

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

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA CINÉTICA  
DE CRESCIMENTO ANAERÓBICO DE *Saccharomyces cerevisiae*

José Guilherme Lembi Ferreira Alves  
ENGENHEIRO QUÍMICO, UFMG, 1992

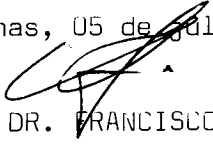
Prof. Francisco Maugeri Filho  
ORIENTADOR

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em  
Engenharia de Alimentos.

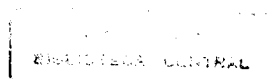
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por JOSÉ GUILHERME LEMBI FERREIRA ALVES e aprovada pela Comissão Julgadora U5.07.96.

Campinas, 05 de julho de 1996

  
PROF. DR. FRANCISCO MAUGERI FILHO  
Presidente da Banca

CAMPINAS  
JULHO/1996



*À memória de meu pai, José, que sempre me incentivou a seguir a profissão que escolhi.*

*À minha mãe, Zélia, pelo carinho e apoio em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho, pela orientação e apoio na realização deste trabalho.
- À FAPESP, pelo financiamento do projeto.
- Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante 30 meses.
- À FAEP/FUNCAMP, pelo auxílio financeiro para o término da tese.
- À Usina São Francisco/SP, pelo fornecimento de melão de cana-de-açúcar.
- À Prof. Dra. Cecília Laluci, da UNESP/Araraquara, ao IPT/SP e às Usinas Barra Grande, Santa Adélia e Cresciumal, todas do estado de São Paulo, pelas doações das cepas testadas.
- Aos meus irmãos Marcelo e Marcos e minhas cunhadas Vânia e Patrícia, pelo incentivo e apoio.
- À Fifa, pela valiosa orientação no Laboratório de Bioengenharia e pela amizade.
- Aos amigos, especialmente Alexandre, Ana, Eduardo, Eliana, Lucy e Yemiko, pelo apoio, companhia e momentos alegres compartilhados.
- Aos colegas, funcionários e professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

## SUMÁRIO

<b>Resumo.....</b>	<b>vii</b>
<b>Summary.....</b>	<b>viii</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>xii</b>
<b>Nomenclatura.....</b>	<b>xiii</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>03</b>
<b>II.1 - Fermentação Alcólica .....</b>	<b>03</b>
<b>II.2 - Processos para produção de etanol via fermentação .....</b>	<b>03</b>
<b>II.2.1 - Processo clássico ou batelada.....</b>	<b>05</b>
<b>II.2.2 - Processo batelada alimentada .....</b>	<b>06</b>
<b>II.2.3 - Processo contínuo.....</b>	<b>06</b>
<b>II.3 - Cinética da fermentação alcólica.....</b>	<b>07</b>
<b>II.3.1 - Modelos cinéticos.....</b>	<b>07</b>
<b>II.3.2 - Parâmetros cinéticos.....</b>	<b>13</b>
<b>II.3.2.1 - Efeito da temperatura nos parâmetros                     do modelo cinético.....</b>	<b>15</b>
<b>II.4 - Fatores que afetam a fermentação alcólica.....</b>	<b>17</b>
<b>II.4.1 - pH .....</b>	<b>17</b>
<b>II.4.2 - Temperatura .....</b>	<b>18</b>

<b>II.4.3 - Substrato .....</b>	<b>20</b>
<b>II.4.4 - Oxigênio.....</b>	<b>20</b>
<b>II.4.5 - Etanol .....</b>	<b>20</b>
<b>II.4.6 - Viabilidade celular .....</b>	<b>21</b>

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

<b>III.1 - Materiais.....</b>	<b>23</b>
<b>III.1.1 - Microrganismo .....</b>	<b>23</b>
<b>III.1.2 - Condições da cultura .....</b>	<b>23</b>
<b>III.1.3 - Meios de cultura .....</b>	<b>23</b>
<b>III.1.4 - Fermentador.....</b>	<b>24</b>
<b>III.2 - Procedimento Experimental.....</b>	<b>25</b>
<b>III.2.1 - Preparo do inóculo para testes com         fermentação contínua.....</b>	<b>25</b>
<b>III.2.2 - Teste para determinação de Pm.....</b>	<b>26</b>
<b>III.2.3 - Seleção do microrganismo.....</b>	<b>27</b>
<b>III.2.4 - Fermentação contínua.....</b>	<b>27</b>
<b>III.3 - Métodos analíticos.....</b>	<b>28</b>
<b>III.3.1 - Concentração de Açúcares Redutores         Totais .....</b>	<b>28</b>
<b>III.3.2 - Concentração de células .....</b>	<b>28</b>
<b>III.3.3 - Concentração de etanol .....</b>	<b>29</b>

III.4 - Determinação do rendimento de etanol ( $Y_p/s$ ) e do rendimento celular ( $Y_x/s$ ) .....	29
III.5 - Determinação das constantes do modelo .....	30
IV. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO .....	33
IV.1 - Seleção do microrganismo .....	33
IV.2 - Determinação de $P_m$ .....	38
IV.3 - Fermentação contínua.....	41
IV.3.1 - Determinação das constantes cinéticas da equação de Monod em função da temperatura.....	43
IV.3.2 - Determinação de $Y_x/s$ .....	49
IV.3.3- - Determinação de $Y_p/s$ .....	54
V. CONCLUSÃO .....	60
VI. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	62
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética do crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*, em meio de cultura industrial, levando-se em consideração a concentração do substrato e a temperatura. A maioria dos trabalhos publicados sobre este assunto têm como base um processo isotérmico e os parâmetros cinéticos são determinados em condições muito diferentes da realidade das destilarias brasileiras. Assim, um estudo para a obtenção de um modelo cinético de crescimento celular aplicável a uma faixa de temperatura de fermentação dentro das condições climáticas do país e de operação das indústrias poderá ser muito útil para estudos futuros de otimização do processo.

Foram realizados ensaios com fermentação contínua em um reator tipo CSTR, em uma faixa de temperatura de 28 a 38°C. O microrganismo utilizado foi uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* cedida pela Usina Santa Adélia/SP, selecionada entre 8 linhagens testadas. O meio de cultura utilizado foi à base de melaço de cana-de-açúcar, contendo 40 gART/l e suplementado com 2,5 g/l de extrato de levedura.

Através das análises dos resultados, foram obtidos alguns modelos matemáticos expressando os parâmetros cinéticos  $P_m$  (concentração de etanol acima da qual não ocorre crescimento celular),  $\mu_{max}$  (velocidade específica máxima de crescimento celular) e  $Y_{x/s}$  (rendimento celular) em função da temperatura. Um valor médio para  $K_s$  (constante de saturação) também foi obtido experimentalmente. Os modelos matemáticos e o valor de  $K_s$  obtidos são mostrados a seguir:

$$1) P_m = 638,1 \cdot e^{(-0,05741 \cdot T)}, \text{ para } 30 < T < 38^\circ\text{C};$$

$$2) \mu_{max} = 4,181 \cdot 10^4 \cdot e^{\left(\frac{-3535}{T}\right)} - 5,397 \cdot 10^{69} \cdot e^{\left(\frac{-50475}{T}\right)}, \text{ para } 28 < T < 38^\circ\text{C};$$

$$3) Y_{x/s} = 0,098 \text{ gcél.seca/gART, para } 28 < T < 34^\circ\text{C};$$

$$Y_{x/s} = 0,292 \cdot e^{(-0,032 \cdot T)}, \text{ para } 34 < T < 38^\circ\text{C}.$$

$$4) K_s \cong 4,1 \text{ gART/l, entre } 28 \text{ e } 38^\circ\text{C};$$

## ABSTRACT

In this work, the anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* in industrial culture medium was studied. Most of the works found in the literature about alcohol production consider the process as an isothermic one. However it is well known that alcoholic fermentation is greatly influenced by the temperature, so that one could expect an optimal temperature profile, either in fed batch or continuous process, that leads to an optimal performance of the whole process. The main goal of this work was then to establish a kinetic model for growth, taking into account the concentrations of alcohol, sugar and cells as well as the fermentation temperature. This work is the first step of a project intending to model the whole process in a temperature range technically possible and easily obtained in brazilian alcohol factories.

The work was carried out in a continuous stirred tank reactor (CSTR), with temperature between 28 and 38°C. The microorganism was *Saccharomyces cerevisiae* isolated at the Usina Santa Adélia, selected from 8 strains. The culture medium was based on sugar cane molasses, with 40 g/l as total reducing sugars, supplemented by yeast extract 2,5 g/l.

Mathematical models were developed for  $P_m$  ( ethanol concentration above which cells do not grow),  $\mu_{max}$  ( maximum specific growth rate of the cells) and  $Y_{X/S}$  ( yield of cells) , as well as a value for  $K_s$  ( saturation constant) was found, as follow:

$$1) P_m = 638,1 \cdot e^{(-0,05741 \cdot T)}, \text{ for } 30 < T < 38^\circ\text{C};$$

$$2) \mu_{max} = 4,181 \cdot 10^4 \cdot e^{\left(\frac{-3535}{T}\right)} - 5,397 \cdot 10^{69} \cdot e^{\left(\frac{-50475}{T}\right)}, \text{ for } 28 < T < 38^\circ\text{C};$$

$$3) Y_{X/S} = 0,098 \text{ gdried cel./gTRS}, \text{ for } 28 < T < 34^\circ\text{C};$$

$$Y_{X/S} = 0,292 \cdot e^{(-0,032 \cdot T)}, \text{ for } 34 < T < 38^\circ\text{C}.$$

$$4) K_s \cong 4,1 \text{ gTRS/l}, \text{ between } 28 \text{ e } 38^\circ\text{C};$$



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Curvas típicas da cinética de produção de álcool para os três processos de fermentação: (a) batelada, (b) batelada alimentada e (c) contínuo.

Figura 2.2- Perfil de temperatura da tolerância máxima ao etanol de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces fragilis*.

Figura 3.1 - Visão esquemática do fermentador BIOFLOW III.

Figura 3.2 - Fotografia do fermentador BIOFLOW III em operação.

Figura 3.3 - Reator de mistura agitado (CSTR).

Figura 4.1 - Curva de crescimento para a linhagem 1 a 32°C.

Figura 4.2 - Curva de crescimento para a linhagem 2 a 32°C .

Figura 4.3 - Curva de crescimento para a linhagem 3 a 32°C .

Figura 4.4 - Curva de crescimento da linhagem 4 a 32°C .

Figura 4.5 - Curva de crescimento da linhagem 5 a 32°C .

Figura 4.6 - Curva de crescimento da linhagem 6 a 32°C .

Figura 4.7 - Curva de crescimento da linhagem 7 a 32°C .

Figura 4.8 - Curva de crescimento da linhagem 8 a 32°C .

Figura 4.24 - Gráfico para determinação de  $Y_{x/s}$  na temperatura de 36°C.

Figura 4.25 - Gráfico para determinação de  $Y_{x/s}$  na temperatura de 38°C.

Figura 4.26 - Variação de  $Y_{x/s}$  com a temperatura.

Figura 4.27 - Gráfico para determinação de  $Y_{p/s}$  na temperatura de 28°C.

Figura 4.28 - Gráfico para determinação de  $Y_{p/s}$  na temperatura de 30°C.

Figura 4.29 - Gráfico para determinação de  $Y_{p/s}$  na temperatura de 32°C.

Figura 4.30 - Gráfico para determinação de  $Y_{p/s}$  na temperatura de 34°C.

Figura 4.31 - Gráfico para determinação de  $Y_{p/s}$  na temperatura de 36°C.

Figura 4.32 - Gráfico para determinação de  $Y_{p/s}$  na temperatura de 38°C.

Figura 4.33 - Variação de  $Y_{p/s}$  com a temperatura.

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Vantagens e inconvenientes dos processos contínuos e descontínuos de fermentação alcoólica, segundo MAIA (1989).

Tabela 2.2 - Tabela com valores encontrados na literatura para parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica.

Tabela 4.1 - Valores de  $\mu_{max}$  obtidos das curvas de crescimento a 32°C.

Tabela 4.2 - Valores de  $P_m$  obtidos nos ensaios em batelada.

Tabela 4.3 - Resultados dos ensaios com fermentação contínua. Os valores de S, X e P são a média das análises, que foram feitas em triplicata.

Tabela 4.4 - Valores obtidos para  $\mu_{max}$  e  $K_s$ , fazendo-se a regressão linear do gráfico  $1/\mu$  vs.  $1/S$ .

Tabela 4.5 - Valores de  $Y_{x/s}$  nas temperaturas de teste.

Tabela 4.6 - Valores de  $Y_{p/s}$  nas temperaturas de teste.

## NOMENCLATURA

A = constante empírica

A1 = constante empírica

A2 = constante empírica

A3 = constante empírica

B = constante empírica

C1 = constante empírica

C2 = constante empírica

D = taxa de diluição

E = energia de ativação

E1 = energia de ativação

E2 = energia de ativação

E3 = energia de ativação

F = vazão volumétrica de alimentação

$F_p(P,T)$  = função que expressa a inibição da fermentação alcoólica pela concentração de etanol e pela temperatura

$F_x(P,T)$  = função que expressa a inibição do crescimento celular pela concentração de etanol e pela temperatura

$G_p(S,T)$  = função que expressa a inibição da fermentação alcoólica pela concentração de substrato e pela temperatura

$G_x(S,T)$  = função que expressa a inibição do crescimento celular pela concentração de substrato e pela temperatura

$I_x$  = termo de contribuição da inibição pela concentração celular

K = constante de velocidade da reação

K1 = constante empírica

K2 = constante empírica

K3 = constante empírica

$K_i$  = constante de inibição pelo substrato

$K_s$  = constante de Monod

$m$  = constante empírica  
 $m_s$  = coeficiente de manutenção  
 $n$  = constante empírica  
 $P$  = concentração de etanol  
 $P_m$  = concentração de etanol acima da qual não ocorre crescimento celular  
 $P_o$  = concentração de etanol na alimentação do fermentador  
 $R$  = constante universal dos gases  
 $r_p$  = velocidade de produção de etanol  
 $r_s$  = velocidade de consumo de substrato  
 $r_x$  = velocidade de crescimento celular  
 $S$  = concentração do substrato limitante  
 $S_o$  = concentração de substrato na alimentação do fermentador  
 $t$  = tempo  
 $T$  = temperatura, °C ou K  
 $T_{min}$  = constante empírica  
 $T_{max}$  = constante empírica  
 $V$  = volume do fermentador  
 $X$  = concentração de células  
 $X_d$  = concentração de células mortas  
 $X_m$  = concentração de células acima da qual não ocorre crescimento celular  
 $X_o$  = concentração de células na alimentação do fermentador  
 $X_t$  = concentração total de células  
 $X_v$  = concentração de células viáveis  
 $Y_{p/s}$  = fração mássica entre etanol produzido e açúcar consumido  
(rendimento de etanol)  
 $Y_{p/x}$  = fração mássica entre etanol produzido e células  
 $Y_{x/s}$  = fração mássica entre células produzidas e açúcar consumido  
(rendimento celular)  
 $Y_x$  = rendimento celular máximo, quando todo o substrato é convertido em células.

## LETRAS GREGAS

$\mu$  = velocidade específica de crescimento

$\mu_{\max}$  = velocidade específica máxima de crescimento

$\mu_{\max,i}$  = velocidade específica máxima de crescimento na presença de etanol

$\tau_c$  = tempo de residência celular

## I. INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica tem sido bastante investigada por cientistas e pesquisadores de todo mundo, em vista do etanol constituir-se uma das mais promissoras alternativas de combustível obtido a partir de fontes renováveis. O Brasil, especialmente, foi o país que mais investiu no setor nas últimas décadas através do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), implantado pelo governo federal a partir dos meados da década de 70. O Proálcool tinha como objetivo reduzir a dependência brasileira de petróleo e, assim, os gastos com sua importação, através da substituição da gasolina pelo etanol como combustível dos veículos automotores. A crise do petróleo, no início da década de 70, criou condições favoráveis para a elaboração e implantação do Proálcool, uma vez que os preços do barril de petróleo subiram significativamente. Assim, foi feito um grande investimento em fermentação alcoólica e as pesquisas concentraram-se, principalmente, no desenvolvimento de processos mais eficientes, com maiores produtividades e menores custos que viabilizariam economicamente a utilização do etanol como combustível.

As primeiras indústrias de álcool brasileiras surgiram associadas às usinas de açúcar e utilizavam o melaço, subproduto da fabricação de açúcar, como matéria-prima. Até o início da década de 60, as indústrias de álcool utilizavam o processo clássico ou batelada, de baixa produtividade. A partir daí, apareceram as primeiras usinas a utilizar o processo Melle-Boinot, desenvolvido na França, na década de 30, segundo Lima, citado por ANDRIETTA (1994). Este processo, também conhecido como batelada alimentada com reciclo de células, apresenta maior rendimento e produtividade que o processo clássico. No início da década de 70, praticamente todas as usinas de álcool já utilizavam o processo Melle-Boinot. A partir da década de 80, intensificaram-se os estudos sobre o processo contínuo, de grande produtividade, e muitas usinas passaram a operar com esse processo, sendo esta mudança feita, na maioria das vezes, empiricamente. Isto gerou uma série de problemas, tanto de projeto como operacionais, que ainda existe em grande parte das usinas. A desconsideração de fundamentos teóricos da cinética do processo no dimensionamento dos reatores e dos

equipamentos de troca de calor elevou bastante o valor do investimento inicial e causou problemas operacionais e perdas em produtividade.

Um estudo da cinética do processo contínuo de fermentação alcóolica é, portanto, de grande importância para a otimização dos processos para produção de álcool e para a elaboração de uma estratégia de controle eficiente nas usinas, visando maior produtividade e menor custo para o processo. É importante salientar a importância que a indústria do álcool atingiu no Brasil, que tornou-se o maior produtor mundial de etanol por via fermentativa, com uma produção de 12 a 13 bilhões de litros por safra nos anos de 87 a 92, segundo SIQUEIRA (1993).

O objetivo deste trabalho é fazer um estudo do crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*, isolada no final da safra da Usina Santa Adélia-SP, em meio de cultura industrial, levando em consideração a concentração de substrato e a temperatura. Pretende-se estabelecer um modelo cinético que expresse a taxa específica de crescimento em função da concentração de substrato, nos moldes da cinética de Monod, e tendo como um segundo parâmetro a temperatura do processo. Este enfoque não é encontrado na maioria dos trabalhos publicados, que têm como base um processo isotérmico. Além disso, pretende-se com este trabalho obter um modelo cinético condizente com a realidade nacional das usinas de álcool, uma vez que o microrganismo, a faixa de temperatura e o meio de cultura foram escolhidos tendo-se em vista as condições operacionais das usinas de álcool brasileiras.

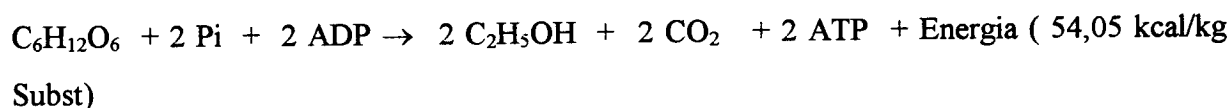


## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II.1 - Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é conhecida a mais de 4000 anos, pois os egípcios desta época fabricavam bebidas alcólicas a partir de sucos de frutas. Entretanto, foi só após a publicação dos trabalhos de Pasteur a partir de 1857, que se aceitou definitivamente que o etanol obtido durante a fermentação era produto do metabolismo da levedura, segundo Oliveira, citado por ANDRIETTA & MAUGERI (1994).

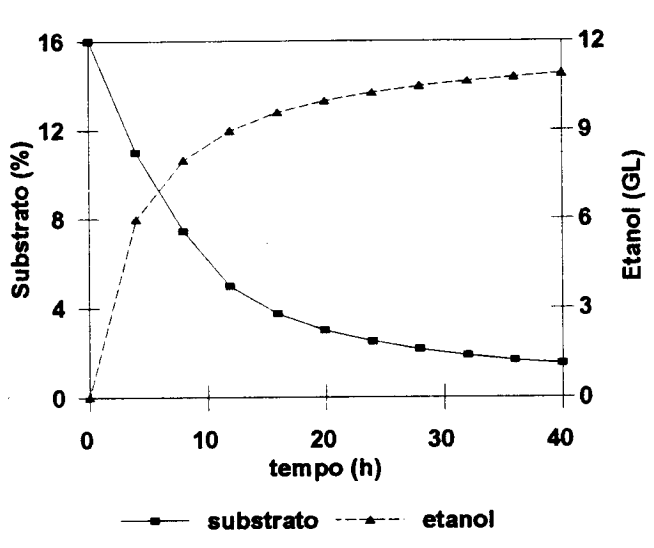
Fermentação alcoólica é um processo que resulta na transformação de açúcares solúveis em etanol e gás carbônico, realizado, principalmente, pelas leveduras e é descrita, de modo geral, pela equação abaixo:



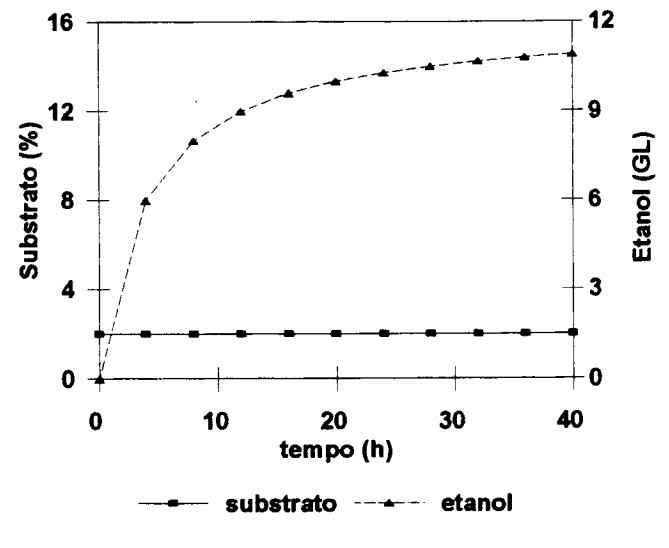
As leveduras mais utilizadas na fermentação alcoólica são *Saccharomyces cerevisiae* ( panificação, cervejaria, usinas de álcool), *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoides* ( vinhos) e *S. carlsbergensis* ( cervejaria). O rendimento teórico da reação é 0,51 g de etanol / g de glicose, mas os rendimentos reais normalmente obtidos atingem 90-95 % do rendimento teórico, uma vez que uma parte do açúcar é utilizada para síntese de material celular e para reações de manutenção.

### II. 2 - Processos para produção de etanol via fermentação

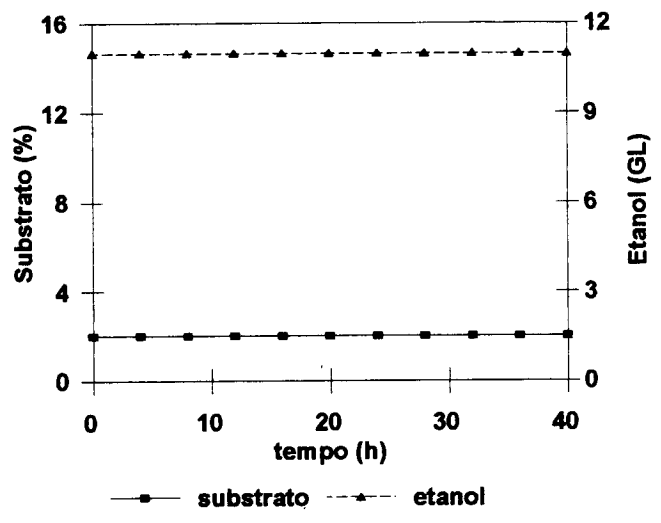
Em termos gerais, a fermentação alcoólica pode ser conduzida através de três processos distintos: batelada, batelada-alimentada ( Melle - Boinot) e contínuo. As destilarias mais recentes utilizam o processo contínuo. A tabela 2.1 mostra uma comparação entre processos descontínuos ( batelada e batelada alimentada) e contínuos. Os processos batelada, batelada-alimentada e contínuo são descritos mais detalhadamente a seguir e suas curvas típicas da cinética de produção de etanol são mostradas na figura 2.1.



(a)



(b)



(c)

Figura 2.1 - Curvas típicas da cinética de produção de álcool para os três processos de fermentação: (a) batelada, (b) batelada alimentada e (c) contínuo.

Tabela 2.1 - Vantagens e inconvenientes dos processos contínuos e descontínuos de fermentação alcoólica, segundo MAIA (1989).

	<b>Processo Descontínuo (batelada e batelada alimentada)</b>	<b>Processo Contínuo</b>
<b>Vantagens</b>	- maior controle sobre contaminação	- maior produtividade - tempos de residência reduzidos - maior adaptabilidade ao controle automático
<b>Inconvenientes</b>	- inibição do crescimento pela concentração de açúcar e de etanol - tempos de residência longos - baixa produtividade	- problemas de contaminação e mutação - menor flexibilidade

### II.2.1 - Processo clássico ou batelada

A fermentação alcoólica convencional é feita usualmente a partir de mostos contendo 100 a 200 g/l de açúcar, geralmente glicose ou sacarose. Um grande volume de mosto é adicionado ao tanque de fermentação. Inocula-se, então, o fermento e etanol é produzido até que o rendimento máximo tenha sido obtido. Encerra-se assim a fermentação e recupera-se o etanol por destilação. Faz-se a limpeza e a assepsia do tanque de fermentação e um novo ciclo pode ser iniciado. Utilizando baixo teor inicial de substrato e sob condições operacionais adequadas é possível atingir rendimentos de até 92-94 % do máximo teórico. Esse processo tem como principal desvantagem a baixa produtividade, que é dificilmente superior a 5 g etanol/l.h.

## **II.2.2 - Processo batelada alimentada**

Consiste em promover a alimentação do mosto ao tanque de fermentação de modo parcelado (intermitente ou contínuo), de modo que o teor de substrato no fermentador nunca ultrapasse um valor pré-fixado. Esse valor corresponde normalmente à concentração a partir da qual começa a ocorrer inibição significativa pelo substrato. O mosto é alimentado no tanque de fermentação simultaneamente ao fermento. Após o término da fermentação, o vinho (mosto fermentado) é bombeado para as centrífugas, onde há a separação do fermento (creme de leveduras). O creme de leveduras é diluído com água e passa por um tratamento ácido para eliminar contaminantes e para ativar as leveduras. Terminado o tratamento, ele repousa durante cerca de 4 horas, quando então está pronto para iniciar um novo ciclo de fermentação. Esse processo pode apresentar uma produtividade três vezes maior (ou até mais) do que o processo em batelada.

## **II.2.3 - Processo contínuo**

Os processos contínuos de fermentação requerem alimentação de mosto e retirada de vinho contínuas do tanque de fermentação, com vazões iguais. O vinho é submetido a um sistema de separação da biomassa (centrifugação, filtração em membrana, etc), que é reintroduzida ao fermentador, após um tratamento ácido. O vinho, isento de biomassa, é obtido continuamente como produto final. Em alguns casos, o vinho já é extraído do reator de fermentação isento de células (fermentação a vácuo ou com uso de células floculantes ou células imobilizadas).

No processo contínuo, o efeito inibitório do substrato é menor, uma vez que há uma alimentação contínua do mosto, mantendo-se a concentração de substrato em níveis mais baixos. Esse processo possui maior produtividade que o processo descontínuo, devido à ausência de paradas para carga, descarga e limpeza dos tanques de fermentação e também pelas células estarem mais adaptadas ao meio. Segundo RODRIGUES et al. (1992), a produtividade do processo contínuo pode chegar ao dobro da produtividade do processo de

batelada alimentada. Entretanto, o processo contínuo apresenta uma flexibilidade menor, devendo ser automatizado para ser bem sucedido.

Uma característica comum a processos contínuos é a operação a altas densidades celulares no fermentador, requisito indispensável à garantia de alta produtividade em etanol (10 g/l.h). A operação à alta densidade celular, por sua vez, introduz padrões metabólicos e fisiológicos peculiares, com aparecimento de efeitos inibidores que não são observáveis nas fermentações convencionais e requerem análise pormenorizada para correlacionar as condições operacionais com as possíveis causas de restrições ao metabolismo normal.

## **II.3 - Cinética da fermentação alcóolica**

O estudo da cinética da fermentação alcóolica tem como objetivos a medida das velocidades instantâneas e médias da transformação de glicose em etanol e em material celular ( crescimento celular) e o estudo da influência de diversos parâmetros nestas velocidades, como as concentrações de glicose, álcool e células e a temperatura.

### **II.3.1 - Modelos cinéticos**

Um modelo cinético é um conjunto de relações, usualmente na forma de equações, entre as variáveis de interesse cinético no sistema a ser estudado. No caso da fermentação alcóolica, as variáveis de interesse cinético são as concentrações de substrato, de etanol, de células e de oxigênio, além de fatores como temperatura e pH.

Segundo BAILEY & OLLIS (1986), os modelos cinéticos normalmente usados em processos fermentativos podem ser classificados em:

- não-estruturados e não-segregados, nos quais as células dos microrganismos são consideradas como soluto;

- estruturados e não-segregados, onde as células são tratadas como espécies de múltiplos componentes, mas com composição média semelhante;
- não-estruturados e segregados, onde as células são tratadas como seres individuais distintos, mas formadas por um único componente;
- estruturados e segregados, onde as células de microrganismo são consideradas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes.

O modelo mais utilizado em fermentação é o não-estruturado e não-segregado por ser mais simples e mais fácil de ser tratado tanto fisicamente como matematicamente.

A maioria dos trabalhos publicados sobre modelagem da fermentação alcóolica partem do princípio que a velocidade de formação de etanol é proporcional à velocidade de crescimento celular, desde que se desconsidere a perda da viabilidade celular, que é um fator importante a altas concentrações celulares. A equação mais simples para se determinar a velocidade específica de crescimento de microrganismos é a de Monod (equação 2.1):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \quad (2.1)$$

onde  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento, S a concentração do substrato limitante,  $\mu_{\max}$  a velocidade específica máxima de crescimento e  $K_s$  uma constante que depende do microrganismo e das condições de cultura, conhecida como constante de Monod. Esta equação é somente válida para sistemas que não possuem interferências significativas de inibidores. Para a fermentação alcóolica, a equação de Monod só pode ser usada para baixas concentrações de etanol no meio de fermentação. Para altas concentrações de etanol, ocorre a inibição da velocidade específica de crescimento pelo etanol, anulando-se o crescimento celular a partir de uma determinada concentração. Em muitos trabalhos publicados, GHOSE & TYAGI (1979); AIBA, SHODA & NAGATANI (1968) e BAZUA & WILKE (1977),

verificou-se que a inibição causada pelo etanol afetava somente  $\mu_{\max}$  e não  $K_s$ , indicando que a velocidade específica de crescimento pode ser representada pela equação 2.2:

$$\mu = \mu_{\max,i} \frac{S}{S + K_s} \quad (2.2)$$

onde  $\mu_{\max,i}$  é o valor da velocidade específica máxima de crescimento na presença de etanol.

Muitos pesquisadores têm tentado estabelecer uma correlação entre  $\mu_{\max,i}$ ,  $\mu_{\max}$  e a concentração de etanol produzido ao longo da fermentação. HOLZBERG et al. (1967), JONES et al. (1984) e GHOSE & TYAGI (1979) sugeriram um modelo linear, conforme mostra a equação 2.3:

$$\mu_{\max,i} = \mu_{\max} - K_1.P = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_m}\right) \quad (2.3)$$

onde  $K_1$  é uma constante empírica e  $P_m (= \mu_{\max}/K_1)$  é a concentração de etanol acima da qual não ocorre mais crescimento celular. Entretanto, uma relação linear entre  $\mu_{\max,i}$  e  $P$  só é aplicável quando a fermentação não é limitada por algum nutriente ou substrato.

Já AIBA et al. (1968), MOULIN et al. (1980) e BONOMI et al. (1981) propuseram uma relação exponencial para  $\mu_{\max,i}$  ( equação 2.4):

$$\mu_{\max,i} = \mu_{\max} . e^{(-K_2.P)} \quad (2.4)$$

onde  $K_2$  parece depender do método de cultivo ( batelada ou contínuo ).

NOVAK et al. (1981) e AIBA & SHODA (1969) propuseram uma relação hiperbólica entre  $\mu_{\max,i}$  e  $P$ , como mostra a equação 2.5:

$$\mu_{\max,i} = \mu_{\max} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{P}{K_3}\right)} \quad (2.5)$$

As equações 2.4 e 2.5, para uma determinada concentração de células e de substrato, preveem uma diminuição contínua da velocidade específica de crescimento com o aumento da concentração de álcool, mas também implicam que as células são capazes de crescer e de produzir etanol indefinidamente, o que não é observado experimentalmente. Na prática, existem concentrações limites de etanol, acima das quais o crescimento e a fermentação cessam.

BAZUA & WILKE (1977) propuseram uma relação parabólica entre  $\mu_{\max,i}$  e P, conforme a equação 2.6:

$$\mu_{\max,i} = \mu_{\max} \cdot \sqrt{1 + \frac{P}{P_m}} \quad (2.6)$$

Entretanto, o ajuste dos dados experimentais obtidos por Bazua e Wilke não foi suficientemente bom, de forma que eles propuseram uma segunda expressão :

$$\mu_{\max,i} = \mu_{\max} - \frac{A \cdot P}{B - P} \quad (2.7)$$

No entanto, os modelos generalizados de LEVENSPIEL (1980) e LUONG (1984) são os mais aceitos e são descritos pelas equações 2.8 e 2.9 :

$$\mu_{\max,i} = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n \quad (2.8)$$

$$\mu_{\max,i} = \mu_{\max} \cdot \left[1 - \left(\frac{P}{P_m}\right)^n\right] \quad (2.9)$$



A constante empírica  $n$  permite que as equações 2.8 e 2.9 possam ser aproximadas às equações 2.3 a 2.6. Quando  $n = 1$ , as equações 2.8 e 2.9 tornam-se lineares e se reduzem à equação 2.3. Quando  $n > 1$ , as equações 2.8 e 2.9 podem ser aproximadas às equações 4 e 5, pois uma rápida queda inicial na velocidade de crescimento é seguida por uma lenta aproximação a  $P_m$ . Já quando  $n < 1$ , as equações 2.8 e 2.9 podem ser aproximadas à equação 2.6 e uma lenta queda inicial na velocidade de crescimento é seguida por uma rápida aproximação a  $P_m$ .

A fermentação alcoólica é também inibida pelo substrato. Este fenômeno é, normalmente, menos importante do que a inibição pelo etanol. GHOSE & TYAGI (1979) propuseram um modelo que inclui a inibição pelo substrato, como mostra a equação 2.10:

$$\mu = \mu_{\max,i} \cdot \frac{S}{\left( K_s + S + \frac{S^2}{K_i} \right)}, \quad (2.10)$$

onde  $K_i$  é a constante de inibição pelo substrato e  $\mu_{\max,i}$  possui uma relação linear com a concentração de etanol (equação 2.3).

MOULIN et al. (1980) propuseram duas expressões para representar a inibição pelo substrato: a equação 2.11 para  $S > 100$  g/l e  $P < 32$  g/l e a equação 2.12 para  $S > 100$  g/l e  $P > 32$  g/l, quando um efeito sinérgico aparece.

$$\mu = \mu_{\max,i} \cdot e^{[K_1 \cdot (S-100)]} \quad (2.11)$$

$$\mu = \mu_{\max,i} \cdot e^{[K_1 \cdot (S-100)]} \cdot e^{[K_2 \cdot (S-100) \cdot P]} \quad (2.12)$$

onde  $K_1$  e  $K_2$  são constantes empíricas e  $\mu_{\max,i}$  possui uma dependência exponencial com  $P$  (equação 2.4).

CYSEWSKI & WILKE (1978) observaram que em fermentação alcoólica com alta densidade celular ocorria um efeito inibidor da concentração celular no próprio

crescimento do microrganismo. Deste modo, introduziram um termo adicional aos modelos matemáticos de fermentação alcóolica, análogo ao modelo proposto por Levenspiel, conforme a equação 2.13:

$$I_x = \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^m \quad (2.13)$$

onde  $I_x$  é o termo de contribuição da inibição pela concentração celular,  $X_m$  a máxima concentração celular a partir da qual não há crescimento e  $m$  um coeficiente empírico.

LEE et al. (1983) propuseram um modelo ( equação 2.14) englobando os três termos de inibição na forma do modelo de Levenspiel, enquanto JARZEBSKI et al. (1989) propuseram modelo na forma de Luong (equação 2.15):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(S + K_s)} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n \cdot \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^m \quad (2.14)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(S + K_s)} \cdot \left[1 - \left(\frac{P}{P_m}\right)^n\right] \cdot \left[1 - \left(\frac{X}{X_m}\right)^m\right] \quad (2.15)$$

O primeiro modelo ( equação 2.14) foi usado na modelagem e simulação de sistemas contínuos múltiplos estágios em escala industrial por ANDRIETTA & STUPIELLO (1990b), ANDRIETTA & MAUGERI (1994) e RODRIGUES et al. (1992). MONBOUQUETTE (1987) enfatizou a necessidade de uso de modelos intrínsecos, ou seja, modelos que levam em consideração o volume ocupado pela fração de células no fermentador para a simulação adequada de fermentações com alta densidade celular. Segundo o autor, modelos não-intrínsecos são adequados somente quando a fração volumétrica de biomassa no fermentador é menor que cerca de 0,10. Modelos não-estruturados intrínsecos incluem um parâmetro adicional, a densidade da biomassa, e termos matemáticos adicionais para descrever a concentração de solutos na fase abiótica devido à expansão da fase biótica, isto é, devido ao crescimento celular.

### II.3.2- Parâmetros cinéticos

Encontra-se na literatura uma variedade muito grande de valores para os parâmetros cinéticos da fermentação alcóolica. Isso ocorre porque esses parâmetros dependem do microrganismo utilizado e de suas condições fisiológicas, do meio de cultura, da temperatura, enfim, das condições em que foram determinados.

A tabela 2.2 mostra uma série de valores encontrados na literatura para alguns parâmetros cinéticos. Com exceção dos trabalhos de BAJPAI & MARGARITIS (1987) e DOMÍNGUEZ, NUNEZ, CHAMY, LEMA (1993), que utilizaram como microrganismo *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia stipitis*, respectivamente, o microrganismo estudado foi *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 2.2 - Tabela com valores encontrados na literatura para parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica.

AUTORES	Ks(gSubs/l)	$\mu_{max}(h^{-1})$	Pm(gEt/l)	Yx/s	Yp/s	T(°C)
Aiba & Shoda (1969)	_____	0,43	_____	_____	0,35	30
Aiba, M. Shoda & M. Nagatani (1968)	_____	_____	90	_____	_____	_____
A.J.Daugulis & D.E.Swaine (1987)	0,315-1,4	_____	87,5 - 140	0,003 - 0,1	0,35 - 0,47	_____
Andrietta & Stupiello (1990a)	_____	_____	103	0,033	0,445	32
Bazua & Wilke (1977)	_____	0,448	80-100	_____	_____	30
Chang Woo Lee & Ho Nam Chang (1987)	_____	_____	90	0,12	0,454	30
Cysewski, citado por Hoppe & Hansford (1982)	4,9	0,58	_____	_____	0,44	35
Egamberdiev Ierusalimskii, citado por Hoppe & Hansford (1982)	_____	0,31	_____	_____	0,39	28
Ghose & Tyagi ( 1979)	0,476	0,40	90	0,09	0,47	30
H. Domínguez, M. J. Núñez, R. Chamy, J. M. Lema (1993)	22,6	0,19	_____	0,28	0,36	30
Hoppe & Hansford (1982)	3,3	0,64	_____	_____	0,43	30
Jarzebski et al. (1989)	0,5	0,24	_____	0,13	_____	30
Lee et al. (1983)	1,6	0,24	90	0,06	0,375	_____
Luong, J. H. T. (1984)	_____	_____	100	_____	_____	30
Maiorella, Blanch & Wilke (1984)	0,315	0,461	87,5	0,11	_____	_____
Pironti, citado por Hoppe & Hansford (1982)	15,5	0,26	_____	_____	0,47	30
Pratima Bajpai & Argyrios Margaritis (1987)	_____	0,35	44,5	0,043	0,48	30
Pratima Bajpai e Argyrios Margaritis (1987)	_____	0,35	44,92	0,043	0,49	35
Pratima Bajpai & Pramod Bajpai (1991)	_____	_____	74-91	_____	0,43-0,48	_____

### II.3.2.1 - Efeito da temperatura nos parâmetros do modelo cinético

As reações individuais que ocorrem dentro da célula são influenciadas pela temperatura, comumente seguindo a equação de Arrhenius:

$$K = A \cdot e^{(-E/RT)} \quad (2.16)$$

onde:

K- constante de velocidade da reação

A - constante

E - energia de ativação

R - constante universal dos gases

T - temperatura absoluta

Uma vez que um grande número de reações influencia o crescimento celular e a formação de um determinado produto dentro da célula, o efeito da temperatura sobre a velocidade global é complexo. Um fator complicante adicional origina-se dos efeitos da temperatura sobre a conformação das enzimas, em que grandes mudanças de atividade enzimática podem ocorrer dentro de estreita faixa de temperatura.

Em um modelo não-estruturado, é normal expressar parâmetros das equações cinéticas como funções da temperatura do tipo Arrhenius. A equação de Monod para crescimento celular pode ser escrita na forma da equação 2.17, onde  $\mu_{\max}$  e  $K_s$  são funções da temperatura.

$$\mu = \mu_{\max}(T) \cdot \frac{S}{[S + K_s(T)]} \quad (2.17)$$

DALE et al.(1990) sugerem a equação de Arrhenius para descrever a variação de  $\mu_{\max}$  com a temperatura, dentro de uma faixa de temperatura que vai de  $T_{\min}$  à Tótima, onde  $T_{\min}$  é a menor temperatura onde o crescimento é observado e Tótima é a temperatura onde a velocidade de crescimento é máxima. Acima de Tótima, observam que as velocidades de crescimento diminuem acentuadamente e as velocidades de morte celular tornam-se significativas devido à destruição térmica das funções enzimáticas dentro da célula.

SINCLAIR & KRISTIANSEN (1987) afirmam que a dependência de  $\mu_{\max}$  e  $K_s$  em relação à temperatura pode ser expressa pelas seguintes equações:

$$\mu_{\max}(T) = A1.e^{(-E1/RT)} - A2.e^{(-E2/RT)} \quad (2.18)$$

$$K_s(T) = A3.e^{(-E3/RT)} \quad (2.19)$$

Na equação 2.18, o primeiro termo à direita corresponde à ativação térmica e o segundo, cuja energia de ativação  $E2$  é muito maior que  $E1$ , corresponde à inativação térmica das enzimas constituintes do microrganismo.

Entretanto, segundo MOHR & KRAWIEC, a equação 2.18 só pode ser aplicada para microrganismos com temperatura ótima de crescimento inferior a 37 °C. MCMEEKIN et al. propuseram uma outra expressão para os casos não previstos pela equação 2.18, que se ajustou bem para crescimento de muitas bactérias e fungos:

$$[\mu_{\max}(T)]^{1/2} = C1.(T - T_{\min}).[1 - e^{C2.(T-T_{\max})}] \quad (2.20)$$

As constantes  $C1$ ,  $C2$ ,  $T_{\min}$  e  $T_{\max}$  são constantes empíricas, ajustáveis através de regressão não linear por computador.

SHU & YANG (1991) utilizaram a equação 2.20 para modelar o efeito da temperatura na produção de goma xantana por *Xantomonas campestris*, obtendo bons resultados. HUANG & CHEN (1988) estudaram o efeito da temperatura na cinética de

produção de etanol por *Zymomonas mobilis*. O modelo utilizado é expresso pelas equações abaixo:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \cdot F_x(P, T) \cdot G_x(S, T) \cdot X \quad (2.21)$$

$$\frac{dP}{dt} = Q_{\max} \cdot \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \cdot F_p(P, T) \cdot G_p(S, T) \cdot X \quad (2.22)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \left( \frac{1}{Y_{p/s}} \right) \cdot \frac{dP}{dt} = \left( \frac{1}{Y_{x/s}} \right) \cdot \frac{dX}{dt} + m_s \cdot X \quad (2.23)$$

onde  $F_x(P, T)$ ,  $F_p(P, T)$ ,  $G_x(S, T)$  e  $G_p(S, T)$  são funções expressando a inibição do crescimento e da produção de álcool pela concentração de etanol e temperatura, no caso dos dois primeiros termos, e pela concentração de substrato e temperatura, no caso dos dois últimos termos.

## II.4 - Fatores que afetam a fermentação alcóolica

Entre os fatores que afetam a fermentação alcóolica, destacam-se: pH, temperatura, concentração do substrato, oxigênio dissolvido, etanol produzido e o tipo de microrganismo utilizado.

### II.4.1 - pH

O pH ótimo para a produção de etanol por leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* situa-se, geralmente, na faixa de 4 a 5. Aumentando-se o pH até 7, observa-se, via de regra, uma diminuição do rendimento em etanol, com aumento da produção de ácido acético, segundo Kim & Kim, citados por MAIA (1989).

Segundo Blanchet & Ballerini, citados por MAIA (1989), o pH interno da célula se mantém na faixa de 5,8 a 6,9, seja qual for o pH extracelular na faixa de 2 a 7. Entretanto, baixos valores de pH tornam o meio mais agressivo, uma vez que exigem das leveduras um maior dispêndio de energia na manutenção do pH interno, além de afetar as proteínas de transporte da membrana citoplasmática que ficam expostas ao meio externo. O pH do meio externo também afeta a velocidade de crescimento das leveduras, a qual atinge um máximo quando o pH está compreendido entre 5 e 6. Na fermentação alcoólica, o estabelecimento e controle do pH do meio em valores inferiores a 5 é também considerado importante como meio para prevenir contaminação por bactérias lácticas e acéticas, segundo Blanchet & Ballerini, citados por MAIA (1989).

#### II.4.2 - Temperatura

Segundo Blanchet & Ballerini, citados por MAIA (1989), a temperatura ótima de crescimento das leveduras é, geralmente, inferior em 5 a 10°C à temperatura ótima para produção de etanol. A fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* é geralmente conduzida em torno de 30°C, quando se pretende maximizar a produtividade em etanol, como na produção de álcool combustível. No entanto, no caso do Brasil, sabe-se que nenhuma usina de álcool trabalha a esta temperatura devido às condições climáticas e operacionais em nosso país. A temperatura ótima depende do conteúdo em etanol no meio, tendendo a diminuir com o aumento do teor alcoólico. Portanto, a otimização de um processo de fermentação com relação à temperatura requer uma redução da temperatura do processo, à medida que o etanol é produzido. A temperatura de fermentação também influencia a fluidez na membrana citoplasmática e a atividade das enzimas, alterando a permeabilidade na membrana e o metabolismo das células.

De acordo com VAN UDEN (1985), existem 3 temperaturas chaves de um processo de crescimento:  $T_{maxi}$  ( temperatura máxima inicial de crescimento),  $T_{maxf}$  (temperatura máxima final de crescimento) e  $T_{opt}$  ( temperatura ótima de crescimento). O aumento da concentração alcoólica ao longo da fermentação provoca uma diminuição das 3



temperaturas. Quando  $T_{maxf}$  se iguala à temperatura do processo, o crescimento celular torna-se nulo.

O efeito inibidor do etanol está intimamente relacionado à temperatura da fermentação. Segundo SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1983), a faixa de melhor resistência ao etanol para cepas usuais de *Saccharomyces cerevisiae* é de 13 a 27°C a 11% (v/v) de etanol, como pode ser visto na figura 2.2, retirada do artigo citado. A tolerância ao álcool diminui para temperaturas mais baixas que 13°C ou mais altas que 27°C, de forma que a inibição do crescimento do microrganismo ocorre tanto em processos à baixa temperatura (cervejas, champanhes), como em processos à alta temperatura (álcool combustível, vinhos tintos).

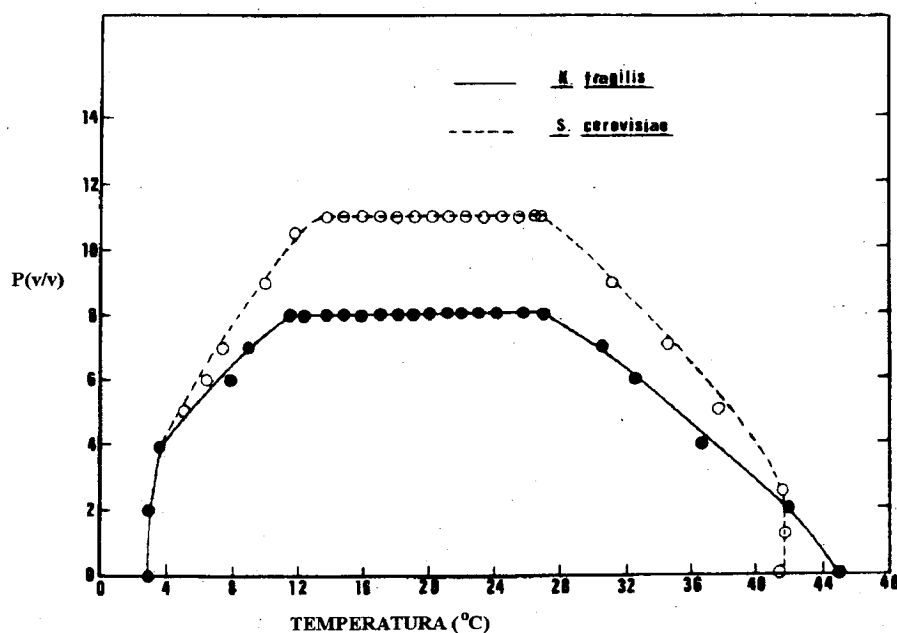


Figura 2.2 - Perfil de temperatura da tolerância máxima ao etanol de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces fragilis*.

### II.4.3 - Substrato

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de fermentar glicose, frutose, sacarose e maltose. O substrato carbonado, a altas concentrações ( aproximadamente 150 g/l de glicose para *S. cerevisiae* ), exerce ação inibitória sobre a fermentação alcoólica. Observa-se que existe uma ação sinérgica entre o etanol e o substrato carbonado, ação esta não muito bem esclarecida.

### II.4.4 - Oxigênio

A fermentação alcoólica é inibida na presença de grandes concentrações de oxigênio, fenômeno este denominado "Efeito Pasteur". Este efeito está intimamente associado ao estado fisiológico da célula, sendo que se manifesta principalmente nas leveduras não proliferantes, nas quais ocorre nítida diminuição do consumo específico de glicose. Nas células em crescimento, por outro lado, não se observa diferença significativa quanto à velocidade de consumo da glicólise entre uma cultura aeróbia e outra anaeróbia.

Segundo Hoppe & Hansford, citados por MAIA (1989), o uso de condições microaeróbicas ( 0,5% de saturação) permite aumentar a utilização do substrato, aumentando a tolerância da levedura ao etanol, sem haver um decréscimo significativo no rendimento em etanol por unidade de substrato consumido . Tal fato está relacionado à síntese de ácidos graxos insaturados constituintes da membrana celular, que depende da disponibilidade de oxigênio. Além de indispensáveis à viabilidade celular, os ácidos graxos insaturados e esteróis aumentam a permeabilidade da membrana ao etanol.

### II.4.5 - Etanol

O etanol foi o primeiro fator a ser reconhecido como inibidor da fermentação alcoólica. As leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces* são consideradas as de melhor resistência ao efeito tóxico do etanol. Este efeito é considerado

resultante de várias contribuições: os mecanismos inibidores de base, a presença ou não de outros inibidores, composição do meio, pressão parcial em oxigênio, temperatura, natureza da cepa e condições de cultura ( batelada ou contínua).

Os fatores que influenciam a sensibilidade ao etanol ( temperatura, aeração, composição do meio) agem direta ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática. Entretanto, o etanol parece não ter um efeito único, provocando modificações nas propriedades da membrana lipídica e nos sistemas de transporte de soluto e agindo sobre algumas enzimas.

HOLZBERG et al. (1967) demonstraram que o crescimento celular não é inibido em concentrações de etanol inferiores a 26 g/l, mas é inibido totalmente quando a concentração de etanol atinge 68,5 g/l no meio da fermentação. LUONG (1984) observou que o etanol apresentava um efeito significativo sobre a velocidade de crescimento celular a concentrações acima de 15 g/l e que a concentração de etanol máxima a partir da qual as células não mais crescem ( $P_m$ ) era aproximadamente 100 g/l. Luong também verificou que a capacidade de produção de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* era completamente inibida a uma concentração de etanol de 105 g/l. DAUGULIS & SWAINE (1987) fornecem uma tabela com uma faixa de valores relatados na literatura para  $P_m$  de 87,5 a 140 g etanol/l, para sistemas utilizando diversas linhagens de leveduras. A análise desses valores deve ser cuidadosa, entretanto, uma vez que eles dependem do tipo de microrganismo, do seu estado fisiológico, do meio de cultura e da temperatura.

#### **II.4.6- Viabilidade celular**

De forma geral, os fatores que influenciam a viabilidade celular são a quantidade de oxigênio dissolvido, a temperatura da fermentação, a quantidade de inóculo, a concentração de substrato e de etanol, a velocidade de produção de etanol e o tempo de contato entre as células e o etanol.

CYSEWSKI & WILKE (1977) observaram que a viabilidade celular diminui continuamente em anaerobiose, mas 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 biossíntese de lipídeos constituintes das membranas plasmáticas e mitocondriais. A adição ao meio de cultura de ácidos graxos insaturados ou esteróis melhora a tolerância das leveduras ao etanol e, assim, aumenta a viabilidade celular.

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. Em trabalho recente, MILANESE - RUBILAR & MAUGERI (1990) verificaram que a viabilidade celular dependia da concentração de etanol e do tempo de residência celular, segundo a expressão:

$$X_v = \frac{e^{-A(\tau_c P)^m}}{P_m - P} \quad (2.24)$$

onde  $X_v$  é a fração viável,  $\tau_c$  o tempo de residência celular,  $A$  e  $m$  constantes empíricas.

JARZEBSKI et al. verificaram a importância da viabilidade celular na cinética da fermentação alcoólica e incorporaram este conceito a um modelo intrínseco tipo Monod, que é mostrado na equação 2.25.

$$r_x = \mu_{\max} \left[ 1 - \left( \frac{P}{P_m} \right)^n \right] \left[ 1 - \left( \frac{X_t}{X_m} \right)^m \right] \frac{S \cdot X_v}{K_s + S} \quad (2.25)$$

onde  $X_v$  é concentração de células viáveis e  $X_t$  é concentração total de células ( $X_t = X_d + X_v$ ), sendo  $X_d$  a concentração de células mortas.

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **III.1 - Materiais**

##### **III.1.1 - Microrganismo**

Foi feita uma seleção entre várias leveduras isoladas de usinas e cedidas por centros de pesquisa. A linhagem escolhida foi a cedida pela Usina Santa Adélia/SP, filiada à Coopersucar. A metodologia para seleção da melhor linhagem de levedura está descrita no item III.2.3.

##### **III.1.2 - Condições da cultura**

O microrganismo foi mantido em “slants” de PDA (Potato Dextrose Agar), a 5°C, repicado rotineiramente dentro de um período máximo de 2 meses.

##### **III.1.3 - Meios de cultura**

Para os testes com fermentação contínua, o meio de cultura utilizado foi à base de melaço de cana-de-açúcar, contendo 40 gART/l e suplementado com 2,5 g/l de extrato de levedura. Foram também adicionados um anti-espumante ( 1ml/ 12 l) e um bactericida com nome comercial Busan ( 1µl/l).

Para os testes de determinação de Pm, o meio de cultura era constituído de 80 gART/l, à base de melaço de cana-de-açúcar e 2,5 g/l de extrato de levedura.

### III.1.4 - Fermentador

Foi utilizado o fermentador BIOFLOW III System, produzido por New Brunswick Scientific Co. Inc., que é mostrado na figura 3.1. Este bioreator possui controlador de temperatura, bombas para alimentação dos nutrientes e eletrodo de pH.

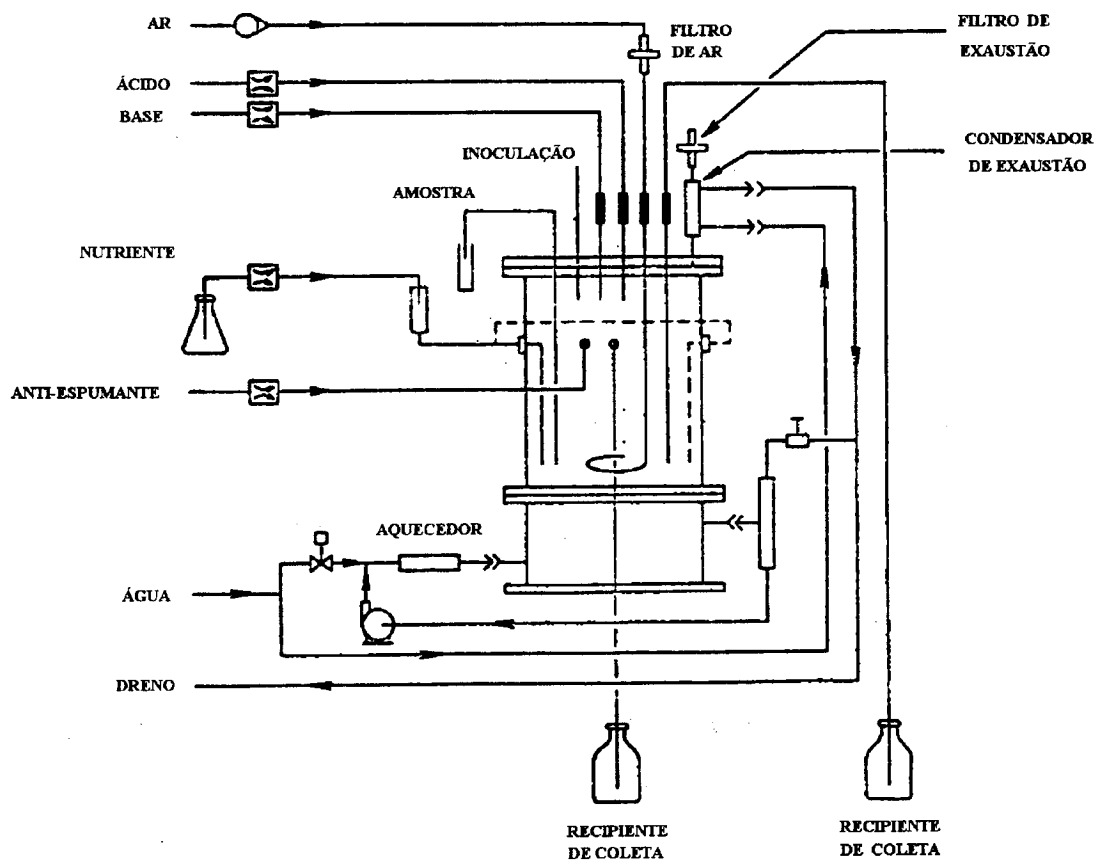


Figura 3.1 - Visão esquemática do fermentador BIOFLOW III.

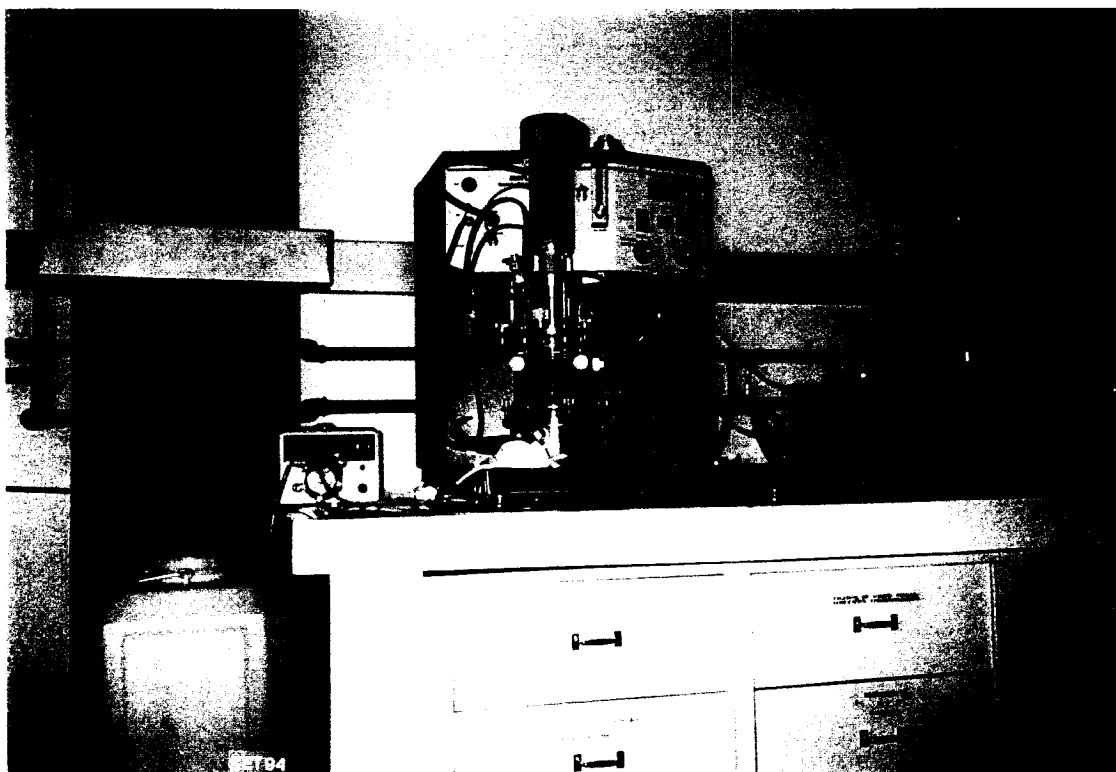


Figura 3.2 - Fotografia do fermentador BIOFLOW III em operação.

## III.2 - Procedimento Experimental

### III.2.1 - Preparo do inóculo para testes com fermentação contínua

A partir de “slants” da linhagem de levedura selecionada com 2 dias de crescimento a 32°C, inoculava-se o frasco de pré - fermentação contendo 100 ml de meio de cultura com melaço de cana-de-açúcar (40 gART/l) e 2,5 g/l de extrato de levedura. Os frascos eram, então, incubados em shaker (150 rpm) a 32°C, durante aproximadamente 24 horas. Adicionava-se, assepticamente, todo conteúdo de pré-fermentação a 1,2 litros do mesmo meio

de cultura no fermentador, previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos. Fazia-se, então, o crescimento do microrganismo durante 24 horas, a 32 °C e agitação de 250 rpm. Podia-se, assim, iniciar os ensaios com fermentação contínua, ajustando-se a temperatura e a vazão de alimentação.

### III.2.2 - Teste para determinação de Pm

Segundo LEVENSPIEL (1980), Pm deve ser determinado deixando o microrganismo em um meio com açúcar suficiente para que não haja inibição do crescimento celular pelo substrato, mas apenas pelo produto. Terminando a produção de álcool, obtém-se Pm analisando o teor alcóolico do meio.

Neste trabalho, foi feita uma alimentação por etapas do açúcar, determinada pela diminuição da velocidade de liberação de CO<sub>2</sub>, que é medida pela variação de peso do frasco, segundo ANDRIETTA & STUPIELLO (1990). Iniciava-se o teste fazendo-se uma pré - fermentação para ativação do microrganismo a 32°C durante 24 horas, seguindo o mesmo procedimento utilizado para preparo do inóculo dos testes com fermentação contínua. Encerrada a pré-fermentação, inoculava-se 10 ml de meio de pré-fermentação em um frasco com 100 ml de meio de cultura contendo 80 gART/l, à base de melaço de cana-de-açúcar e 2,5 g/l de extrato de levedura. Faziam-se, então, as leituras dos pesos iniciais dos frascos (teste em triplicata), que eram incubados em shaker, na temperatura do referido teste e com agitação de 150 rpm. Os frascos eram pesados periodicamente e a partir do momento em que não havia mais uma alteração significativa no peso do frasco, era feita nova alimentação, com uma concentração de açúcares de forma a se ter 80 gART/l no volume total de meio do frasco. O volume de meio adicionado ao frasco era limitado para não causar uma variação muito grande no volume total. Eram feitas novas alimentações, até que não houvesse mais variação significativa no peso de frasco após a adição de mais meio de cultura, significando o término da fermentação. Analisava-se, então, o teor alcóolico do meio e determinava-se, deste modo, Pm na temperatura do teste em questão.



### III.2.3 - Seleção do microrganismo

A seleção da linhagem de levedura baseou-se na avaliação da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) a 32°C. Escolheu - se, deste modo, a linhagem de levedura que apresentou o maior  $\mu_{max}$  nesta temperatura. O valor de  $\mu_{max}$  foi obtido a partir das curvas de crescimento das 8 linhagens de levedura disponíveis.

A metodologia para a construção das curvas de crescimento foi baseada na técnica utilizada por RODRIGUES (1989) e é descrita a seguir:

- A partir de "slants" da linhagem de levedura com 2 dias de crescimento, inocula-se frasco de pré-fermentação contendo 100 ml de meio de cultura com melaço de cana-de-açúcar (40 gART/l) e 2,5 g/l de extrato de levedura, incubando-se em shaker (200 rpm) a 30°C, durante aproximadamente 24 horas;
- Inocula-se outro frasco de fermentação, contendo o mesmo meio de cultura, com 10% do meio fermentado;
- Imediatamente após a inoculação, retiram-se amostras, fazendo-se leituras de absorbância em espectrofotômetro visível a 600 nm. Os frascos são colocados em shaker a 200 rpm na temperatura de 32°C e são feitas leituras de absorbância de hora em hora, aproximadamente, até observar que a leitura está constante, obtendo-se assim a curva de crescimento celular.
- Constroe-se a curva  $\ln(DO/DO_0)$  vs tempo, onde DO é a densidade ótica (absorbância) e  $DO_0$  a densidade ótica no tempo zero, obtendo-se o valor de  $\mu_{max}$  através da inclinação da fase linear da curva de crescimento.

### III.2.4 - Fermentação contínua

Após o preparo do inóculo, descrito no item III.2.1, iniciavam-se os testes com fermentação contínua, ajustando-se a temperatura e a vazão de alimentação. A vazão de alimentação era determinada a partir da variação do peso do frasco de alimentação com o tempo (vazão mássica de alimentação) e da densidade do meio de alimentação, que foi

determinada experimentalmente ( $\rho = 1,0212 \text{ g/ml}$  a  $28^\circ\text{C}$ ). Começava-se com uma vazão de alimentação baixa, mantida durante um período de tempo igual ou maior que três tempos de residência ( $3\tau$ ), após o qual era retirada uma amostra do fermentador, para as análises de açúcar redutor total, álcool e concentração de células. Então, aumentava-se a vazão de alimentação repetindo-se o procedimento anterior. Para cada temperatura, eram ajustadas de 5 a 6 vazões diferentes de alimentação. As vazões de alimentação foram escolhidas de forma a se ter uma faixa de trabalho para a taxa de diluição entre  $0,1$  e  $0,4 \text{ h}^{-1}$ . O limite máximo para a vazão de alimentação ocorre quando a taxa de diluição se iguala a  $\mu_{\text{max}}$ , pois a partir deste valor pode ocorrer lavagem das células do reator.

### **III.3 - Métodos Analíticos**

#### **III.3.1 - Concentração de Açúcares Redutores Totais**

O método utilizado para a análise de açúcares redutores totais foi o método colorimétrico usando ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo MILLER (1959), após prévia hidrólise da sacarose. As análises foram feitas em triplicata.

Para cada solução preparada de DNS, construía-se uma curva padrão, que relacionava a absorbância a  $540 \text{ nm}$  com concentrações conhecidas de sacarose. Fazia-se uma regressão linear dos dados obtidos, obtendo-se assim a equação de uma reta que fornecia a concentração de ART da amostra a partir do valor lido de absorbância.

#### **III.3.2 - Concentração de células**

A concentração de células ( $\text{g cel.seca/l}$ ) foi determinada por gravimetria, usando-se membranas de  $0,45 \mu\text{m}$ , com posterior secagem em estufa a vácuo. Eram medidas 3 amostras de  $10 \text{ ml}$  de meio fermentado, que eram, então, filtradas com membrana de  $0,45 \mu\text{m}$ , previamente seca em estufa a vácuo ( $-60 \text{ cmHg}$ ) a  $60^\circ\text{C}$  por 24 horas e pesadas em balança analítica. As membranas eram colocadas novamente em estufa a vácuo, nas mesmas condições

descritas acima e pesadas. A diferença entre os dois pesos dividido pelo volume da amostra fornecia o valor da concentração de células secas.

### **III.3.3 - Concentração de etanol**

A análise de etanol foi feita por cromatografia gasosa, usando acetona (2%v/v) como padrão interno. Foi utilizado o cromatógrafo VARIAN 3400, com coluna (L = 1,0 m e Dext = 3,2 mm) empacotada com Porapack-Q, 120 mesh e detector de ionização de chama. O injetor e o detector foram mantidos a 220 e 180°C, respectivamente, e a coluna foi operada isotermicamente a 150°C. Nitrogênio foi usado como gás de arraste, a uma vazão de 30 ml/min. Os gases de combustão foram hidrogênio e ar. Amostras de 1 µl foram injetadas e as análises foram feitas em triplicata.

### **III.4 - Determinação do rendimento de etanol ( $Y_{p/s}$ ) e do rendimento**

#### **celular ( $Y_{x/s}$ )**

Os rendimentos de etanol e celular são definidos pelas equações 3.1 e 3.2 para reator de mistura em processo contínuo, onde  $P_0$ ,  $S_0$  e  $X_0$  são as concentrações de etanol, substrato e de células, respectivamente, na alimentação do fermentador, enquanto  $P$ ,  $S$  e  $X$  são as concentrações na saída do fermentador (ver figura 3.2). Os rendimentos foram obtidos através de ensaios com fermentação contínua para várias taxas de diluição. De posse dos dados, foram construídos os gráficos  $\Delta P$  vs.  $\Delta S$  e  $\Delta X$  vs.  $\Delta S$ . Caso o ajuste da regressão linear aos dados seja bom,  $Y_{p/s}$  e  $Y_{x/s}$  são constantes e iguais aos coeficientes angulares das retas obtidas.

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (3.1)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3.2)$$

### III.5 - Determinação das constantes do modelo

O modelo matemático escolhido para ser testado inicialmente é o proposto por JARZEBSKI, MALINOWSKI & GOMA (1989) :

$$r_x = \mu_{\max} \cdot \left[ 1 - \left( \frac{P}{P_m} \right)^n \right] \cdot \left[ 1 - \left( \frac{X_t}{X_m} \right)^m \right] \cdot \frac{S \cdot X_v}{K_s + S} \quad (3.3)$$

onde os expoentes n e m levam em consideração a não-linearidade dos efeitos de inibição do etanol e da concentração de células.

Já as velocidades de consumo de substrato ( $r_s$ ) e de produção de etanol ( $r_p$ ) podem ser expressas pelas equações 3.4 e 3.5, considerando-se na equação 3.5 que a velocidade de produção de etanol é proporcional à velocidade de crescimento celular:

$$-r_s = \frac{r_x}{Y_x} - m_s \cdot X_v \quad (3.4)$$

$$r_p = \frac{r_x}{Y_{p/x}} \quad (3.5)$$

Considerando o esquema do fermentador mostrado na figura 3.3, os balanços de massa de célula, substrato e etanol para o modelo proposto no regime permanente resultam nas seguintes equações, respectivamente:

$$\mu = D \quad (\text{para } X_0 = 0) \quad (3.6)$$

$$D.(S_0 - S) - \frac{\mu \cdot X}{Y_{x/s}} = 0 \quad (3.7)$$

$$D.P - Y_{p/x} \cdot \mu \cdot X = 0 \quad (\text{para } P_0 = 0) \quad (3.8)$$

Nas equações acima, D é a taxa de diluição (F/V) e  $Y_{p/x}$  é definido como  $\frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}}$ .

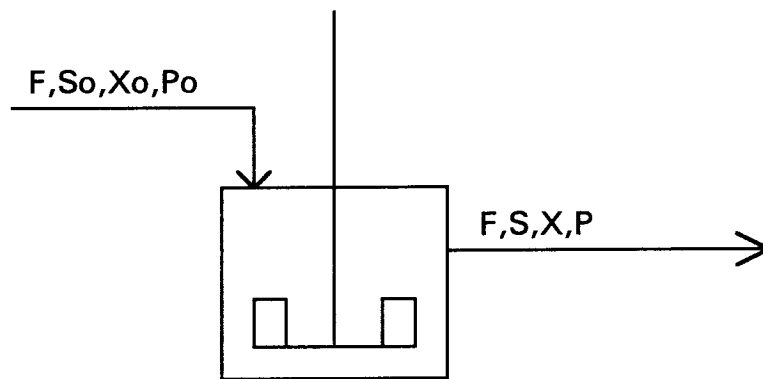


Figura 3.3 - Reator de mistura agitado (CSTR).

Para a determinação dos parâmetros do modelo ( $K_s$ ,  $\mu_{max}$ ,  $n$ ,  $m$ ), deve-se proceder de forma a se fazer simplificações na equação que possibilitam a avaliação destes termos. Para a determinação de  $\mu_{max}$  e  $K_s$ , deve-se trabalhar com baixas concentrações de etanol (baixo P) para desprezar seu efeito inibidor e obter, deste modo, o 2º termo da equação 3.3, aproximadamente, igual a 1, e trabalhar com baixa densidade celular, de modo que o 3º termo também seja próximo de 1, caindo-se na equação de Monod. Usando -se a técnica de linearização de Lineweaver - Burk, faz -se o gráfico  $1/\mu$  vs.  $1/S$  e os dados são ajustados a uma reta. Pode-se, então, determinar  $\mu_{max}$  pela interseção da reta obtida com o eixo dos y

$(1/\mu)$  e  $K_s$  pelo coeficiente angular da reta obtida, para cada temperatura de interesse. Em seguida, trabalhando-se com maior concentração de açúcar e, assim, de etanol, e mantendo a concentração celular baixa para que o 3<sup>o</sup> termo da equação 3.3 ainda possa ser simplificado a 1, pode-se determinar  $P_m$  e  $n$  para as várias temperaturas, segundo método baseado em LEVENSPIEL (1980). Para cada temperatura, deve-se construir o gráfico  $1/\mu$  vs.  $1/S$ , para diferentes  $P$ . Este gráfico fornece o termo  $\mu_{\max} [1 - (P/P_m)^n]$ . Conhecendo  $P_m$ , pode-se obter 'n' construindo-se o gráfico  $\log \{ \mu_{\max} [1 - (P/P_m)^n] \}$  vs.  $\log[1 - (P/P_m)]$ . O coeficiente angular da reta obtida fornece "n". Finalmente, trabalhando-se com reciclo de células e, assim, com altas concentrações de célula pode-se determinar  $X_m$  e  $m$  em várias temperaturas. Paralelamente, podem ser determinadas as outras constantes do modelo ( $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/s}$  e  $m_s$ ) presentes nas equações de velocidade. Neste trabalho, entretanto, vamos nos ater somente às determinações de  $K_s$ ,  $\mu_{\max}$ ,  $Y_{x/s}$  e  $Y_{p/s}$ .

## IV. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

### IV.1 - Seleção do microrganismo

Foram testadas 8 linhagens de levedura:

- uma linhagem disponível no laboratório e isolada de usina (1);
- uma linhagem cedida pela Usina Barra Grande (SP) (2);
- *Saccharomyces uvarum* IZ-1904, cedida pelo IPT(SP) (3);
- *Saccharomyces bayanus*, cedida pelo IPT(SP) (4);
- *Saccharomyces cerevisiae* CCY - 21.4.36, cedida pelo IPT (SP) (5);
- uma linhagem HTYM - 81, isolada da destilaria Santa Isabel (NE) e cedida pela UNESP de Araraquara (6);
- uma linhagem cedida pela Usina Santa Adélia (SP) (7);
- uma linhagem cedida pela Usina Cresciumal (SP) (8);

Foram construídas as curvas de crescimento das 8 linhagens, usando a metodologia descrita no item IV.1, que são mostradas nas figuras 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 . Os valores obtidos de  $\mu_{max}$  estão apresentados na tabela 4.1.

Analisando-se os resultados, chega-se à conclusão que a linhagem a ser escolhida é a número 7, cedida pela Usina Santa Adélia, pois foi a que apresentou maior valor de  $\mu_{max}$  e sendo isolada de usina, provavelmente possui boa tolerância ao etanol e à temperatura.

Tabela 4.1 - Valores de  $\mu_{max}$  obtidos das curvas de crescimento a 32°C.

Linhagem	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )
1	0,14
2	0,17
3	0,21
4	0,19
5	0,23
6	0,27
7	0,32
8	0,19

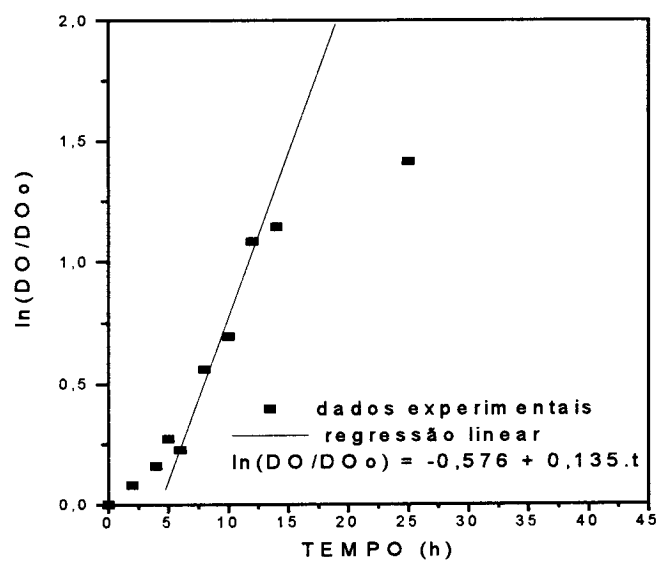


Figura 4.1 - Curva de crescimento para a linhagem 1 a 32°C.



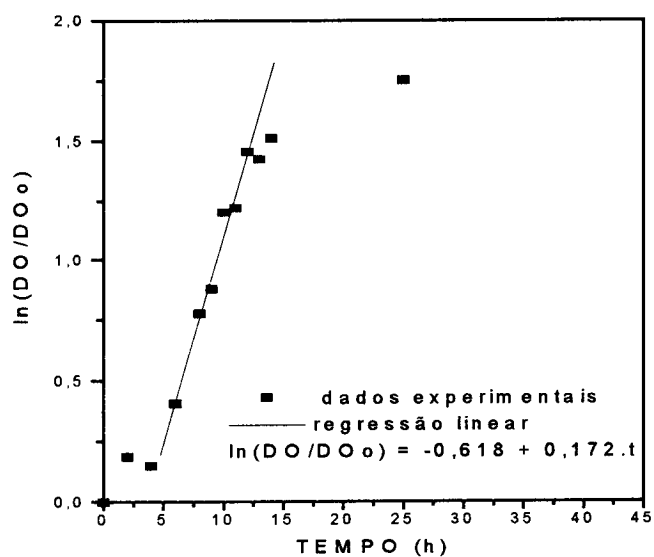


Figura 4.2 - Curva de crescimento para a linhagem 2 a 32°C .

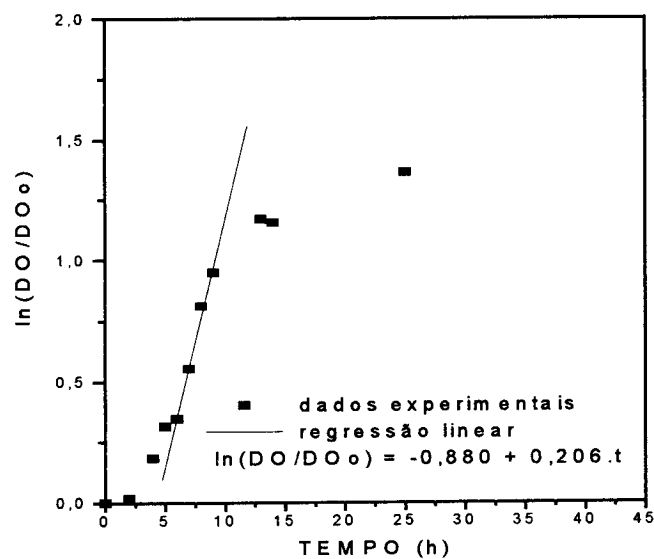


Figura 4.3 - Curva de crescimento para a linhagem 3 a 32°C .

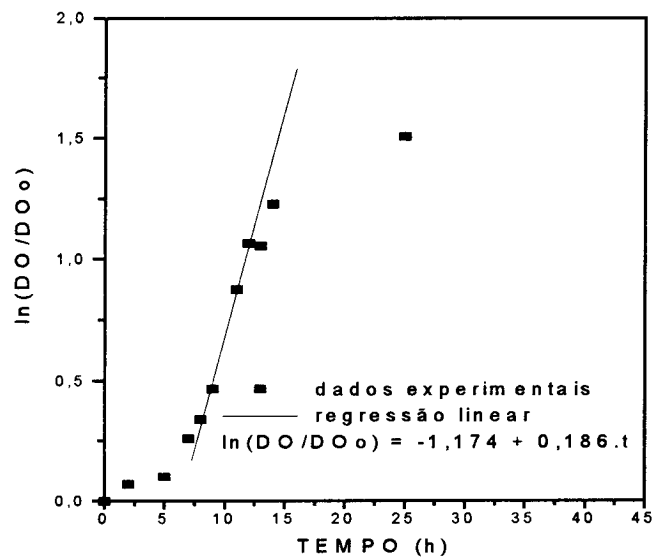


Figura 4.4 - Curva de crescimento da linhagem 4 a 32°C .

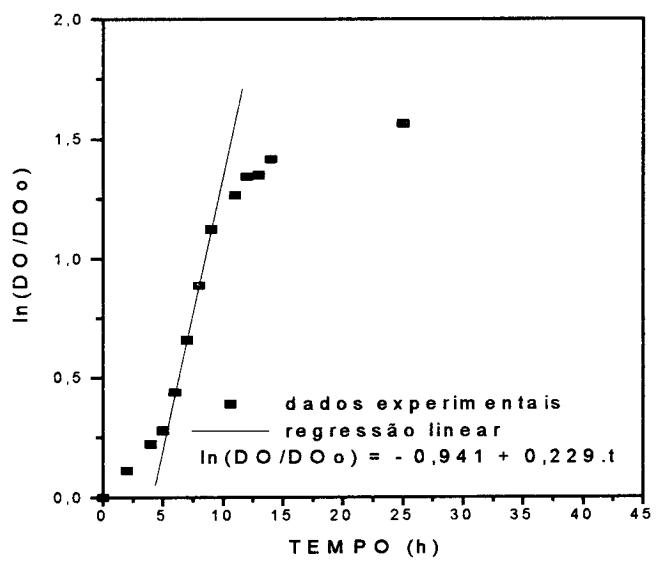


Figura 4.5 - Curva de crescimento da linhagem 5 a 32°C .

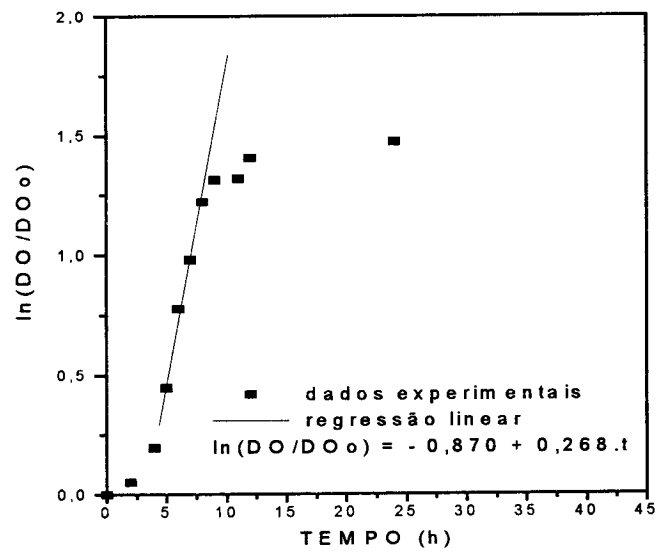


Figura 4.6 - Curva de crescimento da linhagem 6 a 32°C .

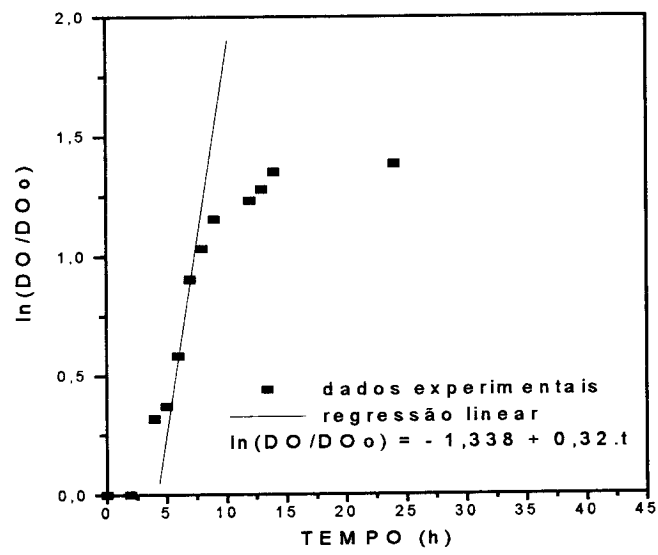


Figura 4.7 - Curva de crescimento da linhagem 7 a 32°C .

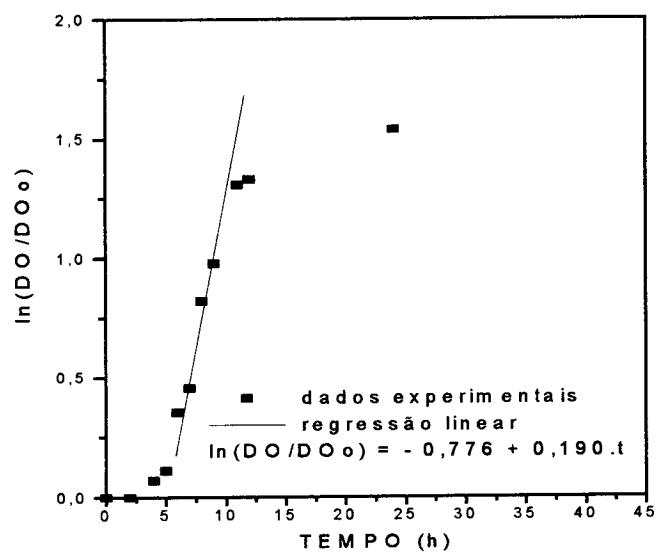


Figura 4.8 - Curva de crescimento da linhagem 8 a 32°C .

#### IV.2 - Determinação de Pm

Foram determinados os valores para Pm para as temperaturas de 28, 30, 32, 34, 36 e 38 °C, segundo a metodologia descrita no item III.2.2. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 4.2 e estão de acordo com valores citados na literatura:

Tabela 4.2 - Valores de Pm obtidos nos ensaios em batelada.

Temperatura (°C)	Pm ( g Etanol/l)
28	83,7
30	111,3
32	100,2
34	98,7
36	78,1
38	71,0

A figura 4.9 mostra os valores de Pm obtidos experimentalmente. Verifica -se que Pm cresce de 28 a 30°C, quando atinge seu maior valor: 111,3 gEtanol/l. A partir dessa temperatura, decresce, chegando a 70,5 g Etanol/l na temperatura de 38°C. Foram testados dois ajustes na faixa de temperatura de 30 a 38°C para descrever essa diminuição de Pm com a temperatura: um ajuste linear e um ajuste exponencial. As equações 4.1 e 4.2 mostram as regressões obtidas, onde T é a temperatura em °C.

$$Pm = 266,45 - 5,135.T \quad (4.1)$$

$$r^2 = 0,94$$

$$Pm = 638,1.e^{-0,05741.T} \quad (4.2)$$

$$r^2 = 0,93$$

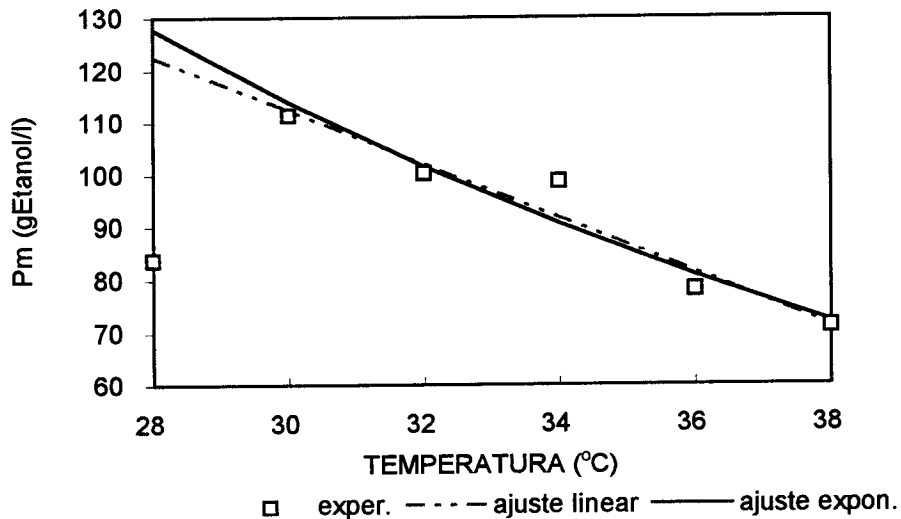


Figura 4.9 - Variação de Pm com a temperatura.

A figura 4.10 mostra uma comparação entre os resultados obtidos e os reportados no trabalho de SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1983). Verifica -se uma discordância entre os dois trabalhos no tocante ao fato de Pm crescer de 28 a 30°C para depois decrescer com a temperatura. Segundo SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1983), existe um patamar para Pm em torno de 87 gEtanol/l entre as temperaturas de 13 a 27°C, utilizando -se *Saccharomyces cerevisiae*. Acima de 27°C, Pm cai significativamente. Esta discrepância pode decorrer de problemas experimentais. Em virtude disso, desconsiderou -se o valor de Pm a 28°C na modelagem. Uma outra diferença observada entre os dois trabalhos foi a obtenção de valores sistematicamente mais altos para Pm nesse trabalho. Isso pode ser explicado pelas diferenças das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e de meio de cultura, lembrando-se que a cepa utilizada nesse trabalho é proveniente de usina de álcool, com uma tolerância supostamente maior ao etanol. Além disso, analisando-se a tabela 2.2, verifica-se que os valores de Pm obtidos nesse trabalho (84 - 111 g Etanol/l) estão dentro do intervalo previsto por DAUGULIS & SWAINE (1987). O ajuste escolhido para o decréscimo de Pm com a temperatura foi o exponencial, descrito pela equação 4.2, uma vez que há uma tendência geral de que os parâmetros cinéticos variem exponencialmente com a temperatura e as correlações para os dois ajustes foram praticamente iguais ( $r^2 = 0,94$  para o ajuste linear e 0,93 para ajuste exponencial). ANDRIETTA & MAUGERI (1994) ajustaram uma equação semelhante à

equação 4.2 para  $P_m$  e obtiveram a seguinte expressão:  $P_m = 895,6 \cdot e^{-0,0676 \cdot T}$ . Verifica-se que os valores encontrados para as constantes cinéticas são da mesma ordem de grandeza. Além disso, os mesmos autores obtiveram para 32°C um valor de  $P_m$  igual a 103 gEtanol/l, valor praticamente idêntico ao obtido nesse trabalho ( $P_m = 100,2$  gEtanol/l). Deve -se ressaltar também que, sob o ponto de vista prático na condução de fermentação alcoólica industrial, temperaturas abaixo de 30°C nunca são atingidas, exceto para bebidas alcólicas que não são objeto deste estudo. Portanto, o fato de se desconsiderar o valor de  $P_m$  a 28°C não compromete os modelos obtidos.

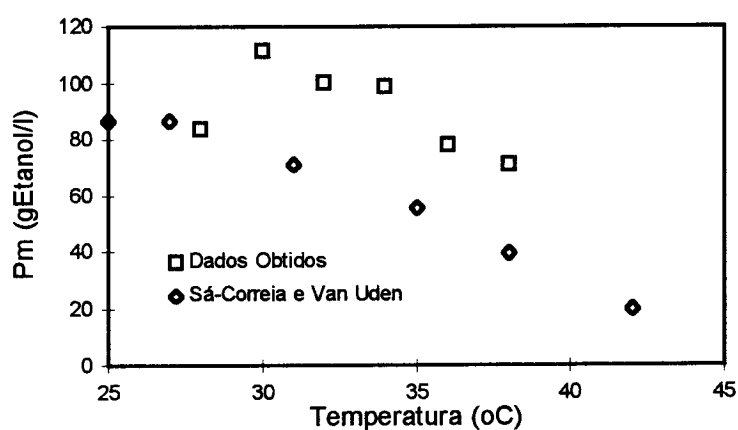


Figura 4.10 - Comparação dos dados obtidos para  $P_m$  com os reportados por Sá-Correia & Van Uden (1983).

### IV.3 - Fermentação contínua

Foram realizados os testes com fermentação contínua para as temperaturas de 28, 30, 32, 34, 36 e 38°C. Os resultados estão apresentados na tabela 4.3. O pH do meio situou - se entre 4,0 e 5,2, para todas as temperaturas.

Tabela 4.3 - Resultados dos ensaios com fermentação contínua. Os valores de S, X e P são a média das análises, que foram feitas em triplicata.

Temperatura (°C)	D (1/h)	S (gART/l)	X(g cel.seca/l)	P(g Et/l)
28	0,112	2,5	3,5	20,0
	0,162	3,7	3,2	19,3
	0,221	13,3	2,9	13,8
	0,275	20,0	2,2	9,6
	0,312	25,5	1,5	7,1
30	0,153	2,6	3,6	19,7
	0,222	5,3	3,3	10,8
	0,241	10,4	2,9	7,4
	0,270	14,1	2,7	12,4
	0,336	23,3	1,8	7,7
32	0,170	3,5	3,4	18,3
	0,226	5,7	3,2	18,5
	0,238	7,7	3,1	14,9
	0,312	19,1	2,4	11,9
	0,348	24,0	2,1	8,7
34	0,143	2,5	3,7	18,4
	0,160	2,7	3,8	13,8
	0,207	4,0	3,4	19,7
	0,230	5,8	3,2	10,3
	0,278	12,2	2,8	12,4
	0,326	15,8	2,5	11,8
36	0,156	2,6	3,4	20,0
	0,203	4,5	2,9	18,3
	0,215	4,9	2,8	14,9
	0,264	12,7	2,7	14,8
	0,374	24,0	1,9	8,3
38	0,127	2,7	3,3	16,0
	0,160	4,1	2,9	16,0
	0,199	8,9	2,7	15,1
	0,208	11,1	2,6	15,5
	0,247	15,1	2,1	12,5
	0,296	23,8	1,7	8,8



#### IV.3.1 - Determinação das constantes cinéticas da equação de Monod em função da temperatura

As constantes cinéticas  $\mu_{max}$  e  $K_s$  foram determinadas nas diferentes temperaturas, usando -se a técnica da linearização de Lineweaver-Burk. Tomou -se como constantes as condições de alimentação, ou seja,  $X_o = 0$  e  $S_o = 40$  g ART/l.

Os gráficos  $1/\mu$  vs.  $1/S$  para cada temperatura são mostrados a seguir. Analisando-se os gráficos  $1/\mu$  vs.  $1/S$  ( figuras 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 e 4.16), observa-se que a regressão linear ajustou-se bem aos dados experimentais ( $r^2 \geq 0,96$ ). Os valores obtidos para  $\mu_{max}$  e  $K_s$  são mostrados na tabela 4.4.

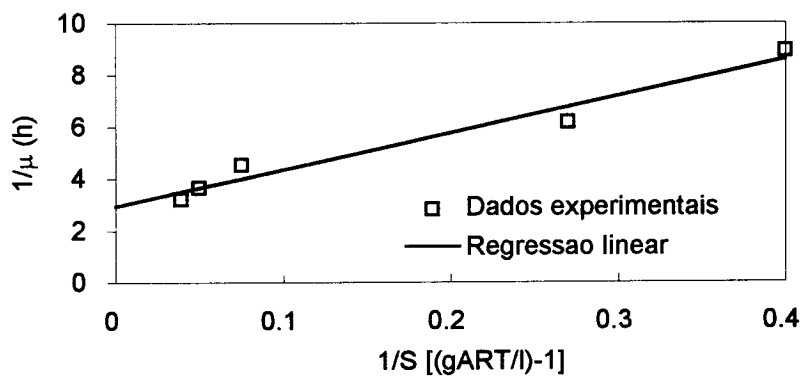


Figura 4.11 - Gráfico para determinação de  $\mu_{max}$  e  $K_s$  na temperatura de 28 °C .

Equação da regressão:

$$\frac{1}{\mu} = 2,922 + \frac{14,208}{S}$$

$$r^2 = 0,963$$

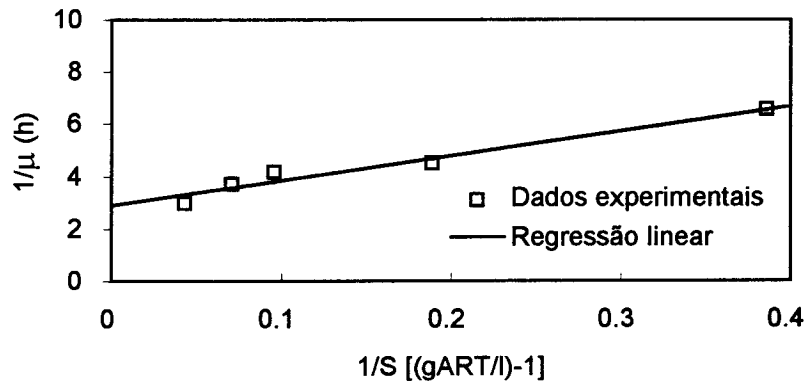


Figura 4.12 - Gráfico para determinação de  $\mu_{max}$  e  $K_s$  na temperatura de 30 °C .

Equação da regressão:

$$\frac{1}{\mu} = 2,895 + \frac{9,417}{S}$$

$$r^2 = 0,962$$

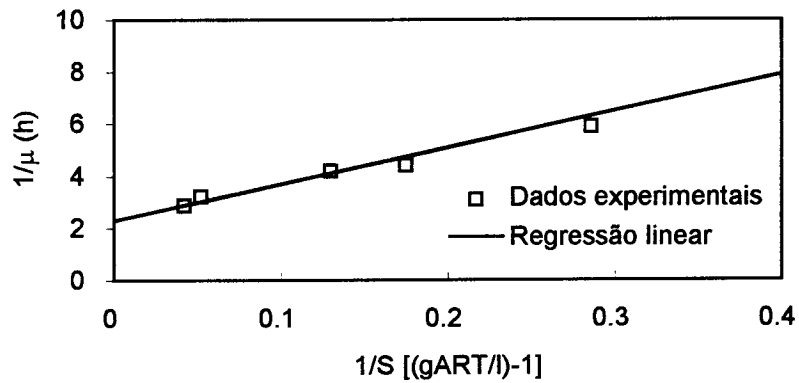


Figura 4.13 - Gráfico para determinação de  $\mu_{max}$  e  $K_s$  na temperatura de 32 °C .

Equação da regressão:

$$\frac{1}{\mu} = 2,507 + \frac{11,746}{S}$$

$$r^2 = 0,987$$

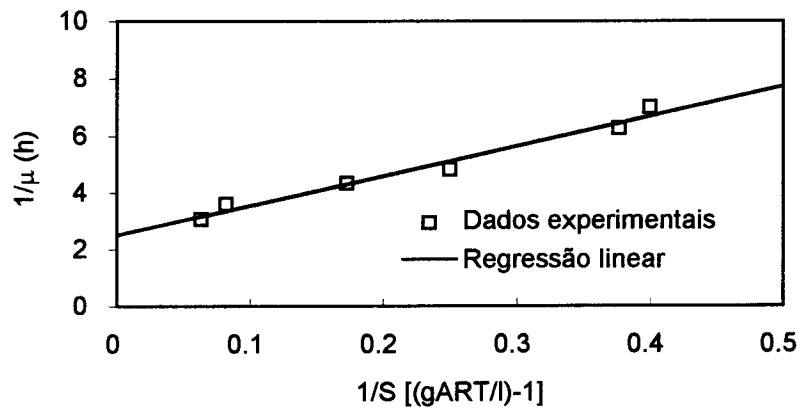


Figura 4.14 - Gráfico para determinação de  $\mu_{max}$  e  $K_s$  na temperatura de 34 °C .

Equação da regressão:

$$\frac{1}{\mu} = 2,511 + \frac{10,424}{S}$$

$$r^2 = 0,976$$

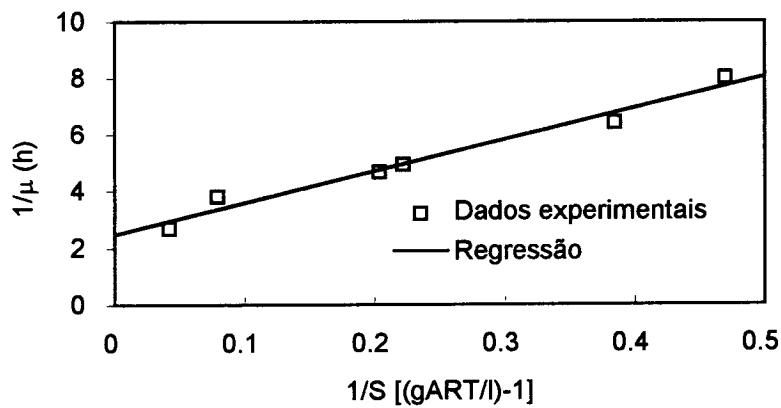


Figura 4.15 - Gráfico para determinação de  $\mu_{max}$  e  $K_s$  na temperatura de 36 °C .

Equação da regressão:

$$\frac{1}{\mu} = 2,467 + \frac{11,161}{S}$$

$$r^2 = 0,973$$

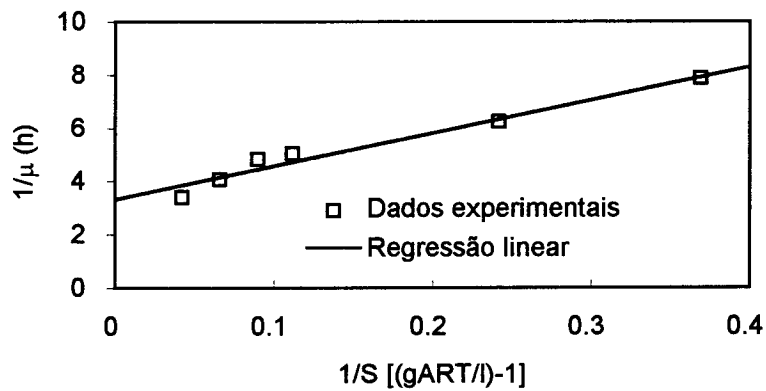


Figura 4.16 - Gráfico para determinação de  $\mu_{max}$  e  $K_s$  na temperatura de 38 °C .

Equação da regressão:

$$\frac{1}{\mu} = 3,309 + \frac{12,528}{S}$$

$$r^2 = 0,964$$

Tabela 4.4 - Valores obtidos para  $\mu_{max}$  e  $K_s$ , fazendo-se a regressão linear do gráfico  $1/\mu$  vs.  $1/S$ .

Temperatura (°C)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$K_s$ (g ART/l)
28	0,342	4,86
30	0,345	3,25
32	0,399	4,69
34	0,398	4,15
36	0,382	3,84
38	0,302	3,79

Ajustando-se os dados de  $\mu_{max}$  à relação proposta por SINCLAIR & KRISTIANSEN (1987), obtém-se a equação 4.3, onde T é a temperatura absoluta em Kelvin. Esta equação foi obtida determinando -se as constantes  $A1 = 4,181 \cdot 10^4$  e  $E1/R = 3535$  K

através da regressão linear de  $\ln(\mu_{\max})$  vs  $1/T$  ( $K^{-1}$ ) para os três primeiros valores de  $\mu_{\max}$ . As constantes  $A_2 = 5,397 \cdot 10^{69}$  e  $E_2/R = 50475$  K foram determinadas pela regressão linear de  $\ln(\mu_{\max_{\text{regressão1}}} - \mu_{\max})$  vs  $1/T$ , para os três últimos valores de  $\mu_{\max}$ . O parâmetro  $\mu_{\max_{\text{regressão1}}}$  é o valor de  $\mu_{\max}$  calculado pela equação obtida da regressão linear dos três primeiros pontos. A figura 4.17 mostra as duas retas que compõem a equação 4.3: a reta de ativação e a de desativação térmica. A figura 4.18 mostra a curva fornecida pela equação 4.3, assim como os dados experimentais. Observa-se que existe um bom ajuste dos dados experimentais. Pelo gráfico, verifica-se que a temperatura em que  $\mu_{\max}$  atinge seu valor máximo de  $0,4 \text{ h}^{-1}$  é  $34,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

$$\mu_{\max} = 4,181 \cdot 10^4 \times e^{(-3535/T)} - 5,397 \cdot 10^{69} \times e^{(-50475/T)} \quad (4.3)$$

Analisando-se a tabela 2.2, verifica-se que existe uma faixa grande de variação para  $\mu_{\max}$  na literatura, de 0,19 a 0,64. Os valores obtidos nesse trabalho estão situados dentro dessa faixa. ANDRIETTA & MAUGERI (1994) obtiveram um valor para  $\mu_{\max}$  igual a  $0,41 \text{ h}^{-1}$  a  $T = 32 \text{ }^\circ\text{C}$ , utilizando um microrganismo isolado de destilaria brasileira, muito semelhante ao valor obtido nesse trabalho a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\mu_{\max} = 0,399 \text{ h}^{-1}$ ).

Quanto à  $K_s$ , observa-se que não existe uma tendência de variação deste parâmetro com a temperatura, como pode ser visto na figura 4.19. Tendo-se em vista as imprecisões envolvidas na sua determinação ( erro experimental da análise de ART e erro envolvido na regressão linear), pode - se considerar que  $K_s$  varia muito pouco com a temperatura e obtém - se um valor médio igual a  $4,1 \text{ gART/l}$  para  $K_s$ . Analisando-se a tabela 2.2, observa-se que esse valor está fora da faixa usual de valores de  $K_s$  ( $0,315\text{-}1,4 \text{ g Substrato/l}$ ), citada por DAUGULIS & SWAINE (1987). Entretanto, o valor obtido para  $K_s$  é próximo dos valores obtidos por HOPPE & HANSFORD (1982) e por Cysewski, citado no mesmo artigo, que são  $3,3$  e  $4,9 \text{ g Substrato/l}$ , respectivamente. Como  $K_s$  é função do microrganismo e do meio de cultura, uma análise mais detalhada desses valores é difícil de ser feita. Entretanto, esse valor obtido para  $K_s$  mais alto que a faixa usual encontrada na literatura e citada por DAUGULIS & SWAINE (1987) talvez possa ser explicado pela deficiência em

algum micronutriente no meio de cultura ou pela existência de compostos inibidores presentes no melaço que afetaram o crescimento celular.

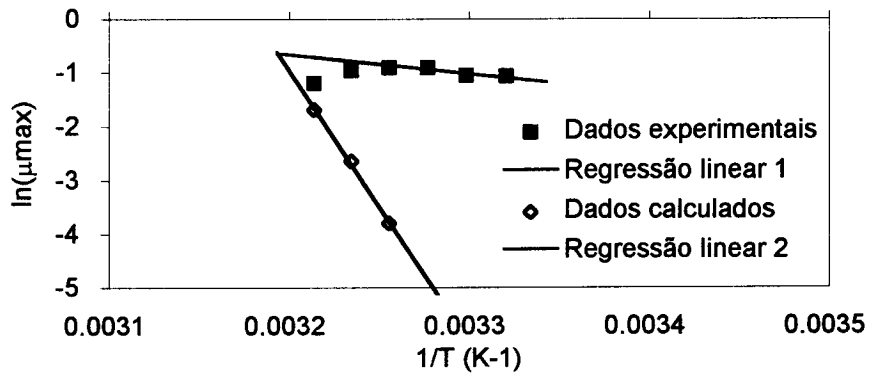


Figura 4.17 - Retas de ativação e desativação térmica para  $\mu_{max}$ .

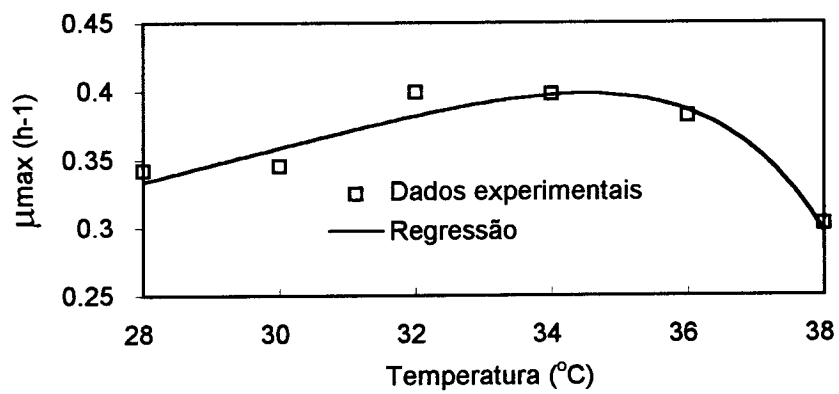


Figura 4.18 - Variação de  $\mu_{max}$  com a temperatura.

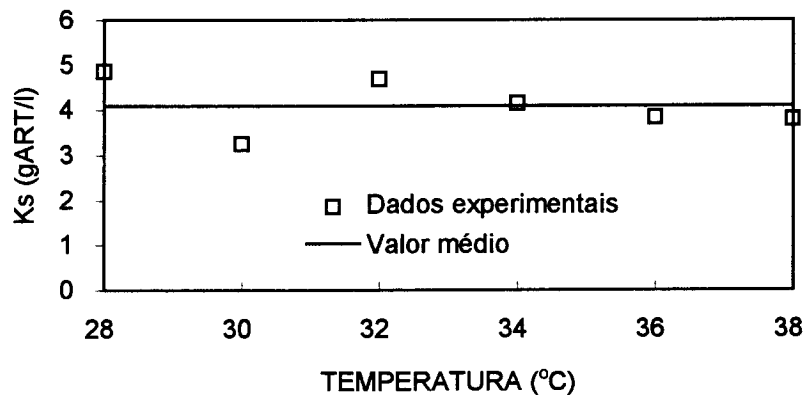


Figura 4.19 - Variação de Ks com a temperatura.

#### IV.3.2 - Determinação de $Y_{x/s}$

Os gráficos X vs.  $\Delta S$  ( figuras 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24 e 4.25) foram construídos de acordo com a metodologia descrita no item III.4 e são mostrados a seguir. Foi feita regressão linear para a obtenção de valores médios de  $Y_{x/s}$  em cada temperatura. Para as temperaturas de 28, 30, 34 e 38 °C, os dados ajustaram-se relativamente bem à regressão linear ( $r^2 \geq 0,9$ ). Portanto, pode-se considerar que  $Y_{x/s}$  é constante nestas temperaturas e igual a 0,097; 0,098; 0,099 e 0,087 g cel.seca/g ART, respectivamente. Já para as temperaturas de 32 e 36 °C, o coeficiente de correlação para a regressão linear não foi bom ( $r^2 = 0,60$  e  $0,56$ , respectivamente). Entretanto, para efeito de comparação, os valores de 0,098 e 0,088 g cel.seca/g ART foram considerados como os rendimentos celulares médios aproximados para as temperaturas de 32 e 36°C. A figura 4.26 mostra a variação do rendimento celular com a temperatura, assim como o modelo proposto para descrever essa variação. Verifica-se que  $Y_{x/s}$  mantém - se constante na faixa de temperatura de 28 a 34°C e apresenta uma queda para temperaturas superiores a 34°C. Portanto, considerou -se que  $Y_{x/s}$  é igual a 0,098 g cel./g ART entre 28 e 34°C e cai exponencialmente de 34 a 38°C, de acordo com a equação 4.4, onde T é a temperatura em °C. Deve -se ressaltar que a equação 4.4 foi obtida a partir de somente 3 pontos e seu coeficiente de correlação ( $r^2$ ) é igual a 0,82.

$$Y_{x/s} = 0,292 \cdot e^{(-0,032 \cdot T)}, T \geq 34 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (4.4)$$

A tabela 4.5 resume os dados obtidos para  $Y_{x/s}$  nas temperaturas de teste.

Tabela 4.5 - Valores de  $Y_{x/s}$  nas temperaturas de teste.

Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	$Y_{x/s}$ ( g cel./ g ART)
28	0,097
30	0,098
32	0,098
34	0,099
36	0,088
38	0,087

Analisando-se as tabelas 4.5 e 2.2, verifica-se que os valores obtidos nesse trabalho estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura citada por DAUGULIS & SWAINE (1987). BAJPAI & MARGARITIS (1987) investigaram o efeito da temperatura na cinética de produção de etanol por células livres de *Kluyveromyces marxianus* em extrato de alcachofra de Jerusalém. O rendimento celular ( $Y_{x/s}$ ) obtido por esses autores manteve-se constante e igual a 0,043 g céls.secas/g açúcares utilizados na faixa de temperatura de 25 a 35  $^\circ\text{C}$ , mas diminuiu significativamente acima de 35  $^\circ\text{C}$ . O mesmo comportamento foi observado nesse trabalho, sugerindo haver um patamar onde o rendimento celular é máximo e uma temperatura máxima a partir da qual o rendimento celular cai significativamente. Nesse trabalho, a temperatura máxima a partir da qual o rendimento celular cai significativamente é 34  $^\circ\text{C}$ , coincidindo, praticamente, com a temperatura em que  $\mu_{\text{max}}$  atinge seu valor máximo (  $T = 34,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ ).



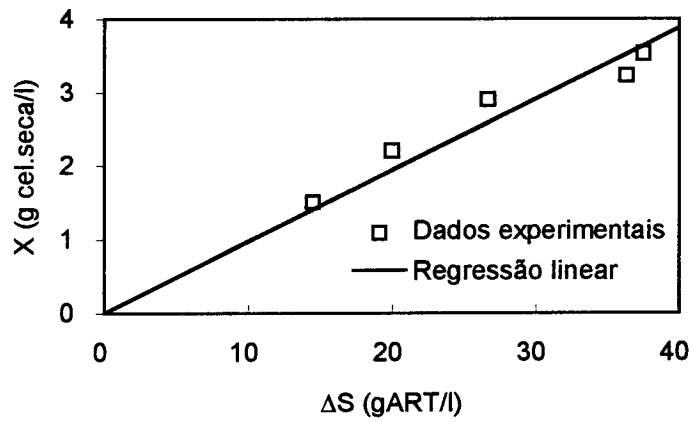


Figura 4.20 - Gráfico para determinação de  $Y_{x/s}$  na temperatura de 28°C .

Equação da regressão:

$$X = 0,097 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,899$$

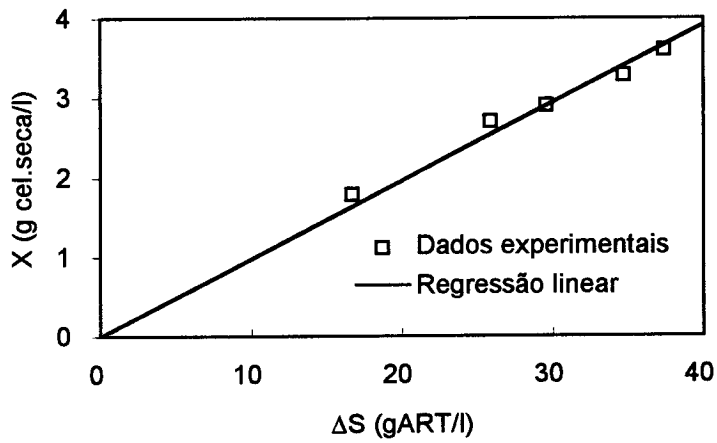


Figura 4.21 - Gráfico para determinação de  $Y_{x/s}$  na temperatura de 30°C .

Equação da regressão:

$$X = 0,098 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,963$$

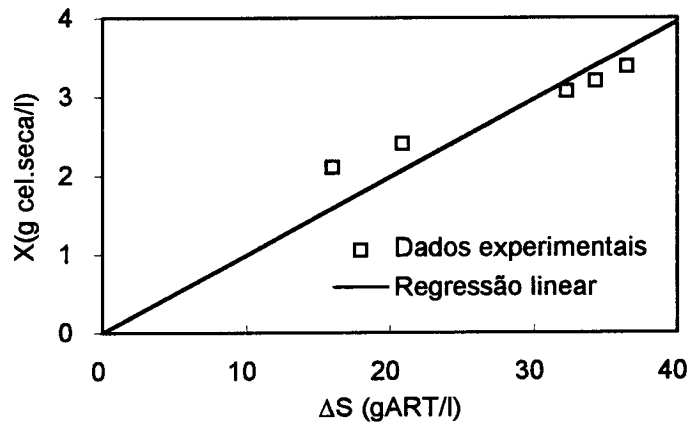


Figura 4.22 - Gráfico para determinação de  $Y_{x/s}$  na temperatura de 32 °C.

Equação da regressão:

$$X = 0,098 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,596$$

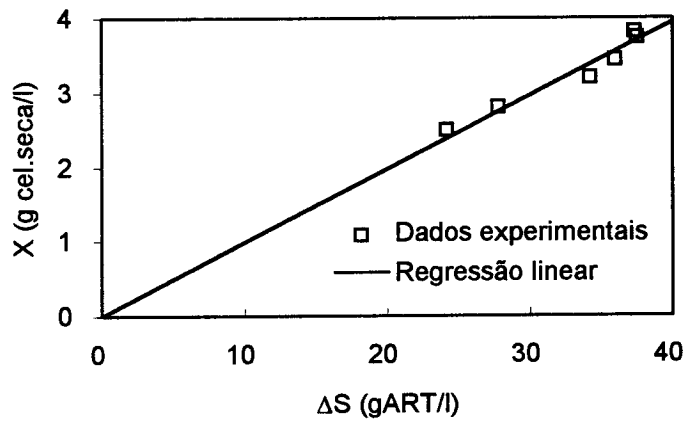


Figura 4.23 - Gráfico para determinação de  $Y_{x/s}$  na temperatura de 34 °C.

Equação da regressão:

$$X = 0,099 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,941$$

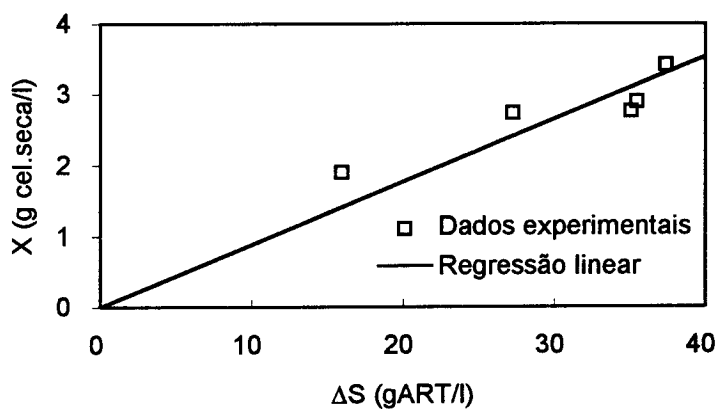


Figura 4.24 - Gráfico para determinação de  $Y_{x/s}$  na temperatura de 36 °C.

Equação da regressão:

$$X = 0,088 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,556$$

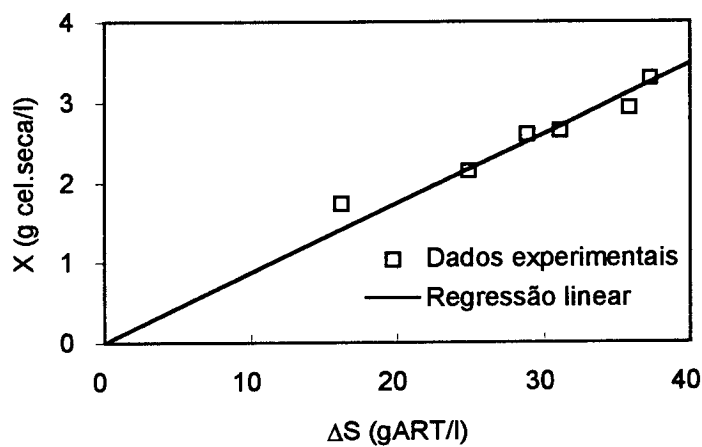


Figura 4.25 - Gráfico para determinação de  $Y_{x/s}$  na temperatura de 38 °C.

Equação da regressão:

$$X = 0,087 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,902$$

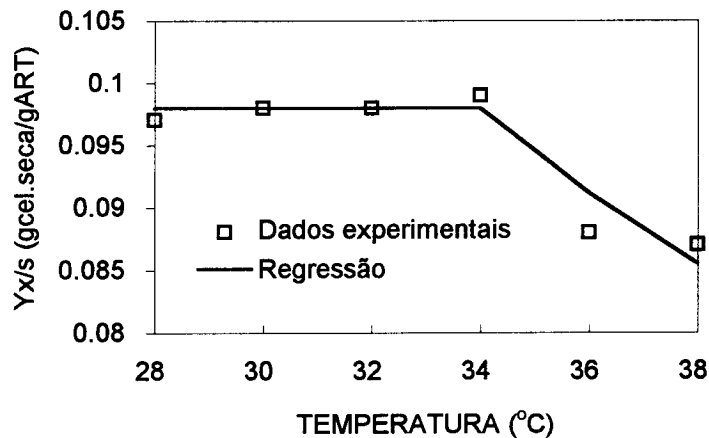


Figura 4.26 - Variação de  $Y_{x/s}$  com a temperatura.

#### IV.3.3 - Determinação de $Y_{p/s}$

Os rendimentos em etanol ( $Y_{p/s}$ ) foram obtidos através dos gráficos P vs.  $\Delta S$  ( figuras 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31 e 4.32), de acordo com metodologia descrita no item III.4. Foram obtidos os valores médios de  $Y_{p/s}$  para cada uma das temperaturas. Os valores obtidos para  $Y_{p/s}$  foram 0,501; 0,505; 0,512; 0,500; 0,502 e 0,511 g etanol/g ART, respectivamente. Verifica -se que os valores de  $Y_{p/s}$  são elevados, atingindo valores próximos ao máximo teórico. Observa -se, no entanto, que não há uma grande variação no rendimento em etanol nesta faixa de temperatura, não sendo evidenciada nenhuma relação de  $Y_{p/s}$  com a temperatura, o que pode ser visto na figura 4.33. Calculando - se um valor médio de  $Y_{p/s}$  para a faixa de temperatura de 28 a 38°C, obtém - se o valor de 0,505 g etanol/g ART.

A Tabela 4.6 resume os dados de  $Y_{p/s}$  nas diferentes temperaturas de teste.

Tabela 4.6 - Valores de Yp/s nas temperaturas de teste.

Temperatura (°C)	Yp/s ( g Et./ gART)
28	0,501
30	0,505
32	0,512
34	0,500
36	0,502
38	0,511

Analisando-se as tabelas 4.6 e 2.2, verifica-se que os valores obtidos nesse trabalho são mais altos do que os valores encontrados na literatura. Além disso, sabe-se que em condições industriais, Yp/s apresenta um valor médio em torno de 0,43. Alguns autores, entretanto, obtiveram valores elevados para Yp/s, como são os casos de BORREGO et al. (1987) e BAJPAI & MARGARITIS (1986), que encontraram valores em torno de 0,50 g etanol/g ART, trabalhando com *Zymomonas mobilis*. Como a maioria dos valores citados na literatura são menores que os obtidos nesse trabalho e pelo fato de Yp/s ter se aproximado muito do máximo teórico, é provável que tenha havido algum problema com os métodos analíticos de etanol e/ou de açúcares redutores totais.

BAJPAI & MARGARITIS (1986) utilizando *Zymomonas mobilis* imobilizada e trabalhando em fermentação contínua obtiveram Yp/s constante e igual a 0,50 g etanol/ g ART na faixa de temperatura de 21 a 40°C, com um pequeno decréscimo a partir dessa temperatura, atingindo o valor de 0,475 a 50°C. BORREGO et al. (1987) obtiveram Yp/s constante e também igual a 0,50 g etanol/ g ART na faixa de temperatura de 20 a 35°C, diminuindo para 0,47 a 40°C. BAJPAI & MARGARITIS (1987), utilizando *Kluyveromyces marxianus*, obtiveram Yp/s constante e igual a 0,485 g etanol/g açúcares utilizados na faixa de temperatura de 25 a 35 °C, com uma nítida diminuição acima de 35°C. Lee et al., citado por

BAJPAI & MARGARITIS (1987), trabalhando com *Saccharomyces uvarum*, reportaram que  $Y_p/s$  permanecia praticamente inalterado na faixa de temperatura de 25 a 43 °C. Portanto, apesar dos valores obtidos para  $Y_p/s$  serem elevados, pode-se concluir de posse dos resultados que  $Y_p/s$  não é influenciado pela temperatura na faixa de 28 a 38 °C dentro das condições experimentais utilizadas nesse trabalho.

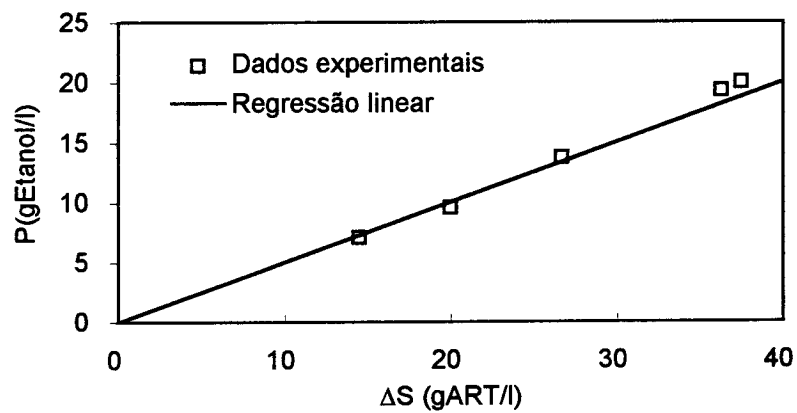


Figura 4.27 - Gráfico para determinação de  $Y_p/s$  na temperatura de 28°C.

Equação da regressão:

$$P = 0,501 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,983$$

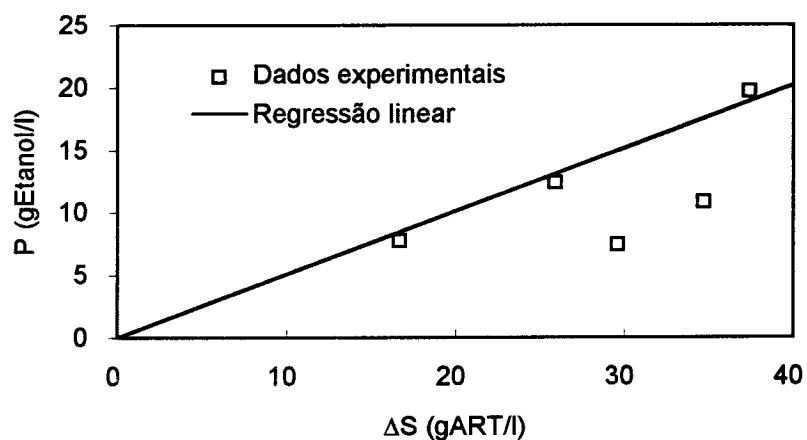


Figura 4.28 - Gráfico para determinação de  $Y_p/s$  na temperatura de 30°C.

Equação da regressão:

$$P = 0,505 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,977$$

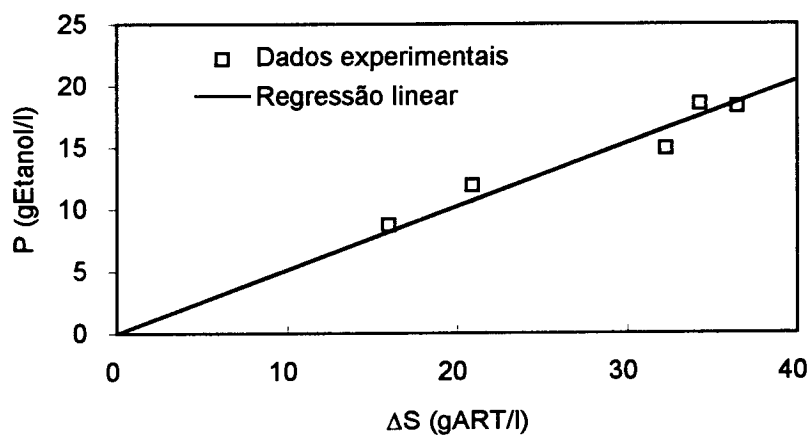


Figura 4.29 - Gráfico para determinação de  $Y_p/s$  na temperatura de 32°C.

Equação da regressão:

$$P = 0,512 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,924$$

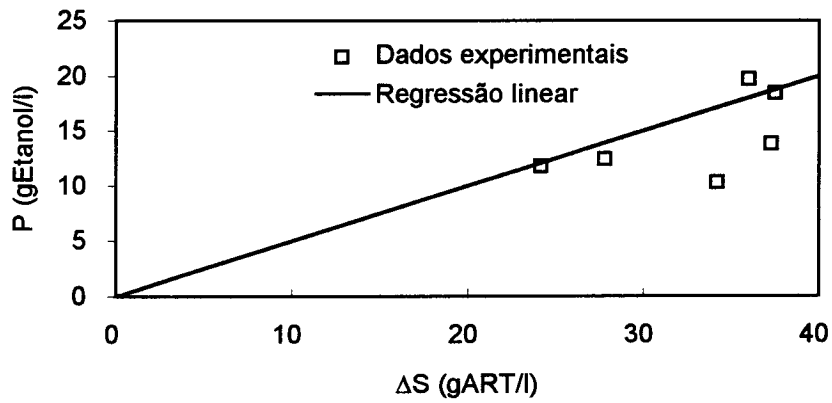


Figura 4.30 - Gráfico para determinação de  $Y_p/s$  na temperatura de 34°C.

Equação da regressão:

$$P = 0,500 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,891$$

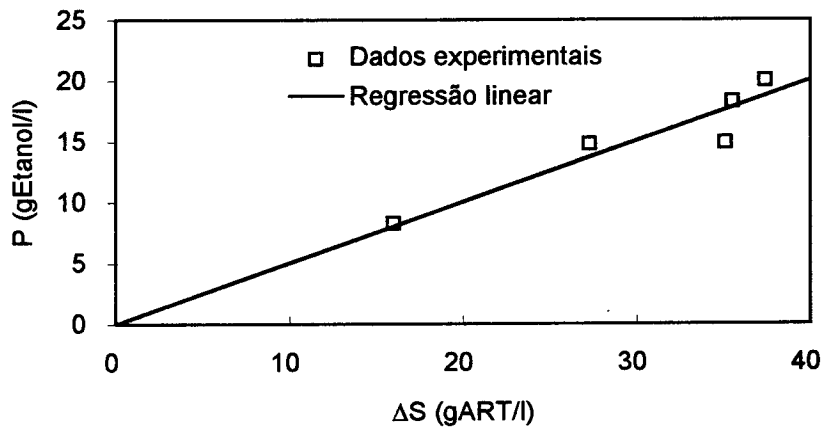


Figura 4.31 - Gráfico para determinação de  $Y_p/s$  na temperatura de 36°C.

Equação da regressão:

$$P = 0,502 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,871$$



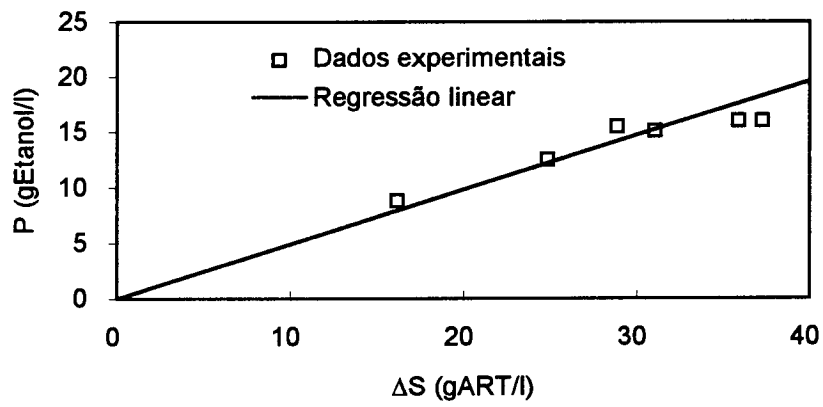


Figura 4.32 - Gráfico para determinação de  $Y_p/s$  na temperatura de 38°C.

Equação da regressão:

$$P = 0,490 \cdot \Delta S$$

$$r^2 = 0,856$$

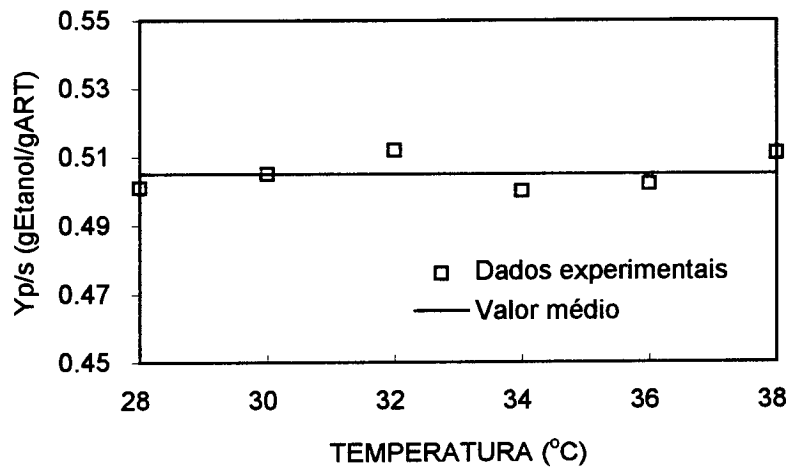


Figura 4.33 - Variação de  $Y_p/s$  com a temperatura.

## V - CONCLUSÃO

- De todas as linhagens estudadas escolheu - se a cedida pela Usina Santa Adélia, que apresentou a maior taxa de crescimento celular. No decorrer dos estudos, a linhagem apresentou bom comportamento, com termo e álcool-tolerância relativamente altas.

- Os dados de  $P_m$  (concentração máxima de etanol acima da qual não há mais crescimento celular), a diferentes temperaturas, mostraram uma tendência a diminuir exponencialmente com a temperatura. Foi proposto o seguinte modelo para  $P_m$ :

$$P_m = 638,1 \cdot e^{(-0,05741 \cdot T)}, \text{ para } 30 < T < 38 \text{ }^\circ\text{C};$$

- Trabalhando -se em fermentação contínua com baixas concentrações de substrato, o microrganismo mostrou seguir a equação de Monod e foi possível determinar  $\mu_{max}$  e  $K_s$  a diferentes temperaturas. Os resultados para  $\mu_{max}$  obtidos em fermentação contínua são 0,342; 0,345; 0,399; 0,398; 0,382 e 0,302  $\text{h}^{-1}$  para as temperaturas de 28, 30, 32, 34, 36 e 38°C, respectivamente. Estes dados mostraram que  $\mu_{max}$  varia com a temperatura seguindo um comportamento de Arrhenius. Obteve - se um modelo matemático, mostrado a seguir, que descreve a variação de  $\mu_{max}$  com a temperatura:

$$\mu_{max} = 4,181 \cdot 10^4 \cdot e^{(-3535/T)} - 5,397 \cdot 10^{69} \cdot e^{(-50475/T)}$$

- Observou-se que a temperatura ótima para crescimento celular da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* testada é 34,5 °C, temperatura na qual  $\mu_{max}$  atinge o valor de 0,40  $\text{h}^{-1}$ ;

- Verificou - se que  $K_s$ , a constante de saturação da equação de Monod, não apresenta variação com a temperatura na faixa estudada, indicando que pode ser considerada constante e igual a 4,1 gART/l na faixa de 28 a 38 °C;

- Observou-se que o rendimento celular ( $Y_{x/s}$ ) mantém-se constante na faixa de temperatura de 28 a 34°C e é igual a 0,098 gcel.seca/gART. Para temperaturas superiores a 34°C, o rendimento celular diminui exponencialmente com a temperatura, segundo a equação:

$$Y_{x/s} = 0,292 \cdot e^{(-0,032 \cdot T)}$$

- Observou -se que o rendimento em etanol ( $Y_{p/s}$ ) foi bastante elevado, próximo ao máximo teórico e não é influenciado pela temperatura na faixa de 28 a 38°C.

## VI - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar as constantes cinéticas  $n$ ,  $m$ ,  $P_m$ ,  $X_m$ ,  $\mu$  e  $m_s$  do modelo proposto por Jarzebski et al. ( equação 3.28), utilizando a mesma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* e o mesmo meio de cultura em sistema contínuo, variando temperatura, concentração de substrato e concentração de células;
- De posse de todos os parâmetros cinéticos, fazer a simulação do modelo obtido e comparar com dados experimentais, a fim de se fazer um ajuste final dos parâmetros;
- Se possível, ajustar os parâmetros cinéticos com dados industriais;
- Otimizar os parâmetros de operação de um processo industrial, utilizando os dados cinéticos obtidos.

## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol.Bioeng., v. 10, p. 845-864, 1968.

AIBA, S. & SHODA, M. J. Ferment. Tecnol., v. 47, p. 790-794, 1969.

ANDRIETTA, S. R. & STUPIELLO, J. P. Simulação e modelagem para processo de fermentação alcóolica (I) Batelada alimentada. Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 8, p. 36-40, mai./ago.,1990a.

ANDRIETTA, S. R. & STUPIELLO, J. P. Simulação e modelagem para processo de fermentação alcóolica (II) Contínua. Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 9, p. 45-51, set./dez., 1990b.

ANDRIETTA, S. R. & MAUGERI, F. Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcóolica Contínua em Escala Industrial. Campinas, 1994. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals . 2a. ed. N. York: McGraw - Hill, 1986. 984 p.

BAJPAI, P. K. & BAJPAI, P. Enzyme and Microbial Technology , v. 13, n. 4, p. 359-362, 1991.

- BAJPAI, P. & MARGARITIS, A. Effect of temperature and pH on Immobilized *Zymomonas mobilis* for continuous production of ethanol. Biotechnol. Bioeng., v. 28, p. 824-828, 1986.
- BAJPAI, P. & MARGARITIS, A. The effect of temperature and pH on ethanol production by free and immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalém artichoke extract. Biotechnol. Bioeng., v. 30, p. 306-313, 1987.
- BAZUA, C. D. & WILKE, C. R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. Symp., v. 7, p. 105-118, 1977.
- BONOMI, A.; ABOUTBOUL, H.; SCHIMITELL, W. Simulation of the Continuous Fermentation of Manioc Hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. Symp., v. 11, p. 333-357, 1981.
- BORREGO, F.; OBÓN, J. M.; CÁNOVAS, M.; MANJÓN, A.; IBORRA, J.L. Biotechnol. Letters, v. 9, n. 8, p. 573-576, 1987.
- CYSEWSKI, G. R. & WILKE, C. R. Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. Biotechnol. Bioeng., v. 19, p. 1125-1143, 1977.
- CYSEWSKI, G. R. & WILKE, C. R. Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. Biotechnol. Bioeng., v. 20, p. 1421- 1444, 1978.

DAUGULIS, A. J. & SWAINE, D. E. Examination of Substrate and Product Inhibition Kinetics on the Production of Ethanol by Suspended and Immobilized Cell Reactors. Biotechnol. Bioeng., v. 29, p. 639-645, 1987.

DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; CHAMY, R.; LEMA, J. M. Determination of Kinetic Parameters of Fermentation Processes by a Continuous Unsteady-State Method: Application to the Alcoholic Fermentation of D-Xylose by *Pichia stipitis*. Biotechnol. Bioeng., v. 41, p.1129-1132, 1993.

GAO, C. & FLEET, G. H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. J. Appl. Bacteriol., v. 65, p. 405-409, jun., 1988.

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

HOLZBERG, I.; FINN, R. K.; STEINKRAUS, K. H. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. Biotechnol. Bioeng., v. 9, p. 413 - 427, 1967.

HOPPE, G. K. & HANSFORD, G. S. Ethanol Inhibition of Continuous Anaerobic Yeast Growth. Biotechnol. Letters, v. 4, n. 1, p. 39- 44, 1982.

- HUANG, S. Y. & CHEN, J. C. Analysis of the kinetics of ethanol fermentation with *Zymomonas mobilis* considering temperature effect. Enzyme Microb. Technol., v. 10, p. 431 - 439, jul., 1988.
- JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations. Biotechnol. Bioeng., v. 34, p. 1225 - 30, 1989.
- LEE, C. W. & CHANG, H. N. Kinetics of Ethanol Fermentation in Membrane Cell Recycle Fermentors. Biotechnol. Bioeng., v. 24, p.1105-1112, 1987.
- LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. Biotechnol. Bioeng., v. 25, p. 497-511, 1983.
- LEVENSPIEL, O. The Monod equation: a revised and a generalization to product inhibition situations. Biotechnol. Bioeng., v. 22, p. 1671-1687, 1980.
- LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng., v. 27, p. 280-285, 1984.
- MAIA, A. B. R. A. Fundamentos de Fermentação Alcólica: Apostila do Curso de Engenharia Química. Belo Horizonte: UFMG, 1989.



- MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Economic Evaluation of Alternative Ethanol Fermentation Processes. Biotechnol. Bioeng., v. 26, p.1003-1025, 1984.
- MCMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; RATKOWISKY, D. A. In: BAZIN, M. J. & PROSSER, J. I. Physiological Models in Microbiology. CRC Press Boca Raton, 1988. v. 1, p. 75.
- MILANESE-RUBILAR, A. A. & MAUGERI, F. Modelling alcohol production and cell viability in a cascade reactor with immobilized cells. Rev. Microbiol., v. 21, p. 79 - 84, 1990.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chem., v. 31, p. 426-428, 1959.
- MOHR, P. W. & KRAWIEC, S. Temperature characteristics and Arrhenius plots for nominal psychrophiles, mesophiles and thermophiles. J. Gen. Microbiol., v. 121, p. 311-317, 1980.
- MONBOUQUETTE, H. G. Models for high cell density bioreactors must consider biomass volume fraction: cell recycle example. Biotechnol. Bioeng., v. 29, p. 1075-1080, 1987.
- MOTA, M.; LAFFORGUE, C.; STREHAIANO, P.; GOMA, G. Bioprocess Eng., v. 2, p. 65, 1987.

MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnol. Bioeng. v. 22, p. 2375-2381, 1980.

NOVAK, M.; STREHAIANO,P.; MORENO, M.; GOMA, G. Alcoholic Fermentation: On the Inhibitory Effect of Ethanol. Biotechnol. Bioeng., v. 23, p. 201, 1981.

RAMOS, M. T. & MADEIRA-LOPES, A. Effects of acetic acid on the temperature profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Lett., v. 12, n. 3, p. 229 - 234, jan., 1990.

RODRIGUES, M. I. Desenvolvimento de Técnicas para o Controle de Fermentação. In: I REUNIÃO TÉCNICA SOBRE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA - COOPERSUCAR. p. 27-60, 1989.

RODRIGUES, M. I.; ANDRIETTA, S. R.; MAUGERI FILHO, F. Simulação de produtividade e rendimento em fermentação alcóolica contínua, para reatores operando em condições ideais e não-ideais de mistura. Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 3, p. 35 - 41, 1992.

SÁ-CORREIA, I. & VAN UDEN, N. Temperature Profiles of Ethanol Tolerance: Effects of Ethanol on the Minimum and Maximum Temperatures for Growth of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. Biotechnol. Bioeng., v. 25, p. 1665, 1983.

SHU, C. H. & YANG, S. T. Kinetics and modeling of temperature effects on batch xanthan gum fermentation. Biotechnol. Bioeng., v. 37, p. 567-574, mar., 1991.

SINCLAIR, C. G. & KRISTIANSEN, B. Fermentation Kinetics and Modelling. New York: Taylor and Francis, 1987. 113 p.

SIQUEIRA, M. A. Proposta de Otimização para Destilarias Autônomas. Stab. Açúcar, Alcool e Subprodutos, v. 11, p. 33 - 38, 1993.

VAN UDEN, N. Ethanol toxicity and ethanol tolerance yeasts. Annual Reports on Fermentation Processes, v. 8, p. 11 - 58, 1985.