

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

**EFEITO DA TEMPERATURA NA CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO
ALCÓOLICA CONTÍNUA COM ALTA DENSIDADE CELULAR**

EZEQUIAS PESSOA DE SIQUEIRA FILHO

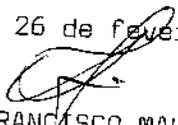
Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

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 EZEQUIAS PESSOA DE SIQUEIRA FILHO e aprovada pela Comissão Julgadora em 26.02.97.

Campinas, 26 de fevereiro de 1997


Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO

Presidente da Banca

CAMPINAS - 1997



RADE	BC
RAMADA:	UNICAMP
275e	
Ex.	
BO UC/	30170
C.	281/97
<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
CO RB	11,00
PA	15/05/97
CPD	

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

SI75e

Siqueira Filho, Ezequias Pessoa de
Efeito da temperatura na cinética da fermentação
alcoólica contínua com alta densidade celular / Ezequias
Pessoa de Siqueira Filho. -- Campinas, SP [s.n.], 1997.

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

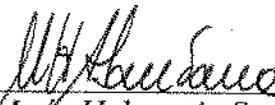
1.Cinética química. 2.Fermentação alcoólica. 3.Álcool.
4.Biomassa. I.Maugeri Filho, Francisco. II.Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos.

CM-00099239-7

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador



Prof.ª Dr.ª Maria Helena A. Santana
Membro



Dr. Silvio Roberto Andrietta
Membro

Prof.ª Dr.ª Maria Isabel Rodrigues
Membro

"Uma geração passa e outra geração lhe sucede: mas a terra permanece sempre firme. O sol nasce e se põe, e torna ao lugar de onde partiu: e renascendo aí, faz o seu giro pelo meio-dia, e depois se dobra para o norte. O vento corre visitando tudo em roda, e volta sobre si mesmo em longos circuitos. Todos os rios entram no mar, e o mar nem por isso transborda. Os rios tornam ao mesmo lugar de onde saem, para tornarem a correr. Todas as coisas são difíceis: o homem não as pode explicar com palavras. O olho não se farta de ver, nem os ouvidos de escutar. Que é o que foi? é o mesmo que o que há de ser: que é o que se fez? é o mesmo que o que se há de fazer. Não há nada que seja novo debaixo do sol, e ninguém pode dizer: eis, aqui está uma coisa nova. Porque ela já a houve nos séculos que passaram antes de nós. Não há memória do que já foi, mas nem ainda haverá recordação das coisas que têm de suceder depois de nós, entre aqueles que hão de existir em tempos a elas muito posterior."

Eclesiastes

*Minhas idéias são frutos do mundo e meu corpo, fruto dos meus ancestrais.
A estes dedico esta tese.*

AGRADECIMENTOS

É bastante difícil querer agradecer a todos em poucas linhas. Uma história não é escrita com poucas palavras, porém dentro do coração ficarão todos aqueles que se envolveram na elaboração deste trabalho, seja com idéias, apoio científico, críticas, amizade, carinho, compreensão, atitudes, gestos. Agradeço a todas as pessoas que conheci, este trabalho trás um pouco de cada uma.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
NOMENCLATURA.....	iii
RESUMO.....	iv
SUMMARY.....	v
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 - HISTÓRICO.....	4
2.2 - FERMENTAÇÃO.....	4
2.3 - MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL.....	6
2.3 - MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL.....	6
2.4 - PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.....	8
2.4.1 - PROCESSO DESCONTÍNUO.....	8
2.4.2 - PROCESSO CONTÍNUO.....	10
2.4.2.1 - SISTEMAS CONTÍNUOS COM ALTA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	12
2.5 - FENÔMENOS DE INIBIÇÃO.....	17
2.6 - EFEITO DA TEMPERATURA.....	22
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 - MICRORGANISMO.....	26
3.2 - MEIO DE CULTURA.....	26
3.3 - ALIMENTAÇÃO.....	26
3.4 - FERMENTAÇÃO CONTÍNUA COM RECICLO DE CÉLULAS.....	26
3.4.1 EQUIPAMENTOS.....	27
3.5 - OPERAÇÃO DO SISTEMA CONTÍNUO.....	29
3.5.1 - PREPARAÇÃO DO SISTEMA DE FILTRAÇÃO.....	29
3.5.2 - ESTERILIZAÇÃO.....	29
3.5.3 - INOCULAÇÃO.....	29
3.6 - SISTEMA EM BATELADA.....	31
3.6.1 - PREPARAÇÃO DO FERMENTADOR.....	31
3.7 - MÉTODOS ANALÍTICOS.....	32
3.7.1 - CONCENTRAÇÃO DE MASSA DE CÉLULAS TOTAIS E VIÁVEIS.....	32
3.7.2 - VIABILIDADE CELULAR.....	32
3.7.3 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (A.R.T.).....	33
3.7.3.1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	33

3.7.3.2 - CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO	34
3.7.3.3 - ANÁLISE DE A.R.T. NAS AMOSTRAS.....	34
3.7.4 - CONCENTRAÇÃO ALCÓOLICA.....	35
3.7.4.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁLCOOL.....	35
3.7.4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	35
3.8 - AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS AOS MODELOS CINÉTICOS	36
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 - SISTEMA CONTÍNUO.....	38
4.2 SISTEMA EM BATELADA.....	64
5 - CONCLUSÕES	80
6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
7 - BIBLIOGRAFIA.....	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - ESQUEMA DO SISTEMA CONTINUO SEM RECICLO DE CÉLULAS (A) E COM RECICLO DE CÉLULAS (B)	12
FIGURA 3.1 - MONTAGEM DO SISTEMA DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA	28
FIGURA 4.1 COMPORTAMENTO DO SISTEMA CONTÍNUO A 28°C	40
FIGURA 4.2 COMPORTAMENTO DO SISTEMA CONTÍNUO A 31°C	41
FIGURA 4.3 COMPORTAMENTO DO SISTEMA CONTÍNUO A 34°C	42
FIGURA 4.4 COMPORTAMENTO DO SISTEMA CONTÍNUO A 37°C	43
FIGURA 4.5 TAXA DE DILUIÇÃO DO SISTEMA CONTÍNUO A 28°C	45
FIGURA 4.6 TAXA DE DILUIÇÃO DO SISTEMA CONTÍNUO A 31 °C	45
FIGURA 4.7 TAXA DE DILUIÇÃO DO SISTEMA CONTÍNUO A 34 °C	46
FIGURA 4.8 TAXA DE DILUIÇÃO DO SISTEMA CONTÍNUO A 37 °C	46
FIGURA 4.9 COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE MASSA VIÁVEL EXPERIMENTAL A 28°C E FUNÇÃO INTERPOLADA	47
FIGURA 4.10 COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE MASSA VIÁVEL EXPERIMENTAL A 31°C E FUNÇÃO INTERPOLADA	48
FIGURA 4.11 COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE MASSA VIÁVEL EXPERIMENTAL A 34°C E FUNÇÃO INTERPOLADA	49
FIGURA 4.12 COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE MASSA VIÁVEL EXPERIMENTAL A 37°C E FUNÇÃO INTERPOLADA	50
FIGURA 4.13 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS USADOS PARA ESTIMAR DX/DT A 28°C	53
FIGURA 4.14 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS USADOS PARA ESTIMAR DX/DT A 31°C	53
FIGURA 4.15 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS USADOS PARA ESTIMAR DX/DT A 34°C	54
FIGURA 4.16 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS USADOS PARA ESTIMAR DX/DT A 37°C	54
FIGURA 4.17 COMPARAÇÃO DO μ EXPERIMENTAL A 28°C COM OS μ ESTIMADOS PELAS EQUAÇÕES 4.7E 4.8.	59
FIGURA 4.18 COMPARAÇÃO DO μ EXPERIMENTAL A 31°C COM OS μ ESTIMADOS PELAS EQUAÇÕES 4.7E 4.8.	60
FIGURA 4.19 COMPARAÇÃO DO μ EXPERIMENTAL A 34°C COM OS μ ESTIMADOS PELAS EQUAÇÕES 4.7E 4.8.	61
FIGURA 4.20 COMPARAÇÃO DO μ EXPERIMENTAL A 37°C COM OS μ ESTIMADOS PELAS EQUAÇÕES 4.7E 4.8.	62
FIGURA 4.21 COMPARAÇÃO DA RETA AJUSTADA COM OS DADOS EXPERIMENTAIS A 28°C	67
FIGURA 4.22 COMPARAÇÃO DA RETA AJUSTADA COM OS DADOS EXPERIMENTAIS A 31°C	68
FIGURA 4.23 COMPARAÇÃO DA RETA AJUSTADA COM OS DADOS EXPERIMENTAIS A 34°C	69
FIGURA 4.24 COMPARAÇÃO DA RETA AJUSTADA COM OS DADOS EXPERIMENTAIS A 37°C	70
FIGURA 4.25 COMPARAÇÃO DOS PM EXPERIMENTAIS COM PM AJUSTADOS PELAS EQUAÇÕES 4.21, 4.22 E 4.23.	73
FIGURA 4.26 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS A 28°C E OS RESULTADOS OBTIDOS POR SIMULAÇÃO	76
FIGURA 4.27 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS A 31°C E OS RESULTADOS OBTIDOS POR SIMULAÇÃO	77
FIGURA 4.28 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS A 34°C E OS RESULTADOS OBTIDOS POR SIMULAÇÃO	78
FIGURA 4.29 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS A 37°C E OS RESULTADOS OBTIDOS POR SIMULAÇÃO	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 SUBSTRATOS CONSUMIDOS E PRODUTOS FORMADOS PELA AÇÃO DE MICRORGANISMOS	6
TABELA 2.2 TIPOS DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL A PARTIR DE CARBOIDRATOS ...	8
TABELA 2.3 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA CONTÍNUA COM RECICLO DE CÉLULAS.....	14
TABELA 2.4 VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS TÉCNICAS EMPREGADAS PARA CULTURAS COM ALTA CONCENTRAÇÃO.....	15
TABELA 2.5 COMPARAÇÃO ENTRE SISTEMAS DE CIRCULAÇÃO USANDO MEMBRANA.....	16
TABELA 2.6 RESUMO DE MODELOS MATEMÁTICOS PROPOSTOS EM FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA ...	21
TABELA 2.7 RESULTADOS OBTIDOS PARA OS PARÂMETROS CINÉTICOS EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA.....	25
TABELA 4.1 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS CONTÍNUOS REALIZADOS A 28 °C.....	38
TABELA 4.2 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS CONTÍNUOS REALIZADOS A 31 °C.....	39
TABELA 4.3 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS CONTÍNUOS REALIZADOS A 34 °C.....	39
TABELA 4.4 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS CONTÍNUOS REALIZADOS A 37 °C.....	39
TABELA 4.5 VALORES DAS CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE ÁLCOOL E AÇÚCAR NO SISTEMA CONTÍNUO.....	43
TABELA 4.6 RESULTADO MÉDIO DE DX/DT A 28 °C CALCULADO PELO MÉTODO NUMÉRICO, "SPLINE", E INTERPOLAÇÃO.....	51
TABELA 4.7 RESULTADO MÉDIO DE DX/DT A 31 °C CALCULADO PELO MÉTODO NUMÉRICO, "SPLINE", E INTERPOLAÇÃO.....	51
TABELA 4.8 RESULTADO MÉDIO DE DX/DT A 34°C CALCULADO PELO MÉTODO NUMÉRICO, "SPLINE", E INTERPOLAÇÃO.....	52
TABELA 4.9 RESULTADO MÉDIO DE DX/DT A 37°C CALCULADO PELO MÉTODO NUMÉRICO, "SPLINE", E INTERPOLAÇÃO.....	52
TABELA 4.10 VALORES DE μ CALCULADOS PELA EQUAÇÃO [2.3] E CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS NO SISTEMA A 28°C.....	55
TABELA 4.11 VALORES DE μ CALCULADOS PELA EQUAÇÃO [2.3] E CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS NO SISTEMA A 31°C.....	55
TABELA 4.12 VALORES DE μ CALCULADOS PELA EQUAÇÃO [2.3] E CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS NO SISTEMA A 34°C.....	56
TABELA 4.13 VALORES DE μ CALCULADOS PELA EQUAÇÃO [2.3] E CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS NO SISTEMA A 37°C.....	56
TABELA 4.14 VALORES DAS CONSTANTES DAS EQUAÇÕES [4.7] E [4.8].	57
TABELA 4.15 VALORES DE $X_{M,A2,M}$ DAS EQUAÇÕES [4.7] E [4.8] OBTIDAS PELA REGRESSÃO NÃO LINEAR.....	58
TABELA 4.16 RESUMO DE ALGUNS VALORES ESTIMADOS PARA X_M	64
TABELA 4.17 RESULTADO DOS EXPERIMENTOS EM BATELADA A 28 °C.....	65
TABELA 4.18 RESULTADO DOS EXPERIMENTOS EM BATELADA A 31 °C.....	65
TABELA 4.19 RESULTADO DOS EXPERIMENTOS EM BATELADA A 34 °C.....	66
TABELA 4.20 RESULTADO DOS EXPERIMENTOS EM BATELADA A 37 °C.....	66
TABELA 4.21 RESULTADO DOS AJUSTES PARA OS MODELOS CINÉTICOS DAS EQUAÇÕES [2.6] E [2.18].	71
TABELA 4.22 RENDIMENTO DAS REAÇÕES DE PRODUÇÃO DE ÁLCOOL E MASSA CELULAR NOS EXPERIMENTOS EM BATELADA.....	74

NOMENCLATURA

A_0, A_1, A_2 = Constantes empíricas

dC_i/dt = Variação da concentração da espécie i com o tempo

dP/dt = variação da concentração alcóolica com o tempo ($g.L^{-1}.h$)

dS/dt = Variação da concentração de substrato com o tempo ($g.L^{-1}.h$)

dX/dt = variação da concentração celular com o tempo ($g.L^{-1}.h^{-1}$)

dX/dt = Variação da concentração celular com o tempo ($g.L^{-1}.h^{-1}$)

E_0, E_1, E_2 = Energia de ativação (cal/mol)

F = vazão volumétrica(L/h)

ΔG° = Energia livre de Gibbs (cal/mol)

K_1, K_2 = Constantes empíricas

K_s = Constante de Monod na eq [2.4] ($g.L^{-1}$)

P = Concentração alcóolica ($g.L^{-1}$)

P_m = Concentração alcóolica máxima onde não há crescimento de células ($g.L^{-1}$)

R = Constante Universal dos gases (cal/mol K)

S = Concentração de substrato ($g.L^{-1}$)

t = tempo(h)

T = temperatura em Kelvin ou Celsius

V = volume do sistema (L)

X = concentração celular ($g.L^{-1}$) base seca

X_m = Concentração celular máxima onde não há crescimento ($g.L^{-1}$)

$Y_{p/s}$ = Rendimento alcóolico(g etanol/g açúcar)

$Y_{x/s}$ = Rendimento celular (g células/ g açúcar)

$Y_{x/p}$ = Rendimento celula/álcool (g células/ g álcool)

μ = velocidade de crescimento específico do microrganismo (h^{-1})

μ_{max} = velocidade de crescimento específico máximo (h^{-1})

v = velocidade específica de produção de etanol (h^{-1})

v_m = velocidade específica máxima de produção de etanol (h^{-1})

v_s = velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1})

RESUMO

A maior parte dos trabalhos em fermentação alcoólica são desenvolvidos sob condições isotérmicas ou em uma faixa de temperatura restrita. A determinação de um modelo cinético capaz de descrever o processo fermentativo numa faixa de temperatura maior, tem suas implicações na elaboração de sistemas otimizados e no controle do processo de fermentação contínua.

Neste trabalho, foi estudado o efeito da temperatura sobre a fermentação alcoólica contínua com alta densidade celular. Altas densidades celulares foram obtidas por meio de um sistema de filtração tangencial acoplado ao reator e mistura.

Foram realizados ensaios em fermentação contínua com *Saccharomyces cerevisiae* na faixa de 28°C a 37°C para se determinar o efeito inibidor devido a concentração celular.

Numa segunda fase, foram realizados experimentos em batelada de 28°C a 37°C e os dados foram ajustados a um modelo cinético de crescimento celular para se determinar o efeito da inibição produzido pela concentração alcoólica, concentração de açúcar e concentração celular em cada temperatura. Os resultados obtidos são mostrados a seguir:

$$P_m = - 9,8973T + 403,65 \text{ de } 28^\circ\text{C a } 37^\circ\text{C.}$$

$$Y_{p/s} = - 0,0033T + 0,4124 \text{ de } 28^\circ\text{C a } 37^\circ\text{C.}$$

$$Y_{x/s} = - 0,0048T + 0,2127 \text{ de } 28^\circ\text{C a } 37^\circ\text{C.}$$

O modelo cinético que melhor descreveu o processo de fermentação alcoólica no intervalo de temperatura de 28°C a 37°C foi:

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

em que, $P_m = - 9,8973T + 403,65 \text{ de } 28^\circ\text{C a } 37^\circ\text{C.}$

$$X_m = 63,8 \text{ g.L}^{-1} \text{ na faixa de temperatura estudada}$$

$$n = 2$$

$$m = 4$$

e os valores de μ_m e K_s em função da temperatura, estimados por ALVES, 1996.

SUMMARY

Most of experiments in the alcoholic fermentation are carried out in isothermic condition or a restricted range of temperature. The determination of kinetics models able to describe the fermentative process at higher temperature range result in the development of optimized system and controlled processes in continuous fermentations.

In this work, the effect of temperature in the continuous alcoholic fermentations at high biomass concentration was researched. High biomass concentration was obtained by a tangential filtration system coupled with continuous stirred tank reactor (CSTR).

Continuous fermentations was carried out with *Saccharomyces cerevisiae* isolated at the Usina Santa Adélia at temperature range of 28 to 37°C to found the inhibitor effect due cellular concentrations.

In the second fase, was carried out batch fermentations at 28 to 37°C and the results was fitted according to kinetic model to investigate the effect of inhibitions caused for alcoholic concentrations, sugar concentrations and biomass concentrations. The results are shown below:

$$P_m = -9,8973T + 403,65 \text{ between } 28 \text{ } ^\circ\text{C to } 37^\circ\text{C.}$$

$$Y_{p/s} = -0,0033T + 0,4124 \text{ between } 28 \text{ } ^\circ\text{C to } 37^\circ\text{C.}$$

$$Y_{x/s} = -0,0048T + 0,2127 \text{ between } 28 \text{ } ^\circ\text{C to } 37^\circ\text{C.}$$

The best kinetics models fitted between 28 °C to 37°C was:

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

so that

$$P_m = -9,8973T + 403,65 \text{ between } 28 \text{ } ^\circ\text{C to } 37^\circ\text{C.}$$

$$X_m = 63,8 \text{ g.L}^{-1}$$

$$n = 2$$

$$m = 4$$

and the values μ_m e K_s as temperature function was estimated by ALVES, 1996.

1 - INTRODUÇÃO

O consumo mundial de petróleo cresceu rapidamente a partir das décadas de 60/70. Vários fatores contribuíram para este crescimento, entre estes podemos citar: ampliação da indústria petroquímica com o avanço das pesquisas em química orgânica e das descobertas de polímeros à base de petróleo, substituição do carvão mineral e vegetal por combustíveis líquidos, ampliação do parque industrial nos países em desenvolvimento da América Latina, Ásia, África, além do consumo exagerado de energia nos países do primeiro mundo como garantia de uma melhor qualidade de vida.

Todos estes fatores fizeram com que a taxa média de consumo de petróleo, registrada no período, fosse de 7,8% e com perspectivas de crescimento para as próximas décadas. Este crescimento se tornaria insustentável a longo prazo, pois com as previsões de uma taxa de crescimento anual de 4%, apontariam um consumo de cerca de 120-160 milhões de barris por dia no final do século, o que acarretaria a triplicação da produção nos países membro da OPEP. Com estes valores, as reservas de petróleo se esgotariam por volta do ano 2010.

A constatação deste quadro, associada às instabilidades políticas vividas por causa da guerra no Oriente Médio, levou a OPEP a dificultar as exportações, conseqüentemente aumentando-se o valor do produto no mercado internacional. Desta forma, o mundo entrou na "crise energética" a partir de 1973. É importante ressaltar que a crise energética vivida pelo mundo na década de 70 teve maiores resultados nos países do terceiro mundo. Estes países, carentes em recursos tecnológicos, sofreram um processo de diminuição no ritmo de crescimento, principalmente na ampliação do parque industrial e na instalação de indústrias multinacionais.

Diante deste quadro, os países industrializados foram obrigados a desenvolver recursos alternativos de energia como forma de aliviar o consumo de petróleo. Face a estes esforços e a diminuição do ritmo de desenvolvimento dos países do terceiro mundo, a taxa média de crescimento do consumo de petróleo caiu para 1,4% no período de 1970/1980.

Podemos citar que além do Brasil, outros países como Paraguai, Costa Rica, Sudão, África do Sul, Nova Zelândia, Tailândia, Colômbia, Filipinas, Costa do Marfim, tiveram apoio financeiro concedido pelo BID (Banco Internacional de Desenvolvimento) para desenvolverem pesquisas em fontes alternativas de energia, como forma de substituir o uso de petróleo, (DIAS, 1982).

O Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL), criado pelo governo em 1975 pelo Decreto nº 76.593, de 14.11.75 e reformulado Decreto nº 80.762, de 18.11.77(DIAS, 1982), aumentou a produção alcooleira de 600 milhões de litros/ano em 1975 para cerca de 11,9 bilhões de litro/ano em 1980. Este patamar foi atingido muito mais devido aos incentivos financeiros que o Governo Federal concedeu aos usineiros para produzirem álcool, que ao desenvolvimento tecnológico alcançado pelas usinas do País, neste período. O PROÁLCOOL, então, tornou-se economicamente inviável com a estabilização do preço do petróleo no mercado internacional, somado ao alto custo de produção do etanol.

A redução dos custos de produção e o aumento da produtividade são os fatores econômicos decisivos para fabricação de um produto. O etanol produzido pelas usinas brasileiras é um produto caro para concorrer com os derivados de petróleo, devido aos processos tecnológicos obsoletos usados na sua produção. Este fator tem como consequência a baixa produtividade e o aumento do preço do produto final.

A maioria das usinas adotam o sistema de fermentação em batelada ou batelada alimentada com regeneração de células, para produção de álcool. Estes sistemas são menos produtivos, se comparados com os sistemas de fermentação contínua. A fermentação contínua, no entanto, é um processo que requer maior conhecimento do comportamento do microrganismo com o meio ambiente onde ele atua. Fatores como temperatura, pH, concentração alcóolica, concentração de biomassa, viabilidade, entre outros, influenciam a produtividade dos sistemas contínuos. Desta forma, a fermentação contínua requer um maior controle do processo e para isso é necessário investir em pesquisa e tecnologia.

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da temperatura na cinética da fermentação alcoólica com alta densidade celular, conduzida a 28°C, 31°C, 34°C e 37°C. Para obter altas concentrações celulares, usou-se o sistema de filtração tangencial do fermentado para reciclo de células, acoplado a um reator de mistura contínuo.

Com base nos resultados dos experimentos do sistema contínuo, obteve-se um modelo cinético para avaliar a influência da concentração celular no crescimento do microrganismo. Numa segunda etapa, verificou-se a influência da concentração de álcool no sistema com alta concentração celular, através de ajuste do modelo cinético aos dados obtidos na fermentação em batelada.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - HISTÓRICO

A história do álcool indubitavelmente data de muitos séculos atrás. Muitos cientistas da antiguidade como Aristóteles, Hipócrates, Plínio, sabiam da presença de um ingrediente combustível no vinho. Aristóteles relatou sobre um vinho que produz um “espírito” e Plínio mais definidamente mencionou a existência de um “vinho que podia incendiar-se”. Entretanto, apesar de saber ou suspeitar da existência de álcool, desde esta época, não há nenhum relato ou indicação que este tenha sido separado do meio fermentado.

A destilação de meios fermentados tornou-se importante no fim do século XV quando foi impresso um livro em Strassburg no ano de 1500, pelo Dr. Heironimus Brunswick, um então conhecido autor de trabalhos médicos. O título da primeira publicação em álcool é “Liber de Arte Distillandi”; uma edição mais detalhada e mais compreensiva publicada em 1507 e outra vez em 1512. Ryff, um outro autor médico, publicou em Frankfurt em 1556 um livro com bastante detalhes do processo de destilação (KIRK 1947).

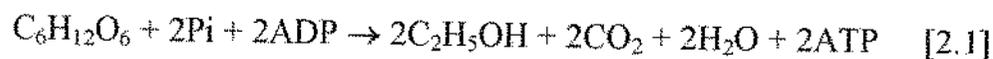
2.2 - FERMENTAÇÃO

A palavra fermentação é originária do Latim e foi usada para designar a transformação de suco de uva em vinho. A palavra latina ‘fervere’ foi usada como metáfora para descrever a aparência de fervor do suco de uva fermentado.

A primeira explanação bioquímica para o processo em que uma solução aquosa de açúcar é decomposta em etanol e gás carbônico, por meio de microrganismos, foi dada por Louis Pasteur. “Através da quebra da molécula de açúcar na ausência de ar, energia é fornecida ao microrganismo, da mesma forma que energia é produzida nos tecidos de animais e plantas, quando os compostos orgânicos são oxidados na presença de ar”. Células de fermento se propagam no líquido fermentando e ele denominou este processo de fermentação alcoólica de “vida sem oxigênio”.

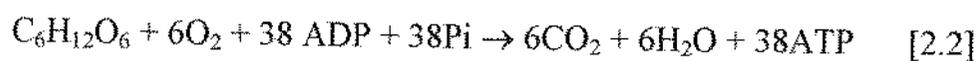
Na fermentação alcoólica, por meio de um complexo sistema de reações enzimáticas que ocorrem no microrganismo, a glicose é transformada em CO₂ e água, no processo aeróbio e em CO₂ e etanol, no processo anaeróbio. A diferença entre os potenciais energéticos das moléculas de substrato e produto, são armazenadas na forma de ATP pelo microrganismo, garantindo desta forma a sobrevivência da espécie.

fermentação alcoólica



$$\Delta G' = -25,4 \text{ kcal/mol (CONN et alii, 1987)}$$

respiração aeróbia



$$\Delta G' = -409 \text{ kcal/mol (CONN et alii, 1987)}$$

A Tabela 2.1 apresenta alguns produtos principais formados pela ação de microrganismos em diversos substratos.

Tabela 2.1 Substratos consumidos e produtos formados pela ação de microrganismos (citado por KIRK, 1951).

Composto metabolizado	Composto formado	Tipo de ação microbiana	Tipo de microrganismo
sacarose, açúcar invertido, rafinose	etanol, CO ₂ álcool amílico, propílico e isoamílico, glicerol, ácido succínico, etc	cultura anaeróbia	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces</i>
etanol	ácido acético	cultura anaeróbia	<i>Bacterium curvum</i> , <i>Acetobacter</i> <i>rancens</i> , <i>A. aceti</i> , <i>A. acetigenum</i>
lactose, maltose, glicose, sacarose, dextranas	ácido láctico	cultura anaeróbia	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. leichmannii</i>
amido, sacarose, açúcar invertido, lactato de cálcio	ácido butírico, CO ₂ , H ₂ , ácido acético, etc.	cultura anaeróbia	<i>Clostridium butyricum</i>
sacarose, frutose, glicose	ácido cítrico	cultura aeróbia	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A.</i> <i>fumaricus</i> , <i>A. aureus</i> , <i>Citromyces</i> <i>pfefferianus</i> , <i>C. glaber</i>
glicose	ácido glucônico	cultura aeróbia	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumaricus</i> , <i>Acetobacter aceti</i> , <i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>
glicose, sacarose, açúcar invertido	ácido fumárico, CO ₂	cultura aeróbia	<i>Rhizopus nigricans</i>
pentoses, hexoses, amido, dissacarídeos, pectina	acetona, etanol, CO ₂ , ácido acético, H ₂	cultura anaeróbia	<i>Bacillus macerans</i>
dextrana, maltose, frutose, sacarose, amido	butanodiol, etanol, CO ₂ , H ₂ , acetona	cultura anaeróbia	<i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus</i> <i>polymyca</i>
lactose, extrato de milho	penicilina	cultura aeróbia	<i>Penicillium notatum</i> , <i>P. chrysogenum</i>
lactose, extrato de milho	Estreptomicina	cultura aeróbia	<i>Streptomyces griseus</i>
lactose, extrato de milho	cloromicetina	cultura aeróbia	<i>Streptomyces venezuelae</i>
glicose, frutose, lactose, maltose, dextrana, amido, glicerol	ácido láctico, ácido propiônica, CO ₂ , H ₂	cultura anaeróbia	<i>propionibacterium freudenreichii</i> , <i>P. technicum</i> , <i>P. arabinosum</i>

2.3 - MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL

Em escala industrial, as leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* são as mais usadas. Entretanto, muitos microrganismos apresentam etanol como um dos produtos de seu metabolismo.

MELO CRUZ & BORZANI(1980), resumiram as principais características das bactérias do gênero *Zymomonas*:

- fermentam vigorosamente a glicose e a frutose com formação de etanol e CO₂.
- crescimento em uma faixa ótima de pH 4,5-6,5.
- temperatura favorável de crescimento entre 25°C e 31°C, ideal a 30°C.
- Anaeróbias facultativas, suportando um certo grau de aerobiose na presença de açúcares fermentescíveis.

TAKAHASHI et alii (1994) produziram etanol a partir da fermentação de pentoses e hexoses, usando *Escherichia coli* modificada com o genes de *Zymomonas mobilis*. Produziram 42,5 g.L⁻¹ de etanol usando um meio contendo 5 g.L⁻¹ de glicose, 80 g.L⁻¹ de xilose e 5 g.L⁻¹ de arabinose em batelada de 96 horas.

RODRIGUEZ et alii (1995), usaram o microrganismo *Zymomonas mobilis* PRO 910, isolada do caldo de cana, com o objetivo de encontrar um modelo matemático de fermentação alcóolica. Avaliaram, através do modelo ajustado, o valor da concentração alcóolica máxima para a qual não haveria mais crescimento do microrganismo e obtiveram uma concentração máxima de etanol igual a 106 g.L⁻¹.

DOMINGUEZ et alii(1993), usaram a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, a partir da fermentação de D-xilose, em regime contínuo, na elaboração de uma estratégia rápida para avaliar os parâmetros cinéticos do processo de fermentação alcóolica.

LAPLACE et alii(1993), desenvolveram um processo de cofermentação alcóolica usando um mutante de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1200 e *Candida shehatae* ATCC 22984 em processos batelada e contínuo, fermentando uma mistura de glicose e xilose. Quando os microrganismos foram co-cultivados continuamente, obtiveram consumo de glicose e xilose 100% e 27 %, respectivamente. Quando o mutante *S. cerevisiae* foi

cultivado com *Pichia stipitis* NRRL Y11545, o consumo de glicose e xilose foi 100% e 69 % respectivamente. Obtiveram 0,42 g etanol/g açúcar.

A tabela 2.2 apresenta alguns tipos de microrganismos que são capazes de sintetizar álcool em seu metabolismo.

Tabela 2.2 Tipos de microrganismos produtores de etanol a partir de carboidratos (VERGARA 1980).

Microorganismo	Substrato	Principais metabólitos
<i>Saccharomyce cerevisiae</i>	Hexoses	Etanol, CO ₂
<i>Zymomonas mobilis</i>	Hexoses	Etanol, CO ₂
<i>Ruminococcus albus</i>	Celulose e hemicelulose	Etanol, CO ₂ , ácido acético
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	Pentoses	Etanol, CO ₂ , ácido acético, ácido láctico
<i>Bacillus macerans</i>	Amido, hexoses	Etanol, CO ₂ , acetona
<i>Erwinia amylovora</i>	Hexoses	Etanol, CO ₂ , ácido láctico
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Pentoses	Etanol, CO ₂ , ácido láctico
<i>Sarcina ventriculi</i>	Hexoses	Etanol, CO ₂ , ácidos
<i>Trichoderma reesei</i>	Celulose	Etanol, glicose

2.4 - PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

Os processos de fermentação alcóolica podem ser conduzido por dois modos distintos: fermentações descontínuas ou em batelada e as fermentações contínuas. Variantes deste dois processos foram admitidas com o desenvolvimento das pesquisas.

2.4.1 - PROCESSO DESCONTÍNUO

Os processos de fermentação alcóolica descontínuos ou comumente denominado batelada, consistem em se adicionar um certo volume de células de levedura a um meio

contendo cerca de 100 a 200 g.L⁻¹ de açúcar e nutrientes (geralmente sais de amônio e fosfato). Ao se adicionar as leveduras, inicia-se a fermentação, caracterizada por uma fase inicial, na qual não se observa fermentação, daí então passando para uma fase onde o microrganismo apresenta maior atividade fermentativa e finalmente passa por uma fase onde não se observa mais desprendimento de CO₂. Este processo todo é realizado industrialmente num período que varia de 6 a 15 horas.(DIAS, 1982).

Ao término da atividade fermentativa, o meio fermentado (vinho) é enviado para o sistema de destilação. Os processos de fermentação em batelada, geralmente alcançam 92-94% do máximo rendimento teórico e apresentam produtividade em torno de 5 g.L⁻¹.h ALVES, (1996).

O processo Melle-Boinot é uma modificação do sistema descontínuo. Na etapa final da fermentação, as leveduras são separadas por centrifugação do mosto e posterior tratamento com ácido sulfúrico. Desta forma, as leveduras recuperadas da etapa anterior são usadas como “pé-de-cuba” na fermentação seguinte, então recebem uma nova quantidade de açúcar, dando-se início a fermentação (LIMA,1975).

A adição da solução de açúcar à dorna de fermentação pode ser feito de uma única vez, em lotes, ou continuamente. Esta última forma de adição, recebe o nome de processo descontínuo alimentado “fed-batch”. Este processo é considerado um intermediário entre o sistema em batelada e o sistema contínuo e tem como principal vantagem a diminuição da fase inicial, manutenção da levedura em fase de crescimento e diminuição de problemas de inibição pelo açúcar.(ROSÁRIO *et alii*, 1979).

Além das dificuldades operacionais inerentes aos processos descontínuos, uma vez que o álcool produzido não é retirado do sistema, os fenômenos de inibição produzidos pelo etanol se acentuam a medida que a fermentação avança. Desta forma, a ação fermentativa e a produtividade diminuem no decorrer da fermentação.

Os processos contínuos foram usados para diminuir o tempo de maturação da cerveja como descrito por OKABE et alii, 1994. Os produtos obtidos pela fermentação contínua foram comparados com os produtos produzidos em batelada e foi verificado que não há uma diferença significativa no produto obtido pelos dois processos, com a vantagem da diminuição do tempo de maturação da cerveja pelo processo contínuo.

2.4.2 - PROCESSO CONTÍNUO

Os sistemas contínuos compreendem uma retirada do vinho e uma alimentação permanente no tanque de fermentação. A fermentação contínua pode ainda ser concebida com ou sem a recirculação das células.

A separação da biomassa do mosto pode ser elaborada por vários métodos, como por exemplo, centrifugação, filtração, separação por membranas, etc.

(YAROVENKO,1979) cita alguns fatores positivos em se usar a fermentação contínua:

- O regime que a fermentação mantém, permite que o microrganismo trabalhe sempre em condições de elevada atividade metabólica(depense da taxa de diluição).
- O produto obtido é mais uniforme, graças as poucas modificações observadas na fase estacionária de operação.
- Os tempos não produtivos do processo em batelada não existem nesta forma de operação, o que implica em equipamentos de menor capacidade para mesma produção.

- A produtividade volumétrica é aumentada, graças a retirada de uma concentração constante do álcool produzido, desta forma consegue-se fermentar altas concentrações de açúcar, sem o aparecimento acentuado do efeito inibidor do etanol.

Alguns pontos negativos porém, foram apontados por PEREGO (1979):

- a manutenção de um meio estéril por muito tempo é bastante difícil.
- pode haver ocorrência de mutantes não interessantes ao processo de fermentação, especialmente quando estes são conduzidos por longos períodos de tempo.

RIGHELATO, (Citado por DIAS, 1982), mencionou as modificações que poderiam ser introduzidas no processo Melle-Boinot, para se aumentar o rendimento e a produtividade em etanol:

- efetuar a fermentação em processo contínuo, com reciclo de células, desta forma, mantém-se altas concentrações celulares e o álcool produzido é constantemente retirado do sistema.
- empregar reatores tubulares com leveduras imobilizadas, como forma de se manter uma alta concentração de biomassa, sem o efeito inibidor do álcool.
- utilizar sistemas de múltiplo estágio, com ou sem aeração.

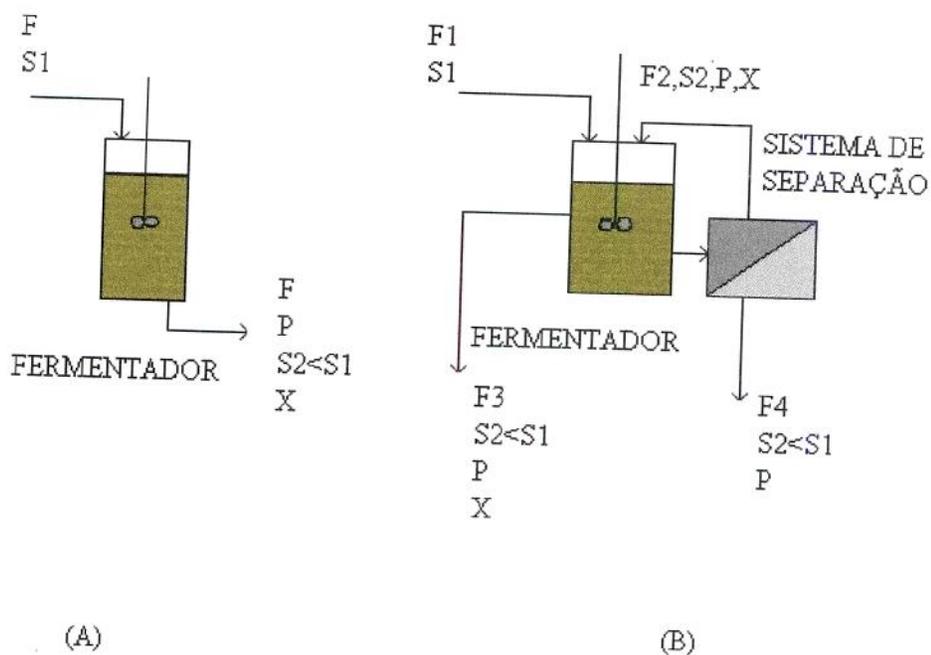


Figura 2.1 - Esquema do sistema contínuo sem reciclo de células (A) e com reciclo de células (B).

2.4.2.1 - SISTEMAS CONTÍNUOS COM ALTA CONCENTRAÇÃO CELULAR

Os sistemas fermentativos com alta concentração de biomassa, são sistemas de elevada produtividade (CHANG et alii, 1994, MELZOCH, 1991). Isto se deve graças a um aumento significativo de células viáveis no sistema, porém, problemas inerentes a estes sistemas vão surgindo com as elevadas concentrações de células. Especialmente o problema de transferência de oxigênio e nutrientes quando os sistemas atingem concentrações celulares acima de 100 g.L^{-1} de células.

Vários métodos foram estudados com o objetivo de obter altas concentrações celulares. Dentre estes métodos podemos citar:

- Imobilização, geralmente aplicada em reatores tubulares, DAUGULIS, & SWAINE, 1987; DALE et alii, 1990; KAREL & ROBERTSON, 1989.
- Reciclo de células através de floculação de certos microrganismos, (BU'LOCK et alii 1984; GHOSE & TYAGI, 1979).
- Reciclo por centrifugação (WIE et alii, 1991).
- Uso de membranas externas e interna KANG et alii, 1993; CHANG et alii, 1993; LAFFORGUE et alii, 1987, 1994; CHANG et alii, 1994; MELZUCH et alii, 1991.

A Tabela 2.3 apresenta alguns trabalhos desenvolvidos em fermentação contínua com reciclo de células. Apresenta também características do sistema de separação usado e a concentração celular.

Tabela 2.3 Fermentação alcoólica contínua com reciclo de células.

AUTORES	OBSERVAÇÃO
OKABE et alii, 1994	<p>Sistema com alta densidade celular obtida por circulação do mosto entre 2 tanques.</p> <p>Extrato de malte usado como matéria-prima.</p> <p>Concentração de células $1,3 \times 10^9$ células/mL.</p>
MELZUCH et alii, 1991	<p>Sistema com alta densidade celular obtida por filtração com membrana.</p> <p>Área total de filtração igual a $1,25 \text{ m}^2$.</p> <p>Análise dos efeitos da taxa de diluição, conc. açúcar, álcool no sistema</p> <p>Concentração de biomassa máxima 60 g.L^{-1}</p>
LAFFORGUE, et alii, 1994	<p>Sistema c/ alta conc. celular obtida por filtração tangencial.</p> <p>Conc. biomassa 330 g.L^{-1}.</p>
CHANG et alii, 1993	<p>Sistema de filtração interno, constituído de um filtro de aço inox.</p> <p>Processo de filtração influenciado pela agitação do sistema.</p> <p>Conc. máxima de células 157 g.L^{-1}</p>
KANG et alii, 1993.	<p>Uso de filtro de cerâmica interno ao sistema para concentração de <i>Bacillus thuringiensis</i>.</p> <p>Concentração máxima de microrganismo igual a $5,5 \times 10^9$ esporos/mL.</p>

A Tabela 2.4 apresenta uma discussão das vantagens e desvantagens das técnicas empregadas em sistemas com alta concentração celular.

Tabela 2.4 Vantagens e desvantagens das técnicas empregadas para culturas com alta concentração. (CHANG, H.N., 1994)

TÉCNICA	VANTAGEM	DESVANTAGEM
Imobilização	<ul style="list-style-type: none"> - Não há 'washout' em nenhuma taxa de diluição. - Proteção das células de tensão de cisalhamento. - Alta densidade de células empacotadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa transferência de oxigênio e nutrientes. - Instabilidade da matriz de imobilização celular. - Difícil 'scale-up'. - Limitações na forma do suporte da matriz.
Floculação	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicidade de equipamentos. - Baixo requerimento em energia. - Fácil 'scale-up'. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicável apenas para células floculantes. - Taxa de diluição limitada pela velocidade de floculação/decantação. - baixa densidade de células.
Centrifugação	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicável em sistemas industriais - Adequado para sistemas em grande escala 	<ul style="list-style-type: none"> - Dificuldade de manutenção de condições asséptica. - Processo caro e complicado.
Membranas externas	<ul style="list-style-type: none"> - Alta razão área/volume de superfície filtrante. - Fácil repassar os módulos de filtração durante a operação. - alta densidade de biomassa 	<ul style="list-style-type: none"> - Recirculação requer sistema de bombeamento extra. - Dificuldade de esterilização. - Diminuição do fluxo devido entupimento do sistema filtrante. - Tensão de cisalhamento danoso para as células. - Não homogeneidade no reator devido as altas concentrações celulares
Membranas internas	<ul style="list-style-type: none"> - Não é necessário recircular o fluido. - Simples operação. - Alta densidade de células. - Esterilizável. 	<ul style="list-style-type: none"> - Diminuição do fluxo devido a entupimento. - Baixa razão área/volume do elemento filtrante. - Inflexibilidade.

CHANG et alii,1994, resumem alguns trabalhos desenvolvidos com sistemas contínuos, usando o sistema de separação com membranas. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 Comparação entre sistemas de circulação usando membrana. (CHANG,1994).

PRODUTO	MICROORGANISMO	CONC. AÇÚCAR (g.L ⁻¹)	CONC. PRODUTO (g.L ⁻¹)	TAXA DE DILUIÇÃO (h ⁻¹)	CONC. CELULAR (g.L ⁻¹)	a (cm ²)
Etanol	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	150	70	1	90	2,33
Etanol	Fermento pão	150	47	0,58	85	0,5
Etanol	<i>Zymomonas mobilis</i>	100	45	0,98	45	0,34
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	140	65	1,31	170	0,6
Etanol	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	64	18,3	0,34	10	1,33
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	47	0,41	56	0,44
Ác.lático	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	62	59	2,55	118	1,5
Ác.lático	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	134	117	0,72	63	0,35
Ác.lático	<i>Lactococcus cremoris</i>	72	49	1,05	88	0,33
Ácido cítrico	<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	150	75	0,015	26	0,2
Butanodiol	<i>Klebsiella oxytoca</i>	105	44	0,02	45	0,01
Acetona, butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	45	16	0,03	20	0,28

* a (cm²) = área superficial da membrana /volume trabalho

2.5 - FENÔMENOS DE INIBIÇÃO

Os processos fermentativos envolvem uma série de reações catalisadas por enzimas que transformam o substrato em produto. Desta forma, a avaliação quantitativa e qualitativa dos fenômenos de crescimento, produção de etanol, consumo de substrato no sistema não são tão triviais.

Estas dificuldades estão associadas à quantidade de variáveis que influenciam o processo de fermentação, como por exemplo: concentração do substrato, produto, biomassa, nutrientes, aeração, taxas de diluição, tipo do microrganismo, temperatura, pH, etc.

Qualquer modelo cinético proposto para descrever o comportamento de uma fermentação, não é uma lei universal. A forma do modelo cinético difere de um experimento para outro. Em geral, estes modelos são propostos a partir de ajustes efetuados com resultados experimentais.

É importante que o modelo cinético forneça informações precisas a respeito do processo e que a expressão do termo de inibição seja tão simples quanto possível.

Vários modelos cinéticos foram elaborados no intuito de descrever o processo fermentativo. Estes modelos cinéticos incluem os termos relativos aos processos de inibição de crescimento de microrganismo e produção de etanol, que ocorrem no desenvolver da fermentação.

A avaliação precisa da cinética do processo fermentativo é de extrema significância, pois através desta avaliação, pode-se desenvolver estratégias com o objetivo de se conseguir sistemas mais produtivos.

Os fatores de inibição mais abordado são os que ocorrem devido a concentração de substrato, concentração alcóolica, concentração de massa celular.

A maioria dos trabalhos sobre modelagem da fermentação alcóolica partem do princípio de que a velocidade de formação do etanol é proporcional à velocidade de

crescimento celular(citado por Alves, 1996). Por sua vez, a velocidade de crescimento celular é proporcional a quantidade de células viáveis no sistema, desta forma obtemos a seguinte expressão para o crescimento de células:

$$dX/dt = \mu X \quad [2.3]$$

A equação mais simples para determinação da velocidade específica de crescimento (μ) é a equação de MONOD(citado por Alves, 1996):

$$\mu = \mu_m S/(S+K_s) \quad [2.4]$$

Segundo a equação de MONOD, o crescimento do microrganismo é apenas uma função da concentração de substrato no meio(S)e se torna máxima, quando a concentração de substrato tende a infinito.

JIN et alii,1981. trabalharam com fermentação alcóolica em um sistema contínuo, constituído por 6 reatores em série, e propuseram um modelo de crescimento do microrganismo que inclui efeitos de inibição pelo substrato e produto.

$$\mu = \mu_0 e^{-k_1.P-k_2.S} \quad [2.5]$$

O modelo cinético proposto por estes autores, admite crescimento ainda que a concentração alcóolica seja grande, sendo zero apenas quando a concentração alcóolica no meio tende a infinito. Esta condição não se observa na prática. O ajuste deste modelo com os dados experimentais por eles conseguido, forneceu:

$$K_1 = 0,06 \text{ (L/g)}$$

$$k_2 = 0,0055 \text{ (L/g)}$$

$$\mu_0 = 0,453 \text{ (1/h)}$$

O efeito inibidor produzido pelo etanol à cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126, foi estudado por LUONG, 1984. Os resultados experimentais obtidos, foram ajustado e comparados com dados de outros autores. O crescimento e produção de etanol, são fenômenos que sofrem influência de inibição pela concentração de etanol.

DOURADO et alii, 1987, usou um modelo cinético que inclui o termo de inibição pelo açúcar e pelo álcool. A partir do modelo cinético assumido, os autores apresentam a modelagem para um sistema de cascata com 6 reatores de mistura.

DAUGULIUS e SWAINE, 1987, fazem uma simulação usando vários modelos cinéticos da taxa de produção de álcool. Estes modelos incluem termos de inibição pelo etanol e pelo açúcar. Os autores comparam o desempenho de um reator com células imobilizadas e um reator de mistura e concluem que o reator de melhor configuração é composto por um reator de mistura trabalhando com $64,2 \text{ g.L}^{-1}$ de álcool e um reator contínuo operando com concentração final de 120 g.L^{-1} .

Um modelo cinético de crescimento celular influenciado pela concentração celular, foi proposto por CHATTAWAY e GOMA, 1988. Estes pesquisadores usaram um sistema contínuo com 4 reatores em cascata. Os experimentos foram conduzidos com várias taxas de diluição e com várias concentrações de açúcar. Segundo os ajustes efetuados a partir dos dados experimentais, eles encontraram valores máximos de concentração celular, onde não ocorre mais crescimento do microrganismo nem produção de etanol equivalentes a $10,0$ e $9,5 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente.

Os valores de concentração de massa ajustados por estes autores são bastante menores se comparados com os valores máximos encontrado em experimentos realizados com reciclo de células. Este fato comprova que os dados experimentais podem estar bem ajustados a um modelo e os parâmetros ajustados possuem pouco significado físico. Como no sistema contínuo de quatro reatores de mistura as concentrações celulares não são grandes, os efeitos de inibição produzidos pela concentração alcóolica são computados em

termos de uma “massa celular máxima” e que na verdade, a concentração celular tem pouco efeito inibidor em sistemas deste tipo.

JARZEBSKI et alii, 1989, trabalhando com modelagem em altas concentrações celulares, propuseram três modelos e compararam com os resultados experimentais obtidos por LAFFORGUE et alii, 1987:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{S + K_s} \left(1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^{A1} \right) \left(1 - \left(\frac{X}{X_m} \right)^{A2} \right) \quad [2.6]$$

$$r_s = -r_x / Y_{x/s} - m_s X_t \quad [2.7]$$

$$r_p = r_x / Y_{x/p} + m_p X_t \quad [2.8]$$

Os resultados dos ajustes foram:

$$\begin{array}{llll} \mu_m = 0,24 \text{ h}^{-1} & A1 = 0,85 & A2 = 1,1 & K_s = 0,5 \text{ g.L}^{-1} \\ Y_{x/s} = 0,12 & Y_{x/p} = 0,4 & P_m = 90 \text{ g.L}^{-1} & X_m = 320 \text{ g.L}^{-1} \\ m_s = 0,22 & m_p = 0,13 & & \end{array}$$

A Tabela 2.6 apresenta alguns modelos cinéticos usados para descrever sistemas de fermentação alcoólica.

Tabela 2.6 Resumo de modelos matemáticos propostos em fermentação alcóolica.

MODELO	PARÂMETROS	AUTORES
$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{P}{P_m}\right) \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{\lambda}}$ [2.9]	$\mu_m = 0,4 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 0,48 \text{ g.L}^{-1}$ $\lambda = 205,2 \text{ g.L}^{-1}$ $P_m = 87 \text{ g.L}^{-1}$ $Y_{pm} = 0,48$ $v_m = 1,4 \text{ h}^{-1}$ $P'_m = 114 \text{ g.L}^{-1}$ $\lambda' = 303 \text{ g.L}^{-1}$ $K_s = 0,666 \text{ g.L}^{-1}$	GHOSE & THYAGI, 1979
$v_s = -\frac{v_p}{Y_{p/s}}$ [2.10]		
$v_p = v_m \left(1 - \frac{P}{P'_m}\right) \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{\lambda'}}$ [2.11]		
$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S}\right) \left(\frac{K_p}{P + K_p}\right) \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)$ [2.12]	$\mu_m = 0,3 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 5 \text{ g.L}^{-1}$ $K_p = 4,5 \text{ g.L}^{-1}$ $P_m = 85 \text{ g.L}^{-1}$ $Y_{p/s} = 0,5$ $Y_s = 0,83$ $\alpha = 13$ $\beta = 0,05 \text{ h}^{-1}$	SEVELY et alii, 1980
$v_s = -\frac{v_p}{Y_{p/s}} - \frac{\mu}{Y_x}$ [2.13]		
$v_p = \alpha\mu + \beta$ [2.14]		
$\mu = \mu_m e^{-k_1 P - k_2 S} \frac{S}{S + K_s}$ [2.15]		
$v_s = -\frac{v_p}{Y_{p/s}}$ [2.16]	$\mu_m = 0,453 \text{ h}^{-1}$ $K_1 = 0,06 \text{ g.L}^{-1}$ $K_2 = 0,0055 \text{ g.L}^{-1}$ $K_s = 0,22 \text{ g.L}^{-1}$ $Y_p = 0,48 \text{ g.L}^{-1}$ $v_m = 1,657 \text{ h}^{-1}$ $K_3 = 0,02395 \text{ g.L}^{-2}$ $K_4 = 0,00129 \text{ g.L}^{-1}$ $K'_p = 0,44 \text{ g.L}^{-1}$	JIN, C.K. et alii, 1981
$v = v_m e^{-k_3 P - k_4 S} \frac{S}{S + K'_p}$ [2.17]		
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n \left(1 - \frac{x}{x_m}\right)^m$ [2.18]		
$v_s = -\frac{\mu}{Y_{x/s}}$ [2.19]	$\mu_m = 0,24 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 1,6 \text{ g.L}^{-1}$ $P_m = 90 \text{ g.L}^{-1}$ $x_m = 100 \text{ g.L}^{-1}$ $n = 1$ $m = 1$ $Y_{xs} = 0,06$ $Y_{xp} = 0,16$	LEE, M.J. et alii, 1983
$v_p = \frac{\mu}{Y_{x/p}}$ [2.20]		

2.6 - EFEITO DA TEMPERATURA

As fermentações alcóolicas industriais são efetuadas em duas faixas de temperatura bem distintas. Entre 7°C e 20°C, na fabricação de bebidas, principalmente vinhos e cervejas (OKABE et alii, 1994) e acima de 30°C em processos de produção de etanol comercial (94-96°G.L).

A temperatura influencia os processos fermentativos de forma significativa, uma vez que estes processos são resultado de uma série de reações químicas em equilíbrio.

As fermentações alcóolicas conduzidas a baixas temperaturas, requerem um maior período que as fermentações conduzidas a temperaturas superiores a 32°C.

ARRHENIUS foi um dos primeiros cientistas a pesquisar o efeito da temperatura na velocidade das reações. Ele verificou que a velocidade de uma reação química poderia ser expressa como função exponencial da temperatura.

$$dc_i/dt = v = A_0 e^{(-E_a/RT)} \quad [2.21]$$

dc_i/dt - variação da concentração da espécie i com o tempo

A_0 - velocidade inicial

E_a - energia de ativação

T - temperatura

R - constante termodinâmica

A equação [2.21] é conhecida como Equação de Arrhenius.

Vários trabalhos já foram realizados na determinação da influência da temperatura nos processos fermentativo (LEÃO e VAN UDEN, 1982., CHEN et alii, 1982, DALE et alii, 1990; CARVALHO et alii, 1996; ALVES, 1996).

LEÃO e VAN UDEN,(1982) pesquisaram sobre o efeito da adição de álcoois (etanol, isopropanol, propanol e butanol) na cinética de morte térmica em *Saccharomyces cerevisiae*. Estes autores propuseram um modelo de morte térmica semelhante a equação de ARRHENIUS e analisaram o comportamento do microrganismo diante dos vários tipos de álcoois e de várias concentrações. Os dados apresentados por estes autores se ajustaram bem ao modelo adotado. Eles encontraram um valor médio de ΔH de ativação de morte térmica igual a 92,1 kcal/mol.

CORREIA e VAN UDEN,(1983), avaliaram o efeito da temperatura mínima e temperatura máxima de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces fragilis*. Eles observaram que o crescimento dos microrganismos é afetado pela concentração alcóolica e que a faixa de crescimento máxima observada situa-se entre 13°C-28°C, com uma concentração alcóolica de 11 % v.v.

Com os microrganismos utilizados por estes pesquisadores, verificou-se que a 4°C não se observa crescimento quando a concentração alcóolica chega a 4 % v.v e que a 42°C o microrganismo não se desenvolve num meio de concentração alcóolica 2 % v.v.

Como citado por VAN UDEN (1971), o estabelecimento da temperatura ótima de crescimento do microrganismo, é o resultado de pelo menos dois processos contrários: um deles construtivo, com uma energia de ativação baixa, e o outro destrutivo, com uma energia de ativação relativamente elevada.

Esta contraposição de efeitos motivada pela temperatura, que leva ao estabelecimento de uma condição ótima, foi observada por NAVARO & DURAND(citado por DIAS, 1982). Em temperaturas baixas (10°C), a produção de etanol era relativamente lenta. Aumentando-se a temperatura para 20°C e 30°C, observou-se uma produção de etanol e acúmulo de álcool intracelular. A 10°C a concentração intracelular foi 100 g.L⁻¹, a 20°C 170 g.L⁻¹ e a 30°C 300 g.L⁻¹. Estes experimentos mostraram que o efeito da elevação da temperatura

diminuiu o transporte dos produtos através da membrana e conseqüente acúmulo de álcool no interior das células.

DALE et alii,(1990), observaram o efeito da temperatura no desempenho de um reator contínuo com células imobilizadas. Os autores propuseram um modelo para taxa de crescimento máximo de células e produção máxima de etanol, do tipo ARRHENIUS:

$$\mu_m(T) = A1 e^{(-E_1/RT)} \quad [2.22]$$

$$v_m(T) = A2 e^{(-E_2/RT)} \quad [2.23]$$

A aplicação das equações [2.22] e [2.23] são válidas na faixa acima da temperatura mínima de crescimento e abaixo da temperatura máxima de crescimento. Estes autores pesquisaram curvas de morte térmica para 40°C, 45°C, 50°C, 55°C nas concentrações de 0, 30, e 60 g.L⁻¹ de etanol, usando o microrganismo *Kluyveromyces fragilis*.

Após ajuste dos dados experimentais, esses autores encontraram os seguintes valores:

$$A1 = 9,08 \times 10^{17} \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

$$A2 = 1,06 \times 10^{11} \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

$$E1 = 27,2 \text{ kcal/mol}$$

$$E2 = 15,3 \text{ kcal/mol}$$

Alves (1996), desenvolveu uma série de relações entre a temperatura e os parâmetros cinéticos do modelo de crescimento proposto por JARZEBSKI et alii,(1989), ajustando os resultados obtidos da fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, em processo contínuo e batelada. Os resultados estão resumidos na tabela 2.7.

Tabela 2.7 Resultados obtidos para os parâmetros cinéticos em função de temperatura. (Alves,1996).

TEMPERATURA(°C)	$\mu_{max}(h^{-1})$	$K_s (g.L^{-1})$	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$
28	0,342	4,86	0,501	0,097
30	0,345	3,25	0,505	0,098
32	0,399	4,69	0,512	0,098
34	0,398	4,15	0,500	0,099
36	0,382	3,84	0,502	0,088
38	0,302	3,79	0,511	0,087

Com base nestes resultados o autor encontrou a seguinte relação para descrever o valor de μ_{max} em função da temperatura:

$$\mu_{max}(T) = 4,18 \times 10^4 e^{(-3535/T)} - 5,397 \times 10^{69} e^{(-50475/T)} \quad [2.24]$$

$$K_s = 4,1 (g.L^{-1}) \quad [2.25]$$

T = temperatura em Kelvin

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MICRORGANISMO

O microrganismo usado na fermentação alcoólica contínua e em batelada foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* cultivada no Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Este microrganismo foi cedido pela Usina Santa Adélia. Em estudos realizados por (Alves,1996), este microrganismo apresentou melhor crescimento, quando comparado com outros tipos de cepas estudadas.

3.2 - MEIO DE CULTURA E INÓCULO

O meio de cultura utilizada para crescimento do inóculo foi preparado de acordo com (LAFFORGUE et alii, 1994) modificando-se a glicose usada, por mesma massa de melaço de cana-de-açúcar.

O inóculo foi preparado esterilizando-se 200 ml de meio de cultura contidos em um erlenmeyer através de autoclavagem a 121°C durante 15 minutos, de forma que após resfriado, foi-lhe adicionado células do microrganismo numa câmara de fluxo laminar(meio estéril). A amostra foi colocada num shaker e agitada a 200 r.p.m. durante 24 horas numa temperatura de 32°C.

3.3 - ALIMENTAÇÃO

A fonte de carbono básica usada foi uma solução de melaço de cana-de-açúcar, concentração igual a 40 g.L⁻¹ de açúcares redutores totais (A.R.T.), acrescido de 2.5 g.L⁻¹ de extrato de levedura no sistema contínuo e 180 g.L⁻¹ de açúcares redutores totais (A.R.T.), acrescido de 2.5 g.L⁻¹ de extrato de levedura no sistema em batelada. Estas soluções foram esterilizadas por autoclavagem a 121 °C durante 15 minutos. Foram adicionado às soluções, 1µg.L⁻¹ de antibiótico comercial JH.

3.4 - FERMENTAÇÃO CONTÍNUA COM RECICLO DE CÉLULAS

3.4.1 EQUIPAMENTOS

O bioreator, os filtros e as bombas são os equipamentos que basicamente compõem o sistema de fermentação contínua com reciclo de células.

Foi utilizado um bioreator do tipo 'BIOFLOW III SYSTEM' produzido por 'New Brunswick Co.'. Este bioreator, consiste em um recipiente de vidro pirex de 2.1 litros (volume útil), montado sobre uma base de controle. Esta base de controle possibilita regular algumas variáveis, como temperatura, pH, nível de agitação, aeração, nutrientes, vazão.

As células foram recicladas após serem filtradas tangencialmente pelo Sistema de microfiltração da 'MILLIPORE Co.' modelo 'CERAFLOW'. Este sistema de filtração é constituído por duas unidades de filtração. Cada unidade de filtração possui 0.2286 m de comprimento, um elemento filtrante cerâmico de 0.2 μm de poro, 0.0372m² de área filtrante, montados internamente numa carcaça de aço inox 316. O conjunto filtrante possui válvulas diafragmas modelo 4196-862-H em aço inox 316, que controlam a passagem de fluido pelo sistema de filtração e manômetros com leitura de 0-100 psig.

Para circular o meio fermentativo através do sistema fermentador-filtros, foi usada uma bomba tipo 'NEMO' fabricada pela 'NETZSCH do BRASIL' modelo 2.NEL.20.A. Acionada por um motor de indução trifásico 'EBERLE' 1.5 C.V. modelo S-80.B4. Este motor está submetido a um Controlador Programável de Velocidade tipo 'BALDOR SERIES 11 INVERTER DRIVE'.

A vazão de saída do mosto filtrado foi controlada por uma bomba peristáltica tipo 'MASTERFLEX' modelo 7549-30 da 'COLE-PARMER INSTRUMENT Co'. O controle de nível do sistema foi mantido através de um medidor de nível instalado dentro do bioreator que aciona a bomba peristáltica tipo 'MASTERFLEX' modelo 7549-30 usada na alimentação.

Um sistema de refrigeração trabalhou paralelamente fornecendo água a 10°C que circulou continuamente pelo sistema. A água de refrigeração usada no sistema foi previamente tratada com fluido para radiador (anti-corrosivo e anti-congelante comercial).

As conexões entre as unidades foram feitas por mangueiras de plástico com 12.7 mm de diâmetro interno, coberta por malha de aço inox 316.

A Figura 3.1 mostra o conjunto usado na realização dos experimentos contínuos e batelada.

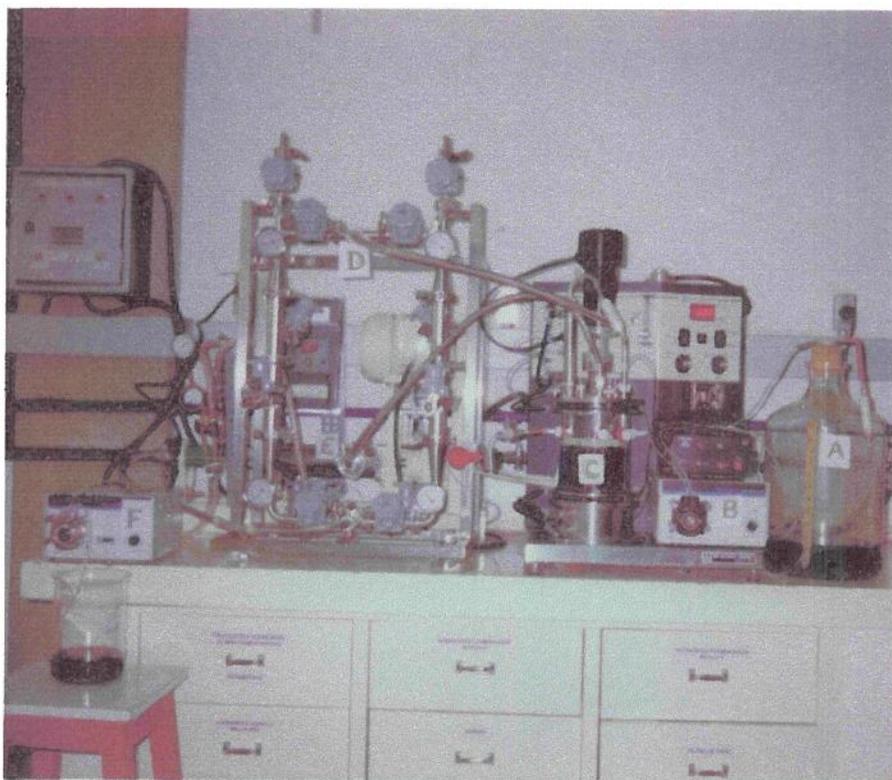


Figura 3.1 - Montagem do Sistema de Fermentação Contínua. (A) tanque de alimentação, (B) bomba peristáltica de alimentação, (C) reator, (D) sistema de filtração tangencial, (E) sistema de bombeamento, (F) bomba peristáltica de extração do mosto filtrado.

3.5 - OPERAÇÃO DO SISTEMA CONTÍNUO

3.5.1 - PREPARAÇÃO DO SISTEMA DE FILTRAÇÃO

Cada ensaio foi realizado com uma unidade de filtração, esta decisão foi tomada após o estudo das vantagens e desvantagens em se trabalhar com os dois filtros, ou com um único.

O tipo de operação com um filtro, mantém um elemento filtrante disponível enquanto o outro está em uso, garantindo assim maior autonomia em termos de tempo de preparo da fermentação. Ao final de um ensaio, apenas a unidade de filtração é lavada e esterilizada, não sendo necessária a parada de todo o sistema, desmontar, lavar, esterilizar, inocular; porém trabalhando-se com uma menor área filtrante e conseqüentemente, menor capacidade de filtração.

Foi realizada uma lavagem dos filtros, passando-se uma solução de NaOH 2N a 40°C em circuito fechado durante 4 horas e enxaguado-se com água destilada por mais 4 horas. Este procedimento retira o material aderido nas paredes do elemento filtrante, recuperando a capacidade de filtração.

3.5.2 - ESTERILIZAÇÃO

Após a montagem do sistema bioreator-filtro, a esterilização foi realizada fazendo-se passar através do sistema de fermentação contínua, vapor saturado a 100° C e 1,0 atm. durante 2 horas. A inclusão do vapor no circuito foi feita por um dos aportes existentes no sistema de filtração. Após esta operação, o sistema reteve um certo volume considerado de água proveniente do processo de esterilização.

3.5.3 - INOCULAÇÃO

O inóculo preparado como descrito no item 3.2 foi adicionado ao sistema após a operação de esterilização. Após a adição do inóculo, as válvulas do sistema de filtração foram ajustadas de forma a liberar a passagem de fluido por apenas um filtro. A bomba de circulação foi acionada pelo motor trifásico mantido a uma rotação de 50 ciclos/segundo. Com o funcionamento da bomba, deu-se início a passagem de fluido pelo elemento filtrante.

Uma bomba peristáltica acoplada ao sistema de filtração, foi ajustada para retirar o mosto filtrado, numa vazão que corresponde a uma taxa de diluição de 0.2 h^{-1} . A retirada contínua do fluido acionou o mecanismo de detecção de variação de nível. Este mecanismo atuou ligando outra bomba peristáltica, que alimenta o sistema para corrigir a perda contínua de mosto filtrado. A temperatura e agitação do experimento foram fixadas em 31°C e 200 r.p.m. respectivamente. Frascos de 12 litros de alimentação estéril contendo 40 g.L^{-1} A.R.T. e $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura foram acoplados ao sistema e desta forma o sistema entrou em funcionamento: alimentação suprida constantemente, vinho retirado com a mesma vazão e livre de células, aumentando-se gradativamente a concentração de células dentro do sistema, uma vez que as células geradas não deixavam o sistema.

Amostras de 30 mL foram recolhidas periodicamente para realização das análises de concentração de açúcar redutor total, massa total, viabilidade, concentração de álcool. O processo de crescimento celular continuou até que a concentração de células no meio atingiu um nível tal, a ponto de provocar entupimento no sistema de filtração e uma elevada perda de carga, que resultou na impossibilidade de se manter a taxa de diluição fixada, a ponto de não se conseguir manter uma vazão constante sem afetar significativamente a viabilidade celular. Neste momento, utilizando as válvulas do sistema de filtração, fechou-se a saída de filtrado e promoveu-se uma purga de células, para diminuir a concentração celular.

Quando se atingiu uma concentração em torno de $4-7 \text{ g.L}^{-1}$ de células, a purga do sistema foi suspensa e através do sistema de válvulas, foi liberada a outra unidade de filtração, tendo início a experiência a 34°C e 200 r.p.m. A partir de então, foi realizada a lavagem e esterilização do filtro esgotado, preparando-o para um novo ensaio.

Da mesma forma foram conduzidas as experiências a 37 °C e 28 °C, alternando-se as unidades de filtração entre cada ensaio, evitando-se a parada do sistema.

Esta forma de operação, utilizando-se células de um experimento anterior como sendo o inóculo do processo seguinte, manteve-se satisfatória, sem contaminação e sem a necessidade de esterilização e novas inoculações. Este tipo de metodologia foi seguido como forma de não expor o sistema várias vezes às condições depreciativas que foram observadas no início, especialmente a operação de esterilização que afeta o estator da bomba e os elementos de borracha do sistema, principalmente em termos do tempo de operação total que os equipamentos ficariam sujeitos, aumentando-se o risco de acontecer problemas durante os ensaios.

3.6 - SISTEMA EM BATELADA

As operações para preparação do sistema em batelada foram bem mais simples se comparadas com o sistema contínuo. O equipamento básico da fermentação em batelada foi o bioreator usado no sistema contínuo.

3.6.1 - PREPARAÇÃO DO FERMENTADOR

Foram adicionados ao bioreator, 2 litros de alimentação contendo 180 g.L⁻¹ A.R.T. e 2.5 g.L⁻¹ de extrato de levedura. Este sistema foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos.

Após a autoclavagem do bioreator, foram adicionados 250 mL de inóculo previamente preparado como descrito no item 3.2. O sistema foi ajustado para temperatura de 28°C e agitação 200 r.p.m.

Após a inoculação, 25 mL de amostras foram recolhidas em intervalos regulares de tempo. Análise de massa de células totais, viabilidade e açúcar foram realizadas. 10 mL de amostras foram congeladas para posterior análise de álcool.

Decorridos 40 horas de fermentação, o sistema foi desmontado e preparado para realização do próximo experimento. Foi usada esta mesma metodologia para os ensaios a 31 °C, 34 °C e 37°C .

3.7 - MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 - CONCENTRAÇÃO DE MASSA DE CÉLULAS TOTAIS E VIÁVEIS

20 mL de mosto que foram recolhidos do meio de fermentação, foram separados em duas amostras de 10 mL e centrifugados a 3500 r.p.m. durante 15 minutos. O sobrenadante foi separado e o precipitado constituído de células, foi lavado e transferido para uma placa de Petri previamente limpa, seca e de peso determinado. A amostra na placa de Petri foi levada a estufa à vácuo e mantida a 60°C, -60mmHg durante 24 horas aproximadamente. Após este período a placa foi pesada e a diferença de peso entre as condições iniciais e finais (placa sem amostra e placa com amostra), deram a massa de células totais (base seca) contida em 10 mL de meio fermentado. A concentração de células totais (base seca) por litro de meio é obtido após a multiplicação deste resultado por 100. O resultado obtido foi a média de dois ensaios.

A massa de células viáveis foi obtida pela equação [3.1]

$$\text{Massa viável(base seca)} = \text{massa total} * \text{viabilidade} \quad [3.1]$$

3.7.2 - VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi medida através do método de coloração das células mortas por corante azul de metileno. Este método se baseia no princípio que células mortas não conseguem destruir o corante que absorvem, tornando-se azuis.(LAFORGUE et alii,1994).

10 mL de mosto foram centrifugados a 3500 r.p.m. durante 15 minutos, o precipitado obtido após centrifugação foi lavado e diluído. 1 mL de amostra da solução diluída foi

adicionada a 1 mL de solução de azul de metileno 0.1%. Uma pequena gota desta solução foi colocada em uma câmara de NEUBAUER para contagem de células e levada ao microscópio.

A viabilidade celular pode ser expressa em termos da quantidade total de células como na equação [3.2]:

$$\text{Viabilidade(\%)} = \frac{\text{número de células brancas}}{\text{número de células totais (brancas + azuis)}} \quad [3.2]$$

3.7.3 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (A.R.T.)

Açúcares redutores podem ser analisados pelo método colorimétrico, após desenvolvimento de cor obtida entre o açúcar redutor e o reagente D.N.S., (MILLER, 1959).

O reagente D.N.S. foi preparado usando-se 5.3 g de ácido 3,5 dinitrosalisílico P.A., 9.9 g hidróxido de sódio P.A., 708 mL água destilada. Estes são misturados e aquecidos a 70°C e então adicionados 3.8 mL de fenol. À solução resultante adicionamos 4.15 g de metabisulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). A solução é mantida sob refrigeração em frasco escuro.

3.7.3.1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO

Constrói-se uma curva de calibração com 6 amostras de sacarose de concentrações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 g.L^{-1} . Em tubos de ensaio, 1 mL das soluções conhecidas foram adicionada a 1 mL de ácido clorídrico 2 N e então levadas a um banho de água a 100 °C, durante 5 minutos. Após este período, as amostras foram resfriadas e adicionou-se 1 mL hidróxido de sódio 2 N.

1 mL de cada amostra neutralizada, foi adicionada a 1 mL de solução do reagente D.N.S. e levada a um banho de água a 100 °C por mais 5 minutos. O branco foi feito utilizando-se 1 mL de água destilada ao invés da amostra. Após os 5 minutos. As amostras e o branco foram resfriadas e foram adicionados 16 mL de solução de tartarato de sódio e potássio ($15,1 \text{ g.L}^{-1}$). A absorbância de cada amostra foi lida no espectrofotômetro a 540 nm

usando-se o branco como referência e a partir destes resultados foi traçada uma curva ABS vs conc. A.R.T (g.L^{-1}).

As análises de açúcar dos experimentos foram realizadas usando-se a mesma metodologia, mudando-se o branco de água destilada para 1 mL de amostra e adição do D.N.S., sem levar ao banho. As concentrações de açúcar dos experimentos foram determinadas com o auxílio da curva de calibração.

Foram construídas curvas de calibração periodicamente sempre que novas soluções de tartarato eram usadas.

3.7.3.2 - CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO

Uma solução conhecida de melaço contendo 5 g melaço/l foi ensaiada como descrito no item 3.7.3.1. Por meio de uma curva de calibração recentemente elaborada, o valor da concentração desta solução é medido em termos de açúcar redutor total. O teor de açúcar redutor total do melaço é então determinado como:

$$\text{Teor de A.R.T. (\%)} = \frac{\text{concentração medida pela curva}}{\text{concentração conhecida gramas de melaço/l (5 g.L}^{-1}\text{)}} \quad [3.3]$$

3.7.3.3 - ANÁLISE DE A.R.T. NAS AMOSTRAS

As análises de açúcar no sistema contínuo foram realizadas com amostras de mosto filtrado, e ensaiado como descrito no item 3.7.3.1. com a diferença que o branco foi 1 mL de mosto adicionado ao D.N.S. e sem levar ao banho a 100°C por 5 minutos. Esta estratégia elimina o valor associado à cor do mosto que é medida indiretamente como açúcar, superestimando o valor da medida.

As análises de açúcar no sistema em batelada foram realizadas tomando-se 1 mL do sobrenadante do mosto previamente centrifugado e diluindo-o de modo que a concentração final da amostra, após diluição, se encontre na faixa de 1 a 6 g.L^{-1} que é a faixa da curva de

calibração. Após a diluição, 1 mL desta amostra é ensaiada como descrito no item 3.7.3.1. com a diferença que o branco usado foi 1 mL da amostra diluída adicionada ao D.N.S. e sem levar ao banho a 100°C por 5 minutos. Todos os ensaios foram realizadas em triplicatas.

3.7.4 - CONCENTRAÇÃO ALCÓOLICA

A concentração alcóolica foi determinada através de cromatografia gasosa. Foi usado o cromatógrafo modelo 'VARIAN 3400' que opera com hidrogênio, ar sintético e oxigênio, usando-se acetona como padrão interno.

As amostras dos experimentos contínuos e batelada foram preparadas seguindo metodologias diferentes. Foi analisado a concentração de álcool nas amostras contendo células e livres de células nos experimentos de fermentação contínua e livre de células na fermentação em batelada.

3.7.4.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁLCOOL

Foi feita uma curva de calibração com 7 amostras contendo 1, 5, 10,15, 20, 25 e 30 g.L⁻¹ de álcool para análise do álcool produzido na fermentação contínua e 5, 30, 45, 60, 75, 90, 110 g.L⁻¹ de álcool para análise de álcool na fermentação em batelada. As amostras foram feitas com álcool P.A.(99,8%) e água destilada.

A cada 1 mL da amostra foi adicionada 1 mL de solução aquosa de acetona 2 % v.v. Estas amostras foram ensaiadas no cromatógrafo e o resultado da análise forneceu as razões entre as áreas do pico do álcool e da acetona. Como a concentração de acetona foi a mesma em todas as amostras, as diferentes razões de áreas estão associadas às diferentes concentrações alcóolicas. Foi feita então uma curva da concentração alcóolica (g.L⁻¹) vs razão das áreas.

3.7.4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Dos experimentos contínuos realizados com reciclo de células, foram retirados 10 mL de mosto filtrado, livre de células e 10 mL de mosto não filtrado. Cada amostra foi então destilada e foram colhidos 10 mL de condensado em proveta graduada. Destes condensados foram tomados 1 mL e a cada amostra foi adicionada 1 mL de solução aquosa de acetona 2 %. Estas amostras resultantes foram ensaiadas no cromatógrafo e a concentração alcóolica determinada com o auxílio da curva de calibração.

Nos experimentos em batelada, 10 mL do sobrenadante do mosto centrifugado a 3500 r.p.m. durante 15 minutos, foram destilados e colhidos 10 mL de condensado. A preparação da amostra seguiu a mesma metodologia anterior. Foi efetuada uma nova curva de calibração a cada nova série de ensaios.

3.8 - AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS AOS MODELOS CINÉTICOS

Os valores da velocidade de crescimento específico (μ) foram calculados de acordo com a equação [2.3], usando-se as derivadas dX/dt em cada ponto.

As derivadas dX/dt foram calculadas, ponto a ponto, com os valores de massa viável ($g.L^{-1}$) *versus* tempo (h), usando-se três metodologias diferentes: através do ajuste numérico proposto por ZAJIC. e LeDUY, 1973; pelo método 'SPLINE' desenvolvido por NUNHEZ, et alii, 1993 e através da derivada da melhor função $X_{viável}=X(\text{tempo})$ interpolada aos dados experimentais, pelo método numérico realizado pelo 'SOFTWARE STATISTICA FOR WINDOWS VERSÃO 5.0'. Os resultados de dX/dt foram a média obtida por estes três métodos. Esta metodologia foi adotada para se evitar usar valores negativos de dX/dt .

As equações [2.6] e [2.18] foram ajustadas aos resultados dos ensaios contínuos a 28°C, 31°C, 34°C, 37°C. Os ajustes foram realizados pelo SOFTWARE STATISTICA FOR WINDOWS - VERSÃO 5.0. Através de regressão não linear dos dados experimentais, foram obtidos os termos X_m , m e A_2 das equações propostas.

O valor de $\mu_{\max}(T)$ e $K_s(T)$ foram estimados pelas equações [2.24] e [2.25].

Após ser determinado os parâmetros de inibição pela massa celular total, através do ajuste das equações [2.6] e [2.18], o modelo foi usado com os dados da fermentação em batelada para se determinar os parâmetros de inibição pelo álcool, nas mesmas temperaturas.

Os valores de $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$ e $Y_{x/p}$ foram calculados como sendo a inclinação da reta obtida do gráfico de concentração alcóolica *versus* concentração de açúcar, concentração celular *versus* concentração de açúcar e concentração celular *versus* concentração alcóolica respectivamente.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das experiências serão apresentados em duas partes: primeiro serão apresentados pelas Tabelas 4.1 a 4.4 os resultados obtidos dos ensaios contínuos nos quais os valores de concentração celular foram utilizados para se determinar o valor da concentração celular máxima, em seguida serão apresentados pelas Tabelas 4.17 a 4.20 os resultados dos ensaios em bateladas, que serão usados no modelo cinético de crescimento do microrganismo.

4.1 - SISTEMA CONTÍNUO

As Tabelas 4.1 a 4.4 apresentam os resultados das experiências realizadas no sistema contínuo com reciclo de células nas temperaturas de 28°C, 31°C, 34°C e 37°C. Estes resultados estão expressos nas figuras 4.1 a 4.4.

Tabela 4.1 Resultados dos experimentos contínuos realizados a 28 °C

TEMPO(h)	CONC. CÉLULAS VIÁVEIS (g.L ⁻¹)	CONC. CÉLULAS TOTAIS (g.L ⁻¹)	CONC. ALCÓOL (g.L ⁻¹)	CONC. álcool*** (g.L ⁻¹)	CONC. AÇÚCAR (g.L ⁻¹)
0	3,45	3,45	0	0	40
19,5	11,1775	13,15	10,74	10,91	1,3
40,5	13,724	18,8	8,85	10,55	1,9
61,5	13,99995	23,85	8,71	10,12	1,8
86,5	16,851656	30,95	9,02	10,8	0,98
109	19,76733	36,9	9,59	10,21	0,7
136,5	22,21362	42,9	9,51	11,73	1,2
164	27,24172	55,55	12,55	12,15	1,4
182	28,262085	58,55	11,97	13,04	1
210,5	30,4384	64	13,3	12,87	1
		MEDIA	10,47	11,38	1,25

álcool*** = CONCENTRAÇÃO DE ALCÓOL NO MOSTO COM CÉLULAS

Tabela 4.2 Resultados dos experimentos contínuos realizados a 31 °C

TEMPO(h)	CONC. CÉLULAS VIÁVEIS (g.L ⁻¹)	CONC. CÉLULAS TOTAIS (g.L ⁻¹)	CONC. ÁLCOOL (g.L ⁻¹)	CONC. álcool*** (g.L ⁻¹)	CONC. AÇÚCAR (g.L ⁻¹)
0	7	7	0	0	38
24	15,847	17,4	12,177	11,73	3,0
48	23,2	27,3	11,436	12,25	2,0
72	36,21	42,6	17,218	16,345	2,0
96	39,1	47,4	16,783	16,6	2,3
120	38,55	54,3	13,44	14,23	1,5
144	40,29	58,4	17,16	17,43	1,3
167	35,38	65,9	16,51	15,789	1,0
192	42,6	71	14,22	15,766	1,3
216	41,762	78,5	8,59	15,6147	1,3
241,5	46,37	82	15,61	14,32	1,1
264,5	45,68	87,35	15,81	15,8776	1,6
312	36	88,3	15,86	15,34	1,6
		MÉDIA	14,57	15,11	1,67

álcool*** = CONCENTRAÇÃO DE ÁLCOOL NO MOSTO COM CÉLULAS

Tabela 4.3 Resultados dos experimentos contínuos realizados a 34 °C

TEMPO(h)	CONC. CÉLULAS VIÁVEIS (g.L ⁻¹)	CONC. CÉLULAS TOTAIS (g.L ⁻¹)	CONC. ÁLCOOL (g.L ⁻¹)	CONC. álcool*** (g.L ⁻¹)	CONC. AÇÚCAR (g.L ⁻¹)
0	8,9	8,9	0	0	39
17,5	18,02	21,2	12,766	12,34	1,3
45,5	26,94	35,45	12,055	12,547	1,05
67	26,35	43	16,74	15,76	1,9
94,5	29,46	54,5	16,34	16,2379	2,3
115,5	26,91	59,8	17,03	17,32	2,8
142	28,9	63	14,24	14,28	1,6
163,5	29	63,2	19,12	17,34	1,66
		MÉDIA	15,47	15,12	1,80

álcool*** = CONCENTRAÇÃO DE ÁLCOOL NO MOSTO COM CÉLULAS

Tabela 4.4 Resultados dos experimentos contínuos realizados a 37 °C

TEMPO(h)	CONC. CÉLULAS VIÁVEIS (g.L ⁻¹)	CONC. CÉLULAS TOTAIS (g.L ⁻¹)	CONC. ÁLCOOL (g.L ⁻¹)	CONC. álcool*** (g.L ⁻¹)	CONC. AÇÚCAR (g.L ⁻¹)
0	5,2	5,2	0	0	42
22	11,76	14	14,2	14,7	2,3
53	20,88	27,95	14,26	16,16	1,8
72	21,29	34,55	16,89	18,24	1,8
92	20,8	32,15	18,079	16,98	2,1
118	17,685	32,75	13,92	14,6	1,5
142	19,0575	36,3	17,72	16,05	1,5
166,25	18,96	39,5	18,79	17,45	1,7
187,25	20,1	40,2	16,95	18,08	1,9
215	18,94	40,3	19,1	18,43	1,8
241	19,58	44,5	18,0147	17,4	1,5
		MÉDIA	16,79	16,81	1,79

álcool*** = CONCENTRAÇÃO DE ÁLCOOL NO MOSTO COM CÉLULAS

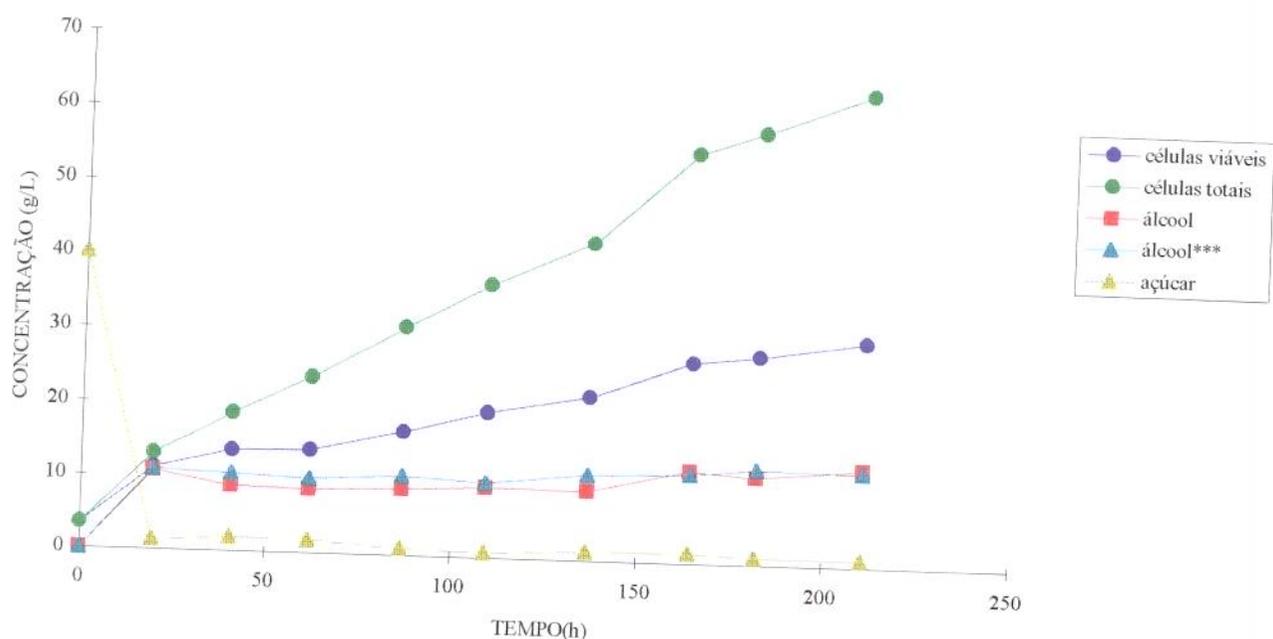


Figura 4.1 Comportamento do sistema contínuo a 28°C.

A Figura 4.1 mostra o comportamento do sistema contínuo a 28° C. A partir de 25 horas, as concentrações de açúcar e álcool se mantiveram constantes e não foi observado uma diferença significativa entre as concentrações de álcool medidos no mosto com células e livre de células.

Observando-se a curva de crescimento de massa celular, verifica-se que há uma tendência indicando que o sistema continuaria crescendo se o sistema de filtração não apresentasse esgotamento. A viabilidade do sistema decresce com o aumento do tempo de ensaio, isto se verifica pelo aumento da distância entre pontos de células totais e células viáveis.

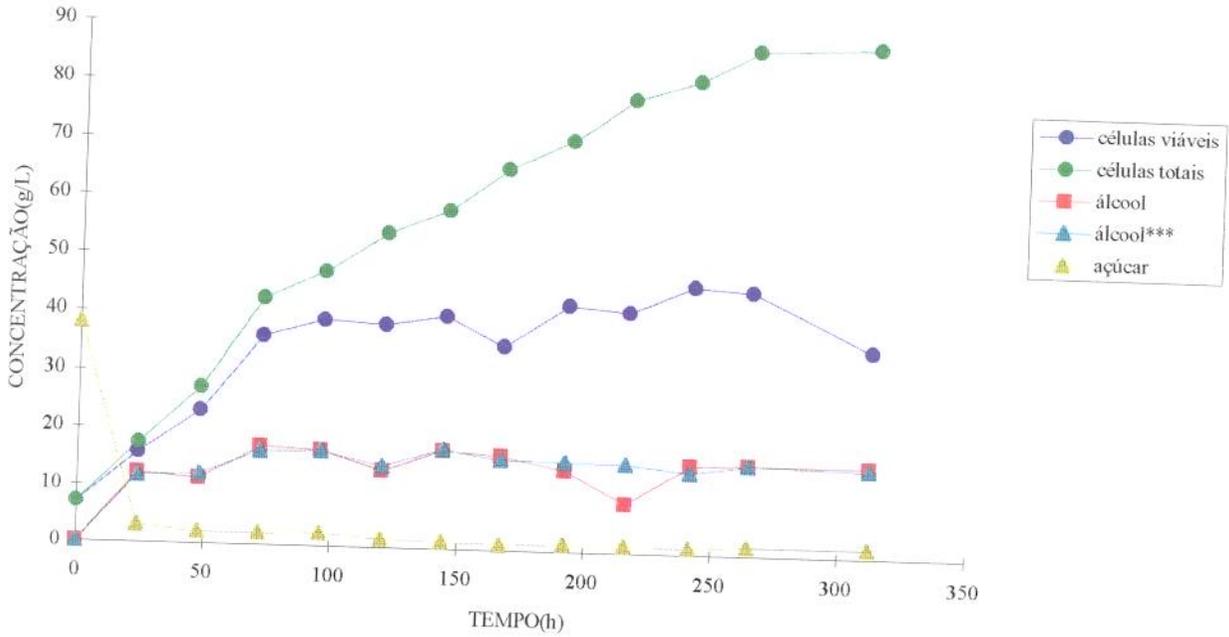


Figura 4.2 Comportamento do sistema contínuo a 31°C.

O comportamento do sistema a 31°C está apresentado na Figura 4.2. Em aproximadamente 25 horas as concentrações do álcool e do açúcar se mantiveram constantes. Os ensaios conduzidos nesta temperatura indicaram que o sistema apresentou esgotamento num período maior que o do ensaio a 28°C (310 horas a 31 °C contra 210 horas a 28 °C) e com isso uma maior concentração de células totais no final do período.(88 g.L⁻¹ a 33°C contra 64 g.L⁻¹ a 28°C). Verifica-se a influência da temperatura na velocidade de crescimento observando-se a inclinação da reta da concentração de massa com o tempo que é maior a 31°C que a 28°C.

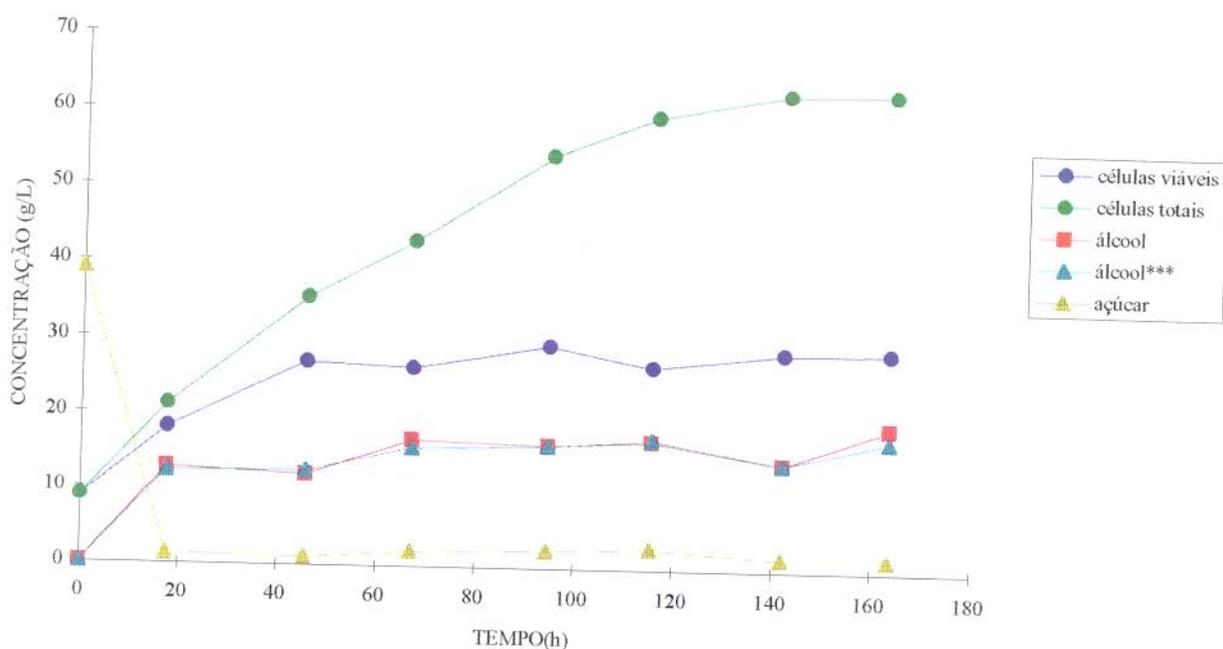


Figura 4.3 Comportamento do sistema contínuo a 34°C

O ensaio contínuo a 34°C foi o que apresentou maior velocidade de crescimento. Observando-se a Figura 4.3, verifica-se que em 115 horas de ensaio atinge-se 60 g.L⁻¹ de células totais.

O sistema apresentou esgotamento num período de tempo menor. Após 140 horas de ensaio não se verificou crescimento celular devido a baixa capacidade do sistema de filtração.

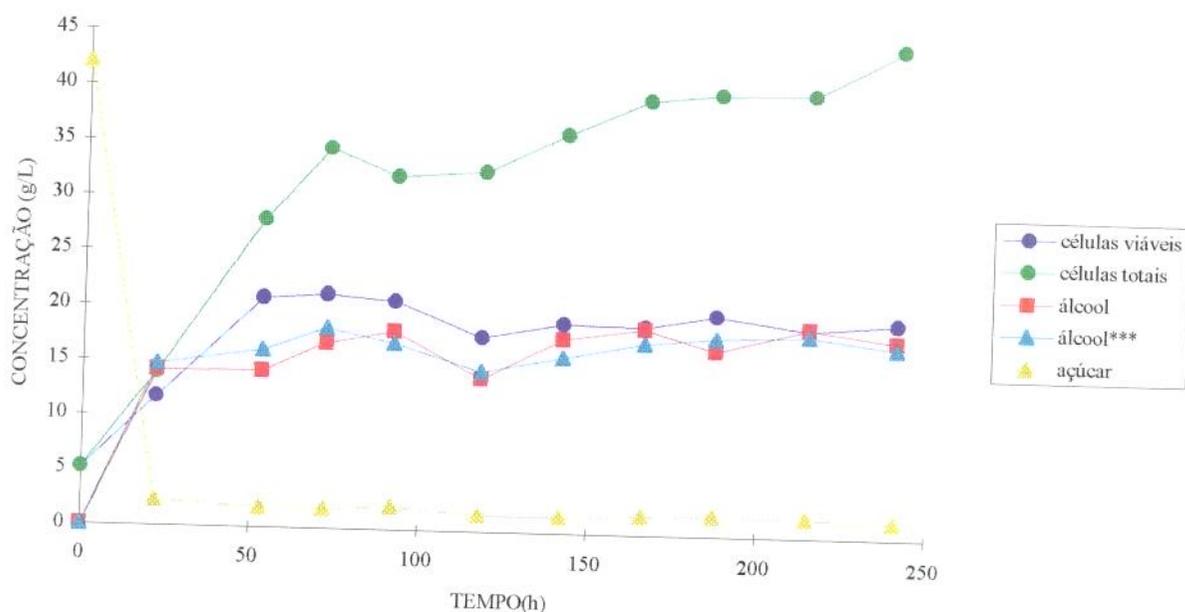


Figura 4.4 Comportamento do sistema contínuo a 37°C.

Observando-se a Figura 4.4 verifica-se que o experimento contínuo conduzido a 37°C foi o que apresentou menor velocidade de crescimento. A concentração final de células totais foi $44,5 \text{ g.L}^{-1}$, num período de 240 horas, valor inferior aos observados nas outras temperaturas.

Os valores das concentrações médias de álcool do mosto com células, álcool do mosto sem células e açúcar, nos ensaios contínuos, estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 Valores das concentrações médias de álcool e açúcar no sistema contínuo.

TEMPERATURA(°C)	Concentração média de álcool (g.L^{-1})	Concentração média de álcool***(g.L^{-1})	Desvio relativo de concentrações alcólicas	Concentração média de açúcar(g.L^{-1})
28°C	10,47	11,38	8,68%	1,25
31°C	14,57	15,11	3,71%	1,67
34°C	15,47	15,12	2,26%	1,80
37°C	16,79	16,81	0,12%	1,79

álcool*** = concentração de álcool no mosto com células.

Observando-se as concentrações médias do álcool obtido no mosto livre de células e no mosto com células, não há uma diferença significativa entre estas. Apesar da concentração de álcool no interior da célula ser diferente da concentração extracelular, como apontado por, Monbouquette, 1987; este fenômeno não foi observado nestes experimentos.

Os sistemas apresentaram uma viabilidade no final dos experimentos em torno de 47% a 28°C, 41% a 31°C, 45,8% a 34°C e 44% a 37°C . Estes valores baixos são devido principalmente as condições de baixa concentração de açúcar e nutrientes, as condições drásticas que as células ficam sujeitas no processo de bombeamento e o cisalhamento produzido em tais concentrações celulares, além do tempo de permanência da célula no sistema.

A taxa de diluição dos experimentos foram fixadas em torno de $0,2 \text{ h}^{-1}$, como pode ser observado nas Figuras 4.5 a 4.8, e uma alimentação de 40 g.L^{-1} de açúcar. O crescimento celular observado foi bem mais lento que os realizados por Lafforgue et alii (1987), que realizaram um experimento a uma taxa de diluição igual a $0,5 \text{ h}^{-1}$ e concentração de açúcar igual a 150 g.L^{-1} ; chegando a 330 g.L^{-1} de células em aproximadamente 160 horas.

Lafforgue et alii, 1994; demonstraram que a viabilidade das células nos sistemas com alta concentração celular foi prejudicada devido ao difícil acesso que os microrganismos tiveram aos nutrientes. Obtiveram uma viabilidade de 42,4% quando o sistema atingiu 330 g.L^{-1} de concentração celular.

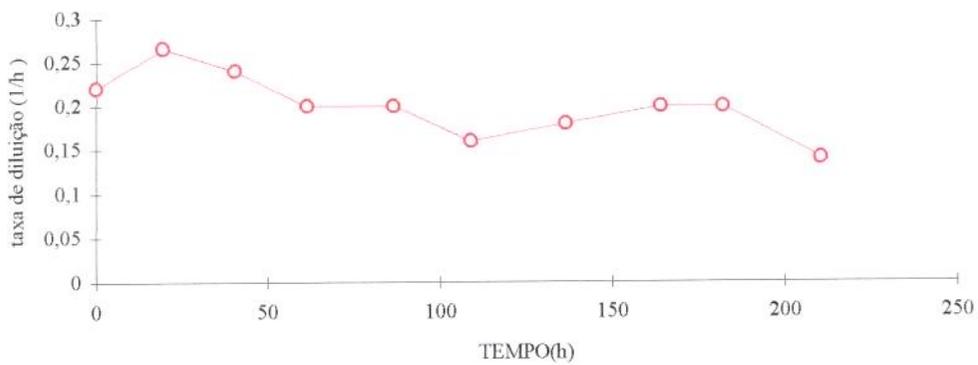


Figura 4.5 Taxa de diluição do sistema contínuo a 28°C.

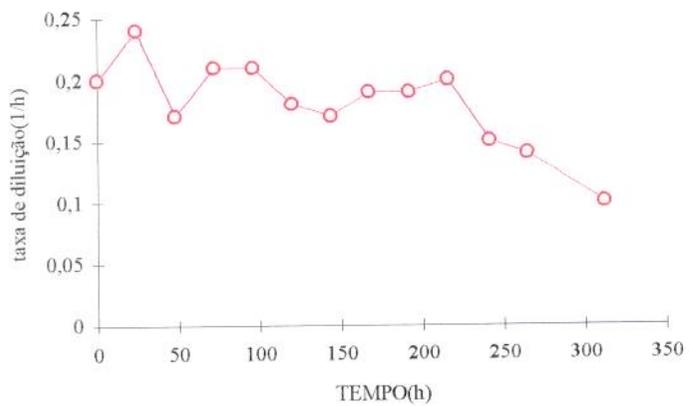


Figura 4.6 taxa de diluição do sistema contínuo a 31 °C.

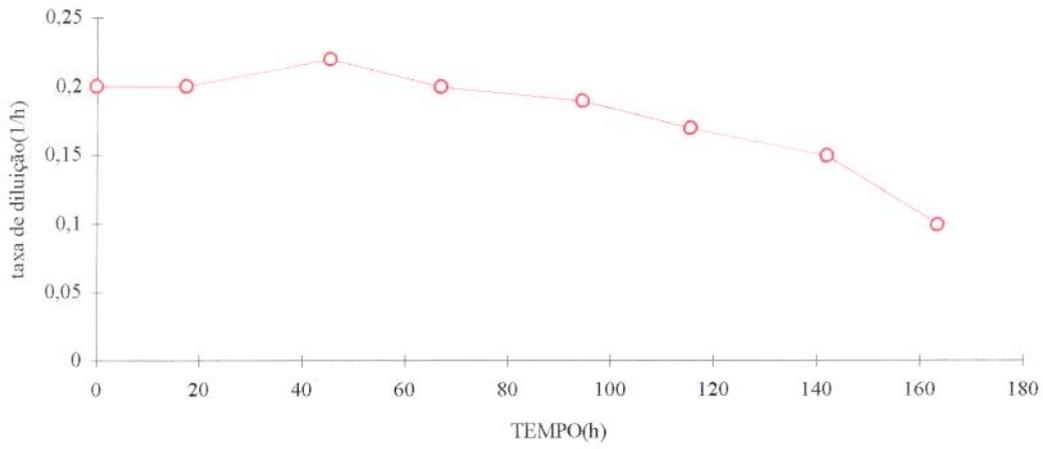


Figura 4.7 taxa de diluição do sistema contínuo a 34 °C.

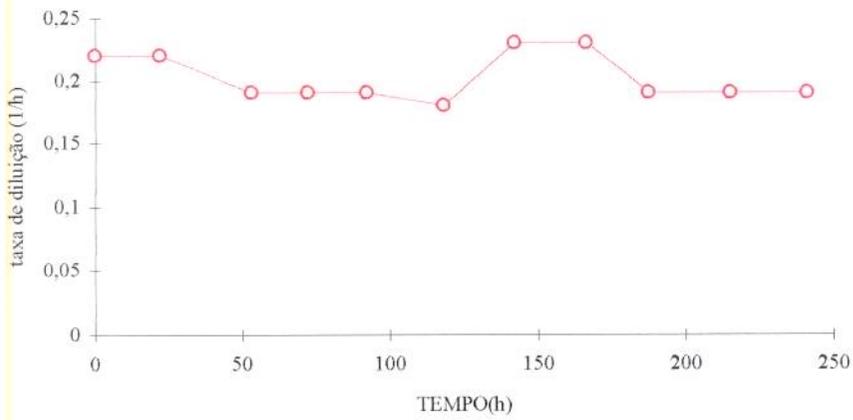


Figura 4.8 taxa de diluição do sistema contínuo a 37 °C.

As figuras 4.9 a 4.12 representam os valores de massa viável com o tempo experimentais e ajustados por interpolação.

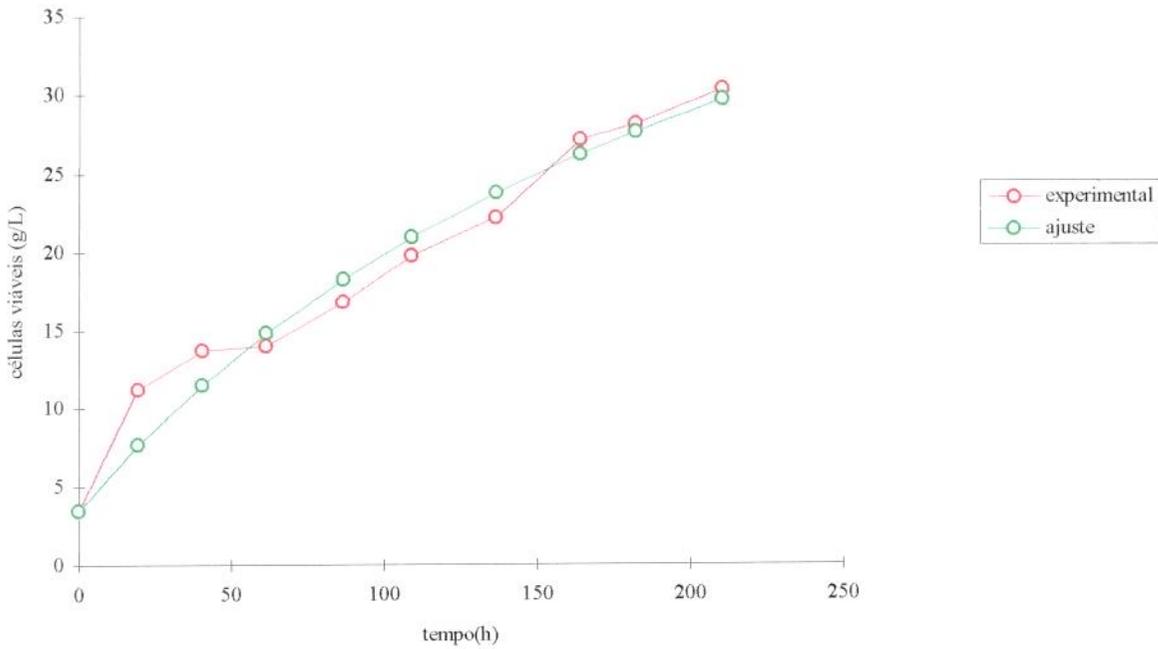


Figura 4.9 Comparação entre resultados de massa viável experimental a 28°C e função interpolada.

$$X(t) = 3,45 + \{(57,77 t)/(250,80 + t)\} \quad [4.1]$$

$$R^2 = 0,9662$$

$X(t)$ = massa viável em função do tempo

t = tempo em horas.

A função interpolada $X = X(t)$ é necessária pois é através dela que iremos determinar o valor de dX/dt para utilizarmos na determinação de μ de acordo com a equação 2.3.

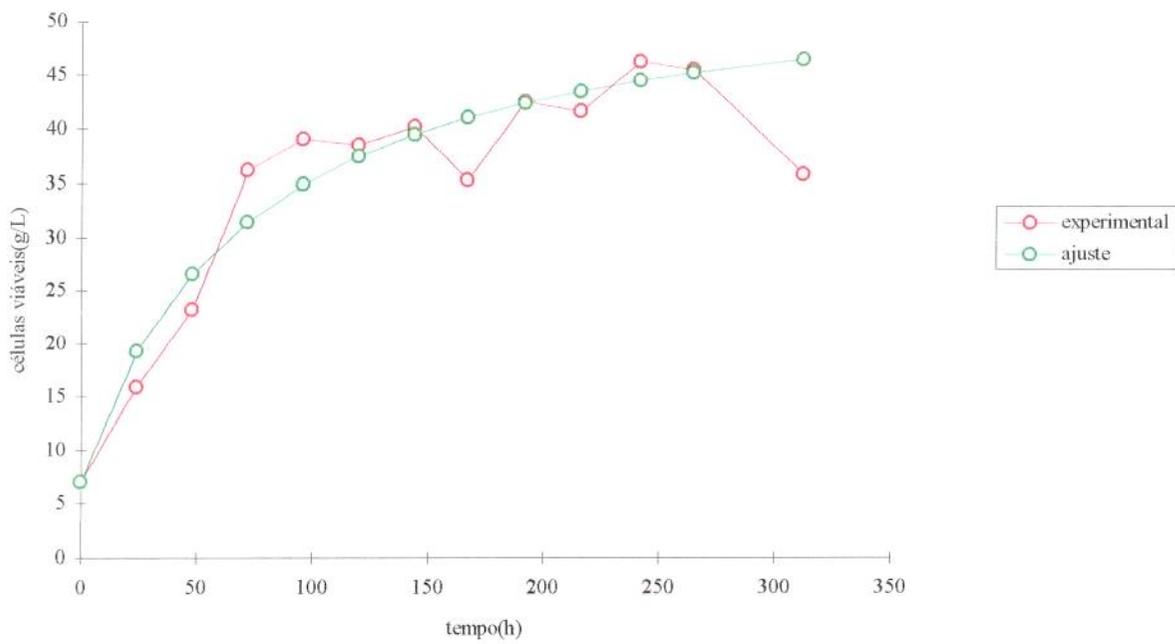


Figura 4.10 Comparação entre resultados de massa viável experimental a 31°C e função interpolada.

$$X(t) = 7 + \{(48,711t)/(71,4447 + t)\} \quad [4.2]$$

$$R^2 = 0,938$$

$X(t)$ = massa viável em função do tempo

t = tempo em horas.

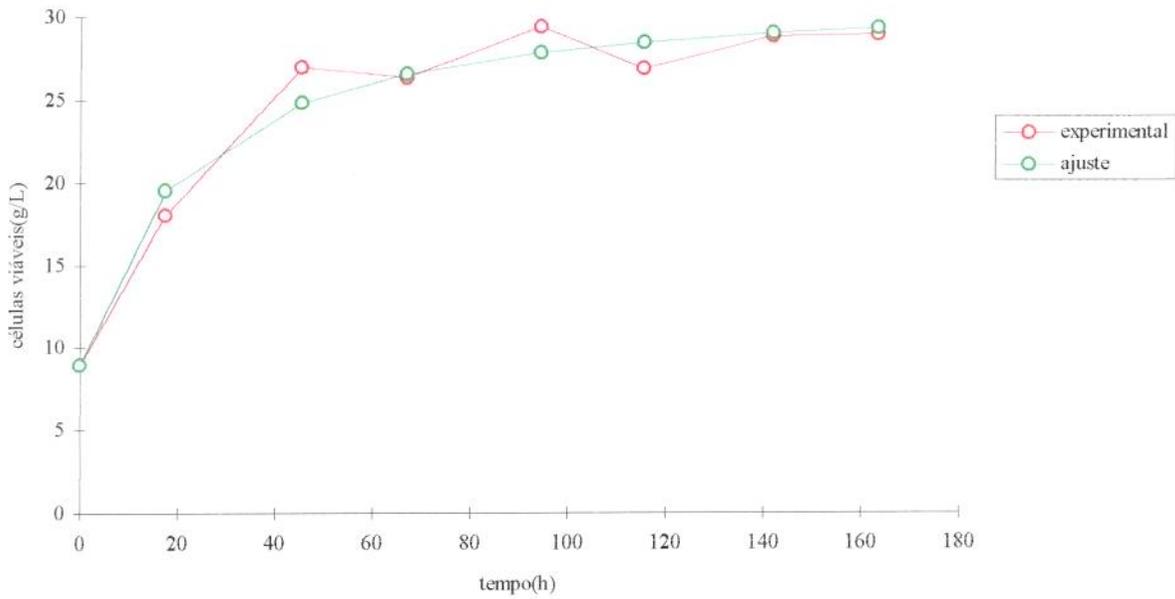


Figura 4.11 Comparação entre resultados de massa viável experimental a 34°C e função interpolada.

$$X(t) = 8,9 + \{(23,08t)/(20,4626 + t)\} \quad [4.3]$$

$$R^2 = 0,966$$

$X(t)$ = massa viável em função do tempo

t = tempo em horas.

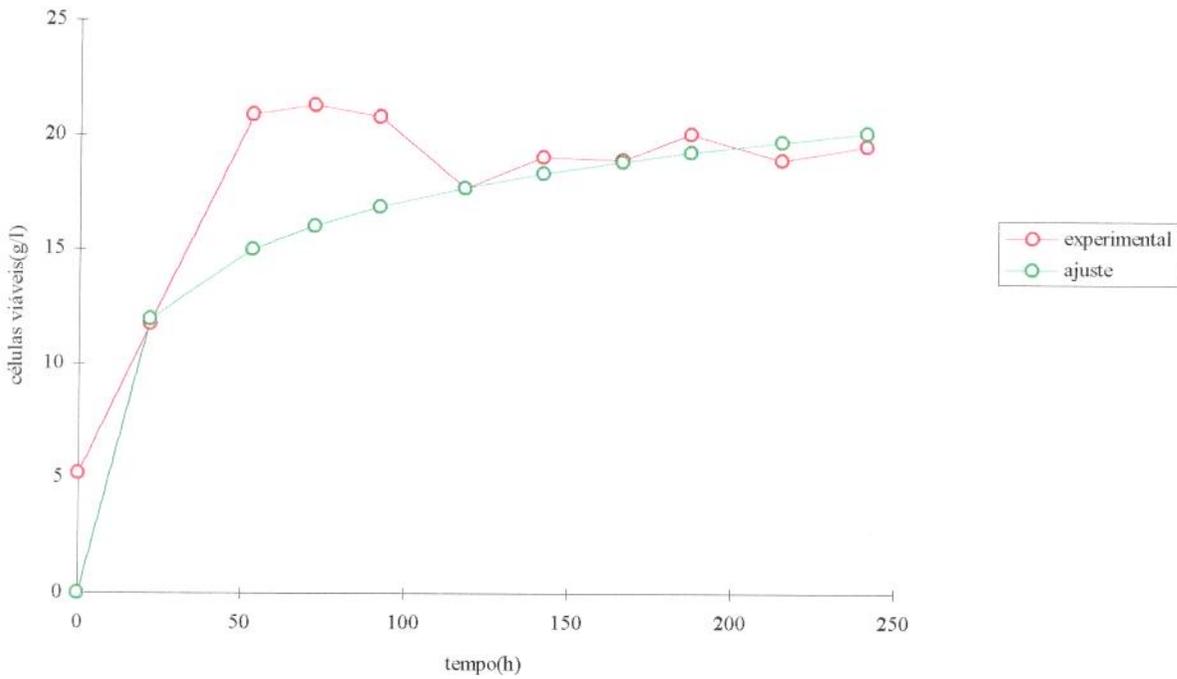


Figura 4.12 Comparação entre resultados de massa viável experimental a 37°C e função interpolada.

$$X_m(t) = 1,4168 + 3,41467 \ln(t) \quad [4.4]$$

$$R^2 = 0,9546$$

X(t) = massa viável em função do tempo

t = tempo em horas.

As Tabelas 4.6 a 4.9 apresentam os valores médios de dX/dt calculados como descrito no item 3.8. As Figuras 4.13 a 4.16 compara os valores de dX/dt obtido pelos 3 métodos descritos no item 3.8

Estes valores foram usados para o cálculo de (μ) segundo a equação 2.3. Os valores de (μ) e massa celular total são apresentados nas Tabelas 4.10 a 4.13 e Figuras 4.17 a 4.20.

Tabela 4.6 Resultado médio de dX/dt a 28 °C calculado pelo método numérico, "spline", e interpolação.

TEMPO(h)	dX/dt
0	0,3134
19,5	0,2266
40,5	0,1707
61,5	0,1486
86,5	0,1273
109	0,1119
136,5	0,0966
164	0,0842
182	0,0773
210,5	0,0681

Tabela 4.7 Resultado médio de dX/dt a 31 °C calculado pelo método numérico, "spline", e interpolação.

TEMPO(h)	dX/dt
0	0,3686
24	0,3595
48	0,3292
72	0,2374
96	0,0862
120	0,05981
144	0,075
167	0,0612
192	0,0501
216	0,0421
241,5	0,0355
264,5	0,0308
312	0,0237

Tabela 4.8 Resultado médio de dX/dt a 34°C calculado pelo método numérico, "spline", e interpolação.

TEMPO(h)	dX/dt
0	0,6000
17,5	0,3820
45,5	0,11170
67	0,0478
94,5	0,0357
115,5	0,0255
142	0,0179
163	0,0140

Tabela 4.9 Resultado médio de dX/dt a 37°C calculado pelo método numérico, "spline", e interpolação.

TEMPO(h)	dX/dt
0	0,2500
22	0,2570
53	0,1199
72	0,0474
92	0,0371
118	0,0289
142	0,0240
166,25	0,0205
187,25	0,0182
215	0,0159
241	0,0142

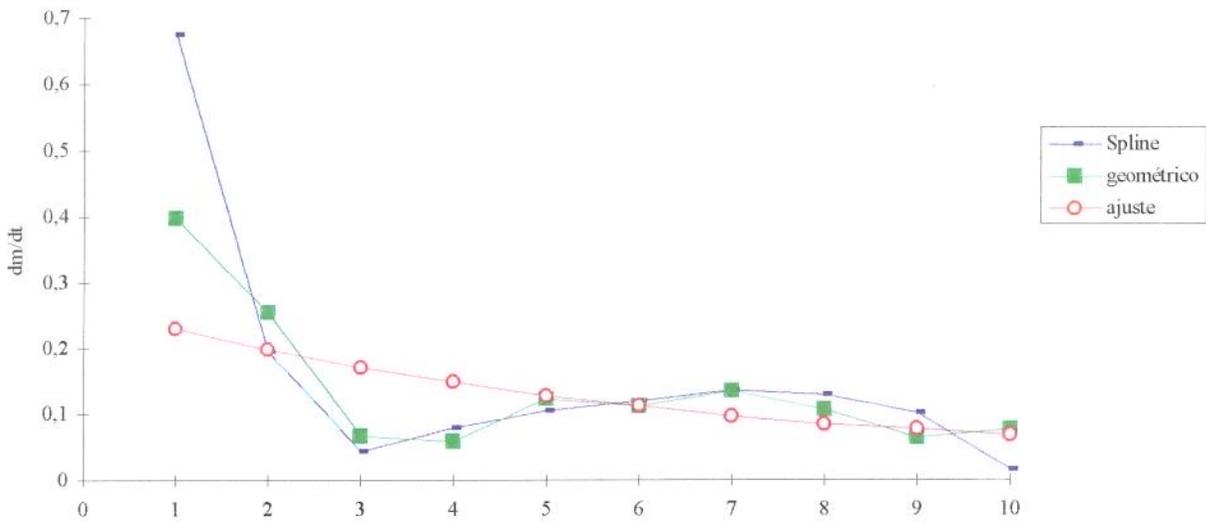


Figura 4.13 Comparação dos métodos usados para estimar dX/dt a 28°C.

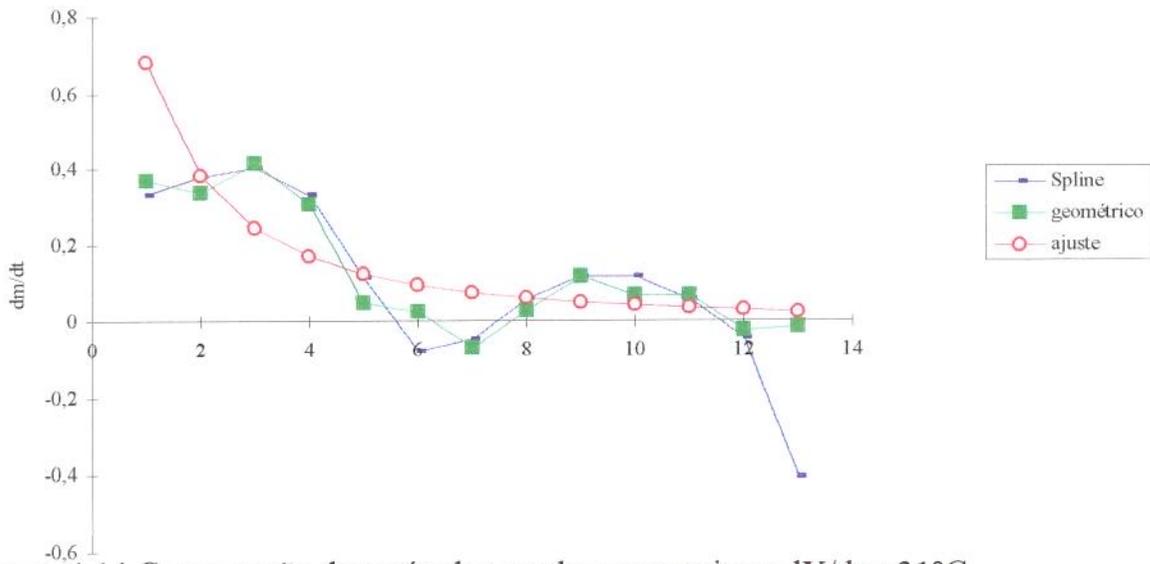


Figura 4.14 Comparação dos métodos usados para estimar dX/dt a 31°C.

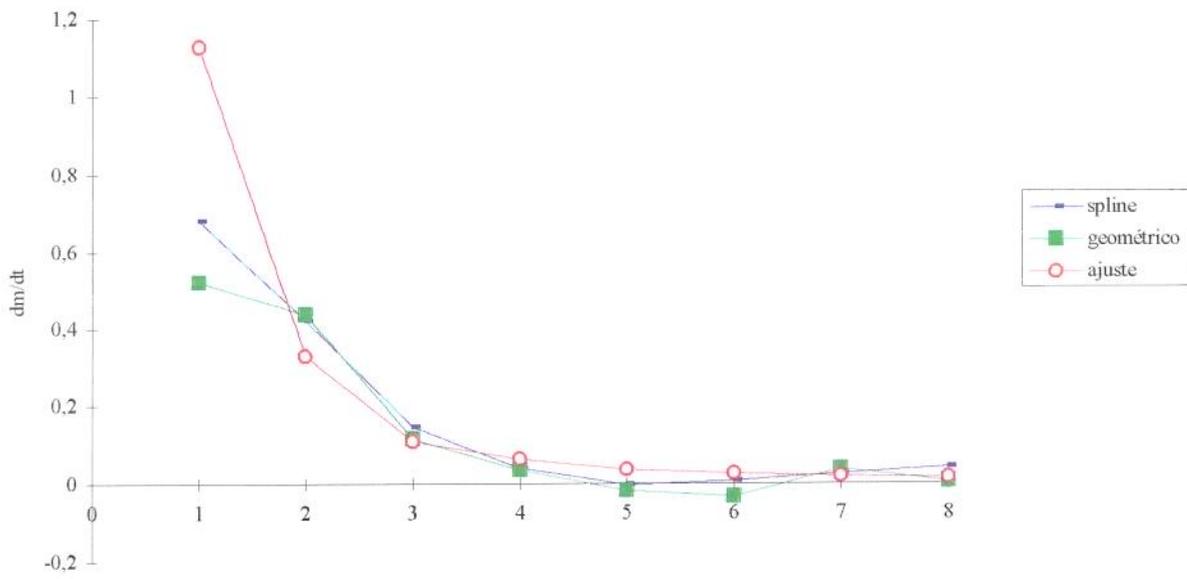


Figura 4.15 Comparação dos métodos usados para estimar dX/dt a 34°C .

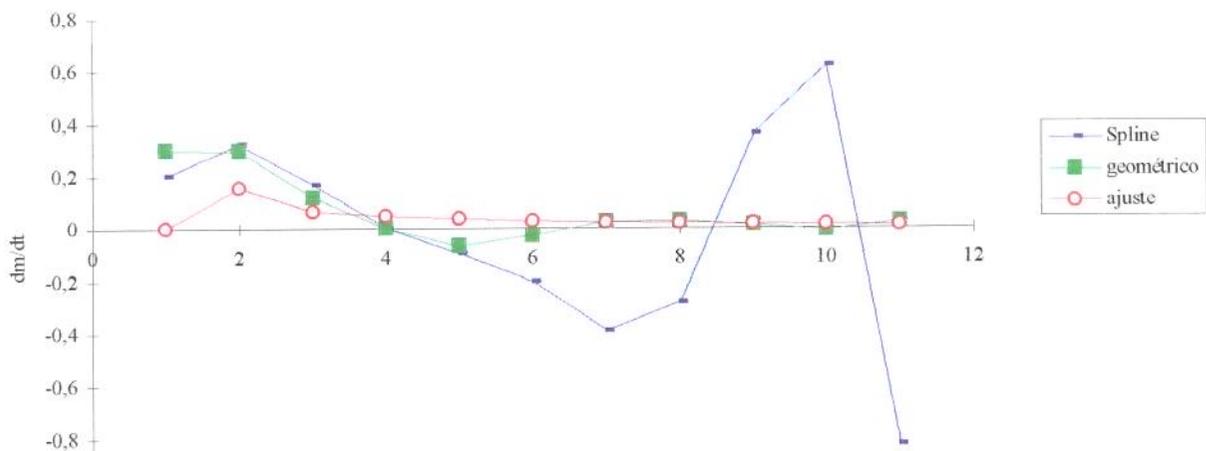


Figura 4.16 Comparação dos métodos usados para estimar dX/dt a 37°C .

Tabela 4.10 Valores de μ calculados pela equação [2.3] e concentração de células totais no sistema a 28°C.

$\mu(\text{h}^{-1})$	CONC. CÉLULAS TOTAIS (g.L^{-1})
0,0908	3,45
0,0203	13,15
0,0124	18,8
0,0106	23,85
0,00755	30,95
0,00566	36,9
0,00435	42,9
0,00309	55,55
0,00274	58,55
0,00224	64

Tabela 4.11 Valores de μ calculados pela equação [2.3] e concentração de células totais no sistema a 31°C.

$\mu(\text{h}^{-1})$	CONC. CÉLULAS TOTAIS (g.L^{-1})
0,0527	7,00
0,0227	17,40
0,0142	27,30
0,00656	42,60
0,00220	47,40
0,00155	54,30
0,00186	58,40
0,00173	65,90
0,00118	71,00
0,00101	78,50
0,00077	82,00
0,00067	87,40
0,00066	88,30

Tabela 4.12 Valores de μ calculados pela equação [2.3] e concentração de células totais no sistema a 34°C.

μ (h ⁻¹)	CONC. CÉLULAS TOTAIS (g.L ⁻¹)
0,0674	8,90
0,0212	21,20
0,00415	35,45
0,00181	43,00
0,00121	54,50
0,000949	59,80
0,000619	63
0,000481	63,2

Tabela 4.13 Valores de μ calculados pela equação [2.3] e concentração de células totais no sistema a 37°C.

μ (h ⁻¹)	CONC. CÉLULAS TOTAIS (g.L ⁻¹)
0,04808	5,2
0,02019	14
0,005742	27,95
0,002228	34,55
0,00178	32,15
0,00164	32,75
0,00126	36,3
0,00108	39,5
0,000907	40,2
0,000839	40,3
0,000724	44,5

Baixas concentrações de etanol não influenciam a velocidade de crescimento específico(μ) e desta forma o termo do álcool nas equações [2.6] e [2.18] é desprezado e as equações tornam-se:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{S + K_s} \left(1 - \left(\frac{X}{X_m} \right)^{1/2} \right) \quad [4.5]$$

$$\mu = \mu_m \frac{S}{S + K_s} \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)^m \quad [4.6]$$

Os valores de μ_{\max} e K_s foram estimados pelas equações [2.24] e [2.25], e os valores médios de concentração de açúcar fornecidos pela Tabela 4.5. Desta forma, o primeiro e o segundo termos do lado direito das equações [4.5] e [4.6] são constantes em cada experimento. O valor da constante para cada temperatura e mostrado na Tabela 4.14. Desta forma obtemos:

$$\mu = Cte(T,S) \left(1 - \left(\frac{X}{X_m} \right)^{1/2} \right) \quad [4.7]$$

$$\mu = Cte(T,S) \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)^m \quad [4.8]$$

Tabela 4.14 Valores das constantes das equações [4.7] e [4.8].

TEMPERATURA(°C)	Cte(T,S)
28	0,077768
31	0,1071247
34	0,1210143
37	0,1082118

Através de ajuste não linear, como descrito no item 3.8, as equações [4.7] e [4.8] foram ajustadas aos dados das Tabelas 4.10 a 4.13 e 4.14. Os resultados de X_m , A_2 , m , obtidos, são mostrado na tabela 4.15.

Tabela 4.15 Valores de X_m , A_2 , m das equações [4.7] e [4.8] obtidas pela regressão não linear.

TEMPERATURA(°C)	Equação [4.7]			Equação [4.8]		
	X_m	A_2	R^2	X_m	m	R^2
28°C	64,92	0,2515	0,6600	68,43	4	0,8427
31°C	69,14	0,2515	0,8291	60,48	4	0,8929
34°C	58,44	0,2515	0,8205	62,51	4	0,9972
37°C	38,8	0,2515	0,9516	33,54	4	0,9462

Observando-se os valores de X_m estimados pelas equações 4.7 e 4.8 verifica-se que estes valores foram menores que as concentrações celulares totais obtidas nos experimentos. Estes resultados, apesar de serem subestimados nos modelos, possuem a mesma ordem de grandeza entre eles. As Figuras 4.17 a 4.20 apresentam os valores de μ experimentais e os valores μ estimados pelas equações 4.7 e 4.8.

O efeito mais marcante da temperatura no valor de X_m observa-se a 37°C. O valor de X_m obtido a 37°C foi menor que os demais. Nesta temperatura observou-se que o processo de rompimento celular foi bem maior que nas demais. O estado fisiológico das células nas condições de baixa concentração de açúcar, nesta temperatura, agrava-se ainda mais.

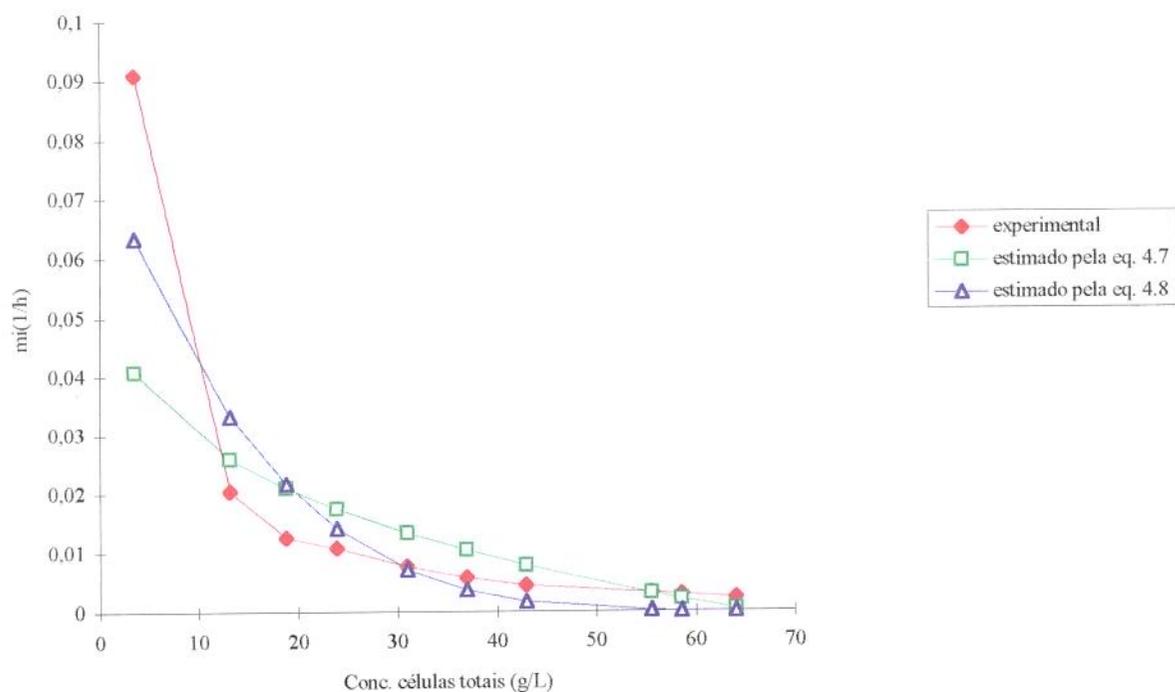


Figura 4.17 Comparação do μ experimental a 28°C com os μ estimados pelas equações 4.7 e 4.8.

A estimativa de μ feita pela equação 4.7 apresenta um decaimento mais suave que a estimativa da equação 4.8. As equações 4.7 e 4.8 se ajustaram melhor aos pontos experimentais em concentrações acima de 30 g.L⁻¹.

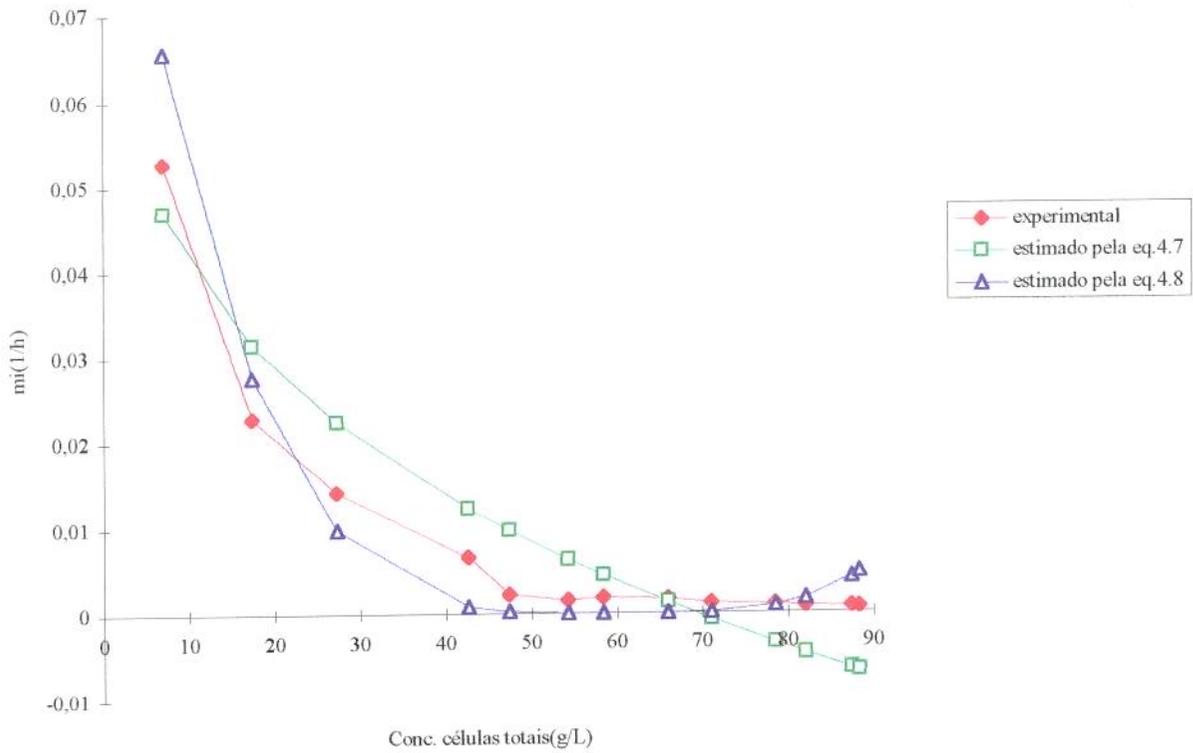


Figura 4.18 Comparação do μ experimental a 31°C com os μ estimados pelas equações 4.7 e 4.8.

A estimativa de μ feita pela equação 4.8 apresentou melhor resultado nos experimentos realizados a 31°C. O valor de X_m estimado pelo modelo 4.7 apresenta valores negativos de μ , significando que o valor de X_m obtido no ajuste é inferior aos valores de concentração de células totais obtida nos experimentos. Este efeito não se observa nos resultados estimados pelo modelo 4.8.

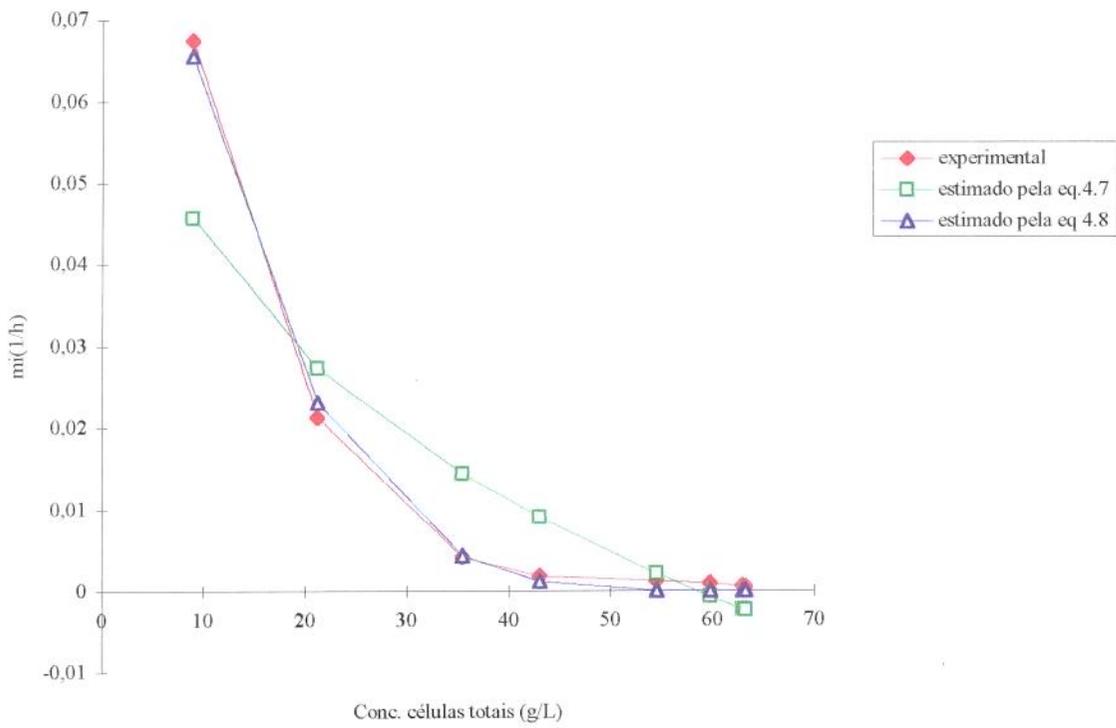


Figura 4.19 Comparação do μ experimental a 34°C com os μ estimados pelas equações 4.7 e 4.8.

Observando-se a Figura 4.19, verifica-se que o modelo descrito pela equação 4.8 se ajusta perfeitamente aos dados experimentais e que o modelo 4.7 não satisfaz.

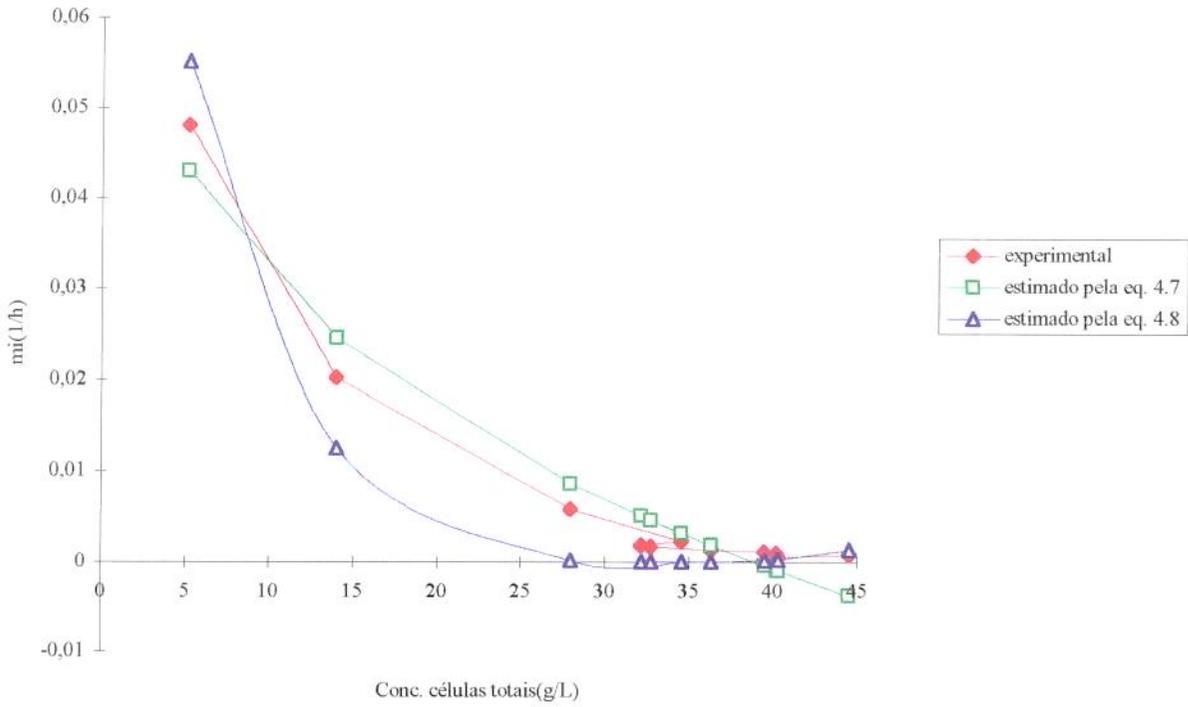


Figura 4.20 Comparação do μ experimental a 37°C com os μ estimados pelas equações 4.7 e 4.8.

Os valores de μ estimados pela equação 4.7 tornam-se negativos quando as concentrações de células totais superam o valor de X_m estimado pelo ajuste. Os resultados apresentados pela Figura 4.20 indicam que a partir de 30 g.L^{-1} os valores de μ estimado pela equação 4.8 são praticamente os mesmos dos resultados experimentais.

O crescimento celular, em sistemas com reciclo de células, é observado até o ponto em que o sistema de filtração mantenha uma taxa de diluição, de modo a fornecer nutrientes em quantidades suficientes ao meio e estes possam ser consumidos pelos microrganismos. Em elevadas concentrações celulares, os sistemas de filtração se tornam insuficientes e começam a surgir fenômenos de inibição, de limitação, perda da atividade metabólica do microrganismo, como foi comprovado por MELZOCH(1991), LAFFORGUE et alii,(1994).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.15, verificou-se que os valores de X_m ficaram subestimados pela capacidade do sistema de filtração sendo que a temperatura não apresentou um efeito considerado nos valores de X_m , já que os valores de X_m observados na faixa de temperatura estudada foram praticamente os mesmos. Só acima de 34 °C que se observou uma queda no valor de X_m .

Os modelos cinéticos, adotados para sistemas com alta concentração celular, apresentam diversos valores de concentração máxima de células e estes valores estão sujeitos ao tipo de sistema de separação além das taxas de diluição e das concentrações de açúcar da alimentação. O valor de X_m só é afetado pela temperatura quando estas são superiores a 34°C. Nas temperaturas inferiores a 34°C, o valor de X_m está sujeito muito mais a influência da capacidade do sistema de filtração que da temperatura.

Por meio de ajuste dos dados experimentais, CHATTAWAY e GOMA,(1988), obtiveram $X_m = 9,5 \text{ g.L}^{-1}$, porém o sistema que os pesquisadores usaram foi um sistema contínuo sem reciclo de células. Este valor, muito abaixo dos obtidos em sistemas com reciclo de células, comprova que o modelo cinético pode descrever razoavelmente o comportamento do microrganismo, porém os valores obtidos são específicos para cada tipo de sistema. A Tabela 4.16 apresenta alguns resultados obtidos para X_m .

Tabela 4.16 Resumo de alguns valores estimados para X_m .

AUTOR	X_m (g.L ⁻¹)	OBSERVAÇÃO
Lee e Chang, 1987	210	taxa de diluição variável, filtro membrana
Chattaway, e Goma, 1987	10,9	sistema contínuo sem reciclo
Melzoch et alii, 1991	10-60	taxa de diluição = 0,2 h ⁻¹ , filtro membrana
Lafforgue et alii, 1994	330	taxa de diluição = 0,55 h ⁻¹ , micro filtração tangencial
LEE, J.M. et alii, 1983	100	simulação de sistema com reciclo de células
Jarzebski, A.B. et alii, 1989	320	Simulação e comparação com dados experimentais

4.2 SISTEMA EM BATELADA

Os modelos cinéticos de crescimento celular, apresentados pelas equações [2.6] e [2.18], foram ajustados aos resultados experimentais do sistema em batelada, que são apresentados nas Tabelas 4.17 a 4.20. Com os resultados do sistema em batelada determinou-se o valor de P_m nas temperaturas de 28°C, 31°C, 34°C e 37°C, considerando-se que o efeito inibidor produzido pela concentração celular foi o valor estimado pelas equações 4.7 e 4.8. e apresentados na Tabela 4.15.

Os valores de dX/dt foram calculados como sendo a derivada da melhor reta interpolada aos dados de concentração celular com o tempo. As Figuras 4.21 a 4.24 apresentam os resultados das funções interpoladas aos resultados experimentais

Os valores de (μ) experimentais foram calculados pela equação [2.3].

Tabela 4.17 Resultado dos experimentos em batelada a 28 °C.

TEMPO(h)	CONC. CÉLULAS (g.L ⁻¹)	CONC. AÇÚCAR (g.L ⁻¹)	CONC. ÁLCOOL (g.L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
0	1,45	186	5,12	0,72540
4	2,9	125	7,395	0,25620
8	7,6	121	24,46	0,07270
13,2	8,55	56,55	45,25	0,04650
16	11,6	32	51,07	0,02929
20	14,2	7,24	61,13	0,01949
24	14,45	8,78	60,4	0,01591
28,5	14,5	7,37	59,92	0,01310
41,5	14	6	66,2	0,00852
46	14	5,5	66	0,00741

Tabela 4.18 Resultado dos experimentos em batelada a 31 °C.

TEMPO(h)	CONC. CÉLULAS (g.L ⁻¹)	CONC. AÇÚCAR (g.L ⁻¹)	CONC. ÁLCOOL (g.L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
0	2,7	186	5,44	0,40217
4	5	175	7,74	0,13555
8	7	128,35	20,54	0,06614
12	9,5	58	40,34	0,03539
16	13,1	17,74	44,3	0,01948
23	13,9	7,4	55,72	0,01220
30	13,8	6	53,6	0,00878
48	13,6	5	59	0,00455

Tabela 4.19 Resultado dos experimentos em batelada a 34 °C.

TEMPO(h)	CONC. CÉLULAS (g.L ⁻¹)	CONC. AÇÚCAR (g.L ⁻¹)	CONC. ÁLCOOL (g.L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
0	4	196	6,45	0,32836
3	6	140	11,46	0,15070
8	10	88	31,22	0,05486
13	13,5	20	52,68	0,02726
17	15,8	2	54,7	0,01777
23,5	15,8	1,3	56	0,01223
30	15,8	0,6	57,8	0,00892

Tabela 4.20 Resultado dos experimentos em batelada a 37 °C.

TEMPO(h)	CONC. CÉLULAS (g.L ⁻¹)	CONC. AÇÚCAR (g.L ⁻¹)	CONC. ÁLCOOL (g.L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
0	7	190	6,23	0,11264
9	8	180	19,32	0,02444
13	11,3	52,15	40,4	0,01157
16	12,2	26,3	49,72	0,00829
21	12,2	2,8	61,43	0,00575
33,5	12,2	0,8	63,77	0,00286

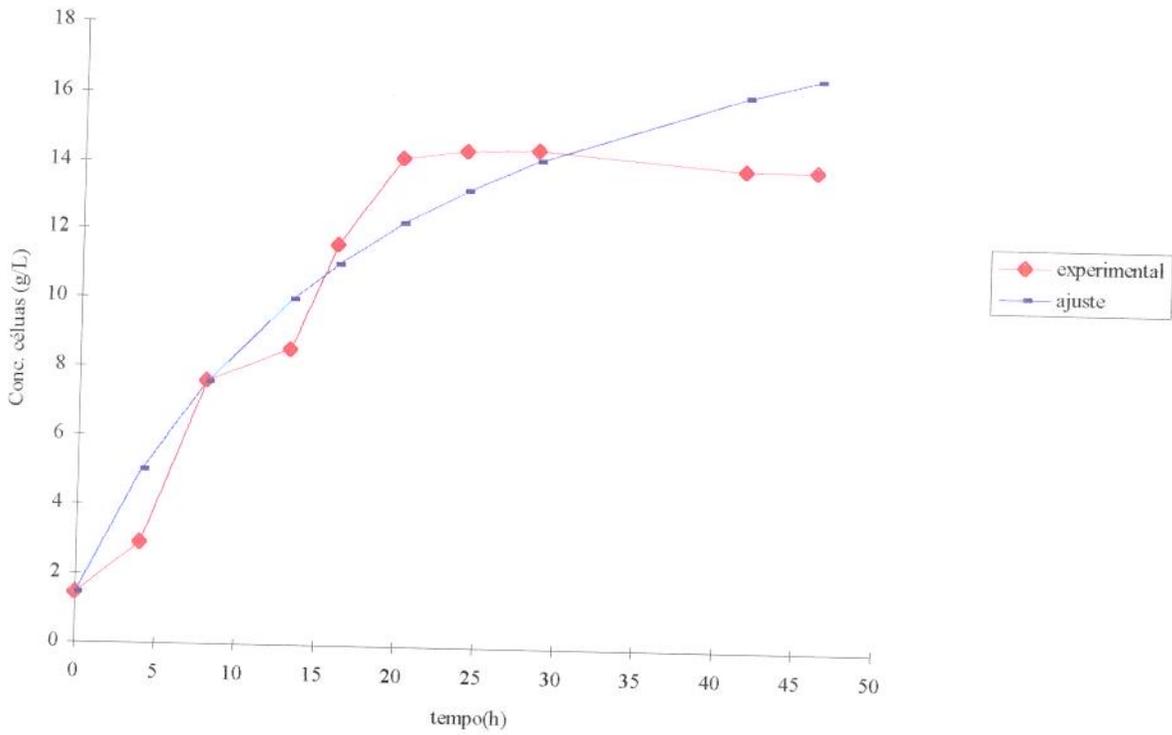


Figura 4.21 Comparação da reta ajustada com os dados experimentais a 28°C

$$X(t) = 1,45 + \{(22,16t)/(21,0683 + t)\} \quad [4.9]$$

$$R^2 = 0,932$$

X(t) = concentração de células em função do tempo.

t = tempo em horas.

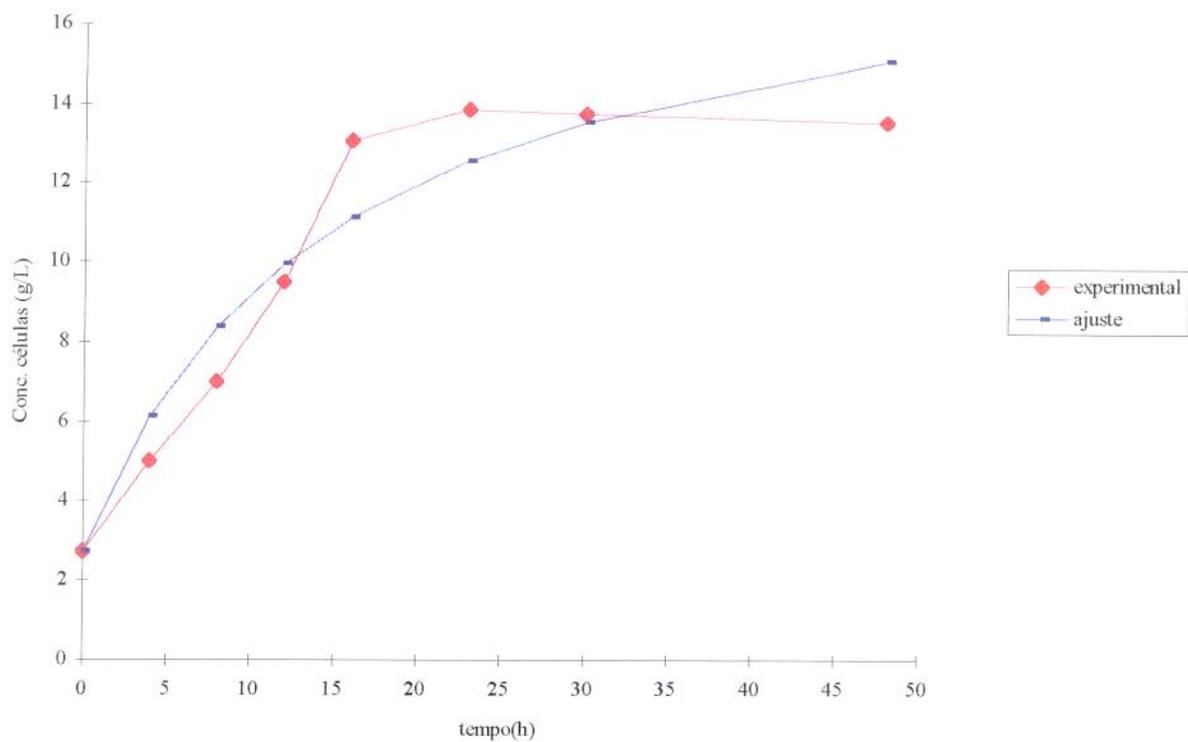


Figura 4.22 Comparação da reta ajustada com os dados experimentais a 31°C

$$X(t) = 2,7 + \{(16,34469t)/(15,052 + t)\} \quad [4.10]$$

$$R^2 = 0,920$$

X(t) = concentração de células em função do tempo.

t = tempo em horas.

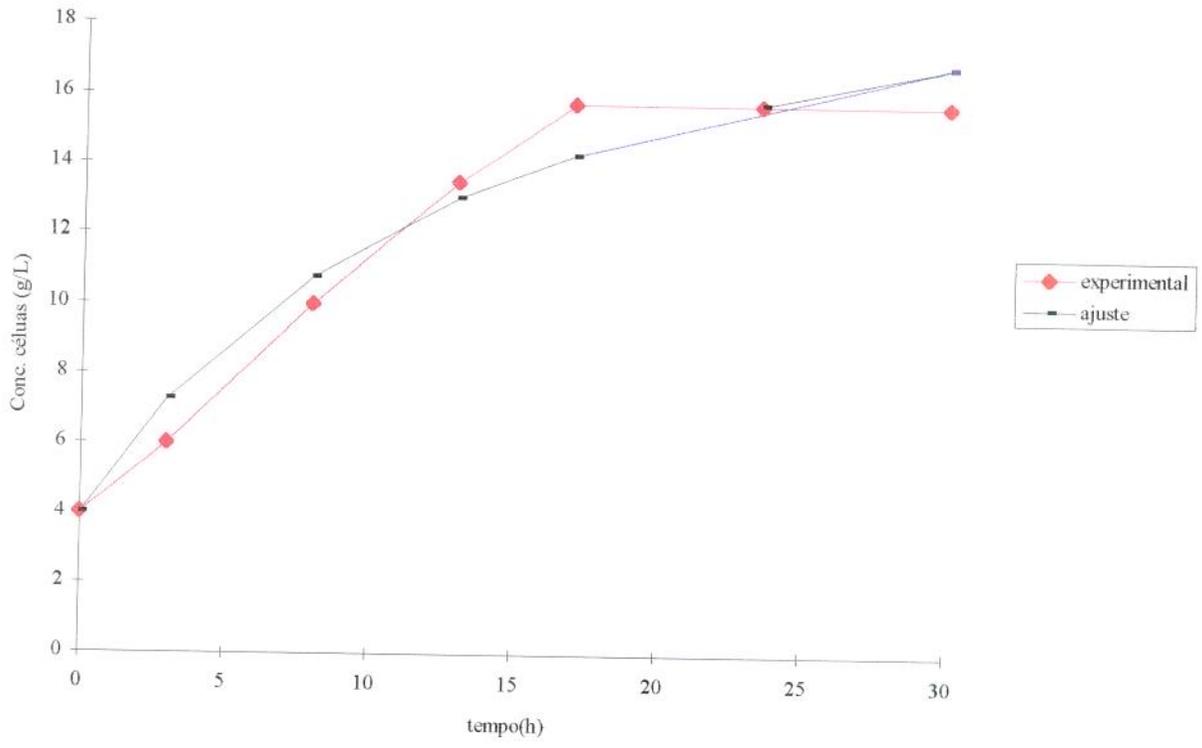


Figura 4.23 Comparação da reta ajustada com os dados experimentais a 34°C

$$X(t) = 4 + \{(19,20t)/(14,6179 + t)\} \quad [4.11]$$

$$R^2 = 0,950$$

X(t) = concentração de células em função do tempo.

t = tempo em horas.

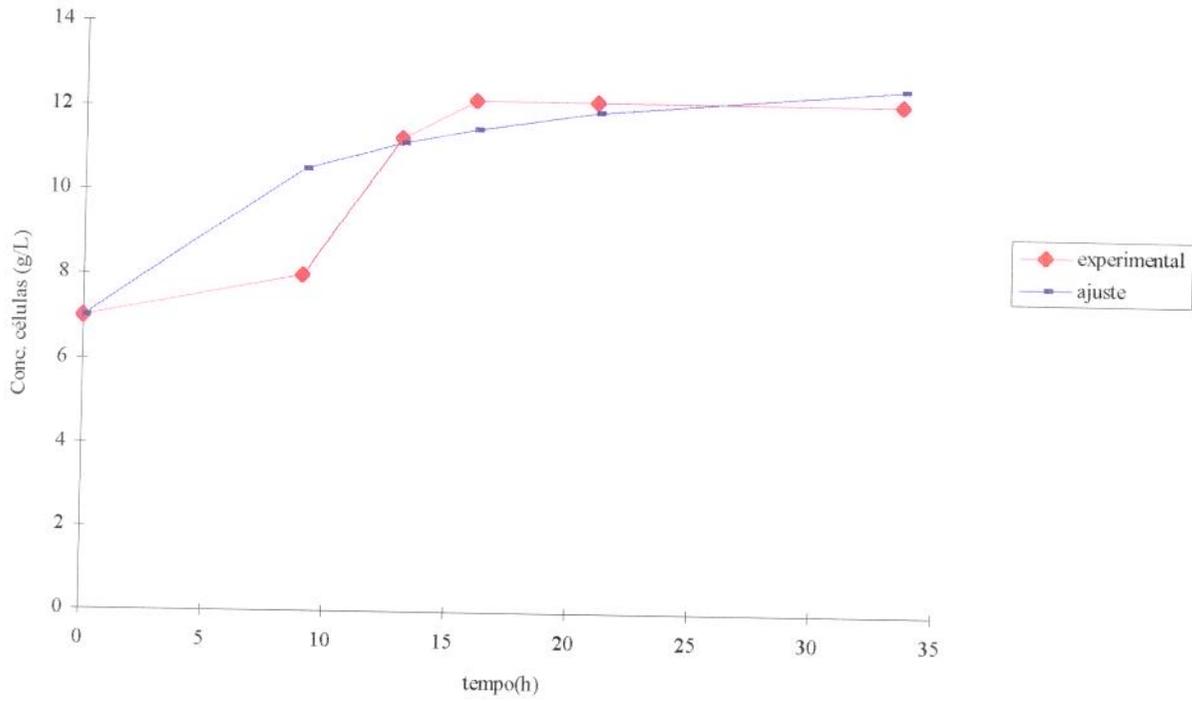


Figura 4.24 Comparação da reta ajustada com os dados experimentais a 37°C

$$X(t) = 7 + \{(7,0406t)/(8,9294 + t)\} \quad [4.12]$$

$$R^2 = 0,964$$

X(t) = concentração de células em função do tempo.

t = tempo em horas.

As equações 2.6 e 2.18 foram ajustadas aos dados das Tabelas 4.17 a 4.20. Os resultados obtidos do ajuste não linear da velocidade de crescimento específico (μ) em função da concentração de açúcar(S), da concentração alcoólica(P) e da concentração celular(X), no sistema em batelada, são apresentados na Tabela 4.21.

Tabela 4.21 Resultado dos ajustes para os modelos cinéticos das equações [2.6] e [2.18].

TEMPERATURA(°C)		Equação [2.6]				Equação [2.18]				
	Xm	Pm	A1	A2	R ²	Xm	Pm	n	m	R ²
28	64,93	65,26	2,18	0,2515	0,65	68,43	134,59	2	4	0,60
31	69,14	59,80	1,5	0,2515	0,63	60,48	83,43	2	4	0,80
34	58,44	54,50	1,8	0,2515	0,74	62,51	69,88	2	4	0,90
37	38,8	52,20	0,61	0,2515	0,85	33,54	60,00	2	4	0,95

Ambos os modelos descrevem uma queda no valor de Pm com o aumento da temperatura. Este fenômeno foi observado por Leão,(1982); Correia,(1983) e Alves,(1996).

Analisando-se os resultados da Tabela 4.21, observa-se que os valores de Pm estimados pela equação [2.6] são relativamente subestimados se comparados com os resultados apresentado por diversos autores, que apresentam valores de Pm em torno de 90-110 g.L⁻¹ (LEE et alii,1983).

A estimativa de Pm pela equação [2.18] fornece valores mais próximos dos citados pela literatura.

Correia (1983), observou que nas temperaturas acima de 28°C, o valor da concentração máxima de etanol decai com a temperatura e estes valores se situam na faixa de 79 g.L⁻¹ a 28 °C e 47,4 g.L⁻¹ a 36 °C.

Os valores de Pm estimados pela equação 2.18 e apresentados na Tabela 4.21 foram comparados com os resultados obtido por ALVES,(1996), que propôs a função:

$$Pm = 620.exp(-0,05735.T) \quad [4.21]$$

$$R^2 = 0,942$$

Temperatura na faixa de 28 °C a 38°C.

Os valores de Pm foram ajustados a uma equação do tipo 4.21, obteve-se:

$$Pm = 540,04.exp(-0,05735.T) \quad [4.22]$$

$$R^2 = 0,75$$

Temperatura na faixa de 28°C a 37°C

Observando-se a correlação do ajuste (0,75), verifica-se que a equação 4.22 não descreve muito bem o comportamento de Pm com a temperatura. Esta equação foi proposta apenas para comparar os valores de Pm obtidos nos ensaios com o Pm conseguido por ALVES, (1996).

Um modelo linear ajustado aos dados de Pm com a temperatura forneceu:

$$Pm = -9,8973.T + 403,65 \quad [4.23]$$

$$R^2 = 0,943$$

T = temperatura na faixa de 28°C a 37°C.

A Figura 4.25 representa os valores de Pm experimentais com os Pm previstos pelas equações 4.21, 4.22. e 4.23.

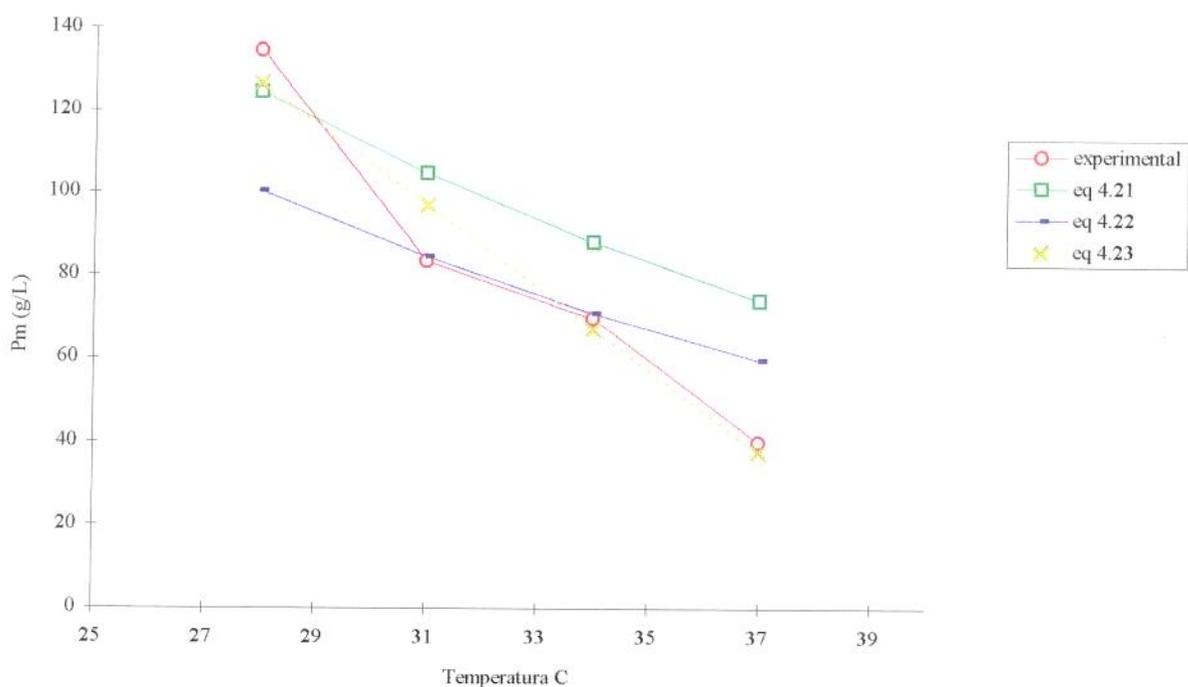


Figura 4.25 Comparação dos P_m experimentais com P_m ajustados pelas equações 4.21, 4.22 e 4.23.

Com o modelo linear os dados de P_m foram melhor ajustados, obtendo-se uma correlação de 0,94.

Com os dados fornecidos pelas Tabelas 4.17 a 4.20, obtém-se os valores dos rendimentos $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$, e $Y_{x/p}$, como descrito no item 3.8. e apresentados na Tabela 4.22.

Tabela 4.22 Rendimento das reações de produção de álcool e massa celular nos experimentos em batelada.

TEMPERATURA(°C)	Yp/s	Yx/s	Yx/p
28	0,320	0,078	0,215
31	0,274	0,058	0,211
34	0,302	0,068	0,222
37	0,290	0,027	0,103

Baseando-se na Tabela 4.22, verifica-se que os rendimentos das reações açúcar-álcool (Yp/s máximo, que teoricamente é 0,511), não ultrapassam 0,35;(cerca de 68% do valor teórico). Valores de Yp/s citados pela literatura situam-se na faixa de 90% do máximo teórico.

Verifica-se que a temperatura afeta os valores de Yp/s, Yx/s e Yx/p, e que estes valores, no âmbito geral, diminuem com o aumento da temperatura, apesar de se verificar um valor discrepante a 34°C. Funções lineares foram propostas para descrever o comportamento de Yp/s e YX/s com a temperatura. Os valores de Y x/p apresentados são constantes e iguais a 0,216 numa faixa de 28°C a 34°C. Os resultados são mostrados a seguir:

$$Yp/s = - 0,0033 T + 0,4124 \quad [4.24]$$

$$R^2 = 0,99$$

$$Yx/s = -0,0048 T + 0,2127 \quad [4.25]$$

$$R^2 = 0,70$$

A variação da concentração de açúcar com o tempo (dS/dt) e a variação da concentração de álcool com o tempo (dP/dt), podem ser relacionadas com a variação da massa celular com o tempo (dX/dt) de acordo com as equações:

$$dS/dt = -(1/Y_{x/s})dX/dt \quad [4.26]$$

$$dP/dt = (1/Y_{x/p})dX/dt \quad [4.27]$$

As equações [2.3], [4.26], [4.27], quando integradas numericamente, fornecem a concentração das espécies em função do tempo.

$$dX/dt|_i = \mu_i X_i \quad [4.28]$$

$$X_{i+1} = X_i + (t_{i+1} - t_i) dX/dt|_i \quad [4.29]$$

$$S_{i+1} = S_i - (1/Y_{x/s})(t_{i+1} - t_i) dX/dt|_i \quad [4.30]$$

$$P_{i+1} = P_i + (1/Y_{x/p})(t_{i+1} - t_i) dX/dt|_i \quad [4.31]$$

Os resultados experimentais de concentração de açúcar, álcool e células, foram comparados com os valores obtidos por simulação das equações 4.29 a 4.31. Adotando-se o modelo de crescimento específico (μ) da equação 2.18 e os dados das Tabelas 4.21 e 4.22. As Figuras 4.26 a 4.29 apresentam os resultados dos ajustes.

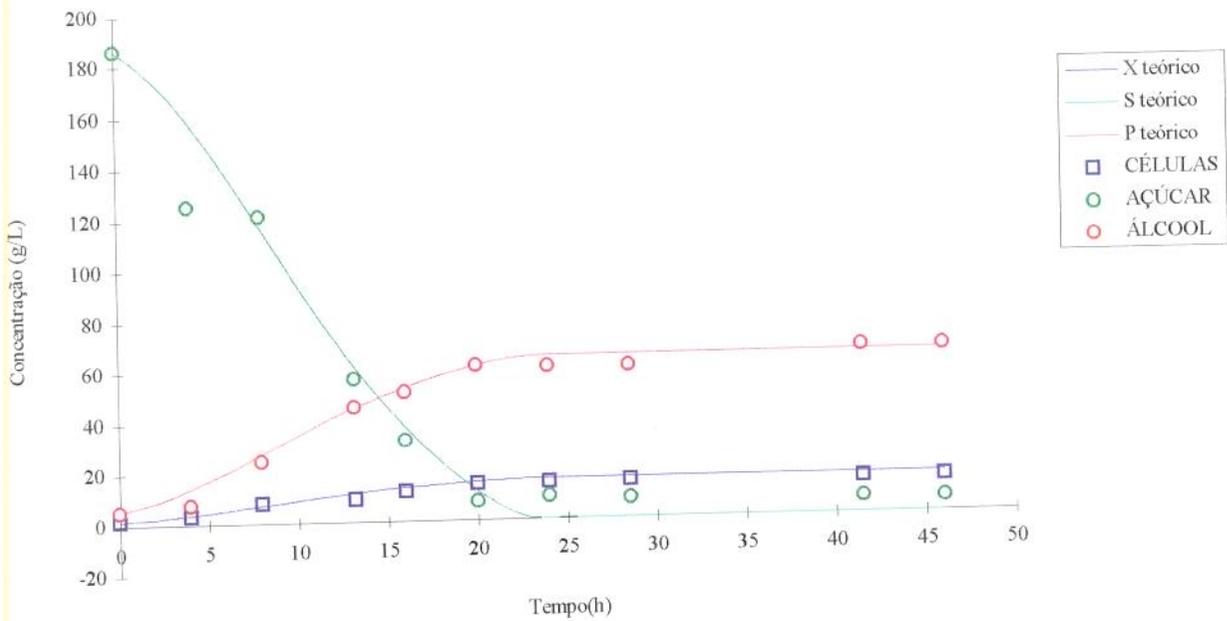


Figura 4.26 Comparação entre os resultados experimentais a 28°C e os resultados obtidos por simulação.

A Figura 4.26 apresenta os resultados obtidos da simulação e os dados experimentais do sistema em batelada a 28°C. As concentrações de células, álcool e açúcar são bem estimadas pelo modelo teórico, porém verifica-se que a partir de 20 horas a concentração de açúcar é subestimada pelo modelo cinético teórico ou as concentrações de açúcar medidas foram superestimadas, uma vez que o melaço é um meio bastante complexo com a possibilidade de haver algum componente redutor que interfira no resultado quando a concentração de açúcar é da mesma ordem de grandeza da substância interferente.

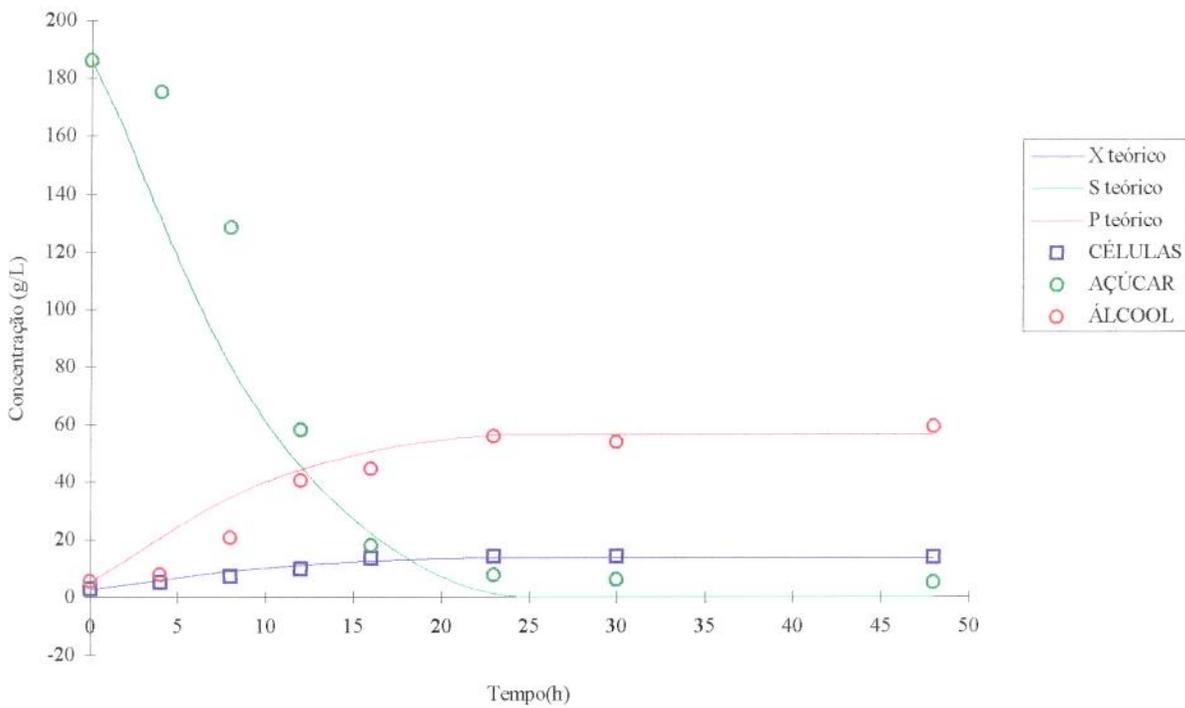


Figura 4.27 Comparação entre os resultados experimentais a 31°C e os resultados obtidos por simulação.

A figura 4.27 compara os valores obtidos da fermentação em batelada conduzida a 31 °C com resultados previstos teoricamente. Os resultados da concentração de açúcar nas primeiras 15 horas de ensaio, são subestimados pelo modelo.

Verifica-se que o modelo teórico descreve o processo de fermentação alcoólica e que a concentração de açúcar no final do ensaio é superior ao valor estimado pelo modelo teórico.

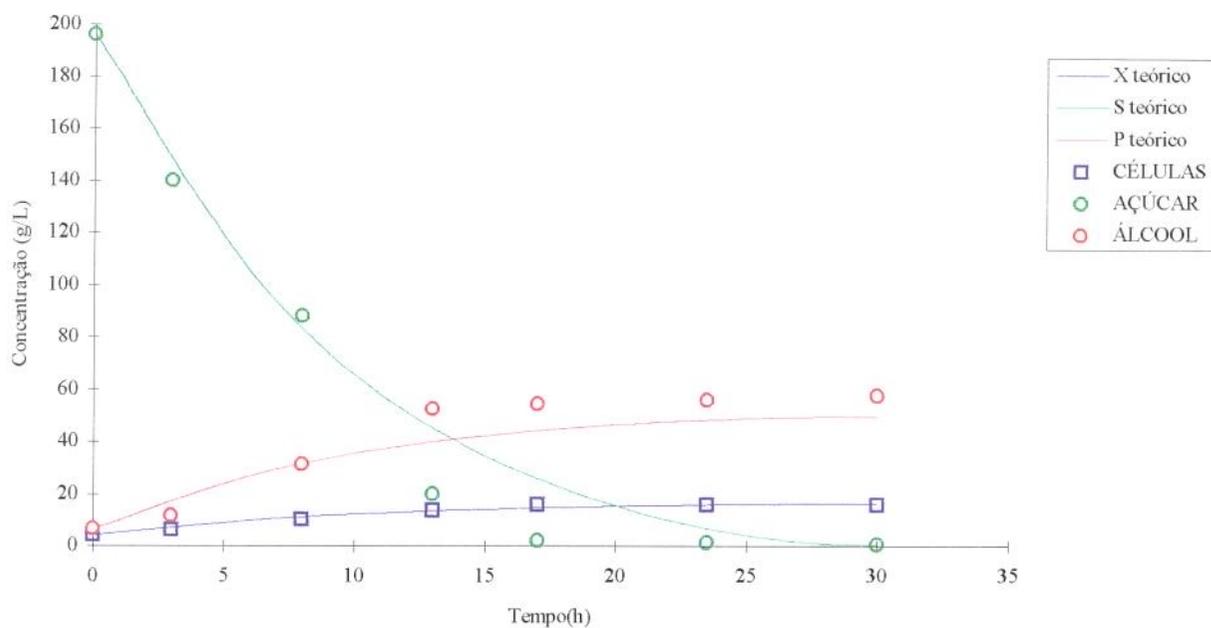


Figura 4.28 Comparação entre os resultados experimentais a 34°C e os resultados obtidos por simulação.

Observando-se a Figura 4.28, verifica-se que o modelo cinético, apesar de descrever bem o comportamento da concentração de açúcar e concentração celular, não conseguiu descrever bem o comportamento da concentração alcóolica, subestimando os valores.

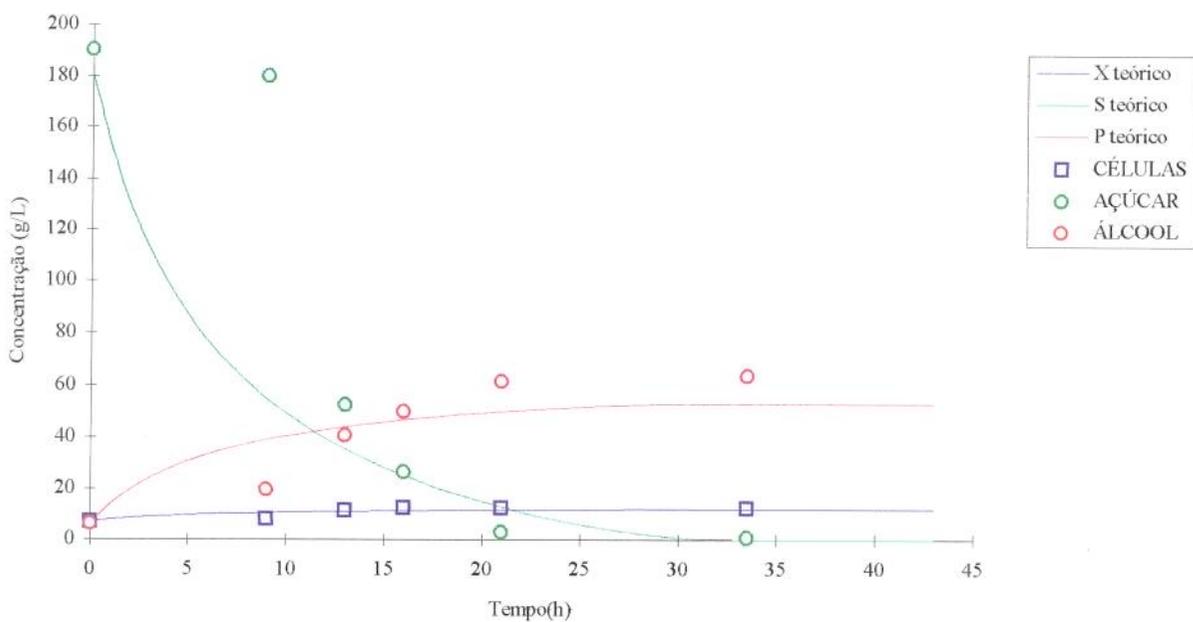


Figura 4.29 Comparação entre os resultados experimentais a 37°C e os resultados obtidos por simulação.

Observando-se a Figura 4.29, que descreve o comportamento do sistema em batelada a 37 °C, verifica-se que o modelo descreve bem o comportamento da concentração celular mas os valores de concentração de açúcar e álcool oscilam em torno dos valores previstos teoricamente.

5 - CONCLUSÕES

- Os diferentes valores de X_m encontrados em cada experimento retratam a capacidade do sistema de filtração e as condições operacionais. X_m independe da temperatura e o valor médio encontrado foi igual a $63,8 \text{ g.L}^{-1}$.

- Verificou-se que os valores de P_m , $Y_{p/s}$ e $Y_{x/s}$, ao contrário de X_m , foram extremamente sensíveis à temperatura. Modelos lineares foram propostos para descrever o comportamento de P_m , $Y_{p/s}$ e $Y_{x/s}$ com a temperatura.

$$P_m = - 9,8973T + 403,65 \text{ de } 28^\circ\text{C a } 37^\circ\text{C}.$$

$$Y_{p/s} = - 0,0033T + 0,4124 \text{ de } 28^\circ\text{C a } 37^\circ\text{C}.$$

$$Y_{x/s} = - 0,0048T + 0,2127 \text{ de } 28^\circ\text{C a } 37^\circ\text{C}.$$

- O modelo cinético proposto por Lee et alii(1983) foi o que melhor descreveu o processo de fermentação alcoólica no intervalo de temperatura de 28°C a 37°C :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s} \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n \cdot \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^m \quad [2.18]$$

em que, $P_m = - 9,8973T + 403,65$

$$X_m = 63,8 \text{ g.L}^{-1}$$

$$n = 2$$

$$m = 4$$

e os valores de μ_m e K_s em função da temperatura, foram estimados por ALVES (1996).

6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ampliar a capacidade do sistema de filtração, evitando-se desta forma a perda de viabilidade celular pelo tempo de residência da célula no sistema.

Realização de fermentações alcóolicas contínuas usando-se meios sintéticos ao invés de melaço de cana-de-açúcar esgotado para se ter um maior controle sobre as variáveis inerentes ao meio de alimentação, quando estas fermentações objetivarem a determinação de parâmetros cinéticos.

Aplicar os processos de fermentação alcóolica contínua com reciclo de células em outros tipos de processos biotecnológicos como por exemplo cultura de células animais, cultura de células vegetais, produção de enzimas, produção de antibióticos, fermentação acética, fermentação láctea, etc.

Implementação no controle de processos fermentativos por meio de sistemas computadorizados, como por exemplo controle das vazões de alimentação, purga, extração do filtrado, entre outros.

7 - BIBLIOGRAFIA

- [1] ALMEIDA LIMA, U.; Produção de Etanol : Almeida Lima, U.; Aquarone, E.; Borzani, W. BIOTECNOLOGIA. **Tecnologia das fermentações.**, São Paulo, EDUSP/Edgar Blücher, V. 1, pp 50-55, 1975.
- [2] ALVES, J. G. L. F. **Estudo da Influência da Temperatura na Cinética de Crescimento Anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae***, Dissertação Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP, 1996.
- [3] BU'LOCK, J.D., COMBERBACH, D.N., GHOMMIDH, D.M. A Study of Continuous ethanol Production Using highly Flocculent Yeast in the Gas lift Tower fermenter. **Chem. Eng. J.**, 29, B9-B24, 1984.
- [4] CARVALHO, B.S., ALVES, J.G.L.F, MAUGERI, F. Modelagem Matemática de Fermentação Alcólica em Função da Temperatura. **XI SINA FERM, SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES**, São Carlos-SP, 2, pp 658-663, 1996.
- [5] CHANG, H. N.; LEE, W. G.; KIM, B.S. Cell Retention Culture with an Internal Filter Module: Continuous Ethanol Fermentation. **Biotech. Bioeng.** 41, pp 677-681, 1993.
- [6] CHANG, H. N.; YOO, I. K. KIM, B. S. High Density Cell Culture by Membrane-Based Cell Recycle. **Biotech. Adv.**, 12, pp 467-487, 1994.
- [7] CHATTAWAY, T., GOMA, G. Modeling Ethanol and Secondary Inhibitions of Ethanol Fermentation in a Multistage Reactor. **Biotechn. Bioeng.**, 32, pp 271-276, 1988.

- [8]CONN, E. E.; STUMPF, PAUL K.; BRUENINO, G.; DOI, R. **OUTLINES OF BIOCHEMISTRY**. JOHN WILEY & SONS, INC, pp 358,465, 5 ed. 1987.
- [9] CORREIA, I.S, VAN UDEN, N. Temperature Profiles of Ethanol on the Minimum and Maximum Temperatures for Growth of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis* **Biotech. Bioeng.**,25, pp 1665-1667,1983.
- [10] DALE, M. C.; CHEN, C.; OKOS, M.R. Cell Growth and Death Rates as Factors in the Long-Term Performance, Modeling and Design of Immobilized Cell Reactors. **Biotech. Bioeng.**,36, pp 983-992, 1990.
- [11]DAUGULIS, A.,J. & SWAINE,D. E.,. Examination of Substrate and Product Inhibition Kinetics on the Production of Ethanol by Suspended and Immobilized Cell Reactors. **Biotech. Bioeng.**,29, pp 639-645, 1987.
- [12]DIAS, J.M.C.S. **Aplicação do Método Dinâmico de Medida da Velocidade Específica Máxima de Crescimento Celular**. Dissertação de mestrado, USP, SÃO PAULO, 1982.
- [13]DOMINGUEZ H., NUNEZ M. J., CHAMY R., LEMA J. M. Determination of Kinetic Parameters of Fermentation Process by a Continuous Unsteady-State Method: Application to the Alcoholic Fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis*. **Biotech. Bioeng.**,41, 11, pp 1129-32, 1993.
- [14]DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; SEVELY, Y. Modeling and Static Optimization of the Ethanol Production in a Cascade Reactor. **Biotech. Bioeng.**,29, pp 187-194,1987.

- [15]GHOSE, T. K. & TYAGI,R.D.Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolyte 1. Batch *versus* Continuous Systems. **Biotech. Bioeng.**,21, pp 1387-1400, 1979.
- [16]JARZEBSKI, A. B., MALINOWSKI,J.J.GOMA,G. Modeling of Ethanol Fermentation at High Yeast Concentration. **Biotech. Bioeng.**,34, pp 1225-30,1989.
- [17]JIN,C.K.;CHIANG,H.L.; WANG,S.S. Staty State Analysis of the Enhancement in the Ethanol Productivity of a Continuous Fermentation Process Employing a Protein-Phospholipid Complex as a Protection Agent. **Enzyme Microbiology Technology**, 3, pp 249-257, 1981.
- [18]KANG, B. C.; LEE, S. Y.; CHANG,H.N. Production of *Bacillus thuringiensis* Spores in Total Cell Retention Culture and Two-Stage Continuous Culture Using an Internal Ceramic Filter System. **Biotech. Bioeng.**,42, pp 1107-1112, 1993.
- [19]KAREL,S.F. & ROBERTSON, C.R.Autoradiographic Determination of Mass-Transfer Limitation in Immobilized Cell Reactors. **Biotech. Bioeng.**,34, pp 320-336, 1989.
- [20] KIRK, DONALD F., OTHMER RAYMOND E., **Encyclopedia of Chemical Technology**, 5, pp 288,1947.
- [21]LAFFORGUE,D.C.;DELORME,P.GOMA,G. Continuous Alcoholic Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* Recycle by Tangential Filtration: Key Points for Process Modelling. **Biotechnology Letters**, 16(7), pp 741-746, 1994.
- [22]LAFFORGUE,C.,MALINOWSKI,J., GOMA, G. High Yeast Concentration in Fermentation with Cell Recycle Obtained by Tangential Microfiltration, **Biotechnolgy Letters**, 9, pp 347-352,1987.

- [23] LAPLACE J. M., DELGENES J. P., MOLETTA R., NAVARRO J. M.J. Cofermentation of Glucose and Xylose to Ethanol by a Respiratory-Deficient Mutante of *Saccharomyces cerevisiae* Co-cultivated with a Xylose-Fermeting Yeast. **Fermentation Bioeng.**, 75, 3, pp 207-12, 1993.
- [24] LEÃO, C., VAN UDEN, N. Effects of Ethanol and Alkanols on the Kinetics and the Activation Parâmetros of Thermal Death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, 24, pp 1581-1590, 1982.
- [25] LEE, C.W.; CHANG, H. N.; Kinetics of Ethanol Fermentations in Membrane Cell Recycle Fermentors, **Biotechnol. Bioeng.** 29, pp 1165-1112, 1987.
- [26] LEE, J.M., POLLARD, J.F. COULMAN, G. A. Ethanol Fermentation with Cell Recycling: Computer Simulation, **Biotechn. Bioeng.**, 25, pp 497-511, 1983.
- [27] LUONG, J.H. Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation, **Biotech. Bioeng.**, 27, pp 280-285, 1985.
- [28] MELZUCH, K.; RYCHTERA, M.; MARKVICHOV, N.S.; POSPICALOVÁ, V.; BASAROVA, G.; MANAKOV, M.N. Application of Membrane recycle Bioreactor for Continuous Ethanol Production, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 34, pp 469-472, 1991.
- [29] MELO CRUZ, M. R., BORZANI, W. Fermentação Alcólica de Melaço e Caldo de Cana-de-Açúcar por *Zymomonas mobilis* . **Rev. Bras. Tecnol.**, Rio de Janeiro, 11, (2), pp517, 1980.
- [30] MILLER, G.L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, **Analytical Chemistry**, 31, 3, pp 426-428, 1959.
- [31] MONBOUQUETTE, H.G., Models for High Cell Density Bioreactors Must Consider Biomass Volume Fraction: Cell Recycle Example. **Biotechnol. Bioeng.** 29, pp 1075-1080, 1987.

- [32] NAVARO, J.M. & DURAND, G. Fermentation Alcoolique: Influence de la Temperature sur l'accumulation d'alcool dans las Cellules de Levure'. **Ann. Microbiol.** 129, pp 215-21, 1978.
- [33] NUNHEZ, J.R., MORI, M., d'ÁVILA, S.G., Fitting Thermodynamic Data Using Modified Spline Technic, Accepted for publication in the **Computers & Chemical Engineering**, 1993.
- [34] JOKABE, M.; ODA, A.; PARK, Y.S.; NOGUCHI, K.; OKAMOTO, T.; MITSUI, S.; Continuous Beer Fermentation by High Cell-Density Culture of Bottom Brewer's Yeast'. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 17, 1, pp 41-45, 1994.
- [35] PEREGO JR, L. **Fermentação Alcólica Contínua de Mosto de Melaço: Influência da Concentração do Mosto e da Vazão Específica de Alimentação na Estabilidade do Sistema a 32 °C.** São Paulo, FCF-USP, 1979, 162 p. dissertação de Mestrado.
- [36] RIGHELATO, R.C. Continuous Fermentation for Alcohol Production form Sugar. **Seminário - São Paulo Technology**, São Paulo, 27-30 nov. 1979 - (Separata)
- [37] RODRIGUEZ E.; GARRO O. A. , PALACIOS UNDA R., CALLIERI D. A. S. Mathematical Modeling of the Alcoholic Fermentation of Glucose by *Zymomonas mobilis mobilis*. **J.Chem.Technol.Biotechnol.** 63, 4, pp 367-73, 1995.
- [38] ROSARIO, E. J.; LEE, K.. & ROGERS, P.L. Kinetics of Alcohol Fermentation at High Yeast Levels. **Biotechnol. Bioeng**, 21, 8, pp 1477-82, 1979.
- [39] SEVELY, Y., POURCIEL, J.P., RAUZY, G.R., BABANS, J.P., paper presented at the 8th IFAC Trienal Congress, Kyoto, Japan, Aug, 1981.
- [40] TAKAHASHI, D. F., CARVALHO, M.L. and F. ALTERTHUM, Ethanol Production from Pentoses and Hexoses by Recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, 16 (7), pp 747-750, 1994.
- [41] JUDEN, N.VAN, 1971, Kinetics and Energetics of Yeast Growth. In ROSE, A.H; HARRISON, J.S.(eds). **The Yeast**. V.2, Physiology and Biochemistry of Yeast. London, Academic Press, 3, pp 75-118, 1971.