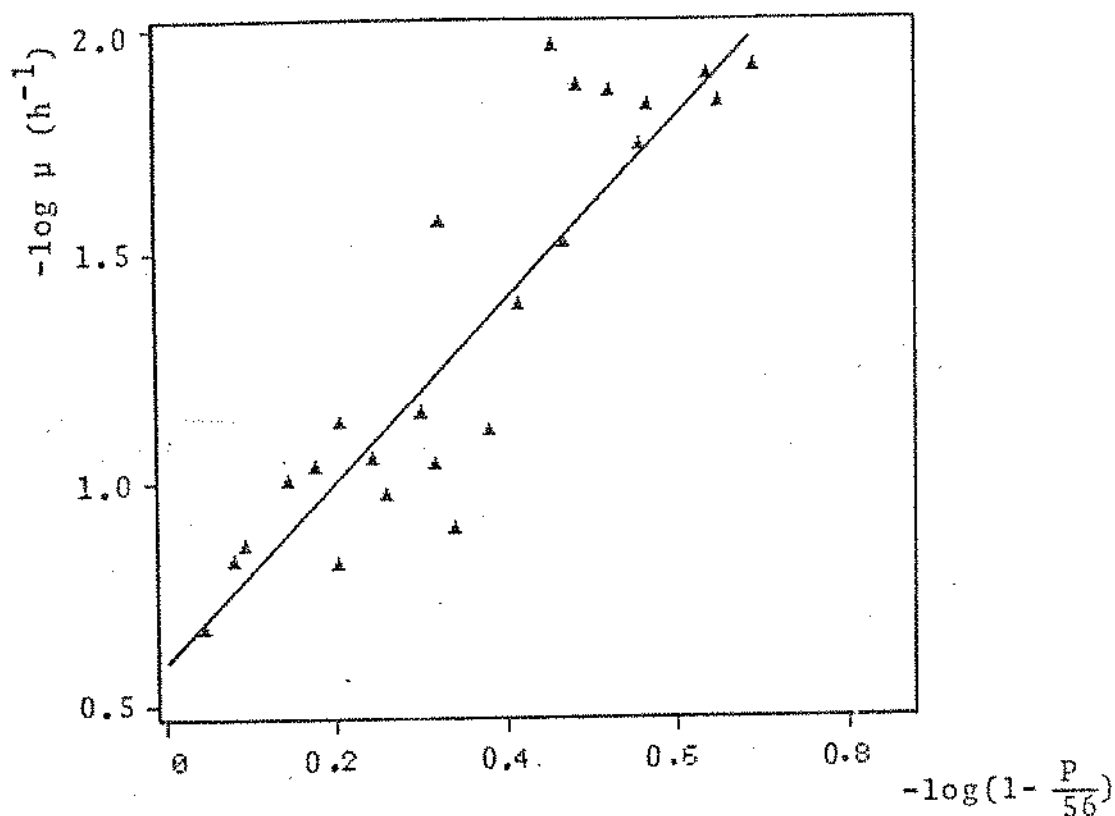


Fig. 31. Determinação gráfica dos parâmetros cinéticos para células livres.

Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos para a melhor correlação (coef. de correlação=0,904) são os seguintes:

$$P_{\text{máx}} = 56 \text{ g/L}; \mu_{\text{máx}}^* = 0,254 \text{ h}^{-1} \text{ e } n = 2,054.$$

O modelo cinético que descreve o comportamento da fermentação assume a seguinte expressão:

$$\mu(h^{-1}) = \mu_{obs} + 0,0076 h^{-1} = 0,254 \left(1 - \frac{P}{56}\right)^{2,054} \quad (4.26)$$

Na figura 32 pode-se ver para 4 taxas de diluição a correlação existente entre os pontos experimentais (concentração de etanol e taxa específica de crescimento celular) e o modelo cinético obtido anteriormente (eq. 4.26).

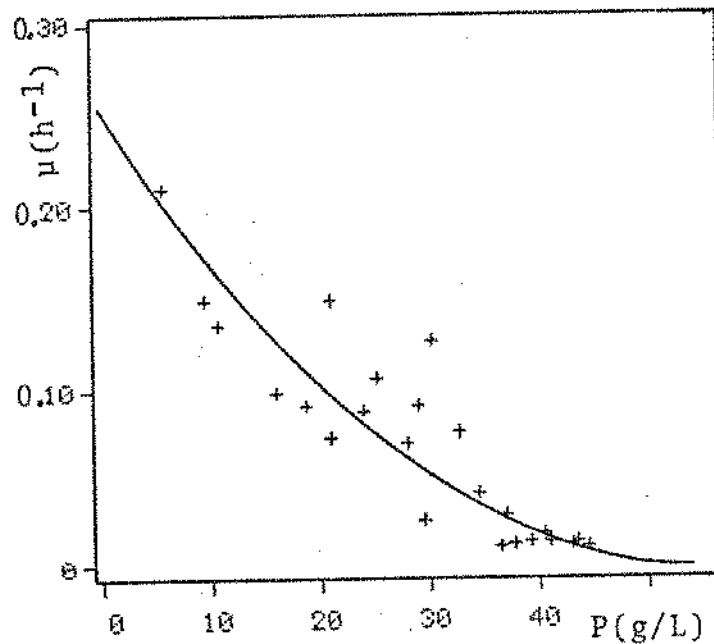


Fig. 32. Efeito da concentração de etanol (P) na taxa específica de crescimento celular ( $\mu$ ). Células livres.

A fim de melhor visualizar a validade do modelo cinético, os valores em cada reator das concentrações de etanol, substrato e massa seca obtidos pelo modelo, serão representados em função da taxa específica de crescimento para duas taxas de diluição

diferentes. Para a concentração de etanol no fermentador  $i$  obtemos a partir da eq. 4.26 a seguinte expressão:

$$P_i = 56 \left( 1 - \left( \frac{\mu_i}{0,254} \right)^{\frac{1}{2,054}} \right) \quad (4.27)$$

Por outro lado, para o sistema compreendido entre a entrada no primeiro fermentador e a saída do sexto fermentador são válidas as seguintes expressões:

$$Y_{p/s} = \frac{P_i - P_o}{S_o - S_i} \quad (4.28)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X_i - X_o}{S_o - S_i} \quad (4.29)$$

Assumindo que para uma taxa de diluição fixa os rendimentos em todos os fermentadores são iguais, as expressões para as concentrações de substrato e massa seca tem a seguinte expressão:

$$S_i = S_o - \frac{P_i - P_o}{Y_{p/s}} \quad (4.30)$$

$$X_i = X_o + Y_{x/s} (S_o - S_i) \quad (4.31)$$

Nas expressões anteriores  $P_i, S_i, X_i$  são respectivamente as concentrações de etanol, substrato e massa seca no fermentador  $i$  e  $P_o, S_o, X_o$  são respectivamente as concentrações de etanol, substrato e massa seca na entrada do primeiro fermentador.

Na figura 33 estão representadas para duas taxas de di-

luição as expressões teóricas para concentração de etanol, substrato e massa seca correspondentes as equações 4.27, 4.30 e 4.31 (linha contínua) e para efeito comparativo, os valores experimentais, observando-se um ajuste satisfatório entre eles.

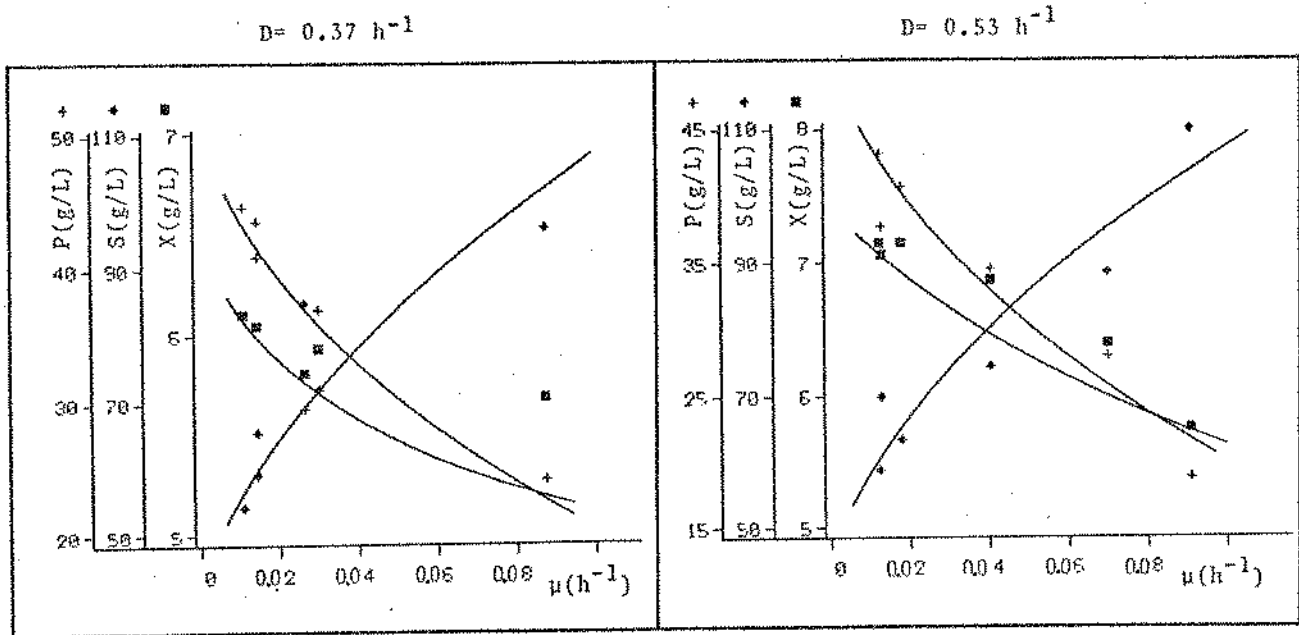


Fig.33. Representação gráfica do modelo cinético e das concentrações experimentais de etanol (P), substrato (S) e massa seca (X). Células livres.

## 6. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS PARA CÉLULAS IMOBILIZADAS.

Para um fermentador de características CSTR, a taxa específica de crescimento celular pode ser definida da seguinte forma:

$$\mu = \frac{(dX/dt)_{\text{cresc}}}{X_i} \quad (4.31)$$

Na expressão anterior a taxa específica de crescimento celular está referida à massa celular livre presente no fermentador e não à massa celular total, uma vez que a quantidade de massa celular imobilizada é desconhecida. Um balanço de massa celular no fermentador conduz à seguinte expressão:

$$FX_{i-1} + (dX/dt)_{\text{obs}} V = FX_i \quad (4.32)$$

Assumindo que a taxa de morte celular é pequena em relação às taxas específicas de crescimento observadas, podemos concluir que  $(dX/dt)_{\text{obs}} = (dX/dt)_{\text{cresc}}$  o que é válido para altas taxas específicas de crescimento observadas (baixas concentrações de etanol). Dividindo a expressão anterior pelo volume  $V$  de cada fermentador e substituindo na equação (4.31) obtemos:

$$\mu = \frac{D(X_i - X_{i-1})}{X_i} \quad (4.33)$$

Esta expressão será usada para avaliar as taxas específicas de crescimento celular e corresponde à mesma expressão geral obtida anteriormente para células livres sem considerar o efeito

da morte e lise celular.

Por outro lado e para simplificar o desenvolvimento de um modelo cinético que descreva o comportamento de um fermentador com células imobilizadas, será estudado o caso simples de uma unidade sem reciclagem de células, correspondendo ao fermentador n°1 da experiência com células imobilizadas sem reciclo. Um balanço de massa celular no fermentador conduz à seguinte expressão:

$$V(dX/dt)_{obs} = V(dX/dt)_{cresc} = V(dX/dt) = FX \quad (4.34)$$

Dividindo pelo volume e substituindo a expressão anterior de definição de taxa específica de crescimento celular (equação 4.31) obtemos finalmente:

$$\mu = \frac{(dX/dt)}{X} = D \quad (4.35)$$

Podemos observar que para este tipo de fermentador a taxa específica de crescimento assim definida é igual à taxa de diluição do fermentador da mesma forma que para células livres.

Foi observado que para altas taxas de diluição a concentração de etanol e de massa celular no primeiro fermentador não eram nulas como consequência da atividade do material celular imobilizado. Baseado nesta evidência experimental, procurou-se um modelo cinético que observe as condições limites de concentrações de massa seca e etanol, em relação à taxa de diluição uma vez que ficou demonstrado experimentalmente que as concen-

trações de etanol e massa seca tendem para valores nulos somente quando a taxa de diluição tende para infinito e que, para taxas de diluição muito pequenas, as concentrações de etanol e massa seca atingem valores máximos nos quais não existe crescimento celular.

Entre os modelos cinéticos propostos por diversos autores (MONOD (44), AIBA (3), LEVENSPIEL (39)) para descrever o efeito da concentração de substrato e etanol na taxa específica de crescimento, nenhum deles cumpre simultaneamente as condições limites experimentais observadas no experimento que são:

Para  $D = \mu = 0$  :  $P = P_{\text{máx}}$ .

Para  $D = \mu \rightarrow \infty$  :  $P = 0$

O modelo de MONOD não cumpre nenhuma das duas condições limites porque, além da taxa específica de crescimento não depender da concentração de etanol presente, para taxas de diluição muito pequenas prediz uma concentração nula de substrato qualquer que seja a concentração inicial, dando origem a concentrações de etanol sem um limite superior. Por outro lado, para taxas de diluição superiores à taxa específica máxima de crescimento, este modelo fornece resultados contraditórios.

O modelo proposto por AIBA também não cumpre nenhuma das duas condições limites, embora nele a taxa específica de crescimento dependa exponencialmente da concentração de etanol, uma vez que para taxas de diluição muito pequenas ele prediz concentrações de etanol muito altas e para taxas de diluição muito



grandes prediz concentrações de etanol negativas.

O modelo proposto por LEVENSPIEL se ajusta perfeitamente aos dados experimentais de células livres como foi visto no capítulo anterior, mas para o caso de células imobilizadas ele somente cumpre a primeira condição limite experimental. Para taxas de diluição muito pequenas prediz uma concentração máxima de etanol acima da qual não mais existe crescimento celular, mas para taxas de diluição muito grandes este modelo prediz concentrações negativas de etanol, não cumprindo assim a segunda condição limite.

Considerando a inexistência de um modelo cinético adequado para ajustar os dados experimentais e que observe ao mesmo tempo as condições limites experimentais, foram criados e analisados uma ampla variedade de modelos. Finalmente, baseado-se na simplicidade e boa correlação experimental, foi escolhido um modelo para fermentações com células imobilizadas mas que também pode ser aplicado em fermentações onde as concentrações de massa celular no interior do fermentador sejam maiores do que no efluente (células floculantes, sistemas com decantadores internos, sistemas com filtros internos, etc.)

$$\mu = K \frac{S}{K_s + S} \left( \frac{P_{\max}}{P} - 1 \right)^{n^*} \quad (4.36)$$

Na expressão anterior  $K$  (constante de heterogeneidade) é o valor da taxa específica de crescimento celular para uma concentração de etanol igual a  $0,5P_{\max}$ , sendo desejável que apresente um alto valor.  $K_s$  é a constante de saturação da mesma for-

ma que no caso de células livres.

Tomando logaritmo da expressão anterior e considerando que as concentrações de substrato foram sempre muito superiores aos valores reportados para a constante de saturação, ou seja, considerando o termo de limitação do crescimento por falta de substrato como valor unitario, tem-se:

$$\log \mu = \log K + n \cdot \log \left( \frac{P_{\text{máx}}}{P} - 1 \right) \quad (4.37)$$

Graficando  $\log \mu$  em função de  $\log((P_{\text{máx}}/P)-1)$  obtém-se uma reta de inclinação  $n^*$  e intercepção  $\log K$ .

Por outro lado, considerando que o microrganismo usado e as condições de operação do sistema foram as mesmas que no caso de células livres, assumiremos que a concentração máxima de etanol ( $P_{\text{máx}}$ ) é de 56 g/L. Para os cálculos das taxas específicas de crescimento celular foi usada a equação 4.33.

Na figura 34 estão graficados os logaritmos das taxas específicas de crescimento em função de  $\log((P_{\text{máx}}/P)-1)$  para diversos fermentadores e taxas de diluição afim de se obter os parâmetros cinéticos para células imobilizadas.

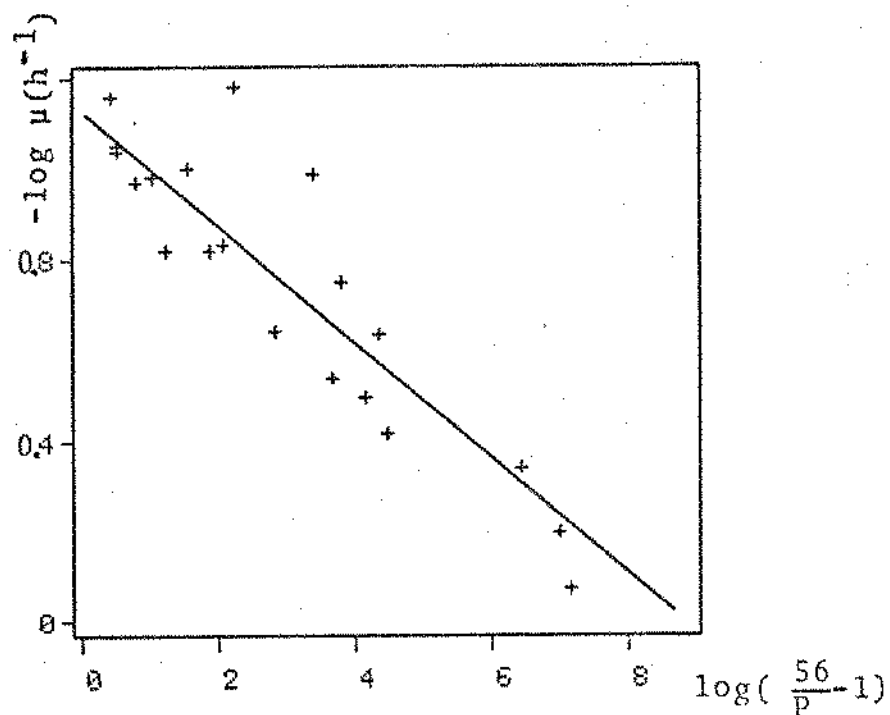


Fig. 34. Determinação gráfica dos parâmetros cinéticos para células imobilizadas.

Através de regressão linear nos pontos experimentais da figura 34 (coef. de correlação= 0,916) obtivemos para uma concentração máxima de etanol de 56 g/L os seguintes valores para os parâmetros cinéticos:

$$K = 0,0757 \text{ h}^{-1}$$

$$n^* = 1,270$$

Substituindo-se os valores anteriores na equação 4.36 resulta a seguinte expressão para a taxa específica de crescimento celular usando células imobilizadas em função da concentração de etanol:

$$\mu = 0,0757 \left( \frac{56}{P} - 1 \right)^{1,27} \quad (4.38)$$

A partir da equação anterior podemos obter a seguinte expressão que relaciona a concentração de etanol com a taxa específica de crescimento celular.

$$P = \frac{56}{\left(\frac{\mu}{0,0757}\right)^{1/1,27} + 1} \quad (4.39)$$

Para o caso particular de células imobilizadas sem reciclo em duas taxas de diluição (0,627 e 0,836 h<sup>-1</sup>) que apresentaram rendimentos celular e de produto similares (Y<sub>p/s</sub> = 0,51; Y<sub>x/s</sub> = 0,028) as expressões para as concentrações de substrato e etanol são as seguintes:

$$S = 150 - \frac{P}{0,51} \quad (4.40)$$

$$X = 0,028(150-S) \quad (4.41)$$

Na figura 35 pode-se ver graficadas (linha contínua) as concentrações teóricas de etanol, substrato e massa seca previstas pelo modelo cinético proposto (equações 4.39, 4.40 e 4.41) em função da taxa específica de crescimento celular e para efeito comparativo os resultados experimentais; evidenciando assim a boa correlação existente entre eles. Pode-se observar como na medida que a taxa específica de crescimento aumenta, a concentração de substrato tende a 150 g/L e as de etanol e massa seca tendem a zero. Por outro lado, em baixas taxas específicas de crescimento as concentrações de massa celular, substrato e etanol tendem a valores limites. Em linha pontilhada pode-se ver os

resultados previstos para concentração de etanol pelo modelo de LEVENSPIEL, o que evidencia a impossibilidade da sua aplicação nestes casos.

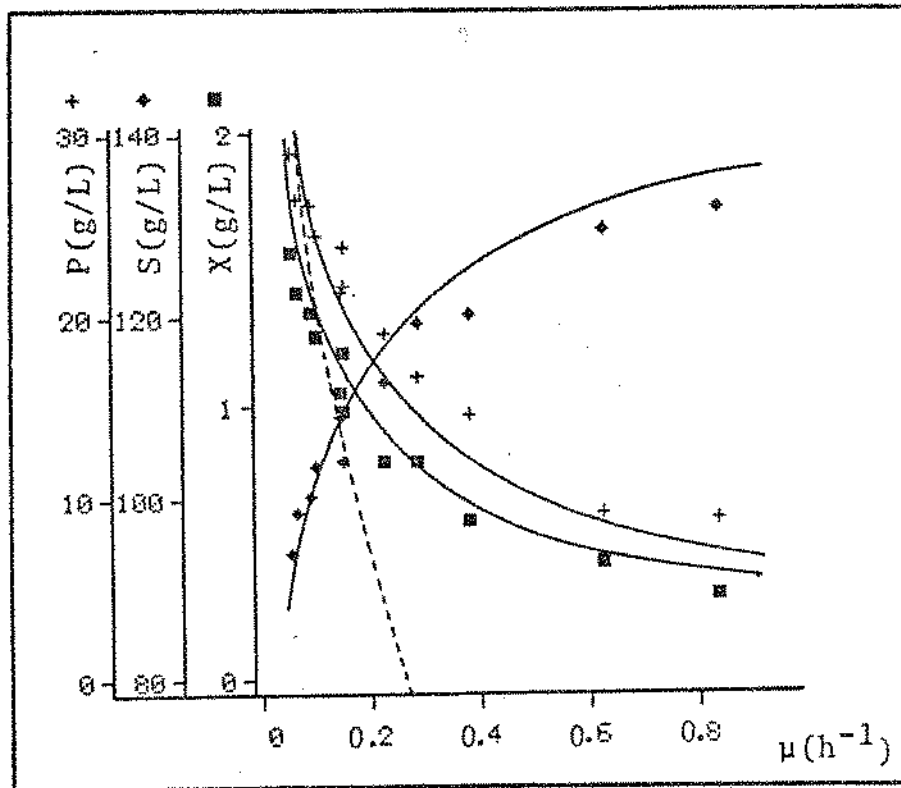


Fig. 35. Concentrações de etanol (P), substrato (S) e massa seca (X) experimentais e previstas pelo modelo cinético em função da taxa específica de crescimento celular ( $\mu$ ). Células imobilizadas.

7. DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE VIABILIDADE CELULAR PARA SISTEMAS SEM RECICLAGEM DE CÉLULAS.

No presente capítulo será proposto um modelo que permita prever a viabilidade celular para sistemas sem reciclagem de células em base às concentrações de etanol presentes e aos tempos médios de residência celular. Para  $n$  fermentadores de características CSTR, será definido o tempo médio de residência celular do sistema, compreendido entre o fermentador 1 e o fermentador  $n$  como:

$$\tau_{ci} = \frac{\text{massa celular total}}{\text{taxa retirada}} = \frac{V(X_1 + \dots + X_i)}{FX_i} \quad (4.42)$$

Em base aos resultados experimentais foi observado que os modelos propostos deveriam cumprir as seguintes condições limites:

- Para  $\tau_{ci} = 0$ , viab. celular = 100%
- Para  $\tau_{ci} \rightarrow \infty$ , viab. celular = 0%
- Para  $P = 0$ , viab. celular = 100%
- Para  $P = P_{\text{máx}}$ , viab. celular = 0%

$P_{\text{máx}}$  é a concentração máxima de etanol que o microorganismo poderia produzir para tempos de residência celular muito grandes cujo valor foi anteriormente avaliado sendo de 56 g/L.

Entre vários modelos estudados, selecionou-se um por sua simplicidade e bom ajuste aos dados experimentais. É o seguinte:

$$V\% = 100 \exp\left(-d \left(\frac{\tau_{ci} P}{P_{\text{máx}} - P}\right)^m\right) \quad (4.43)$$

Tomando logaritmo natural da expressão anterior obtemos:

$$\ln\left(\frac{V\%}{100}\right) = -d\left(\frac{\tau_{ci}P}{P_{\max}-P}\right)^m \quad (4.44)$$

Multiplicando a expressão anterior por -1 e tomando novamente logaritmo natural obtemos finalmente:

$$\ln\left(-\ln\left(\frac{V\%}{100}\right)\right) = \ln(d) + m \ln\left(\frac{\tau_{ci}P}{P_{\max}-P}\right) \quad (4.45)$$

Observa-se que graficando  $\ln(-\ln(V\%/100))$  em função de  $\ln(\tau_{ci}P/(P_{\max}-P))$  obteremos uma reta de inclinação  $m$  e intercepção  $\ln(d)$ .

Na tabela 7 são apresentados, para 4 taxas de diluição diferentes, os valores das variáveis antes definidas para uma concentração máxima de etanol de 56 g/L.

Tabela 7.

Valores experimentais para obtenção dos parâmetros  
do modelo de viabilidade celular.

$\ln(-\ln(\frac{V\%}{100}))$	$\tau_{ci} (h)$	$\ln(\frac{\tau_{ci} P}{P_{\max} - P})$
-1,62	18,6	3,28
-0,81	34,9	4,21
-0,37	54,0	4,91
-0,06	92,2	5,63
0,16	167,3	6,29
0,39	277,9	6,79
-3,31	9,4	2,03
-1,77	16,8	3,39
-0,99	23,8	4,02
-0,68	33,5	4,54
-0,45	40,4	4,91
-0,08	50,3	5,29
-5,30	5,7	0,86
-3,31	9,9	2,48
-2,27	14,3	3,20
-1,85	19,4	3,77
-1,56	25,1	4,12
-1,35	30,9	4,35
-4,60	4,4	0,47
-3,68	7,2	2,13
-2,93	10,9	2,93



A fim de se obter os valores dos parâmetros do modelo proposto, representou-se na figura 36 as variáveis antes definidas, cujos valores aparecem na tabela 7.

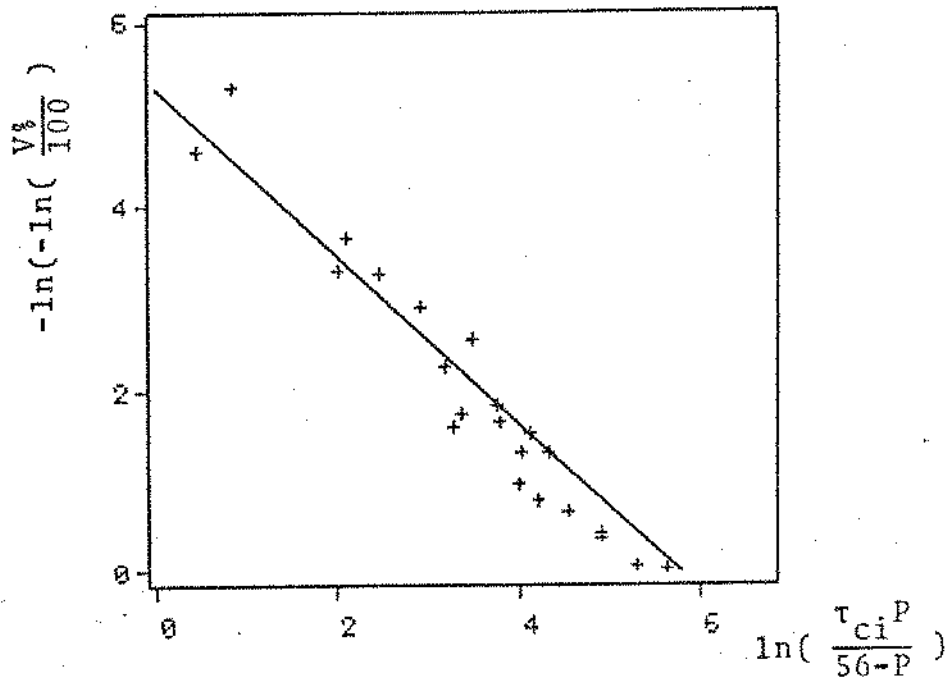


Fig. 36. Obtenção dos parâmetros do modelo de viabilidade celular para células imobilizadas sem reciclo.

Por regressão linear nos pontos experimentais da figura 36 obteve-se um coeficiente de correlação  $r = 0,965$  com um grau de certeza superior a 99,9%. Os parâmetros do modelo foram obtidos a partir da inclinação e intercepção, resultando na seguinte expressão para o modelo de viabilidade celular.

$$V\% = 100 \exp\left(-0,0047 \left(\frac{\tau_{ci} P}{56-P}\right)^{0,953}\right) \quad (4.46)$$

Na figura 36 pode-se observar que o modelo desenvolvido (linha contínua) ajusta-se satisfatoriamente aos dados experimentais obtidos para células imobilizadas sem reciclo.

## V. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.

As conclusões que podem ser tiradas de todo o trabalho realizado, são as seguintes:

- A adição de extrato de levedura numa dosagem de 1 g/L é suficiente para conseguir bom rendimento e produtividade de etanol para fermentações contínuas, apesar de ter sido observado durante as experiências alguma limitação, provavelmente por escassez de vitaminas.

- Entre os meios 2,3 e 4, o meio 2 prestou-se melhor para a produção de etanol, alcançando maior rendimento e boa produtividade, sendo que os 3 e 4 provocaram inibição do processo fermentativo devido ao excesso de sais minerais.

- O sistema de fermentadores atinge rapidamente o estado estacionário, bastando a operação contínua durante um tempo equivalente a 1,075 vezes o tempo de residência do sistema.

- A técnica de medição de CO<sub>2</sub> gerado pelo sistema permite acompanhar razoavelmente bem o estabelecimento do regime estacionário.

- A determinação do tempo de residência hidráulico real é muito importante e deve sempre ser realizada antes da operação de qualquer sistema contínuo. No caso presente, ele foi de gran-

de utilidade na verificação do comportamento hidrodinâmico do reator, permitindo sua otimização com vistas a obtenção de um sistema próximo ao de mistura perfeita.

- A imobilização de células em esponja de polietileno mostrou-se mais eficiente nos primeiros estágios, atingindo uma concentração de 55 g/L de massa seca no primeiro reator.

- Comparando-se o sistema operando com reciclo e sem reciclo de células, o reciclo mostrou-se benéfico, sendo que foi obtida uma maior produtividade quando o sistema operou com células livres com reciclo do que operando com células imobilizadas sem reciclo. Neste último caso, ao se passar a operar com reciclo, foi obtido o melhor comportamento global do fermentador, podendo-se trabalhar a altas taxas de diluição sem perda na produtividade.

- O aumento da taxa de reciclo foi em todos os casos benéfico. Observou-se sempre um aumento considerável na conversão e na produtividade com o incremento na taxa de reciclo. O maior valor da produtividade, 5,35 g/L-h, foi obtido com células imobilizadas, com uma taxa de reciclo de 0,116 e uma taxa de diluição de  $0,882 \text{ h}^{-1}$ . A maior conversão, 62,2%, ocorreu também com células imobilizadas, com uma taxa de reciclo de 0,457 e uma taxa de diluição de  $0,965 \text{ h}^{-1}$ .

- A aeração mostrou-se positiva somente no intervalo de

0,01 a 0,02 VVM, onde ocorreu um aumento na biomassa e na produção de etanol. A produtividade aumentou aproximadamente 7,5%, a conversão 5,6% e o rendimento de etanol 6,5% nesse intervalo, em relação ao processo sem aeração. Valores superiores da taxa de aeração prejudicaram o processo.

- A viabilidade celular de forma geral diminuiu com o aumento do tempo de residência no sistema e o fato de se ter introduzido aeração não modificou de forma considerável esse comportamento. O modelo matemático proposto pela equação 4.43 ajusta-se satisfatoriamente para o sistema sem reciclo de massa celular, mostrando que a viabilidade depende, além do tempo de residência, também da concentração de etanol.

- Os rendimentos alcoólicos obtidos, na quase totalidade dos experimentos, foram altos, chegando-se a obter o máximo teórico possível. Isto demonstra que o sistema multiestagio favorece a conversão de substrato a etanol, com perdas mínimas, mormente para o sistema operando com células imobilizadas.

- O modelo cinético proposto por LEVENSPIEL ajusta-se satisfatoriamente aos dados experimentais para células livres.

- Para sistemas que visam a retenção da massa celular no interior do reator, os modelos existentes (3,39,44) não podem ser usados. O modelo proposto (eq. 4.36) ajusta-se perfeitamente aos dados experimentais de células imobilizadas.

Como recomendações para trabalhos futuros podemos sugerir o seguinte:

- Utilizar uma linhagem de levedura com maior álcool-tolerância.

- Utilizar um meio de cultura mais rico, por exemplo, melão ou caldo de cana como fonte de carbono.

- Estudar com profundidade o problema da imobilização preferencial nos primeiros reatores.

- Estudar o desempenho do equipamento com alimentação repartida, a fim de diminuir o efeito inibitório por excesso de substrato.

- Verificar a validade do modelo matemático expresso pela equação 4.36, em outros sistemas heterogêneos.

- Estudar o efeito da vazão de recirculação interna dos reatores nos parâmetros de fermentação.

- Estudar o efeito do uso de reatores de diversos volumes, visando a otimização da produtividade do sistema.

## VI. BIBLIOGRAFIA.

1. ABBOTT, B.J. "Immobilized cells." In: Annual reports on fermentation. PERLMAN. Ed. Ac. Press, New York, vol. 1, 205-233, 1977.
2. ABBOTT, B.J. "Immobilized cells." In: Annual reports on fermentation. PERLMAN. Ed. Ac. Press, New York, vol. 2, 91-123, 1978.
3. AIBA, S.; SHODA, M. e NAGATANI, M. "Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation." Biotech. Bioeng., 10, 845-864, 1968.
4. ANDERSON, J.G.; BLAIN, J.A.; DIVERS, M. e TODD, R. "Use of the disc fermenter to examine production of citric acid by *Aspergillus niger*." Biotech. Letters, 2, 99-104, 1980.
5. ARLIE, J.P.; BALLERINI, D. e NATIVEL, F. Les procédés modernes de fabrication de l'éthanol de fermentation. Institut Français du Pétrole, Rapport réf: 32144, Mai 1984.
6. ATKINSON, B.; BLACK, G.M.; LEWIS, P.J. e PINCHES, A. "Biological particles of given size, shape and density for use in biological reactors." Biotech. Bioeng., 21, 193-200, 1979.

7. BAZUA, C.D. e WILKE, C.R. "Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Sacharomyces cerevisiae*." Biotech. Bioeng. Symp., 7, 105-118, 1977.
8. BLACK, G.M. "Immobilized biomass systems." In: E.B.C. Symposium on biotechnology." Nutfield, Great Britain, 218-229, 1983.
9. BLACK, G.M.; WEBB, C.; MATTHEWS, T.M. e ATKINSON, B. "Practical reactor systems for yeast cell immobilization using biomass support particles." Biotech. Bioeng., 26, 134-141, 1984.
10. BRIFFAUD, J. "Cinétique comparée de la production d'acide citrique en fermentation homogène et hétérogène. Influence de la limitation diffusionnelle de l'oxygène." Tese Doc. Eng., I.N.P.L., Nancy, 1978.
11. BUENO NETTO, C.L. "Fermentation alcoolique par levures floculées: étude des facteurs limitants et potentialités technologiques." Tese Doc. Ing., I.N.S.A., Toulouse, 1984.
12. CHIBATA, I. e TOSA, T. "Transformation of organic compounds by immobilized microbial cells." Adv. Appl. Microbiol., 22, 1-27, 1977.



13. COOPER, P.F. e WHEELDON, D.H.V. Cap. 7. In: Biological fluidised bed treatment of water and wastewater. COOPER, P.F. and ATKINSON, B. Ed. Ellis Horwood, 1981.
14. CRABTREE, H.G. Biochemical Journal, 23, 536, 1929.
15. CYSEWSKI, G.R. "Fermentation kinetics and process economics for the production of ethanol." Thesis of p.H.D. University of Berkeley, 1976.
16. CYSEWSKI, G.R. e WILKE, C.R. "Utilization of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis." Biotech. Bioeng., 18, 1297-1313, 1976.
17. CYSEWSKI, G.R. e WILKE, C.R. "Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle." Biotech. Bioeng., 19, 1125-1143, 1977.
18. CYSEWSKI, G.R. e WILKE, C.R. "Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol." Biotech. Bioeng., 20, 1421-1444, 1978.
19. DEL ROSARIO, E.J.; LEE, K. e ROGERS, P.L. "Kinetics of alcohol fermentation at high yeast levels." Biotech. Bioeng., 21, 1477-1482, 1979.

20. DIAS, S.M.; NOVAIS, J.M. e CABRAL, J.M. "Immobilization of yeasts on titanium activated inorganic supports." *Biotech. Letters*, 4, 203-208, 1982.
21. DURAND, G. e NAVARRO, J.M. "Immobilized microbial cells." *Process Biochem.*, 9, 14-23, 1978.
22. FREIN, E.; MONTECOURT, B.S. e EVELEIGH, D.E. "Cellulase production by *Trichoderma reesei* immobilized on k-carageenan." *Biotech. Lett.*, 4, 287-292, 1982.
23. GENCER, M.A. e MUTHARASAN, R. "Ethanol fermentation in a yeast immobilized tubular fermentator." *Biotech. Bioeng.*, 25, 2243-2269, 1983.
24. GHOMMIDH, C. "Utilization de microorganismes immobilisés en reacteur aéré: oxydation de l'ethanol par *Acetobacter aceti*." Tese Doc. Ing., I.N.S.A., Toulouse, 1980.
25. GHOSE, T.G. e TYAGI, R.D. "Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I. Batch versus continuous systems." *Biotech. Bioeng.*, 21, 1387-1400, 1979.
26. HARMANT, P. "Etude comparée de la fermentation alcoolique par des levures libres et adsorbées." Tese Doc. Ing., I.N.S.A., Toulouse, 1980.

27. HAUKELI, A.D. e LIE, S. "The effect of oxygen and unsaturated lipids on the physiological conditions of brewers' yeast." Abstract of papers, 5th. Int. Ferm. Symp., ed. H. DELLWEG, Berlin, 1976.
28. HAWKINS, J.E.; STOTT, D.A.; STOKES, R.L. e CLENNETT, A. Apendice 1. In: Biological fluidised bed treatment of water and wastewater. COOPER, P.F. and ATKINSON, B. Ed. Ellis Horwood, 1981.
29. HOLZBERG, I.; FINN, R.K. e STEINKRAUS, K.H. "A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice." Biotech. Bioeng., 9, 413-417, 1967.
30. JACK, T.R. e ZAJIC, J.E. "The immobilization of whole cells." Adv. Biochem. Eng., 5, 125-145, 1977.
31. JIRKU, V.; TURKOVA, J. e KRUMPHANZL, V. "Immobilization of yeast cells with retention of cell division and extracellular production of macromolecules." Biotech. Lett., 2, 509-513, 1980.
32. JONES, R.P.; PAMMENT, N. e GREENFIELD, P.F. "Alcohol fermentation by yeasts- the effect of environmental and other variables." Process Biochem., 42-48, 1981.

33. KIERSTAN, M. e BUCKE, C. "The immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels." *Biotech. Bioeng.*, 19, 387-397, 1977.
34. KOSARIC, N.; WEECZOREK, A.; COSENTINO, G.P. e MAGEE, R.J. "Ethanol fermentation." *Biotechnology*, 3, 258-385, 1983.
35. KOSARIC, N.; RUSSEL, I. e STEWART, G. "Ethanol production by fermentation: an alternative liquid fuel." *Adv. in Appl. Microbiol.*, 26, 147-227, 1980.
36. KOKUBU, T.; KARUBE, I. e SUZUKI, S. "Protease production by immobilized mycelia of *Streptomyces fraidae*." *Biotech. Bioeng.*, 23, 29-39, 1981.
37. LEE, K.J.; LEFEBVRE, D.E.; TRIBE, D.E. e ROGERS, P.L. "High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis* using continuous cell recycle." *Biotech. Letters*, 2, 487-492, 1980.
38. LEE, S.S.; ROBINSON, F.M. e WANG, H.Y. "Rapid determination of yeast viability." *Biotech. Bioeng. Symp.*, 11, 641-649, 1981.
39. LEVENSPIEL, O. "The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations." *Biotech. Bioeng.*, 22, 1671-1687, 1980.

40. LINKO, .Y.Y. e LINKO, P. "Continuous ethanol production by immobilized yeast reactor." *Biotech. Letters*, 3, 21-26, 1981.
41. MAIORELLA, B.; WILKE, C.R. e BLANCH, H.W. "Alcohol production and recovery." *Adv. Biochem. Engineer.*, 20, 43-92, 1981.
42. MARGARITIS, A. e WILKE, C.R. "The rotofermentor. I. Description of the apparatus, power requirements and mass transfer characteristics." *Biotech. Bioeng.*, 20, 709-726, 1978.
43. MILLER, G.L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Analytical Chem.*, 31, 426-428, 1959.
44. MONOD, J. "The growth of bacterial cultures." *Ann. Rev. Microbiol.*, 3, 371-394, 1949.
45. MOO-YOUNG, N.; LANTEY, J. e ROBINSON, C.W. "Immobilization of yeast cells on various supports for ethanol production." *Biotech. Letters*, 2, 541-548, 1980.
46. MORENO, M. "Fermentation alcoolique: contribution à l'étude des phénomènes d'inhibition en culture discontinue et en gradostat." *Tese Doc. Ing.*, I.N.S.A., Toulouse, 1979.

47. MORENO, M. e GOMA, G. "Alcohol fermentation in strict anaerobiosis in plug flow fermentor: effect of cell recycling." *Biotech. Letters*, 1, 483-486, 1979.
48. MOSS, F.; RICKARD, P. e BUSH, F.E. "The response by microorganism to steady state growth in controlled concentrations of oxygen and glucose." *Biotech. Bioeng.*, 13, 63-75, 1971.
49. NAGASHIMA, M.; AZUMA, M.; NOGUCHI, S.; INUZUKA, K. e SAMEJIMA, H. "Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells." *Biotech. Bioeng.*, 26, 992-997, 1984.
50. NAGODAWITHANA, T.W.; CASTELLANO, C. e STEINKRAUS, K.H. "Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentation." *Appl. Microbiol.*, 28, 383-391, 1974.
51. NAGODAWITHANA, T.W. e STEINKRAUS, K.H. "Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentation." *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 158-162, 1976.

52. NAGODAWHITHANA, T.W.; WHITT, J.T. e CUTAIA, A.J. "Study on the feedback effect of ethanol on selected enzymes of the glycolytic pathway." *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, 35, 179-183, 1977.
53. NAVARRO, J.M. "Fermentation en continu à l'aide de microorganismes fixés." Tese Doc. Eng., Univ. Toulouse, 1975.
54. NAVARRO, J.M. e DURAND, G. "Modification of yeasts metabolism by immobilization onto porous glass." *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 4, 243-254, 1977.
55. NAVARRO, J.M. e DURAND, G. "Fermentation alcoolique: influence de la température sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levure." *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 129B, 215-224, 1978.
56. NAVARRO, J.M. "Levures immobilisées: croissance et métabolisme; fermentation alcoolique." Tese Doc. d'Etat. Univ. Toulouse, 1980.
57. NISHIZAWA, Y.; MITANI, Y.; TAMAI, M. e NAGAI, S. "Ethanol production by cell recycling with hollow fibers." *J. Ferment. Tech.*, 61, 599-605, 1983.

58. NORD, F.F. e WEISS, S. Capitulo 7. In: The chemistry and biology of yeasts. A.H. COOK. Ed. Ac. Press, New York, 1958.
59. ODA, G.; SAMEJIMA, H. e YAMADA, T. Proceedings of Biotech 83, 597-611. Ed. Online Public Ltd., 1983.
60. OURA, E. "Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I. Factors affecting the type of metabolism." Biotech. Bioeng., 16, 1197-1212, 1974.
61. OURA, E. "Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. II. Activities of the oxidative enzymes." Biotech. Bioeng., 16, 1213-1225, 1974.
62. OURA, E. "Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. Activities of the glycolytic and pentose phosphate pathways." Biotech. Bioeng., 18, 415-420, 1976.
63. RAMALINGHAM, A. e FINN, R.K. "The vacuferm process: a new approach to fermentation alcohol." Biotech. Bioeng., 19, 583-589, 1977.
64. RIVIERE, J. "Les applications industrielles de la microbiologie." Ed. Masson et Cie., Paris, 1975.



65. ROGERS, P.J. e STEWART, P.R. "Mitochondrial and peroxisomal contributions to the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture." *J. Gen. Microbiol.*, 79, 205-217, 1973.
66. ROLZ, C. "Conceptos sobre la biotransformación de azúcares a etanol combustible." *Interciencia*, 7, 153-159, 1982.
67. ROSEN, K. "Continuous production of alcohol." *Process Biochem.*, 13, 25-26, 1978.
68. RYU, D.Y.; KIM, Y.J. e KIM, J.H. "Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentations systems." *Biotech. Bioeng.*, 26, 12-16, 1984.
69. RYU, Y.W. "Production d'éthanol en continu à l'aide de levures adsorbées sus support solide." Tese Doc. Ing., I.N.S.A., Toulouse, 1980.
70. SEDHA, R.K.; VERMA, G.; GUPTA, R.P. e TEWARI, H.K. "Ethanol production from molasses using cell recycling of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Ferment. Tech.*, 62, 471-476, 1984.
71. SOLS, A.; GANCEDO, C. e FUENTE, G.D. "Energy-yielding metabolism in yeasts." In: *The yeasts*. ROSE, A.H. e HARRISON, J.S. Ed. Ac. Press, London, vol. 2, 1969.

72. THOMAS, D.S.; HOSSACK, J.A. e ROSE, A.H. "Sterol and phospholipid composition influence ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc. Soc. Gen. Microbiol., 4, 92-93, 1977.
73. UCHOA, A. "Fermentation alcoolique: etude en culture continue de l'effect de la temperature et des antibiotiques en gradostat." Tese Doc. Ing., I.N.S.A., Toulouse, 1982.
74. VANDANME, E.J. "Immobilized microbial cells as catalysts." Chem. Ind., 24, 1070-1072, 1976.
75. VERMA, G.; SEDHA, R.K. e GUPTA, R.P. "Use of yeast cells recycling for rapid ethanol production from molasses." J. Ferm. Tech., 61, 527-531, 1983.
76. WADA, M.; KATO, J. e CHIBATA, I. "Continuous production of ethanol using immobilized growing yeast cells." Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech., 10, 275-287, 1980.
77. WANG, D.I.; COONEY, C.L.; DEMAIN, A.L.; DUNHILL, P.; HUMPHREY, A. e LILLY, M.D. Fermentation and enzyme technology. John Wiley and Sons. New York, 1979.
78. WILLIAMS, D. e MUNNECKE, D.M. "The production of ethanol by immobilized yeast cells." Biotech. Bioeng., 23, 1813-1825, 1981.

## VII. ANEXOS.

### ANEXO 1. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA HIDRAULICO REAL.

#### 1.1. INTRODUÇÃO.

Para as diversas modificações feitas nos reatores foram realizados os estudos de distribuição de tempos de residência com o propósito de otimizar o comportamento do sistema em termos das características hidrodinâmicas e de imobilização de células.

Foi verificado que existe um compromisso entre a obtenção de uma alta quantidade de células imobilizadas e a obtenção do comportamento CSTR ideal para o qual é necessário uma alta vazão de recirculação interna diminuindo assim a quantidade de massa celular imobilizada.

A fim de conhecer o comportamento hidrodinâmico das diversas configurações internas do reator, foram usadas as técnicas de injeção de traçador na forma de pulso e degrau. Para o caso do pulso procedeu-se a alimentação do reator em forma contínua com água de torneira de pH 7.2 e injeção na entrada de uma solução concentrada de ácido clorídrico e medindo-se o pH na saída em intervalos de 5 minutos.

Para o caso da técnica do degrau foi colocado no reator água de torneira para em seguida iniciar a alimentação constante de uma solução de sacarose de concentração  $C_0$ . Mediu-se a concentração de sacarose na saída ( $C(t)$ ) em intervalos de aproximadamente 3 minutos. Esta técnica foi usada para analisar o comportamento hidrodinâmico da configuração definitiva dos reatores usados para fermentação contínua com células imobilizadas.

## 1.2. ANTECEDENTES TEÓRICOS.

Para um reator de características CSTR como apresentado na figura 37, a teoria que permite a avaliação do comportamento hidrodinâmico de um reator através da técnica do degrau é a seguinte:

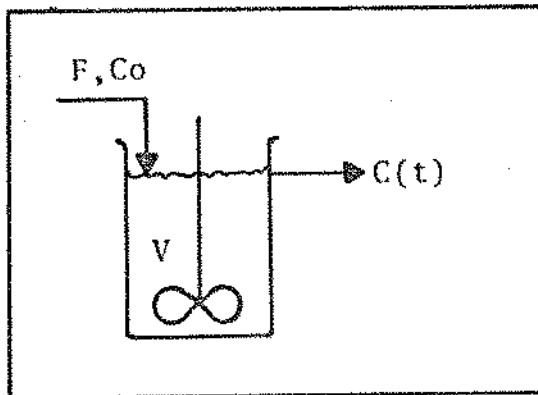


Fig. 37. Reator CSTR.

Na figura temos:

F= vazão de alimentação da solução de sacarose.

Co= concentração da solução de sacarose.

C(t)= concentração de sacarose na saída do reator.

V= volume do reator.

Fazendo um balanço de sacarose no reator em estado não estacionário apresentado anteriormente obtemos:

Taxa entrada de sacarose= Taxa saída + Taxa acumulação

$$FCo = FC + V \cdot (dC/dt) \quad (7.1)$$

Na expressão anterior  $V^*$  é o volume útil (ou de reação) do reator cujo valor deve ser similar ao volume real, indicando assim um bom aproveitamento dele.

Dividindo a expressão anterior por  $F$  e lembrando que o tempo de residência hidráulico real num reator está definido da seguinte maneira:

$$\tau^* = \frac{V^*}{F} \quad (7.2)$$

obtemos finalmente:

$$C_0 - C = \tau^* (dC/dt) \quad (7.3)$$

Arranjando e integrando a expressão anterior entre os limites  $t = 0$  e  $t = t$  obtemos:

$$\ln \frac{C_0}{C_0 - C} = \frac{t}{\tau^*} \quad (7.4)$$

Apartir da expressão anterior observamos que graficando  $\ln(C_0/(C_0 - C))$  em função do tempo  $t$  obteremos uma reta cuja inclinação permite avaliar o valor do tempo de residência hidráulico real do reator.

### 1.3. CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO TESTE.

A primeira etapa foi determinar o volume do reator sem o empacotamento, por enchimento com água resultando num volume de 1300 mL. Posteriormente ele foi esvaziado e empacotado com 24,7 gr de cubos de polietileno que correspondem a 25 mL de polietileno, resultando assim num volume de reator de 1275 mL. Logo após foi enchido com água de torneira, observando-se a presença permanente de grande número de bolhas de ar retidas no interior do leito o que resultará num acréscimo do volume de reator não utilizado (volume morto). Foi ligada a bomba de recirculação interna numa vazão aproximada de 10-15 mL/s para logo iniciar a alimentação de uma solução de sacarose de 244 g/L numa vazão constante de 770mL/h. Tomou-se amostras periódicas do efluente do reator para determinação refratométrica da concentração de sacarose, durante um período de 50 minutos. Nestas condições de operação o tempo de residência hidráulico para um reator CSTR ideal seria de  $1275/770 = 99,5$  minutos.

#### 1.4. RESULTADOS FINAIS.

Na figura 38 são graficados as variáveis definidas na equação 7.4 que permite avaliar o tempo de residência hidráulico real do reator.

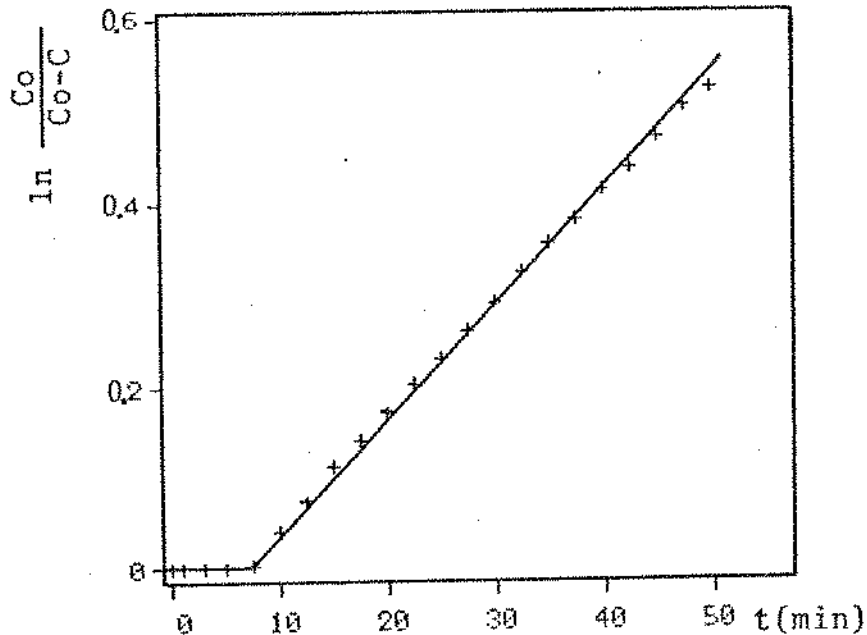


Fig. 38. Avaliação do comportamento hidrodinâmico do reator de leito empacotado.

Por regressão linear nos pontos anteriormente graficados foi obtido um coeficiente de correlação de  $r=0,9997$ , mas a reta não passou pelo origem, uma vez que a alimentação de sacarose não foi feita diretamente pelo fundo do reator e também devido à baixa velocidade média de recirculação interna, estimada em 10 cm/min. O valor da intercepção da reta com o eixo X indica a presença de regime misto tubular (PFR) e CSTR onde o tempo de residência real do escoamento tubular é de 7,0 minutos. O tempo de residência real para o reator CSTR foi obtido a partir da inclinação da reta resultando num valor de 81,6 minutos. Conside-

rando que a reação ocorrerá em ambos tipos de escoamento, os volumes de reação do reator serão os seguintes:

$$V_{PFR}^* = F\tau_{PFR}^* = 90 \text{ mL.}$$

$$V_{CSTR}^* = F\tau_{CSTR}^* = 1045 \text{ mL.}$$

Por outro lado a avaliação do volume morto devido à presença de ar retido no leito e eventuais canalizações (by pass) ou estagnações do fluxo pode ser estimada pela diferença existente entre o volume do reator (1275 mL) e o volume de reação (90+1045= 1135 mL) resultando em 140 mL.

Vistos os resultados anteriores podemos concluir que o volume útil ou de reação representa 89% do volume do reator, indicando que os fermentadores na sua configuração definitiva apresentaram um bom comportamento hidrodinâmico. O modelo final de cada reator está esquematizado na figura 39.

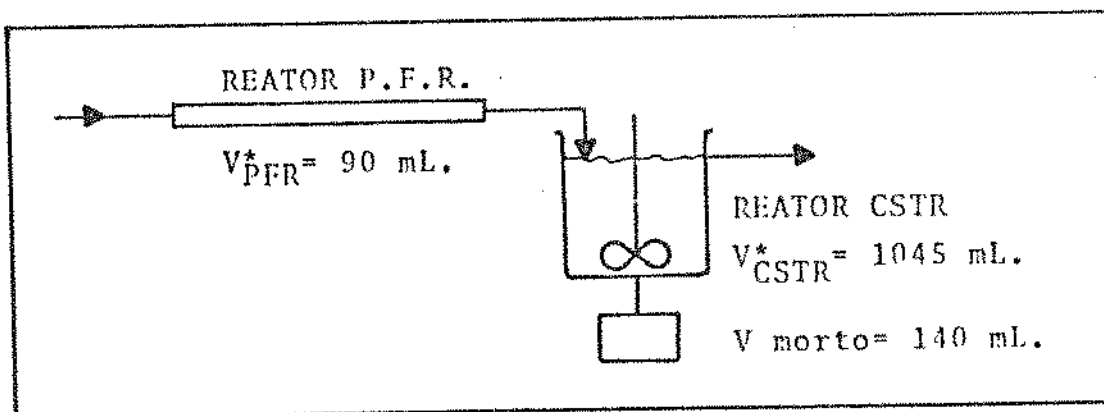


Fig.39. Modelo hidrodinâmico do fermentador de leito empacotado.



## ANEXO 2. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.

### 2.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA.

Foi estudado o efeito exercido pela concentração de extrato de levedura no meio usado para fermentação alcoólica descontínua. Usou-se o meio semi-sintético nel descrito no item 1.3.2 de Material e Métodos, variando a concentração de extrato de levedura entre 0,5 e 5,0 g/L.

Foram realizadas fermentações durante um período de 30 horas, retirando-se amostras a cada 2 horas para análise das concentrações de massa seca, substrato e etanol. De forma geral, foi observado que aumentando a concentração de extrato de levedura, tanto as concentrações de massa celular e de etanol aumentaram e as de substrato diminuíram.

Na tabela 8 estão representados, para diferentes concentrações de extrato de levedura, os resultados globais obtidos após 30 horas de fermentação descontínua.

Tabela 8.

Efeito da concentração de extrato de levedura na fermentação  
alcoólica descontínua.

Extrato levedura (g/l)	Massa seca produzida (g/l)	Etanol produzido (g/l)	Substrato consumido (g/l)	Y <sub>x/s</sub>	Y <sub>p/s</sub>	Conversão substrato (%)	Produtiv. global (g/l-h)
0,5	3,15	38,4	95	0,033	0,40	41	1,28
1,0	3,63	41,3	124	0,029	0,34	50	1,38
1,5	4,00	41,3	106	0,038	0,39	45	1,38
2,0	4,25	38,3	103	0,041	0,37	47	1,28
3,0	4,10	39,5	120	0,034	0,33	48	1,32
5,0	4,40	45,0	128	0,034	0,35	56	1,50

Pode-se observar na tabela 8 que, embora os aumentos de massa celular foram altos (aprox. 50%), não aconteceu o mesmo com a quantidade de etanol produzida que aumentou ao redor de 15%. Este fato resultou numa diminuição permanente no rendimento de etanol com o aumento do extrato de levedura, como consequência de uma maior quantidade de substrato utilizado para produção de massa celular.

Por outro lado, apesar que o aumento da concentração de extrato de levedura tenha aumentado a produtividade de etanol, a queda de rendimento evidencia o compromisso existente neste caso entre o aumento da produtividade e a diminuição do rendimento de etanol.

Em vista dos resultados optou-se por usar para as seguin-

tes formulações uma concentração de extrato de levedura de 1,0 g/L uma vez que concentrações menores acarretariam baixas produtividades de etanol e por outro lado concentrações mais altas, além de encarecer consideravelmente o custo do meio, diminuiriam o rendimento de etanol. Por outro lado em fermentações contínuas, principalmente em sistemas com reciclagem de células e/ou com células imobilizadas, pode-se trabalhar em níveis mais baixos de extrato de levedura em relação às fermentações descontínuas devido ao material intracelular liberado no meio pelas células autolisadas.

## 2.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SAIS MINERAIS.

Para a realização destes testes foram feitas 3 fermentações descontínuas usando os meios semi-sintéticos 2,3,4 descritos no item 1.3.3. de Material e Métodos com concentração de extrato de levedura de 1,0 g/L e variando as concentrações dos sais minerais. As três fermentações foram acompanhadas durante um período de 53 horas, retirando-se amostras em intervalos de 2,5-3,0 horas para análise das concentrações de massa seca, substrato e etanol.

Foi observado que os meios 2 e 3 favoreceram a produção de massa celular, apresentando concentrações similares ao longo de toda a fermentação. O meio 4, rico em sais minerais, apresentou a menor produção de massa celular.

Em relação à quantidade de etanol produzido, os meios 2 e 3 tiveram o mesmo comportamento, mas o meio 4 apresentou inicialmente concentrações menores, mas a partir das 40 horas de

fermentação atingiu valores superiores aos teores de etanol atingidos pelos meios 2 e 3. Na tabela 9 estão representados para os meios de cultura 2-3-4 os resultados finais obtidos após 53 horas de fermentação.

Tabela 9.

Efeito da concentração de sais minerais na fermentação alcoólica descontínua.

Meio	Massa seca produzida (g/l)	Etanol produzido (g/l)	Substrato consumido (g/l)	Yx/s	Yp/s	Conversão substrato (%)	Produtiv. global (g/l-h)
2	4,9	52,5	96	0,051	0,55	54	0,99
3	4,9	51,5	111	0,044	0,46	62	0,97
4	3,6	57,0	145	0,025	0,39	78	1,08

Pode-se observar que os rendimentos de etanol caíram drasticamente na medida em que a concentração de sais minerais era aumentada, embora as produtividades não tenham variado sensivelmente. Por outro lado, é interessante observar que também os rendimentos de massa seca diminuíram apreciavelmente na medida em que a concentração de sais foi aumentada, indicando uma possível inibição pelo excesso de sais, ou mesmo uma alta taxa de manutenção celular. Em vista destes resultados, optou-se pelo meio 2 uma vez que ele tem o menor custo e apresentou um ótimo rendimento de etanol e de massa seca além de boa produtividade.

Considerando-se que para o meio 2 a concentração máxima

de etanol atingida foi de 53 g/L, com uma conversão de substrato de somente 54%, optou-se formular como meio para as fermentações contínuas, uma modificação do meio 2 com concentrações 25% inferiores para todos seus componentes, exceto para o extrato de levedura, resultando finalmente no meio 5 (item 1.3.4 de Material e Métodos) o qual foi utilizado em todos os experimentos.

## ANEXO 3. ESTABELECIMENTO DO ESTADO ESTACIONARIO.

### 3.1. INTRODUÇÃO TEÓRICA.

De forma geral, para um sistema de fermentadores em estado transiente, a taxa de mudança de uma propriedade característica  $I$  é proporcional à magnitude da força impulsora, o qual matematicamente fica expresso da seguinte forma:

$$\frac{dI}{dt^*} = k(I_{\infty} - I) \quad (7.5)$$

$$t^* = \frac{t}{\tau_s} = \text{tempo adimensional} \quad (7.6)$$

$$\tau_s = \frac{V_s}{F_f} \quad (7.7)$$

Integrando a expressão anterior entre os limites  $t = 0$  e  $t = t$ , obtemos a seguinte expressão:

$$\ln\left(\frac{I_{\infty} - I}{I_{\infty} - I_0}\right) = -kt^* \quad (7.8)$$

na qual:  $I_{\infty}$  = valor de  $I$  para  $t \rightarrow \infty$

$I_0$  = valor de  $I$  para  $t \leq 0$

Graficando  $-\ln((I_{\infty} - I)/(I_{\infty} - I_0))$  em função de  $t^*$  obteremos uma reta cuja inclinação fornece o valor de  $k$ .

Por outro lado, graficando a porcentagem de mudança do sistema  $M\%$  em função do tempo adimensional  $t^*$  podemos visualizar a rapidez do estabelecimento do regime estacionário.

A porcentagem de mudança M% pode ser definida como:

$$M\% = \frac{I - I_0}{I_\infty - I_0} 100 = 100(1 - \exp(-kt^*)) \quad (7.9)$$

$$0 < M\% < 100$$

### 3.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS.

Como propriedade característica do sistema foi selecionada a taxa de produção de CO<sub>2</sub> (Q) usando a técnica de medição descrita em Material e Métodos. Foi acompanhada a mudança da taxa de produção de CO<sub>2</sub> quando a taxa de diluição do sistema (Ds) foi mudada de 0.076 h<sup>-1</sup> (τ<sub>S</sub>=13.3 h) para 0.105 h<sup>-1</sup> (τ<sub>S</sub>=9.54 h). A vazão inicial de CO<sub>2</sub> (Q<sub>0</sub>) e a vazão final de CO<sub>2</sub> (Q<sub>∞</sub>) foram respectivamente 9343 mL/h e 12225 mL/h. Os resultados experimentais são apresentados na tabela 10.

Tabela 10.

Estabelecimento do estado estacionario.

tempo (h)	tx	Q (mL/h)	M%	$-\ln \frac{Q_{\infty}-Q}{Q_{\infty}-Q_0}$
0,0	0,0	9343	0,0	0,0
0,17	0,018	9580	0,0822	0,0822
0,33	0,035	9600	0,0892	0,0934
0,50	0,052	9700	0,124	0,132
0,67	0,070	10000	0,228	0,259
0,83	0,087	10000	0,228	0,259
1,00	0,105	10060	0,249	0,286
1,16	0,122	10100	0,263	0,305
2,00	0,210	10700	0,471	0,636
3,00	0,315	10900	0,540	0,777
4,00	0,420	11280	0,672	1,115
5,00	0,523	11700	0,818	1,703
6,00	0,628	11680	0,811	1,665
7,00	0,733	11850	0,870	2,039
27,00	2,830	12225	1,0	-

A partir dos dados da tabela 10 foram construidas as figuras 40 e 41.



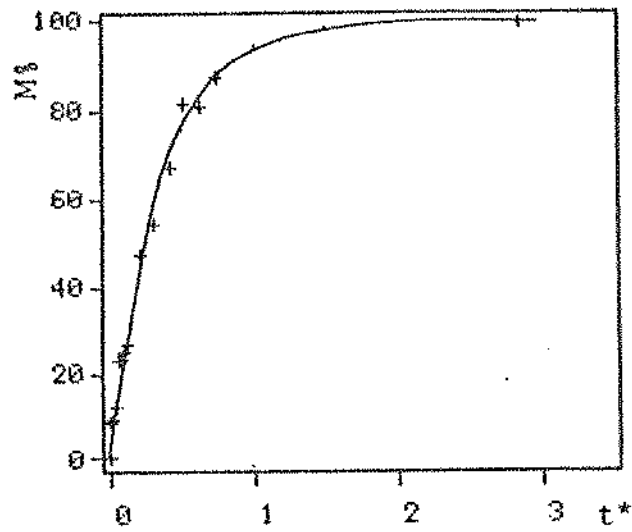


Fig. 40. Porcentagem de mudança da vazão de CO2 do sistema (M%) em função do tempo adimensional (t\*).

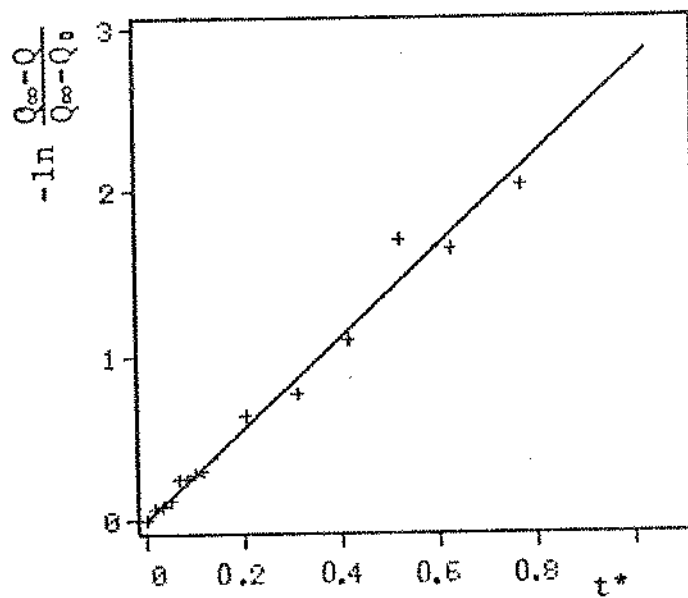


Fig. 41. Obtenção gráfica dos parâmetros da equação de estado transiente.

### 3.3. CALCULO DE PARAMETROS DO SISTEMA.

#### 3.3.1.-Valor da constante k da equação de estado transiente.

Através de regressão linear feita nos pontos experimentais da figura 41 obtivemos uma reta de coeficiente de correlação  $r = 0,993$  a qual está representada na figura 41. A partir de sua inclinação obtivemos o valor  $k = 2,79 \text{ h}^{-1}$ . Conseqüentemente a expressão para porcentagem de mudança do sistema fica:

$$M\% = \frac{Q - Q_0}{Q_\infty - Q_0} 100 = 100(1 - \exp(-2,79t^*)) \quad (7.10)$$

a qual está representada na figura 40.

#### 3.3.2.-Condições necessárias para estabelecimento do estado estacionário.

De forma geral, admite-se que quando a taxa de mudança do sistema (M%) atinga 95% estaremos praticamente nas condições de estado estacionário. Nesta situação temos:

$$t^* = (t^*)_{95\%} = \frac{3,0}{k} \quad (7.11)$$

Para o sistema analisado (cascata de 6 fermentadores) este valor é de  $(t^*)_{95\%} = 1,075$  o que significa que o sistema estudado atinge o estado estacionário muito rapidamente, bastando alimentar os fermentadores em forma contínua durante um tempo equivalente a 1,075 vezes o tempo de residência do sistema.

Na taxa de diluição estudada, o tempo de operação neces-

sario para atingir 95% da mudança total é de 10,26 h.

Numa forma mais generalizada, o tempo necessário para atingir 95% da mudança total pode ser avaliado da seguinte forma:

$$(t)_{95\%} = (t^*)_{95\%} \tau_s = \frac{3\tau_s}{k} = \frac{3V_s}{kF_f} \quad (7.12)$$

Para o caso estudado obtemos:

$$(t)_{95\%}(\text{h}) = \frac{3,0 \cdot 6 \cdot 1275}{2,79 F_f} = \frac{8224}{F_f(\text{mL/h})}$$

Observa-se que na medida que a vazão de alimentação aumenta, o tempo necessário para o estabelecimento do estado estacionário diminui proporcionalmente.

De forma prática, o estabelecimento do estado estacionário pode ser determinado de uma maneira muito simples através da medição do volume de meio coletado no efluente ( $V_m$ ) da cascata de fermentadores. Ou seja:

$$V_m = F_f(t)_{95\%} = V_s(t^*)_{95\%} = \text{constante} \quad (7.13)$$

Desta forma, no sistema considerado e para qualquer taxa de diluição, o estado estacionário praticamente é atingido toda vez que o volume de meio coletado no efluente supere o valor de 8,22 litros. De forma rotineira foram usados tempos de operação tais que permitiam coletar volumes de 25-30 litros de meio, o que confirma o estabelecimento do estado estacionário.