UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM ALTA DENSIDADE CELULAR: MODELAGEM CINÉTICA, CONVALIDAÇÃO DE PARÂMETROS E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO.

DANIEL IBRAIM PIRES ATALA

Engenheiro de Alimentos

PROF. DR. FRANCISCO MAUGERI FILHO

Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Daniel Ibraim Pires Atala, aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de março de 2000.

Campinas, 16 de março de 2000.

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Presidente da Banca

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Etadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Campinas, março de 2000.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
At14f
V. Ex.
TOMBO BC/ 41810
PROC. 278/00
C D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 05-08-00
N.º CPD

CM-00143108-9

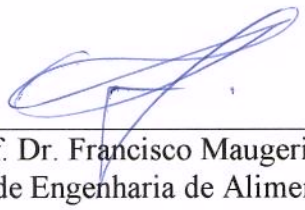
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Atala, Daniel Ibraim Pires
At14f Fermentação alcoólica com alta densidade celular: modelagem cinética, convalidação de parâmetros e otimização do processo / Daniel Ibraim Pires Atala. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

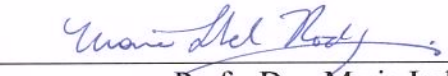
Orientador: Francisco Maugeri Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Álcool. 2.Fermentação. 3.Densidade. 4.Temperatura. 5.Inibição. 6.Modelagem. I.Maugeri Filho, Francisco. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

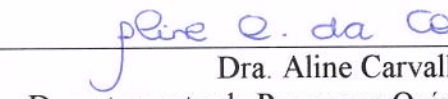
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Departamento de Engenharia de Alimentos - UNICAMP



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigures
Departamento de Engenharia de Alimentos - UNICAMP



Dra. Aline Carvalho da Costa
Departamento de Processos Químicos – FEQ – UNICAMP

Prof. Dr. Silvio R. Andrietta
Faculdade de Engenharia Química – CPQBA – UNICAMP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho antes de tudo a Deus por ter me dado condições de subir mais um degrau em minha carreira profissional.

Aos meus pais, Ibraim Atala e Elzira Pires Atala, pela amizade, pelo amor, pelo carinho e companheirismo e por jamais terem medido esforços para que eu chegasse até aqui. A educação, o amor e o exemplo de vida é a maior herança que alguém pode receber, muito obrigado!!

Aos meus irmãos Alle Pires Atala, o caçulinha e Danilo pelo carinho, incentivo e amizade.

Aos meus tios Ana Lúcia e Péricles pelo carinho e incentivo em minha vida profissional.

À Bel pelo amor, carinho, compreensão e amizade.

Esta conquista é de todos vocês, com todo meu amor!!!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho, pela orientação, paciência e amizade.

Aos membros da banca pelas correções e enriquecimento deste trabalho

À Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues pela amizade, alegria, ajuda e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvio Andrietta, pela ajuda dada durante as etapas difíceis deste trabalho.

À Dra. Aline C. Costa pelo auxílio, debates, companheirismo e por ter se tornado uma grande amiga.

À UNICAMP e ao Departamento de Engenharia de Alimentos desta Faculdade, por possibilitarem a complementação da minha formação.

À CAPES pelo apoio financeiro através de bolsa de estudo, tanto na pós graduação quanto na graduação que possibilitaram o aprimoramento de minha formação.

Ao Bruno, José Guilherme e Ezequias pelas dicas iniciais que facilitaram a montagem e funcionamento do processo.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia (Fifa, Guiga, Suzana, Luciano, Janaina, André, Li, Lia, Márcio, Yemiko, Rafael, Juliana e Reinaldo) pelo excelente ambiente de trabalho encontrado, que possibilitaram sem dúvida, no bom desenvolvimento deste trabalho

Não poderia me esquecer das novas amizades feitas neste período. Ao Fermando (Carioca), Éder, Suzi, Paty, Dani, Dinho, Cris, Fer, Sueli, Mauro, Flávio, Amorim, Martin e Leopoldo pela convivência e pelos momentos de alegria passados juntos.

Aos colegas de apartamento (Guiga, Luciana, Rosiléia, Carla, Cacá, e meu irmão Alle) e aos meus vizinhos (Rodi, Cris, Hellen e Raquel) pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do Lopca –FEQ em especial ao Prof. Dr. Rubens Maciel Filho.

À minha cunhada e minha querida sobrinha Ana Carolina.

A maravilhosa família da Bel em especial a D. Inez por terem me recebido de braços abertos.

Aos meus eternos amigos e companheiros David, João Marcos, Armando, Xandoka, Mamé, Waldir, Valério, Lalá, Daniela, Ana Carolina, Fabiana, Luana, Daciane, Meirinha e etc...

Aos meus Professores e amigos Walter Algusto Ruiz, Jorge. A.V. Costa, Luiz A.A. Pinto, Eliana B. Furlong e Marta A. Ruiz por terem me mostrado o maravilhoso mundo da pesquisa e, de certa forma, responsáveis por eu estar aqui hoje.

E finalmente a todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS III

LISTA DE FIGURAS V

NOMENCLATURA IX

RESUMO XI

ABSTRACT XII

I. INTRODUÇÃO 1

II. OBJETIVO 3

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

III.1. PERSPECTIVAS DO SETOR SUCROALCOOLEIRO 4

III.2. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL 5

III.3. PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 6

III.3.1. PROCESSO BATELADA ALIMENTADA OU MELLE – BOINOT 6

III.3.2. PROCESSOS BATELADA ALIMENTADA ESTENDIDA 7

III.3.3. PROCESSOS CONTÍNUOS 8

III.4. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA 9

III.4.1. MODELOS CINÉTICOS 9

III.4.2. CINÉTICA DE INIBIÇÃO 10

III.4.3. MODELOS CINÉTICOS PARA ALTA DENSIDADE CELULAR 13

III.4.4. PARÂMETROS CINÉTICOS 14

III.4.5. EFEITO DA TEMPERATURA NOS PARÂMETROS CINÉTICOS 16

III.5. ALTA DENSIDADE CELULAR: 18

IV. MATERIAIS E MÉTODOS 20

IV.1. MATERIAIS 20

IV.1.1. MICRORGANISMO 20

IV.1.2. MEIO DE CULTURA E INÓCULO 20

IV.1.3. Equipamentos 21
IV.2. Operação do Sistema Batelada Alimentada Estendida 28
IV.2.1. Preparação do Sistema de Filtração 28
IV.2.2. Esterilização 28
IV.2.3. Inoculação 29
IV.3. Métodos Analíticos 30
IV.3.1. Concentração de Células Totais 30
IV.3.2. Viabilidade 30
IV.3.3. Concentração de Etanol 31
IV.4. Modelagem Matemática e Parâmetros Cinéticos 31
IV.4.1. Modelagem Matemática do processo batelada 32
IV.4.2. Modelagem Matemática do Processo Batelada Alimentada Estendida 34
IV.5. Planejamento Experimental e Otimização do Processo. 39
IV.6. Recursos Computacionais 41
IV.7. Balanços Macroquímicos 42

V. Resultados e Discussão 45

V.1. Dados Experimentais 45
V.2. Ajuste de Parâmetros e Modelagem Matemática 62
V.2.1. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Yx, e mx através do Software Macrobal®. 62
V.2.2. Processo Batelada 71
V.2.3. Processo Batelada Alimentada Estendida 83
V.3. Simulações do Processo Fermentativo Batelada Alimentada Estendida .93
V.4. Estudo da inluência das variáveis do modelo cinético 102
V.5. Planejamento Experimental e Otimização do Processo 114

VI. Conclusões 128

VII. Sugestões 130

VIII. Referências Bibliográficas 131

LISTA DE TABELAS

Tabela IV.1: Matriz elementar dos compostos mais relevantes do processo 42

Tabela V.1: Dados experimentais do processo batelada e batelada alimentada estendida para a temperatura de 28°C 46

Tabela V.2: Dados experimentais do processo batelada e batelada alimentada estendida para a temperatura de 31°C 47

Tabela V.3: Dados experimentais do processo batelada e batelada alimentada estendida para a temperatura de 34°C 48

Tabela V.4: Dados experimentais do processo batelada e batelada alimentada estendida para a temperatura de 37°C 49

Tabela V.5: Dados experimentais do processo batelada e batelada alimentada estendida para a temperatura de 40°C 50

Tabela V.6: Quadro geral do processo batelada 53

Tabela V.7: Quadro geral do processo batelada alimentada estendida 54

Tabela V. 8: Dados experimentais do processo batelada 63

Tabela V. 9: Constantes da função sigmoidal utilizado no ajustes das variáveis 64

Tabela V.10: Velocidades de reações calculadas pelo Table Curve 3D 66

Tabela V.11: Velocidades de reações estimadas pelo Macrobal 67

Tabela V.12: Parâmetros cinéticos 67

Tabela V. 13: Parâmetro Yx calculado para o processo fermentativo 70

Tabela V.14: Parâmetro mx calculado para o processo fermentativo 70

Tabela V.15: Parâmetros cinéticos da modelagem do processo batelada 71

Tabela V.16: Parâmetros cinéticos da modelagem do processo batelada alimentada estendida 83

Tabela V.17: Condições iniciais utilizadas na simulação do processo 93

Tabela V.18: Níveis das variáveis do planejamento saturado 103

Tabela V.19: Matriz do planejamento saturado de Plackett e Burman para 32 ensaios..... 104
Tabela V.20: Matriz do planejamento saturado de Plackett e Burman - Respostas..... 105
Tabela V.21: Tabela de efeitos estimados para a resposta rendimento. 106
Tabela V.22: Tabela de efeitos estimados para a resposta conversão. 107
Tabela V.23: Tabela de efeitos estimados para a resposta produtividade. 108
Tabela V.24: Tabela de efeitos estimados para a resposta biomassa viável. 109
Tabela V.25: Tabela de efeitos estimados para a resposta substrato..... 110
Tabela V.26: Tabela de efeitos estimados para a resposta etanol. 111
Tabela V.27: Tabela geral de efeitos das variáveis estudadas. 112
Tabela V.28: Níveis dos fatores do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2}..... 114
Tabela V.29: Matriz do planejamento fatorial fracionário 115
Tabela V.30: Tabela de efeitos estimados para rendimento. 115
Tabela V.31: Tabela de efeitos estimados para conversão. 116
Tabela V.32: Tabela de efeitos estimados para produtividade..... 116
Tabela V.33: Tabela de efeitos estimados para formação de biomassa viável. 116
Tabela V.34: Tabela de efeitos estimados para consumo de substrato..... 117
Tabela V.35: Tabela de efeitos estimados para formação de produto..... 117
Tabela V.36: Tabela geral de efeitos das variáveis estudadas. 118
Tabela V.37: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fracionário composto central 119
Tabela V.38: Matriz do planejamento fatorial composto central. 120
Tabela V.39: Tabela de efeitos estimados para rendimento. 121
Tabela V.40: Tabela de efeitos estimados para conversão. 121
Tabela V.41: Tabela de efeitos estimados para produtividade..... 122
Tabela V.42: Análise de variância da resposta rendimento 122
Tabela V.43: Análise de variância da resposta conversão 122
Tabela V.44: Análise de variância da resposta produtividade 123

LISTA DE FIGURAS

Figura III.1: $\mu_i/\mu max$ plotado contra P/Pmax em função de n. 12

Figura IV.1: Esquema do processo fermentativo 21

Figura IV. 2: Fotografia do sistema de fermentação. 22

Figura IV.3: Fotografia da plataforma do biorreator utilizado nas fermentações. 23

Figura IV.4: Esquema do equipamento para microfiltração tangencial 24

Figura IV.5: Fotografia do sistema de filtração. 25

Figura IV.6: Filtração por fluxo tangencial 26

Figura IV.7: Sistema de fermentação com reciclo de células 34

Figura V.1: Comportamento do sistema fermentativo na temperatura de 28°C. 51

Figura V.2: Comportamento do sistema fermentativo na temperatura de 31°C. 51

Figura V.3: Comportamento do sistema fermentativo na temperatura de 34°C. 52

Figura V.4: Comportamento do sistema fermentativo na temperatura de 37°C. 52

Figura V.5: Comportamento do sistema fermentativo na temperatura de 40°C. 53

Figura V.6: Comportamento da concentração de biomassa total no processo batelada. 55

Figura V.7: Comportamento da concentração de substrato no processo batelada. 55

Figura V.8: Comportamento da concentração de etanol no processo batelada. 56

Figura V.9: Comportamento da concentração de glicerol no processo batelada. 56

Figura V.10: Comportamento da concentração de biomassa total no processo batelada e batelada alimentada estendida. 57

Figura V.11: Comportamento da concentração de substrato no processo batelada e batelada alimentada estendida. 57

Figura V.12: Comportamento da concentração de etanol no processo batelada e batelada alimentada estendida. 58

Figura V.13: Comportamento da concentração de glicerol no processo batelada e batelada alimentada estendida. 58

Figura V.14: Consumo de substrato no sistema batelada e batelada alimentada estendida na temperatura de 28°C. 60

Figura V.15: Consumo de substrato no sistema batelada e batelada alimentada estendida na temperatura de 31°C. 60

Figura V.16: Consumo de substrato no sistema batelada e batelada alimentada estendida na temperatura de 34°C. 61

Figura V.17: Consumo de substrato no sistema batelada e batelada alimentada estendida na temperatura de 37°C. 61

Figura V.18: Consumo de substrato no sistema batelada e batelada alimentada estendida na temperatura de 40°C. 62

Figura V.19: Ajustes dos dados experimentais através da função sigmoidal em: (a) Biomassa viável por tempo; (b) Concentração de açúcares redutores totais por tempo; (c) concentração de etanol por tempo e (d) concentração de glicerol por tempo 64

Figura V.20: Gráfico de μs versus μs não considerando produto. 68

Figura V.21: Gráfico de 1/Ysx versus 1/μx não considerando produto 69

Figura V.22: Gráfico de μs versus μs considerando produto 69

Figura V.23: Gráfico de 1/Ysx versus 1/μx considerando produto. 70

Figura V.24: Modelagem cinética do processo batelada na temperatura de 28°C. 72

Figura V.25: Modelagem cinética do processo batelada na temperatura de 31°C. 73

Figura V.26: Modelagem cinética do processo batelada na temperatura de 34°C. 74

Figura V.27: Modelagem cinética do processo batelada na temperatura de 37°C. 75

Figura V.28: Modelagem cinética do processo batelada na temperatura de 40°C. 76

Figura V.29: Variação de μmax em relação à temperatura. 77

Figura V.30: Variação de Xmax em relação à temperatura. 78

Figura V.31: Variação de Pmax em relação à temperatura 78

Figura V.32: Variação de Yx em relação à temperatura 79

Figura V.33: Variação de α em relação à temperatura. 80

Figura V.34: Valores calculados de Yx em função da temperatura. 81

Figura V.35: Valores calculados de mx em função da temperatura. 81

Figura V.36: Modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida na temperatura de 28°C. 84

Figura V.37: Modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida na temperatura de 31°C. 85

Figura V.38: Modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida na temperatura de 34°C. 86

Figura V.39: Modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida na temperatura de 37°C. 87

Figura V.40: Modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida na temperatura de 40°C. 88

Figura V.41: Variação de Ki em relação à temperatura. 89

Figura V.42: Variação de Yx em relação à temperatura 90

Figura V.43: Variação de α em relação à temperatura. 90

Figura V.44: Variação de Kp em relação à temperatura 91

Figura V.45: Comportamento da concentração de biomassa viável na simulação do processo. 94

Figura V.46: Comportamento da concentração de substrato na simulação do processo. 94

Figura V.47: Comportamento da concentração de etanol na simulação do processo. 95

Figura V.48: Comportamento do rendimento na simulação do processo. 96

Figura V.49: Comportamento da conversão na simulação do processo 96

Figura V.50: Comportamento da produtividade na simulação do processo. 97

Figura V.51: Otimização do rendimento do processo através da simulação. 98

Figura V.52: Otimização da conversão do processo através de simulação. 99

Figura V.53: Otimização da produtividade do processo através da simulação 100

Figura V.54: Efeitos das variáveis analisadas no Planejamento saturado 113

Figura V.55: Efeitos das variáveis analisadas no Planejamento saturado 113

Figura V.56: Efeitos das variáveis analisadas no planejamento fatorial fracionário 118

Figura V.57: Superfícies de respostas para o rendimento em função da: (a) temperatura e da taxa de diluição com So no nível 0; (b) concentração de substrato na alimentação e da temperatura com D no nível 0 e (c) concentração de substrato na alimentação e da taxa de diluição com T no nível 0 124

Figura V.58: Superfícies de respostas para a conversão em função da: (a) temperatura e da taxa de diluição com So no nível 0; (b) concentração de substrato na alimentação e da temperatura com D no nível 0 e (c) concentração de substrato na alimentação e da taxa de diluição com T no nível 0 125

Figura V.59: Superfície de resposta para o rendimento em função da temperatura e da taxa de diluição com a concentração de substrato na alimentação no nível −1.68 126

Figura V.60: Superfície de resposta para a conversão em função da temperatura e da taxa de diluição com a concentração de substrato na alimentação no nível −1.68 126

Figura V.61: Superfície de resposta para a produtividade em função da temperatura e da taxa de diluição. 126

Figura V.62: Otimização das resposta de rendimento e produtividade. 127

a	Constantes empíricas
b	Constantes empíricas
D	Taxa de diluição (F/V)
F	Vazão de alimentação do reator
Kd	Constante global de morte celular
Kp	Constante de morte celular devido a concentração de etanol
Kt	Constante de morte celular devido a temperatura
Ki	Constante de inibição pelo substrato
Ks	Constante de Monod
m	Expoente da equação de inibição pela biomassa
n	Expoente da equação de inibição pelo produto
mp	Coeficiente de produção de etanol associada a massa celular
mx	Coeficiente de manutenção
P	Concentração de etanol no fermentador
Pi	Concentração de etanol na alimentação (modelagem matemática)
Pi	Concentração de etanol no instante do processo (planejamentos experimentais)
Pmax	Máxima concentração de etanol na qual cessa o crescimento
rx	Velocidade de crescimentos celular
rd	Velocidade de morte celular
rp	Velocidade de formação de produto
rs	Velocidade de consumo de substrato
S	Concentração de ART no reator
S	Concentração de ART no instante inicial de fermentação
So	Concentração de ART na alimentação
T	Temperatura
V	Volume útil do sistema de fermentação
X	Concentração de biomassa no reator
Xd	Concentração de células mortas
Xi	Concentração de células em relação ao tempo inicial do processo
Xmax	Máxima concentração de biomassa na qual cessa o crescimento celular
Xo	Concentração de células na saída do sistema

Xt	Concentração de células totais
Xv	Concentração de células viáveis
Yp	Coeficiente estequiométrico
Ypx	Coeficiente de produção de etanol associado ao crescimento celular
Yps	Rendimento do processo
Yxs	Taxas de conversão de substrato por concentração de microrganismo
Yx	Rendimento Limite

Gregas

α	Produção de etanol associada com o crescimento celular
β	Produção de etanol associada com a concentração celular
γ	Relação entre o a concentração de etanol intracelular e extracelular
μ	Velocidade específica de crescimento
μmax	Velocidade específica máxima de crescimento celular
ρ	Relação de massa seca pelo volume de massa única

Subscrito

in	entrada no sistema fermentativo
out	saída do sistema fermentativo

RESUMO

O avanço tecnológico da indústria alcooleira no Brasil nas décadas de 70 e 80, foi fruto do programa "Proálcool", lançado pelo governo brasileiro com o objetivo de substituir a gasolina derivada do petróleo, consumida pelos veículos automotores, pelo etanol. O Brasil se tornou então o maior produtor mundial de etanol por via fermentativa. Apesar disto, os estudos encontrados na bibliografia têm como base um processo isotérmico. Em condições reais de operação encontradas nas usinas, isso nem sempre é observado, entretanto, o estudo do efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos que quantificam a reprodução e morte celular, o consumo de substrato e a produção de etanol são informações importantes para a elaboração de estratégias de controles mais eficientes nas usinas.

Diante destes fatos o objetivo deste trabalho foi a obtenção de um modelo cinético estudando o efeito da temperatura em fermentação alcoólica com alta densidade celular, com a convalidação dos parâmetros cinéticos e de conversão considerando o efeito inibitório exercido pela concentração de biomassa, substrato e de etanol no processo fermentativo.

Os experimentos foram conduzidos em fermentação batelada e batelada alimentada estendida com *Saccharomyces cerevisiae*, nas temperaturas de 28°C a 40°C. O acompanhamento analítico se deu através de análises de sacarose, glicose, frutose e etanol por HPLC, de massa seca por gravimetria e de células viáveis por microscopia.

Como resultado obteve-se um modelo matemático que descreveu satisfatoriamente o processo fermentativo nestas faixas de temperatura e de densidade celular. Foi possível realizar diversas simulações do processo para analisar o comportamento do processo em diversas condições.

A otimização e simulação do processo mostraram que alto rendimento, conversão e produtividade são conseguidos quando se trabalha com temperaturas de 28°C a 34°C e entre as taxas de diluições de 0.08 a 0.13 h^{-1} com rendimento, conversão e produtividade superiores a 90% 0.93 e 8.5 g/L/h, respectivamente.

ABSTRACT

The technological progress of the alcohol industry in Brazil in the decades of 70 and 80 was the result of the "Próalcool" program, developed by the Brazilian government to substitute gasoline, derived from petroleum, by ethanol. Brazil has then become the largest ethanol world producer by fermentation.

Because there is a great difficulty in maintaining a constant temperature during industrial alcoholic fermentation, the majority of the kinetic studies found in the literature, which are based on an isothermical process, can lead to errors when used to describe the dynamic behavior of an industrial plant. This is why the study of the effect of the temperature in the kinetic parameters that describe cell growth and death, substrate consumption and ethanol production is important to the development of efficient control strategies in the alcohol industries.

The objective of this work is to obtain a kinetic model considering the effect of the temperature in the alcoholic fermentation with high cellular density, besides authenticating kinetic and conversion parameters considering the inhibitory effect of biomass, substrate and ethanol in the fermentation process.

Experiments were performed in batch and extended fed-batch mode using *Saccharomyces cerevisiae* in a temperature range from 28 to 40°C. Sucrose, glucose, fructose and ethanol concentrations were measured by HPLC, dry cell weight was measured by gravimetry and viability was measured by microscopy.

The obtained kinetic model described the fermentation process well in the temperature and cellular density range considered. Simulations were performed to analyze the dynamic behavior of the process in many different conditions.

Process simulation and optimization have shown that high yield, conversion and productivity were attained in temperatures from 28 to 34°C with dilution rates from 0.08 to $0.13h^{-1}$. Yield, conversion and productivity higher than 90%, 0.93 and 8.5 g/L/h, respectively, were attained.

I. INTRODUÇÃO

Durante a década de 60 e 70, o consumo de petróleo cresceu rapidamente devido principalmente a ampliação da indústria petroquímica, a substituição do carvão mineral e vegetal por combustíveis líquidos e o desenvolvimento dos parques industriais dos países em desenvolvimento. Fisicamente o petróleo é uma matéria-prima abundante, não renovável e de distribuição desigual.

Sob o aspecto sócio econômico é um grande gerador e concentrador de riquezas. Porém, segundo FRANCO (1999), o petróleo gera relativamente poucos empregos e provoca danos ambientais desde a sua extração até o seu uso como matéria-prima industrial. A instabilidade política vivida em virtude da guerra do Oriente Médio, na década de 70, elevou o preço do barril, acarretando assim, uma crise energética mundial, mostrando a necessidade de se desenvolver alternativas para os países e regiões pobres nesse recurso e que podem se beneficiar de outros fatores de produção.

Em 1975, o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Álcool (PROÁCOOL), que concedeu incentivos financeiros para a produção de álcool com a finalidade de diminuir o consumo brasileiro de petróleo através da substituição da gasolina pelo etanol como combustível dos veículos automotores. Porém, com o fim dos subsídios no final da década de 80, o setor sucroalcooleiro passou por uma grande crise devido principalmente aos baixos preços do barril de petróleo que inviabilizaram a produção de etanol. Com a alta do preço do petróleo, que passou de US$10 para quase US$25 em agosto de 1999, com o ajuste cambial e os ganhos de produtividade do setor, o custo de produção de álcool tornou-se menor que o preço da gasolina na refinaria (FURTADO, 1999).

O álcool é uma produção local, que gera divisas em exportações, gera empregos e desenvolve a tecnologia nacional. Atualmente, cerca de 20% dos veículos que circulam no país são movidos a álcool e o restante consome uma mescla de gasolina com 24% de álcool anidro para o aumento de sua octanagem, em substituição ao chumbo que causa problemas ambientais. Segundo FURTADO (1999) com dados da safra de 98/99 o Brasil é o maior produtor mundial de cana - de - açúcar, de açúcar e de etanol por via fermentativa, com

uma produção de 13,8 bilhões de litros. ANDRIETTA (1994) cita que apesar disto, uma grande parte de suas unidades produtoras apresentam falhas tanto de projeto quanto operacionais por desconhecer a cinética do processo no dimensionamento dos reatores e trocadores de calor.

Segundo ALVES (1996), as primeiras indústrias brasileiras produtoras de etanol estavam vinculadas a usinas de açúcar e usavam o melaço, subproduto da fabricação de açúcar, como matéria–prima. Até o início dos anos 60, as indústrias de álcool utilizavam o processo clássico ou batelada, de baixa produtividade. Com o surgimento do Proálcool, muito se investiu no setor alcooleiro e como conseqüência, um grande número de projetos de novos processos surgiram. ANDRIETTA E STUPELLO (1990) comentam que o processo contínuo de múltiplos estágios e o processo batelada alimentada estendido vêm ganhando espaço nos últimos anos, sendo que, ainda hoje, o processo mais utilizado é o sistema batelada alimentada (Melle – Boinot), desenvolvido na França na década de 30.

O processo batelada e batelada alimentada são menos produtivos quando comparados com o processo contínuo, ou batelada alimentada estendida. SIQUEIRA (1997) afirma que a fermentação contínua é um processo que requer maior conhecimento do comportamento do microrganismo no meio ambiente onde ele atua. Fatores como temperatura, pH, concentração alcoólica, concentração de biomassa, viabilidade e outros influenciam na produtividade do sistema, requerendo assim maior controle sobre o processo.

A operação com altas densidades celulares no meio de cultura, segundo CARVALHO (1996), tem se tornado uma técnica promissora no ganho de produtividade e redução de custos de produção.

As maiorias dos estudos encontradas na bibliografia têm como base um processo isotérmico. Em condições reais de operação encontradas nas usinas brasileiras, isso nem sempre é observado e logo, o estudo do efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos que quantificam a reprodução e morte celular, o consumo de substrato e a produção de etanol são informações importantes para a elaboração de estratégias de controles mais eficientes nas usinas.

II. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de um modelo cinético que descrevesse satisfatoriamente o crescimento do microrganismo, o consumo de substrato e a formação de produto através da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para isso as seguintes etapas foram realizadas:

- estudo do efeito da temperatura com alta densidade celular em sistema batelada e batelada alimentada estendida;
- modelagem matemática do processo e convalidação dos parâmetros;
- simulações do processo fermentativo;
- otimização do processo fermentativo em relação ao rendimento, a conversão e a produtividade.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1. PERSPECTIVAS DO SETOR SUCROALCOOLEIRO

Segundo FURTADO (1999) a alta do preço do petróleo deu um novo ânimo para as destilarias, que depois de uma queda brutal de preços começaram a recuperar o valor do álcool, tendo como efeito imediato a retomada da produção de carros a álcool pela industrias nacional. Segundo dados da Anfavea, a produção de carros a álcool em 1998 foi de apenas 0,1% do total de veículos produzidos, em 1999 este valor deve ter um pequeno aumento chegando a 0,6%. O carro a álcool representa 20% da frota automotiva nacional e atualmente o álcool anidro é utilizado como aditivo no combustível derivado do petróleo na proporção de 24%. O governo está estudando o aumento da adição de etanol na gasolina para 26% e a adição de 3% de etanol no óleo diesel.

Para atender o aumento da demanda, já perceptível com a volta da produção de carros, o setor se organiza e adota a autogestão, que visa manter o crescimento do setor por um longo período. A autogestão consiste em quatro medidas que estabelecem uma política industrial sucroalcooleira.

Em primeiro lugar, criaram mecanismo de pagamento da cana – de – açúcar para corrigir distorções pós-liberação do preço do álcool, instituindo um cálculo para estipular o valor da cana baseado nos preços da remuneração de açúcar e álcool. Outra ação visa prevenir o setor de mais uma perigosa escassez de álcool combustível no mercado, mantendo um estoque estratégico de combustível de 2 meses. Criaram a Bolsa Brasileira do Álcool (BBA), com a finalidade de centralizar a venda de álcool feita para as distribuidoras de combustível, para impedir a diminuição dos preços. A quarta medida seria começar a trabalhar com vendas futuras, operando por meio de operações na Bolsa de Mercadoria e Futuro, planejando assim, a oferta de cana em consonância com a produção de álcool e açúcar (FURTADO, 1999).

WHEALS *et al.* (1999) comentam que após 25 anos somente o Brasil, os Estados Unidos e o Canadá produzem grandes quantidades de etanol combustível, e que o uso do etanol como aditivo nos combustíveis reduz a emissão de monóxido de carbono, óxido de nitrogênio e hidrocarbonetos. Citam também que a União Européia recomenda a utilização de 5% de etanol em toda gasolina antes de 2010. A tabela III.1 apresenta os valores das formulações dos combustíveis utilizados em diversos países com relação à concentração de etanol.

Tabela III.1: Formulações de combustíveis em relação a quantidade de etanol

Combustível*	Etanol (%v/v)
Etanol hidratado (Brasil)	95,5
E85 (América do Norte)	85
Gasolina (Brasil)	24
E10 (gasohol) (América do Norte)	10
Combustível oxigenado (USA)	7,6
Gasolina Reformulada (USA)	5,7
Biodisel (Suecia)	15

*etanol hidratado contem 4,5%v/v de água, os demais contem hidrocarbonetos e traços de água.

III.2. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL

SIQUEIRA (1997) cita que em escala industrial, as leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Schizosacharomyces* são as mais usadas. Entretanto, muitos microrganismos apresentam etanol como um dos produtos de seu metabolismo.

Recentemente, a bactéria gram – negativa *Zimomonas mobilis*, devido a sua maior taxa específica de consumo de substrato e produção de etanol, tem sido usada no lugar de leveduras na fermentação alcoólica (HUANG e CHEN, 1988).

MELO CRUZ e BORZANI (1980) resumiram as principais características das bactérias do gênero *Zimomonas*:

- crescimento em uma faixa ótima de pH de 4.5 – 6.5
- temperatura favorável de crescimento entre 25°C e 31°C
- anaeróbias facultativas, suportando um certo grau de aerobiose na presença de açúcares fermentescíveis.

SIQUEIRA (1997) apresenta através da tabela III.2, alguns tipos de microrganismo que são capazes de sintetizar álcool em seu metabolismo.

Tabela III.2: Tipos de microrganismo produtores de etanol a partir de carboidratos

Microrganismo	Substrato	Principais Metabólitos
Saccharomyces cerevisiae	Hexoses	Etanol, CO_2
Zimomonas mobilis	Hexoses	Etanol, CO_2
Ruminococus albus	Celulose e hemicelulose	Etanol, CO_2 e ácido acético
Clostridium thermosacharolyticum	Pentoses	Etanol, CO_2, ácido acético e ácido láctico
Bacillus macerans	Amido, hexoses	Etanol, CO_2 e acetonas
Erwinia amylovora	Hexoses	Etanol, CO_2 e ácido láctico
Leuconostoc mesenteroides	Pentoses	Etanol, CO_2 e ácido láctico

III.3. PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Os processos fermentativos para produção de etanol podem ser conduzidos de dois modos distintos: por processos descontínuos ou em bateladas e por processos contínuos.

III.3.1. PROCESSO BATELADA ALIMENTADA OU MELLE – BOINOT

Um grande avanço na produção industrial de etanol foi alcançado na década de 30, quando surgiu na França o processo Melle – Boinot. Segundo ALMEIDA (1960) citado por ANDRIETTA (1994) o processo possui as seguintes vantagens:

- economia de açúcar devido à menor reprodução celular, elevando o rendimento de etanol;
- eliminação de contaminantes pela centrifugação do meio fermentado (separação de células de levedura);
- fermentação mais pura devido ao tratamento do leite de levedura (tratamento ácido);
- eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do "pé – de – cuba", prática exigida no processo clássico, diminuindo portanto a complexidade das operações na planta;
- grande potencial para a automação de processos e redução de custos operacionais.

CARVALHO (1996) explica que teoricamente o processo se baseia na alimentação contínua e crescente de substrato ao fermentador (sem purga e até que se atinja o volume máximo), seguindo a taxa de crescimento de massa celular e consequentemente taxa de consumo de substrato, de maneira que a concentração de açúcares total permaneça constante.

III.3.2. PROCESSOS BATELADA ALIMENTADA ESTENDIDA

O processo batelada alimentada estendida é um processo intermediário entre o batelada alimentada e o contínuo. As modificações realizadas no processo Melle – Boinot deixaram o sistema fermentativo contínuo, porém com reciclo total de células. Desta forma, mantêm-se altas concentrações celulares e o etanol produzido é constantemente retirado do sistema. A concentração celular tende a crescer continuamente. No entanto, a prática demostra que um patamar é atingido, onde a concentração se mantém constante.

III.3.3. PROCESSOS CONTÍNUOS

Com o esgotamento tecnológico do processo batelada alimentada, Melle – Boinot, a fermentação alcoólica contínua se firmou como uma alternativa industrial viável. (CARVALHO, 1996). SIQUEIRA (1997) explica que 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 recirculação de células. A separação de biomassa no mosto pode ser elaborada por vários métodos, como por exemplo, a centrifugação, a filtração, a separação por membranas, etc.

ANDRIETTA (1994) cita as vantagens dos processos fermentativos contínuos como sendo:

- maior produtividade;
- maior uniformidade do produto;
- maior adaptabilidade ao controle automático.

SIQUEIRA (1997) comenta alguns pontos negativos da fermentação contínua:

- dificuldade de manutenção de um meio estéril por muito tempo;
- ocorrência de mutantes não interessantes ao processo de fermentação especialmente quando estes são conduzidos por longos períodos de tempo.

Segundo ANDRIETTA *et al.* (1994), o processo de fermentação contínua começou a ser utilizado industrialmente no Brasil no final da década de 70, mas somente na metade da década de 80 é que realmente se consolidou como uma alternativa à produção de etanol.

No processo batelada alimentada e contínuo, o efeito inibitório do substrato é menor, uma vez que há uma alimentação contínua do mosto, mantendo-se a concentração de substrato em níveis mais baixos. ALVES (1996) afirma que o processo contínuo possui maior produtividade que o processo descontínuo, devido à ausência de paradas para carga, descarga e limpeza dos tanques de fermentação e também pelas células estarem mais adaptadas ao meio.

III.4. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Segundo CARVALHO (1996), o objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é o de quantificar as taxas de crescimento celular, de consumo de substrato, formação de produto e demais parâmetros relacionados, além de verificar a influência de outros fatores como pH, temperatura e inibidores sobre estas taxas. No caso da fermentação alcoólica, estes valores são essenciais para o projeto adequado de uma unidade industrial de produção de etanol e para melhor entender o seu comportamento.

III.4.1. MODELOS CINÉTICOS

Segundo BAYLEY e OLLIS (1986), os modelos cinéticos usados em fermentação podem ser divididos em:

- Não estruturados e não segregados: a população celular é considerada como soluto monocomponente;
- Estruturado e não segregado: as células são consideradas multicomponentes com composição média semelhante;
- Não estruturados e segregados: as células são consideradas como indivíduos heterogêneos, porém descritos por um único componente e
- Estruturados e segregados: as células são elementos distintos e descritas por multicomponentes.

Segundo ANDRIETTA (1994), o tipo de modelo mais encontrado na literatura para descrever a fermentação alcoólica é o não estruturado e não segregado.

Embora o mecanismo de crescimento de microrganismo seja um conjunto de reações complexas, é possível representar este crescimento por modelos relativamente simples. A equação mais simples que representa este fenômeno é a equação proposta por MONOD.

$$\mu = \mu\max \cdot \left(\frac{S}{Ks + S} \right) \quad (1)$$

onde μmax e Ks são as velocidades específica máxima de crescimento do microrganismo e a constante de MONOD, respectivamente.

Esta equação demostra que a velocidade específica de crescimento μ é uma função da concentração de substrato limitante e é valida somente para sistemas que não possuam efeitos inibidores significativos, ou seja, para baixas concentrações de etanol e de biomassa no meio fermentativo.

III.4.2. CINÉTICA DE INIBIÇÃO

LUONG (1985) afirma que durante o processo de fermentação alcoólica o etanol acumula no meio fermentativo até que a atividade metabólica do microrganismo cesse, pois a presença de etanol diminui o valor da velocidade específica de crescimento. A equação (1) pode ser então representada da seguinte forma:

$$\mu = \mu_I \cdot \left(\frac{S}{Ks + S} \right) \quad (2)$$

onde μ_I é um fator de correção que leva em consideração a interferência da concentração de etanol sobre a velocidade específica máxima de crescimento.

Vários modelos cinéticos foram propostos para verificar a correlação entre $\mu_I/\mu max$ e a concentração de etanol durante o processo fermentativo.

Quatro tipos de correlações foram apresentados por LUONG (1985), que mostram a dependência de μ_I com concentração de etanol, sendo elas:

- **Relação Linear:**

$$\mu_I = \mu\max - K_1 \cdot P = \mu\max \cdot \left(1 - \frac{P}{P\max}\right) \tag{3}$$

onde K_I é uma constante empírica e Pmax (=$\mu max/K_I$) é a concentração de etanol na qual as células não apresentam crescimento.

- **Relação Exponencial:**

$$\mu_I = \mu\max \cdot \exp(-K_2 \cdot P) \tag{4}$$

onde K_2 é uma constante empírica dependente do método de cultivo, batelada ou contínuo.

- **Relação Hiperbólica:**

$$\mu_I = \mu\max \cdot \frac{1}{1 + P/K_3} \tag{5}$$

onde K_3 é uma constante empírica.

- **Relação Parabólica:**

$$\mu_I = \mu\max \cdot \left(1 - \frac{P}{P\max}\right)^{0.5} \tag{6}$$

As equações (3) e (6) não ajustaram satisfatoriamente bem os dados experimentais. As equações (4) e (5) assumem que o crescimento ocorre e que as células são capazes de produzir etanol indefinidamente. Neste caso μ_I se aproxima de zero quando a concentração de produto P se aproxima de infinito. Na realidade, existe um limite de concentração de etanol na qual cessa o crescimento celular e a formação de produto.

- **Relação não linear generalizada:**

LEVENSPIEL (1980) propôs a seguinte relação não linear generalizada:

$$\mu_I = \mu\max \cdot \left(1 - \frac{P}{P\max}\right)^n \tag{7}$$

A equação (7) vem sendo amplamente utilizada nos últimos anos, pois pode se aproximar das equações (3) a (6) de várias maneiras. Quando a constante empírica n for igual a 1, a equação (7) torna-se idêntica à equação (3), quando n > 1, a equação (7) fica semelhante as equações (4) e (5) e quando n < 1, a equação (7) se aproxima da equação proposta por BAZUA e WILKE (1977):

$$\mu_I = \mu\max \cdot \frac{a \cdot P}{b - P} \tag{8}$$

onde a e b são constantes empíricas.

A figura III.1 apresenta um gráfico de $\mu_I/\mu max$ plotado contra P/Pmax em função de n. Pode-se observar que μ_I aproxima-se de μmax quando a concentração de etanol se aproxima de zero, ou seja, não existe efeito inibitório no metabolismo celular pronunciado pelo etanol e a equação (7) torna-se idêntica a equação proposta por MONOD. O crescimento celular é completamente inibido quando a concentração de etanol se aproxima de Pmax, máxima concentração de etanol em que é observada atividade metabólica celular.

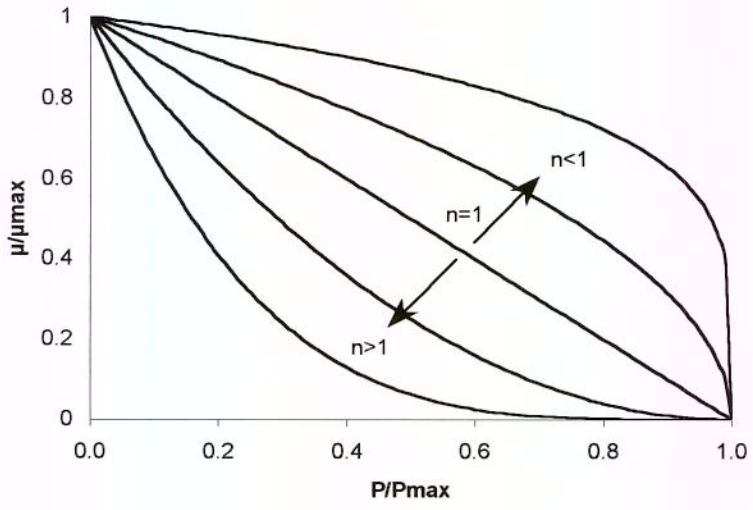


Figura III.1: μ_i/μmax plotado contra P/Pmax em função de n.

LUONG (1985) propôs uma relação semelhante à não linear generalizada de LEVENSPIEL (1980) para descrever a dependência de μ_I com a concentração de produto.

$$\mu_I = \mu\max \cdot \left[1 - \left(\frac{P}{P\max}\right)^n\right] \tag{9}$$

Substituindo a equação (7) na equação (2), obtêm-se a seguinte relação:

$$\mu = \mu\max \cdot \left(\frac{S}{Ks + S}\right) \cdot \left(1 - \frac{P}{P\max}\right)^n \tag{10}$$

III.4.3. MODELOS CINÉTICOS PARA ALTA DENSIDADE CELULAR

LAFFORGUE *et al.* (1987), LEE e CHANG (1987), CHANG *et al.* (1993) e MELZOCH *et al.* (1991) estudaram o efeito da alta concentração celular no estudo de modelos cinéticos. LAFFORGUE *et al.* (1987), obtiveram 345 Kg/m^3 de biomassa no reator com reciclo de células através de membrana, porém verificaram que em alta densidade celular, surgiram modificações na viscosidade do meio, na água intracelular, no tamanho das células e nas particularidades morfológicas do microrganismo.

LEE e CHANG (1987) conseguiram uma máxima concentração de células no meio fermentativo de 210 g/L, utilizando membrana no reciclo de células, porém citam enormes dificuldades operacionais por causa da viscosidade do meio.

CYSEWSKI e WILKE (1978) observaram que em fermentação alcoólica com alta densidade celular ocorria um efeito inibitório da concentração celular no próprio crescimento do microrganismo. Verificaram também que a relação linear entre a taxa específica de crescimento e a concentração celular não apresentava um bom ajuste.

JARZEBSKI *et al.* (1989) trabalharam com modelagem em altas concentrações celulares e propuseram um modelo semelhante à relação não linear generalizada proposta por LEVENSPIEL (1980).

$$\mu_I = \mu\max \cdot \left(1 - \frac{X}{X\max}\right)^m \tag{11}$$

onde m é uma constante empírica e Xmax é a concentração máxima de células no meio na qual é observada atividade metabólica pelo microrganismo.

Associando-se a equação (11) à equação (10), obtêm-se uma relação para a taxa de crescimento celular em função dos efeitos de inibição da concentração de produto e da concentração celular.

$$\mu = \mu\max \cdot \left(\frac{S}{Ks + S}\right) \cdot \left(1 - \frac{P}{P\max}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X\max}\right)^m \tag{12}$$

A equação (12) foi utilizada por SIQUEIRA (1997), ALVES (1996), ANDRIETTA (1994) e CARVALHO (1996) para modelagem de processos fermentativos, com um bom ajuste aos dados experimentais.

III.4.4. PARÂMETROS CINÉTICOS

Na literatura pode ser encontrada uma variedade muito grande de valores para os parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica. Esta variação de parâmetros acontece devido ao tipo de microrganismo utilizado, das condições experimentais, como temperatura e meio de cultivo, das condições fisiológicas, entre outros.

A tabela III.3, apresenta alguns valores de parâmetros cinéticos levantados em bibliografia conforme citados por DOURADO *et al.* (1987).

Tabela III.3: Valores de alguns parâmetros cinéticos citados na literatura

Modelo	Parâmetros		Autores/Microrg.
$\mu = \mu\max\left(1-\frac{P}{P\max}\right)\frac{S}{Ks+S+S^2/\lambda}$ $v_S = -\frac{v_P}{Yps}$ $v_P = v_O\left(1-\frac{P}{P'm}\right)\frac{S}{K's+S+S^2/\lambda'}$	$\mu\max = 0.4\ h^{-1}$ Ks = 0.48 g/L $\lambda = 205.2$ g/L Pmax = 87 g/L Yps = 0.48	$v_O = 1.4\ h^{-1}$ P'm = 114 g/L $\lambda' = 303$ g/L K's = 0.66 g/L	GHOSE and THYAGI (1979) *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y132
$\mu = \mu\max\left(\frac{S}{Ks+S}\right)\left(\frac{Kp}{Kp+P}\right)\left(1-\frac{P}{P\max}\right)$ $v_S = -\frac{v_P}{Yps} - \frac{\mu}{Yx}$ $v_P = \alpha\mu + \beta$	$\mu\max = 0.3\ h^{-1}$ Ks = 5 g/L Kp = 4.5 g/L Pmax = 85 g/L	Yps = 0.5 Yx = 0.83 $\alpha = 13$ $\beta = 0.05\ h^{-1}$	SEVELEY *et al.* (1980) *Saccharomyces cerevisiae*
$\mu = \mu\max\left(\frac{S}{Ks+S}\right)\exp[-K_1P - K_2S]$ $v_S = -\frac{v_P}{Yps}$ $v_P = v_O\left(\frac{S}{Kp+S}\right)\exp[-K_3P - K_4S]$	$\mu\max = 0.453\ h^{-1}$ $K_1 = 0.06$ g/L K_2=0.0055 g/L $K_3 = 0.024$ g/L K_4=0.0013 g/L	Ks = 0.22 g/L Kp = 0.44 g/L Yp = 48 g/L $v_O = 1.657\ h^{-1}$	JIN, C. K. *et al.* (1983) *Saccharomyces sakekiokai*
$\mu = \mu_O\left(\frac{S}{Ks+S}\right)\left(1-\frac{P}{Pm}\right)^n\left(1-\frac{X}{Xm}\right)^m$ $v_S = -\frac{\mu}{Yxs}$ $v_P = \frac{\mu}{Yxp}$	$\mu_O = 0.24\ h^{-1}$ Ks = 1.6 g/L Pm = 90 g/L Xm = 100 g/L	n = 1 m = 1 Yxs = 0.06 Yxp = 0.16	LEE, M. J. *et al.* (1983)

Ks e Kp são constantes cinéticas;

K_1, K_2, K_3, K_4 e λ são constantes empíricas;

α e β expressam a parte de produção de etanol associada com o crescimento celular e a parte de produção de etanol combinada com a concentração celular, respectivamente;

Yxs, Yxp e Yps são taxas de transformações de consumo de substrato por concentração de microrganismo, formação de produto por concentração de microrganismo e transformação de produto por concentração de substrato, respectivamente.

III.4.5. EFEITO DA TEMPERATURA NOS PARÂMETROS CINÉTICOS

SIQUEIRA (1997) cita que as fermentações alcoólicas industriais são efetuadas em duas faixas de temperatura. Entre 7°C e 20°C, na fabricação de bebidas, principalmente vinhos e cervejas, e acima de 30°C, em processos de produção de etanol comercial. Segundo o mesmo autor a temperatura influencia os processos fermentativos de forma significativa, uma vez que estes processos são resultados de umas séries de reações químicas de equilíbrio. HUANG e CHEN (1988) afirmam que a viabilidade, o rendimento celular e o rendimento na produção de etanol para cultura em batelada diminuíram com o aumento da temperatura. O efeito inibitório exercido pela concentração de etanol aumenta também com a elevação da temperatura, afetando assim, a taxa de crescimento celular, a formação de produto e o consumo de substrato.

Recentemente, SIQUEIRA (1997), ALVES (1996), CARVALHO (1996) e ANDRIETTA (1994) estudaram a influência da temperatura nos parâmetros cinéticos em fermentação alcoólica. SIQUEIRA (1997) estudou o efeito da temperatura na cinética de fermentação alcoólica com alta densidade celular, obtendo um modelo cinético para uma ampla faixa de temperatura, de 28°C a 37°C. ALVES (1996) estudou a influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*. CARVALHO (1996) verificou o efeito da temperatura na cinética de morte celular em fermentação alcoólica contínua com reciclo de células.

JIMENEZ e VAN UDEN (1985) descrevem o comportamento da tolerância ao etanol da *Saccharomyces cerevisiae* em função da temperatura. Os resultados mostraram que para temperaturas intermediárias, entre as chamadas críticas inferiores (12°C) e superior (28°C), a tolerância ao etanol se mantém constante. Acima da temperatura crítica superior, a tolerância cai drasticamente com o aumento da temperatura e para temperaturas abaixo da crítica inferior, tem-se também a queda da tolerância, acompanhando a queda da temperatura. Segundo o mesmo autor, a tolerância ao etanol pode ser associada aos valores do parâmetro Pm.

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

$$\frac{dCi}{dt} = v = Ao \cdot \exp\left[-\frac{Ea}{RT}\right] \tag{13}$$

Onde:

DCi/dt – variação da concentração da espécie i com o tempo

Ao – velocidade à temperatura infinita

Ea – energia de ativação

T – temperatura

R – constante termodinâmica

ALVES (1996) descreve que em um modelo não estruturado, é normal expressar parâmetros das equações cinéticas como funções da temperatura do tipo ARRHENIUS. A equação de MONOD, equação (1), para crescimento celular, pode ser escrita na forma da equação (14), onde μmax(T) e Ks(T) são respectivamente a velocidade específica de crescimento máxima e constante de MONOD expressas em função da temperatura.

$$\mu = \mu\max(T) \cdot \left(\frac{S}{Ks(T) + S}\right) \tag{14}$$

De maneira análoga, a equação (12) pode ser representada da seguinte maneira:

$$\mu = \mu\max(T) \cdot \left(\frac{S}{Ks(T) + S}\right) \cdot \left(1 - \frac{P}{P\max(T)}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X\max(T)}\right)^m \tag{15}$$

A equação (15) foi utilizada por SIQUEIRA (1997) para verificar o efeito da temperatura na cinética da fermentação alcoólica contínua com alta densidade celular, e os parâmetros obtidos para uma faixa de temperatura de 28°C a 37°C foram:

Pmax = -9.8973T + 403.65

Yps = -0.0033T + 0.4124

Yxs = -0.0048T + 0.2127

Xmax = 63.8 g/L

n = 2

m = 4

ALVES (1996), estudando a influência da temperatura na cinética de crescimentos anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*, obteve os seguintes parâmetros para a equação (15):

$$P\max = 638.1 \cdot \exp[-0.05741 \cdot T] \quad \text{para } 30 < T < 38^{\circ} C$$

$$\mu\max = 4.181x10^{4} \cdot \exp\left[\frac{-3535}{T}\right] - 5.397x10^{69} \cdot \exp\left[-\frac{50475}{T}\right] \quad \text{para } 30 < T < 38^{\circ}C$$

Yxs = 0.098 gcel. seca/gART para $28 < T < 34^{\circ} C$

Yxs = 0.292. exp[-0.032.T] para $34 < T < 38^{\circ} C$

Ks = 4.1 gART/L para $28 < T < 38^{\circ} C$.

III.5. ALTA DENSIDADE CELULAR:

Segundo CHANG *et aL.* (1994), processos fermentativos com altas densidades celulares são processos de elevada produtividade, pois ocorre um grande aumento do número de células viáveis no sistema. SIQUEIRA (1997) afirma que surgem problemas inerentes em sistemas com altas densidades celulares, devido especialmente à dificuldade de transferência de oxigênio e nutrientes quando o mesmo atinge concentrações celulares superiores a 100 g/L.

Na literatura existem vários trabalhos e metodologias relacionadas com as altas densidades celulares. DAUGULIS e SWAINE (1987) afirmam que a imobilização é freqüentemente utilizada em reatores tubulares. GHOSE e TYAGI (1979) utilizaram o reciclo de células através do processo de floculação. VAN WIE *et al.* (1991) trabalharam com reciclo de células usando centrifugação e CHANG *et al.* (1994) e MELZOCH *et al.* (1991) utilizaram membranas internas e externas.

A tabela III.4 apresenta uma discussão das vantagens e desvantagens das técnicas de cultura com alta densidade celular conforme CHANG *et al.* (1994).

Tabela III.4: Vantagens e desvantagens de técnicas de cultura com alta densidade celular.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Imobilização	- Não ocorre lavagem "washout" em qualquer taxa de diluição - proteção das células contra tensões de cisalhamento - alta densidade no empacotamento	- baixa transferência de nutrientes e oxigênio. - Instabilidade na matriz de imobilização - Dificuldade de ampliação de escala
Reciclo de Células		
Sedimentação e Floculação	- equipamento simples - baixa necessidade energética - facilidade de ampliação de escala	- aplicável somente a culturas floculentas - taxa de diluição limitada pela velocidade de sedimentação - baixa densidade celular
Centrifugação	- aplicação industrial - aplicável para substrato rico em material particulado - utilizável em sistemas de grande porte.	- dificuldades de manter condições assépticas - custo alto - complexidade operacional
Membrana interna	- sem necessidade de circulação de líquidos - operação simples - alta densidade celular - homogeneidade no reator - facilmente esterelizável	- diminuição no fluxo filtrado devido à incrustações - limitação na área por volume de trabalho - não flexível
Membrana externa	- grande área de filtragem por volume de trabalho - facilidade de manutenção durante a operação - alta densidade celular	- necessidade de bomba de recirculação - esterilização difícil - diminuição no fluxo filtrado devido a incrustações - danos na célula por excesso de tensões - não homogeneidade no reator

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. MATERIAIS

IV.1.1. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado para a fermentação batelada alimentada estendida e batelada foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* cultivada no laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia de Alimentos da Unicamp. O microrganismo foi cedido pela Usina Santa Adélia e em estudos realizados por ALVES (1996), apresentou melhor crescimento quando comparada com outras cepas. A levedura é mantida em ágar inclinado P.D.A. (Potato Dextrose Agar) e é repicada periodicamente.

IV.1.2. MEIO DE CULTURA E INÓCULO

O meio utilizado na fermentação foi o melaço de cana-de-açúcar cedido pela Usina Éster diluído a 240 g/L de açúcares redutores totais (ART) e enriquecido com 1 g/L de extrato de levedura e 2.5 g/L de sulfato de amônio. A esterilização foi realizada em autoclave por 30 minutos a 121°C. Foram utilizados o antibiótico e o antiespumante de marcas comerciais Bussan e Aratrop, respectivamente.

O meio de cultura utilizado para o preparo do inóculo possui os seguintes compostos:

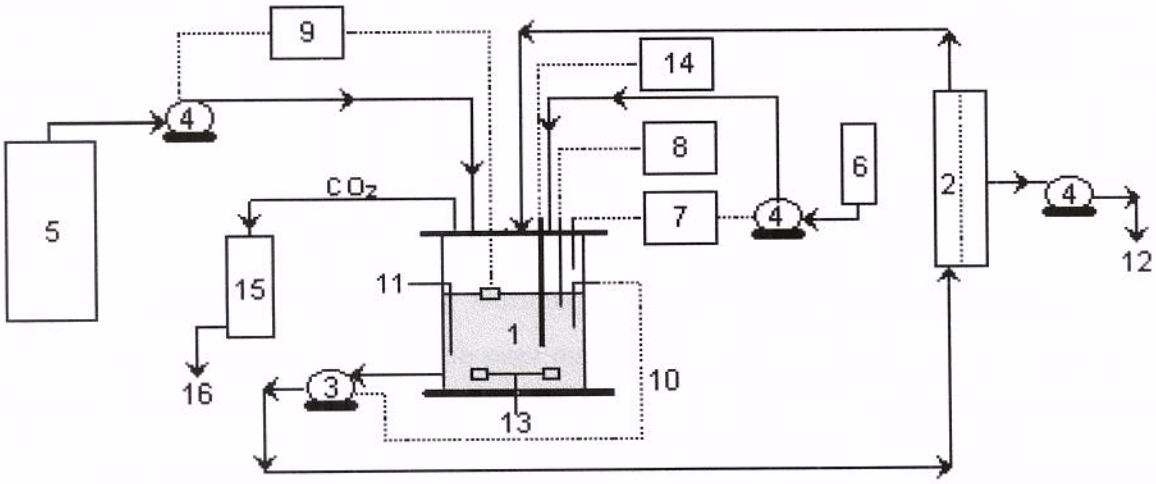
Glicose	50 g
KH_2PO_4	5.0 g
NH_4Cl	1.5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.7 g
KCl	1.2 g
Extrato de levedura	5.0 g
Água de torneira	1.0 L

O pH final do inóculo foi 6.0, sendo ajustado com ácido fosfórico concentrado.

O inóculo foi preparado esterilizando 200 ml de meio de cultura em um erlenmeyer aletado em autoclave por 15 minutos a 121° C. A inoculação com a levedura de *Saccharomyces cerevisiae* se deu em câmara de fluxo laminar (ambiente estéril) e incubada em frascos com agitação de 200 r.p.m. durante 24 horas na temperatura de 32°C.

IV.1.3. EQUIPAMENTOS

O processo fermentativo se deu em um sistema composto por um biorreator, filtros e bombas. A figura IV.1 apresenta o esquema do processo fermentativo e a figura IV. 2 mostra detalhes do sistema.



1 – Fermentador
2 – Microfiltro tangencial
3 – Bomba de recirculação do tipo helicoidal
4 – Bombas peristálticas
5 – Tanque de alimentação
6 – Reservatório de antiespumante
7 – Sensor de espuma
8 – Turbidímetro
9 – Controlador de nível
10 – Controle de nível mínimo da bomba
11 – Inoculador
12 – Saída de permeado
13 – Agitação
14 – Indicador de temperatura
15 – Reservatório de água
16 – Medida de volume de CO_2 liberado

Figura IV.1: Esquema do processo fermentativo

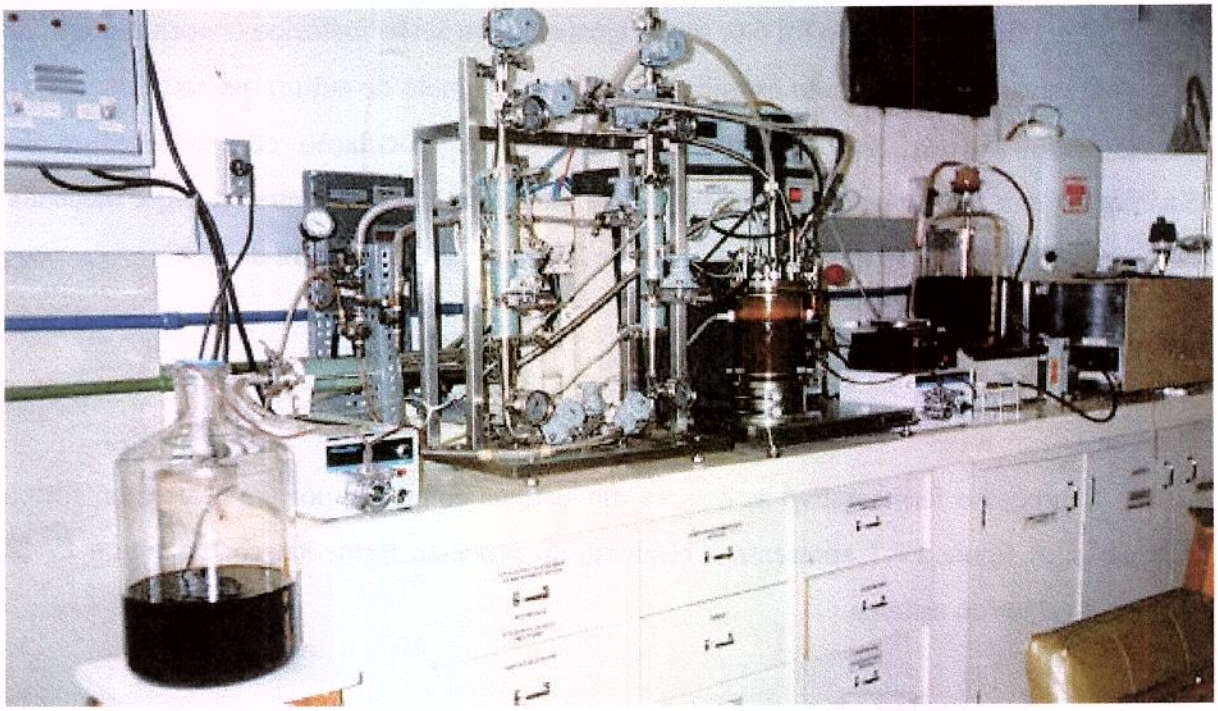


Figura IV. 2: Fotografia do sistema de fermentação.

IV.1.3.1. FERMENTADOR

O biorreator utilizado foi do tipo "Bioflow III System" produzido por "New Brunswick Co.". Este biorreator consiste em um vaso de vidro Pirex de aproximadamente 3 litros de volume útil, montado sobre uma base de controle que possibilita controlar algumas variáveis de processo como temperatura, pH, agitação, aeração, oxigênio dissolvido, nutrientes, vazão e adição de antiespumante. O resfriamento do fermentador é feito pelo acoplamento de um banho térmico com circulação de água. A figura IV.3 mostra detalhes da plataforma do fermentador utilizado.

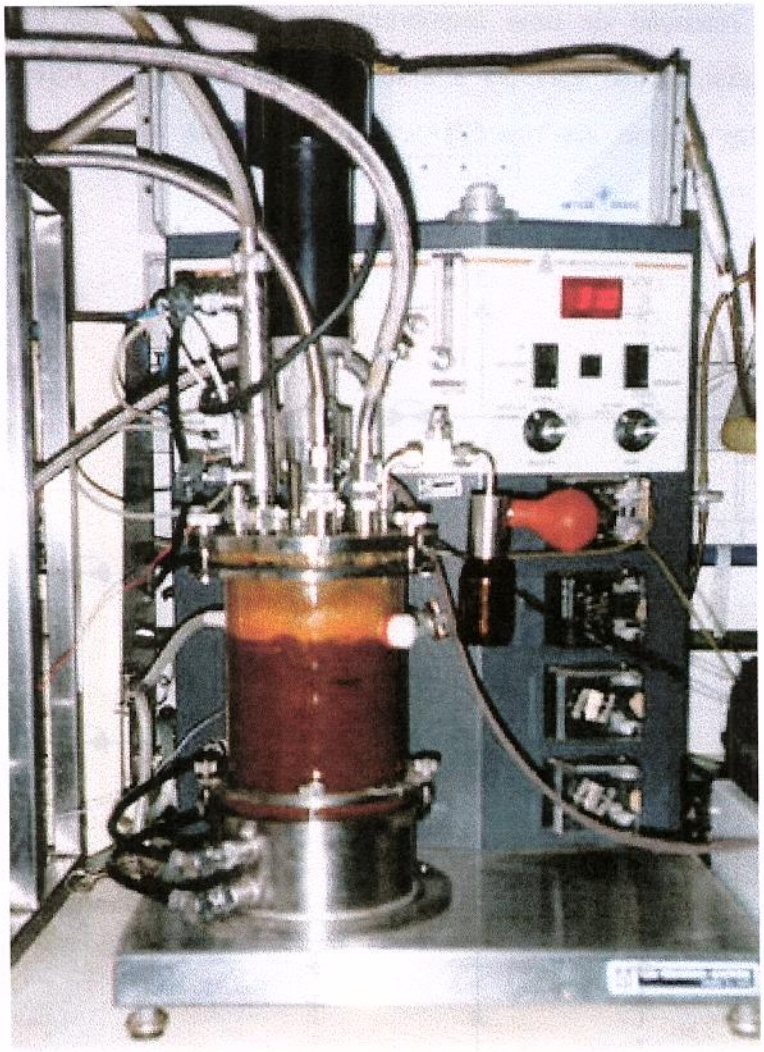


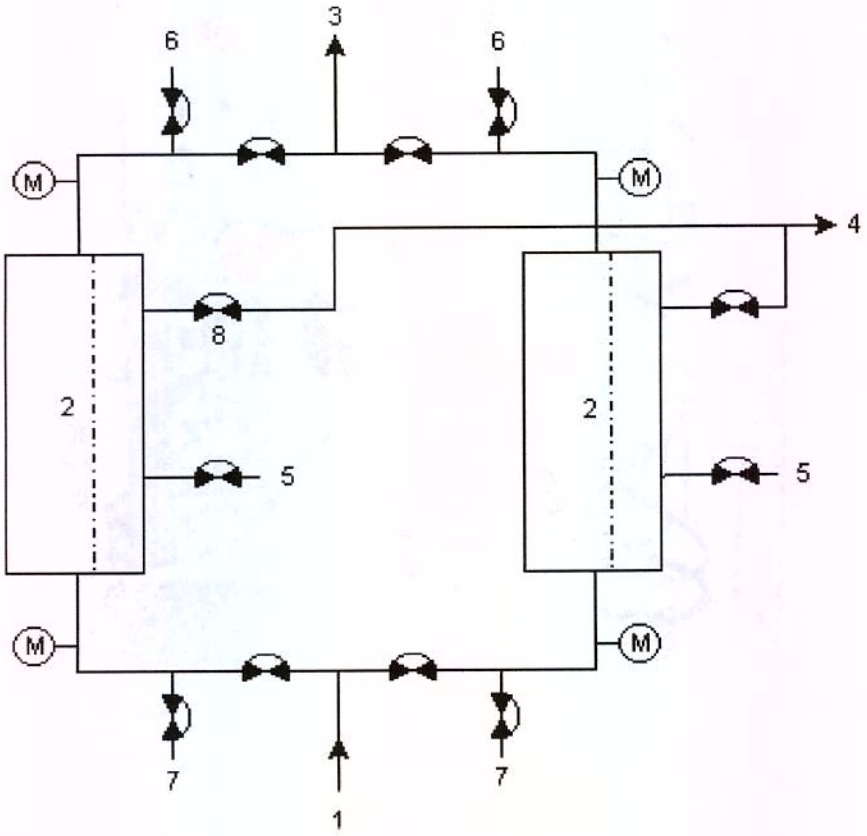
Figura IV.3: Fotografia da plataforma do biorreator utilizado nas fermentações.

IV.1.3.2. MICROFILTRO TANGENCIAL

As células foram recicladas através de um sistema de microfiltração tangencial projetado e construído pela "Millipore Co.", modelo "Ceraflow", conforme mostrado esquematicamente na figura IV.4 e na figura IV.5. A microfiltração é uma técnica usada para a separação de partículas em suspensão, baseada em seu tamanho.

Segundo CARVALHO (1996), o microfiltro é uma fina membrana permeável, suportada em material cerâmico, que retém partículas de um certo tamanho e permeia outras pequenas partículas dissolvidas ou suspensas, incluindo o solvente. Portanto, a

característica de retenção de uma membrana é função direta do diâmetro do poro. Membranas inorgânicas são estáveis a altas temperaturas e sob fortes tensões, o que significa que estas podem ser repetidamente esterilizadas no local e são ideais para operação à altas pressões.



1 – Fluxo de alimentação
2 – Membrana inorgânica
3 – Fluxo de meio retido
4 – Saída de permeado
5 – Dreno de permeado
6 – Entrada de vapor
7 – Saída de vapor condensado
8 – Válvula de diafragma ¾ pol., aço inox
M – Manômetros

Figura IV.4: Esquema do equipamento para microfiltração tangencial

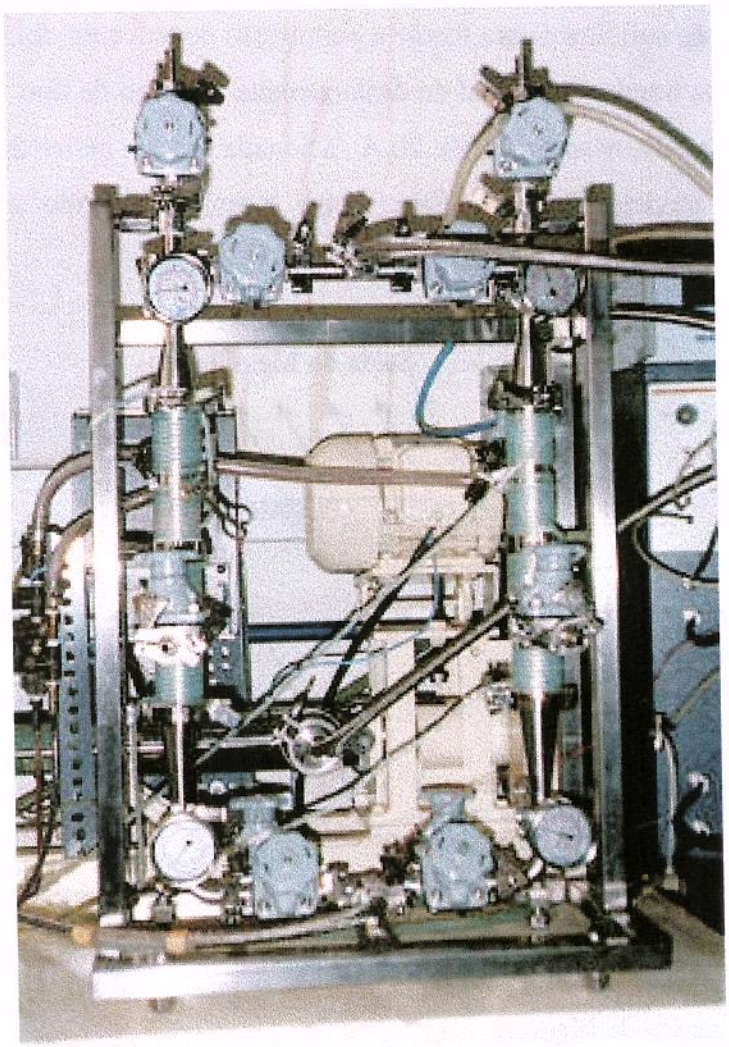


Figura IV.5: Fotografia do sistema de filtração.

Este sistema de filtração é constituído por duas unidades de filtração, cada uma com 0.2286m de comprimento, um elemento filtrante do tipo inorgânico externo feito de alumina de alta pureza, de 0.22 μm de poro e 0.0372 m^2 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 fluído pelo sistema de filtração.

O princípio da filtração é demostrado na figura IV.6, o qual se baseia no gradiente de pressão entre a parte interna do filtro e a parte externa, de modo que o permeado migre através dos poros do elemento filtrante. A circulação do meio fermentativo pelos orifícios

do filtro, com pressão suficiente para forçar a permeação do solvente, foi conseguida com o acoplamento de uma bomba helicoidal de deslocamento positivo do 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 estava submetido a um controlador programável de velocidade tipo "Baldor Series 11 Inverter Drive".

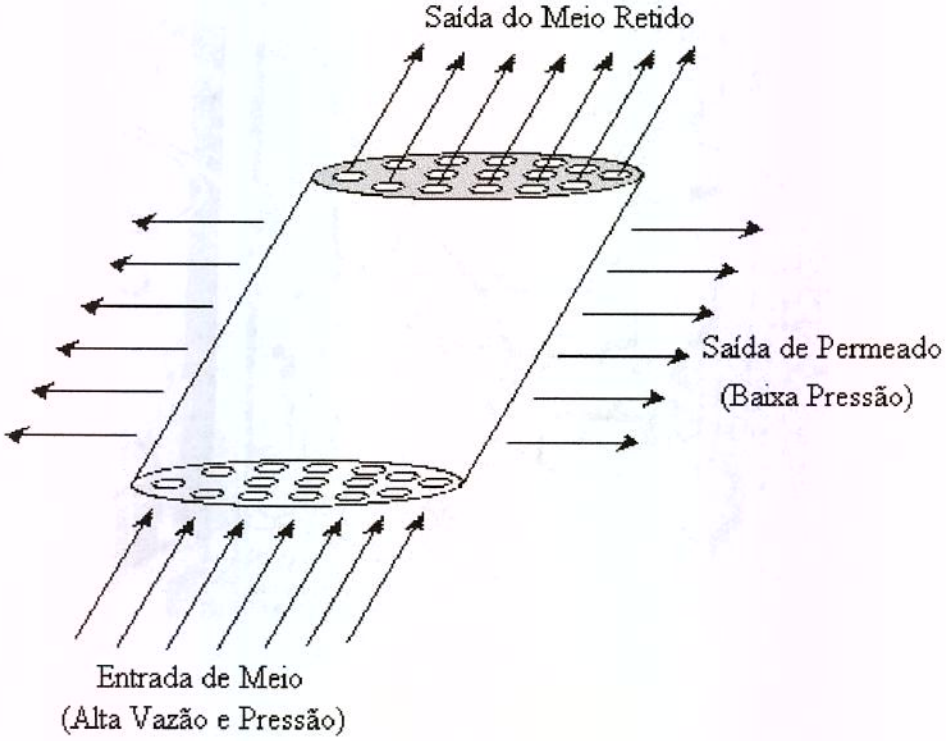


Figura IV.6: Filtração por fluxo tangencial.

A vazão de saída do mosto filtrado foi controlada por uma bomba peristáltica tipo "Masterflex" modelo 7549-30 de fabricação da "Cole-Parmer Instrument Co".

IV.1.3.3. PERIFÉRICOS

As conexões utilizadas entre o sistema de filtração e o fermentador foram realizadas através de mangueiras plásticas de 12.7 mm de diâmetro interno revestidas por uma malha de aço inox 316.

O nível do sistema foi mantido através de um medidor de nível instalado dentro do biorreator, conectado a um controlador tipo liga/desliga que acionava a bomba peristáltica tipo "Masterflex" modelo 7549-30 usada na alimentação.

O controle de nível mínimo foi realizado pela impossibilidade de operação sem líquido, devido às características da bomba de circulação utilizada (bomba helicoidal com estator de borracha nitrílica), pois pode haver perda do estator. Uma vareta de aço inox foi introduzida na lateral do fermentador, ficando a sua extremidade cerca de 6 cm abaixo do nível de meio, que é condutor, e isolada da parte superior do fermentador. O variador de freqüência Baldor possui um dispositivo de segurança que interrompe o funcionamento da bomba em certas condições. Quando a vareta estiver submersa no meio, o contato entre as duas extremidades do fio do variador de freqüência Baldor é estabelecida e a bomba é acionada. Qualquer falha no sistema (falta de melaço, bóia travada, etc.) que cause diminuição do nível do fermentador, será detectada pelo sensor de nível mínimo que desligará automaticamente a bomba de circulação.

O controle de espuma se deu através de um sensor fornecido pela "New Brunswick Co.", que estava localizado na parte superior do fermentador, alinhado cerca de 3 cm acima do nível ótimo, conforme figura IV.1. Quando a espuma atingia a ponta de vareta, acionava a bomba de alimentação de antiespumante.

O condensador de substâncias voláteis foi acoplado na parte externa da placa superior, passando através de sua camisa de resfriamento água resfriada provinda do banho térmico externo.

A medida de vazão de gás carbônico se deu conectando um rotâmetro à saída superior de gás, com a finalidade de avaliar a atividade do meio fermentativo e a produção instantânea de CO_2.

IV.2. OPERAÇÃO DO SISTEMA BATELADA ALIMENTADA ESTENDIDA

IV.2.1. PREPARAÇÃO DO SISTEMA DE FILTRAÇÃO

SIQUEIRA (1997) cita as vantagens e desvantagens de se trabalhar apenas com um dos filtros como sendo:

- 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 levada a esterilização, não sendo necessária a parada de todo o sistema.
- trabalha-se com uma menor área de filtração e consequentemente menor capacidade de filtração.

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

IV.2.2. ESTERILIZAÇÃO

A esterilização foi realizada após a montagem dos equipamentos do biorreator – filtro, fazendo passar vapor saturado a 100°C e 1 atm em todo o sistema de fermentação durante 2 horas. A inclusão do vapor no circuito se deu por um dos aportes existentes no sistema de filtração, conforme pode ser observado na figura IV.4.

IV.2.3. INOCULAÇÃO

O inóculo foi preparado conforme descrito no item IV.1.2 e foi adicionado ao sistema após a etapa de esterilização. Logo em seguida à adição do inóculo, as válvulas do sistema de filtração foram ajustadas para que se possa trabalhar com somente um filtro e inicialmente sem retirada do mosto filtrado, com o objetivo de que ocorra o consumo total de substrato (etapa de fermentação em batelada). Após a diminuição da atividade do microrganismo que era acompanhada pela produção de CO_2, o sistema batelada foi finalizado, dando início à transição para o sistema batelada alimentada estendida.

Esta transição ocorria pois no fim do sistema batelada, o nível do meio fermentativo encontrava-se abaixo da bóia de nível, devido à retirada de amostra para o acompanhamento analítico, e uma quantidade razoável de meio era alimentado. Com o fim da atividade do microrganismo nesta fase, era dado início ao sistema batelada alimentada estendida.

A bomba de circulação foi acionada pelo motor trifásico e mantido para uma rotação de 10 ciclos/segundo no sistema batelada e de 50 ciclos/segundo no sistema batelada alimentada estendida. Esta ação diminuiu o tempo de transição pois a fermentação batelada se dava no volume total do sistema. Uma bomba peristáltica acoplada ao sistema de filtração foi ajustada para a retirada do mosto filtrado, numa vazão correspondente a uma taxa de diluição ao redor de 0.1 h^{-1}. A retirada do fluído filtrado acionava o mecanismo de detecção de nível, que ligava outra bomba peristáltica, alimentando o sistema e mantendo o nível constante durante toda a fermentação.

Amostras de aproximadamente 30 mL foram recolhidas periodicamente para a realização de análises de concentração de açúcares redutores totais, massa seca, viabilidade e concentração de álcool. O processo de crescimento celular continuava até que a concentração de células atingia um nível tal, que provocava o entupimento no sistema de filtração e consequentemente uma elevada perda de carga, impossibilitando manter, desta maneira, a taxa de diluição do sistema sem afetar significativamente a viabilidade celular.

Neste momento, utilizando as válvulas do sistema de filtração, fechava-se a saída do filtrado promovendo a purga de células. Passava-se então água esterilizada no sistema até que todo resíduo da fermentação fosse retirado, passando logo após a este procedimento, vapor saturado a 100°C por duas horas no sistema composto pelo fermentador e pelo filtro não utilizado. Enquanto a nova fermentação era realizada, o filtro utilizado na fermentação anterior era lavado com NaOH conforme descrito anteriormente, sendo esterilizado junto com o sistema na fermentação seguinte. Este procedimento garantiu a economia de tempo na limpeza dos esquipamentos, a esterilidade da fermentação em todos as temperaturas, além de se ter o mesmo volume útil em todo os experimentos, já que o sistema não era desmontado e a bóia de nível estava sempre na mesma posição.

IV.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

IV.3.1. CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS

A concentração de células em base seca foi determinada por gravimetria. As frações do meio fermentado foram retiradas e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 RPM em frascos previamente tarados. As massas decantadas foram ressuspensas por três vezes em água destilada e ao final secas em estufas à vácuo na temperatura de 70°C.

IV.3.2. VIABILIDADE

A viabilidade celular foi medida através do método da coloração das células mortas por corante de azul de metileno através da contagem em câmara de Neubauer. Segundo LAFFORGUE *et al.* (1994), este método baseia-se no princípio de que células mortas não conseguem reduzir o corante que absorvem, tornado-se azuis.

A viabilidade celular foi então expressa em termos da quantidade total de células, como sendo a razão entre o número de células brancas e o número de células totais (brancas mais azuis).

IV.3.3. CONCENTRAÇÃO DE ETANOL

As concentrações de açúcares redutores e de etanol foram determinadas através de análises em HPLC modelo Varian 9010. Para isso utilizou-se coluna da marca SHODEX modelo KS 801 na temperatura de 70°C e como eluente, água deionizada e deaerada com um fluxo de 0.50 mL/mim. Foram usados como padrões soluções coquetel de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol, nas concentrações de 0,01% a 4%, sendo o software Millennium® v.2.1 usado para integrar e quantificar os dados obtidos.

IV.4. MODELAGEM MATEMÁTICA E PARÂMETROS CINÉTICOS

Para a realização da modelagem matemática foi utilizado modelo cinético não – estruturado, onde o microrganismo foi considerado como um simples reagente, com uma composição química definida e sua reprodução descrita por equações estequiométricas.

Conforme CARVALHO (1996), as variáveis e parâmetros utilizados poderão ser classificados em:

a) variáveis de estado: definem o estado do processo

Xt, Xv, Xd, S, P

b) variáveis operacionais: variáveis cujos os valores podem ser alterados pelo operador do processo.

F, So, Xd (=0), Pi (=0)

c) variáveis intermediárias: todas as taxas que podem ser expressas em função das variáveis anteriores

rx, rs, rp, rd

d) parâmetros cinéticos.

μmax, Kd, Ks, m, n, Pmax, Xmax

e) parâmetros estequiométricos

Yxs, Yxp, Yps

IV.4.1. MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO BATELADA

Para a modelagem do processo batelada foi admitido que:

- o reator é de mistura perfeita
- reator de volume constante
- volume das bolhas desprezível
- densidade constante

As equações do modelo podem ser obtidas através dos balanços:

- **Balanço de Massa:**

Acúmulo = entrada – saída + geração

$$\frac{d(\rho \cdot V)}{dt} = (\rho_{in} \cdot F_{in}) - (\rho_{out} \cdot F_{out}) + geração$$

$$\rho_{in} = \rho_{out} = 0 \qquad F_{in} = F_{out} = 0 \qquad \text{geração} = 0$$

Portanto:

$$\frac{dV}{dt} = 0 \tag{16}$$

- **Balanço de Biomassa Viável:**

Acúmulo = entrada – saída + geração

$$\frac{d(X_v \cdot V)}{dt} = F \cdot Xo - F \cdot X + rx \cdot V - rd \cdot V$$

Analogamente tem-se

$$\frac{dXv}{dt} = rx - rd \tag{17}$$

- **Balanço de morte celular:**

Acúmulo = entrada – saída + geração

$$\frac{d(Xd \cdot V)}{dt} = F \cdot Xo - F \cdot X + rd \cdot V$$

Analogamente tem-se:

$$\frac{dXd}{dt} = rd \tag{18}$$

- **Balanço de Produto:**

Acúmulo = entrada – saída + geração

$$\frac{d(P \cdot V)}{dt} = rp \cdot V$$

$$\frac{d(P \cdot V)}{dt} = \frac{d}{dt}\left[(vol.\ reator - vol.\ cell) \cdot P + [etanol\ intra]\right] = \frac{d}{dt}\left[\left(1 - \frac{Xt}{\rho}\right) \cdot P \cdot V + \frac{Xt}{\rho} \cdot \gamma \cdot P \cdot V\right]$$

$$\frac{d}{dt}\left[\left(1 - \frac{Xt}{\rho}\right) \cdot P \cdot V + \frac{Xt}{\rho} \cdot \gamma \cdot P \cdot V\right] = rp \cdot V$$

Desenvolvendo, tem-se:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{rp + \frac{P}{\rho} \cdot (1 - \gamma) \cdot rx}{1 - \frac{Xt}{\rho} + \gamma \cdot \frac{Xt}{\rho}} \tag{19}$$

- **Balanço de Substrato:**

Acúmulo = entrada – saída + geração

$$\frac{d(S \cdot V)}{dt} = -rs \cdot V$$

$$\frac{d}{dt}\left[\left(1 - \frac{Xt}{\rho}\right) \cdot S \cdot V\right] = -rs \cdot V$$

Desenvolvendo tem-se:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-rs + \frac{S}{\rho} \cdot rx}{1 - \frac{Xt}{\rho}} \qquad (20)$$

IV.4.2. MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO BATELADA ALIMENTADA ESTENDIDA

Um sistema típico de fermentação com reciclo de célula com membrana é esquematizado na figura IV.4.

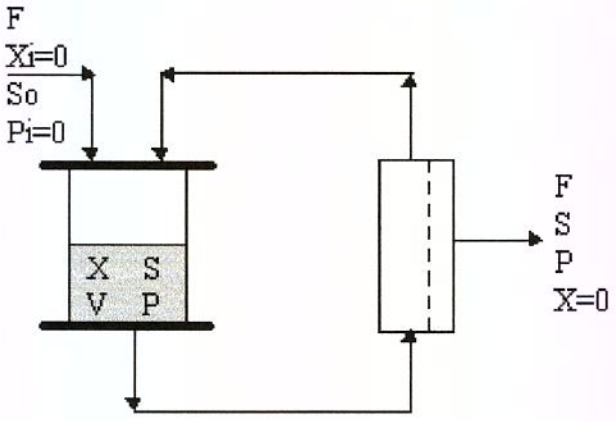


Figura IV.7: Sistema de fermentação com reciclo de células

No modelo foi admitido que:

- o reator é de mistura perfeita
- reator de volume constante
- volume das bolhas desprezível
- a corrente de filtrado é livre de células
- a alimentação é estéril (Xi = 0)
- densidade constante

As equações do modelo podem ser obtidas através dos balanços:

- **Balanço de Massa:**

Acúmulo = entrada – saída + geração

$$\frac{d(\rho \cdot V)}{dt} = (\rho_{in} \cdot F_{in}) - (\rho_{out} \cdot F_{out}) + geração$$

$\rho_{in} = \rho_{out} = 0$ $\qquad F_{in} = F_{out} = F$ $\qquad$ geração = 0

Portanto:

$$\frac{dV}{dt} = 0 \qquad (21)$$

- **Balanço de Biomassa Viável:**

Acúmulo = entrada – saída + geração

$$\frac{d(Xv \cdot V)}{dt} = F \cdot Xi - F \cdot Xv + rx \cdot V - rd \cdot V$$

Analogamente tem-se:

$$\frac{dXv}{dt} = rx - rd \tag{22}$$

- **Balanço de morte celular:**

Acúmulo = entrada – saída + geração

$$\frac{d(Xd \cdot V)}{dt} = F \cdot Xdi - F \cdot Xd + rd \cdot V$$

Analogamente tem-se:

$$\frac{dXd}{dt} = rd \tag{23}$$

- **Balanço de Produto:**

Acúmulo = entrada – saída + geração

$$\frac{d(P \cdot V)}{dt} = F \cdot Po - F \cdot P + rp \cdot V$$

$$\frac{d(P \cdot V)}{dt} = \frac{d}{dt}\left[(vol.\ reator - vol.\ cell) \cdot P + [etanol\ intra]\right] = \frac{d}{dt}\left[\left(1 - \frac{Xt}{\rho}\right) \cdot P \cdot V + \frac{Xt}{\rho} \cdot \gamma \cdot P \cdot V\right]$$

$$\frac{d}{dt}\left[\left(1 - \frac{Xt}{\rho}\right) \cdot P \cdot V + \frac{Xt}{\rho} \cdot \gamma \cdot P \cdot V\right] = rp \cdot V - F \cdot P$$

Desenvolvendo, tem-se:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{rp - \frac{F}{V} \cdot P + \frac{P}{\rho} \cdot (1 - \gamma) \cdot rx}{1 - \frac{Xt}{\rho} + \gamma \cdot \frac{Xt}{\rho}} \tag{24}$$

- **Balanço de Substrato:**

Acúmulo = entrada – saída + geração

$$\frac{d(S \cdot V)}{dt} = F \cdot So - F \cdot S - rs \cdot V$$

$$\frac{d}{dt}\left[\left(1 - \frac{Xt}{\rho}\right) \cdot S \cdot V\right] = F \cdot (So - S) - rs \cdot V$$

Desenvolvendo tem-se:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\frac{F}{V} \cdot (So - S) - rs + \frac{S}{\rho} \cdot rx}{1 - \frac{Xt}{\rho}} \tag{25}$$

As velocidades de formação de biomassa, morte celular, formação de produto e consumo de substrato podem ser descritas para o processo batelada e batelada alimentada estendida pelas seguintes equações:

$$rx = \mu(T, S, P) \cdot Xv \tag{26}$$

$$rd = Kd(T, P) \cdot Xv \tag{27}$$

$$rs = \frac{rx}{Yx(T)} + \frac{rp}{Yp} + mx(T) \cdot Xv \tag{28}$$

$$rp = Y_{p/x}(T) \cdot rx + mp(T) \cdot Xv \tag{29}$$

Onde Xv, Xd, S e P são as concentrações de células viáveis, células mortas, substrato (ART) e produto, respectivamente; rx, rd, rs e rp são respectivamente as velocidades cinéticas de crescimento, morte, consumo de substrato e formação de produto; F.So é a vazão mássica de substrato na alimentação e D é a taxa de diluição (D=F/V, onde F é a vazão volumétrica de alimentação de substrato, que é igual à vazão de retirada de mosto filtrado, e V é o volume do reator); ρ é a relação entre a massa seca e o volume de massa úmida, γ é a relação entre a concentração de etanol intracelular e extracelular.

As equações de balanço de produto e substrato levam em conta a fração volumétrica ocupada pela biomassa. MONBOUQUETTE (1992) enfatizou a necessidade do uso de aproximações de concentrações intrínsecas de concentração de substrato e produto para descrever operações em biorreatores com alta densidade celular e indica que aproximações não intrínsecas são indicadas, quando o volume da fração de biomassa for menor que 10% do volume total do fermentador.

A equação (30), foi utilizada por ANDRIETTA (1994), ALVES (1996), CARVALHO (1996) e SIQUEIRA (1997) para modelagem de processos fermentativos, com um bom ajuste dos dados experimentais, portanto, ela será utilizada neste trabalho. A modelagem será realizada em uma faixa de temperatura que varia de 28 à 40°C.

$$\mu = \mu_O \cdot \left(\frac{S}{Ks + S}\right) \cdot \left(1 - \frac{P}{Pm}\right)^n \left(1 - \frac{X}{Xm}\right)^m \exp(-Ki \cdot S) \qquad (30)$$

Os parâmetros cinéticos utilizados para a modelagem do processo tiveram como base os calculados por SIQUEIRA (1997) e ALVES (1996). Para a determinação do rendimento limite (Yx) e do coeficiente de manutenção (mx), foram utilizados dados de fermentação em batelada simples, através de relações de rs e rx, obtidos em análises de balanços de massa macromolecular. Para isso contou-se com o auxílio do software Macrobal, onde as taxas das reações foram estimadas através das velocidades calculadas a partir dos dados experimentais em batelada, ajustada através da função sigmoidal.

O rendimento do processo batelada alimentada estendida pode ser definido como a sendo a quantidade de etanol produzida pela fermentação alcoólica em relação à quantidade de açúcares que pode ser convertido em álcool pela multiplicação do valor estequiométrico de 0.511 g/g. A equação (31) apresenta o rendimento para o processo batelada alimentada estendida.

$$\mathrm{Re}nd = \frac{P}{So \cdot 0.511} \cdot 100 \qquad (31)$$

Define-se a conversão do sistema batelada alimentada estendida como a relação entre a concentração de substrato consumido no meio fermentativo e a concentração de substrato alimentado no processo, conforme apresentado na equação (32).

$$Conv = \frac{So - S}{So} \tag{32}$$

A produtividade do sistema batelada alimentada estendida é definida como sendo a quantidade de etanol produzido por unidade de volume do fermentador por unidade de tempo. A equação (33) apresenta a produtividade do processo.

$$\text{Pr}od = \frac{F}{V} \cdot P = D \cdot P \tag{33}$$

As equações diferenciais foram integradas através do método de Runge-Kutta de 4ª ordem, sendo os parâmetros cinéticos ajustados com o auxílio dos dados experimentais.

IV.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO.

Segundo RODRIGUES (1993) na maioria dos processos químicos e bioquímicos a necessidade de obter altos rendimentos acaba sempre comprometendo a produtividade. Atualmente, a imposição de minimizar custos tem levado os engenheiros de processo a analisar previamente as implantações dos sistemas, como objetivo de determinar faixas de operação que continuem garantindo um bom rendimento sem prejuízos na produtividade, situação esta imprescindível para a viabilidade de um processo. Em processos bioquímicos geralmente se observa a influência de muitas variáveis, onde a importância de cada variável deve ser determinada. Portanto a otimização baseada no planejamento experimental e analise de superfície de resposta é uma ferramenta muito útil de trabalho para melhor compreensão do sistema, permitindo a análise individual do efeito de cada variável e de suas interações nas respostas desejadas.

Para estabelecer estratégias de controle eficiente e para obter uma otimização do processo fermentativo, torna-se necessária à realização de um estudo do comportamento das principais variáveis do modelo cinético do processo. Inicialmente foi realizado um

estudo da influência das principais variáveis do modelo cinético através de um planejamento de "screening desing" conforme proposto por PLACKETT e BURMAN (1946).

A metodologia de planejamentos saturados de PLACKETT e BURMAN (1946) permite analisar um grande número de fatores com um número pequeno de experimentos. BARROS NETO *et al.* (1996) comentam que embora em um planejamento saturado com N ensaios seja possível analisar N-1 fatores, sempre é conveniente escolher um número menor, para que as colunas não utilizadas façam papel de variáveis inertes e possam ser empregadas para estimar o erro associado aos efeitos.

O estudo da influência das variáveis do modelo matemático teve como finalidade verificar o efeito, a importância e a interferência de cada variável sobre as respostas rendimento, conversão, produtividade, biomassa viável, substrato e etanol.

Kalil *et al.* (2000) estudaram a influência de 10 fatores para a maximização do rendimento, sem afetar a produtividade, de um processo de fermentação alcoólica utilizando como etapa preliminar, a metodologia de Plackett e Burman.

O modelo matemático proposto neste trabalho possui 21 variáveis, sendo 14 parâmetros cinéticos, 4 variáveis de estado (Xv, Xd, S e P onde Xt=Xv+Xd) e 3 variáveis operacionais (T, D e So). Para a análise de sensibilidade foi escolhido um planejamento com 32 ensaios conforme apresentado por PLACKETT e BURMAN (1946), sendo as respostas obtidas através de simulação.

Para a otimização do processo foi necessário um estudo do comportamento das variáveis de estado (Xv, Xd, S, P) e operacionais (T, D e So) do sistema, visto que os parâmetros cinéticos do modelo matemático não são passiveis de controle. Para isso realizou-se inicialmente um planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} de resolução IV com um total de 17 ensaios sendo um no ponto central. Este tipo de planejamento é indicado para verificar quais fatores são significativos no processo. Como resposta obteve-se através do modelo cinético dados de rendimento, produtividade, concentração de biomassa viável,

substrato e etanol após 100 horas de fermentação. Este estudo foi realizado através da simulação em computador, utilizando-se para isso um modelo matemático.

Com os resultados obtidos com o planejamento fatorial fracionário foi realizada uma otimização do processo através da metodologia de superfície de resposta. Neste tipo de planejamento ocorre um aumento do número de níveis, passando de 3 para 5, ampliando-se assim a faixa de estudo de cada fator.

Nesta etapa do trabalho foi possível otimizar as respostas rendimento e produtividade do sistema fermentativo. Para isso foi realizado um planejamento fatorial composto central com 3 fatores, sendo eles a temperatura, a taxa de diluição e a concentração de substrato na alimentação, sendo as faixas dos níveis a serem estudadas determinados através da simulação do processo. Por serem variáveis operacionais, eles são as únicas que podem ser alteradas pelo controlador.

IV.6. RECURSOS COMPUTACIONAIS

Para o tratamento dos dados experimentais vários recursos computacionais foram utilizados. A integração numérica das equações diferenciais do modelo batelada e batelada alimentada estendida foram realizadas pelo método de Runge-Kutta de 4ª ordem sendo utilizados os softwares Fortran Power Station 4.0 e MathCad 7.0.

O tratamento estatístico dos resultados, o estudo da influência das variáveis do modelo e os planejamentos experimentais foram realizados com o auxílio do software Statistica 5.0.

Para o cálculo das velocidades de reações utilizadas na estimativa do balanço macroquímico, foi utilizado o software TableCurve 2D v.4.0 da Jandel Scientific. Os balanços macroquímicos foram realizados com o auxílio do software Macrobal v. 2.0 desenvolvido pela Delft University de Technology.

As superfícies ajustadas nas simulações dos processos foram realizadas com o auxílio do software Table Curve 3D v.2.0 da Jandel Scientific e os gráficos apresentados

nos dados experimentais e na modelagem do processo foram realizado com o Software MS Excel 97 e Microcal Origin v.4.0

IV.7. BALANÇOS MACROQUÍMICOS

Os balaços macromoleculares ou macroquímicos estão sendo recentemente aplicados para o cálculo de coeficientes de rendimento e taxas de manutenção em processos biotecnológicos. Estes balanços foram realizados com o auxílio do software Macrobal que aplica princípios de conservação para a estimação da velocidade de reação.

Para isso, o processo fermentativo deve ser escrito em forma de equações químicas onde o microrganismo é considerado um elemento químico. Para efeito de simplificação a concentração de açúcares será transformada em glicose.

$$1\,CH_{1.83}O_{0.56}N_{0.17} + rs \cdot C_6H_{12}O_6 + rpC_2H_6O + rwH_2O + rcCO_2 + rnNH_4^- rgC_3H_8O_3 = 0$$

O Macrobal necessita de uma matriz elementar dos compostos citados acima. A tabela IV.1 apresenta a matriz elementar dos compostos mais relevantes do processo.

Tabela IV.1: Matriz elementar dos compostos mais relevantes do processo

Elemento	Carbono	Hidrogênio	Oxigênio	Nitrogênio	PM (g/gmol)
Biomassa	1	1.83	0.56	0.17	25.17
Glicose	6	12	6	-	180
Etanol	2	6	1	-	46
CO_2	1	-	2	-	44
Amônia	-	4	-	1	18
Glicerol	3	8	3	-	92
Água	-	2	1	-	18

Com os dados do processo batelada de formação de biomassa, etanol e CO_2 e de consumo de substrato e com o auxílio do software Table Curve 2D, calculam-se as velocidades das reações em função do tempo. O ajuste dos dados experimentais foi realizado através da função signoidal que é descrita pela equação (34)

$$y = a + \frac{b}{1 - \exp\left[-\frac{c - tempo}{d}\right]} \tag{34}$$

onde a, b, c e d são constantes da função sigmoidal e y pode ser a concentração de biomassa, etanol, substrato, glicerol e CO_2. Derivando a equação (34) têm-se as velocidades da reações calculadas em função do tempo. Para se ter os valores expressos em mol, basta dividir os dados experimentais pelo peso molecular de cada composto.

Com as taxas calculadas e com o erro da medida que neste caso foi admitido como sendo de 5%, exceto para a medida de CO_2 que foi de 10%, os dados foram colocados no software Macrobal e por análise estatística do teste de hipóteses o valor estimado das velocidades de reação foi calculado.

Com as velocidades de reações estimadas, foi possível calcular o rendimento limite (Yx) e taxa de manutenção (mx) através de relações entre rs e rx, sendo utilizados como base para a modelagem cinética do processo.

As relações entre rs e rx podem ser calculadas como:

- Com inclusão do produto:

$$rs = \frac{rx}{Yx} + \frac{rp}{Yp} + mx \cdot X \tag{35}$$

dividido a equação (35) por rx e desenvolvendo, tem-se:

$$\frac{1}{Ysx} - \left[\frac{1}{Ypx} \cdot \frac{1}{Yp}\right] = \frac{mx}{\mu x} + \frac{1}{Yx} \tag{36}$$

onde Yp é o valor estequiométrico que vale 0.511 g/g

Plotando o lado esquerdo da equação (36) em função de 1/μx, o termo angular tem-se mx e o inverso do termo linear, Yx

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dividindo a equação (35) por X e desenvolvendo tem-se:

$$\mu s - \left(\frac{\mu p}{0.511}\right) = \frac{\mu x}{Yx} + mx \tag{37}$$

Plotando o lado esquerdo da equação (37) em função de μx, o inverso do termo angular é Yx e o termo linear é mx.

- Sem inclusão do produto:

As equações (36) e (38) desconsiderando o produto ficam da seguinte maneira:

$$\frac{1}{Ysx} = \frac{mx}{\mu x} + \frac{1}{Yx} \tag{39}$$

$$\mu s = \frac{\mu x}{Yx} + mx \tag{40}$$

Em ambos os casos, os valores de μs e μx são calculados com os dados estimados do Macrobal e com o valor da biomassa calculada pela função sigmoid do Table Curve 2D.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. DADOS EXPERIMENTAIS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos através de experimentos realizados em sistema batelada e batelada alimentada estendida nas temperaturas de 28, 31, 34, 37 e 40°C, conforme apresentado nas tabelas V.1 a V.5 e nas figuras V.1 a V.5.

As amostras foram retiradas periodicamente com a finalidade de realizar um acompanhamento do consumo açúcares redutores totais através da sacarose, da glicose e da frutose, da formação de álcool, glicerol e de massa seca e do acompanhamento da viabilidade do meio fermentativo.

Tabela V.1: Dados experimentais do processo batelada e batelada alimentada estendida para a temperatura de 28°C.

Tempo (h)	Xt	viab (%)	Xv	S	Sac.	Gli.	Fru.	P	Gliol
0	1.53	100	1.53	196.41	123.90	30.78	35.53	0.00	0.00
4	1.43	100	1.43	185.00	93.52	21.64	25.01	8.34	0.00
6.5	2.08	100	2,08	181.69	116.91	27.49	31.44	11.71	0.00
9	2.59	100	2.59	171.46	115.28	22.41	28.01	13.55	0.00
11	3.67	100	3.67	168.09	116.70	19.63	25.93	14.95	2.28
13	4.92	100	4.92	149.13	111.74	12.38	19.43	21.26	1.83
14	5.41	100	5.41	140.10	96.53	16.69	22.06	27.11	4.86
16	6.97	100	6.97	112.71	48.09	30.44	31.78	33.32	6.06
18	9.11	100	9.11	81.21	24.27	22.85	32.88	41.49	6.88
22	11.22	98.11	11.01	38.71	2.97	10.48	25.12	59.78	9.29
26	12.33	96.05	11.84	15.41	8.06	0.34	6.61	74.44	7.38
27.5	13.30	98.97	13.16	12.11	8.77	0.00	2.90	82.18	7.61
28.5	12.10	97.71	11.82	12.87	5.83	1.87	4.88	75.26	8.01
32.5	13.48	95.08	12.82	58.20	7.93	19.16	30.72	70.40	9.14
40.5	17.14	92.26	15.81	81.45	8.48	25.54	47.01	69.51	10.36
46.5	21.41	90.09	19.29	84.14	9.23	25.52	48.93	73.50	10.37
51	27.65	84.68	23.41	82.98	9.78	23.99	48.72	73.83	9.98
58	34.12	82.48	28.14	83.41	10.77	23.61	48.50	79.99	9.66
62	37.93	79.41	30.12	89.92	11.19	26.56	51.61	78.35	9.93
66.5	41.53	78.81	32.73	98.77	10.37	30.57	57.31	72.45	10.98
71	45.64	77.33	35.29	97.78	9.64	29.61	58.04	78.38	11.57
76.5	50.80	73.73	37.46	99.16	9.08	30.02	59.61	73.36	11.66
83	57.91	75.10	43.49	96.30	7.50	29.42	59.00	72.37	12.00
89.5	58.39	65.44	38.21	99.44	7.67	31.07	60.32	69.78	12.65
96.5	67.46	69.51	46.89	98.72	6.71	31.69	59.98	68.64	13.05
107.5	69.81	60.40	42.17	84.54	6.47	25.93	51.81	69.02	12.05
111	62.43	61.35	38.30	86.73	6.41	26.46	53.54	66.55	11.85
113.5	66.50	58.97	39.22	88.72	6.44	28.33	53.63	65.08	12.11

Tabela V.2: Dados experimentais do processo batelada e batelada alimentada estendida para a temperatura de 31°C.

Tempo (h)	Xt	viab (%)	Xv	S	Sac.	Gli.	Fru.	P	Gliol
0	1.16	100.0	1.16	224.79	137.38	39.40	41.14	0.21	0.00
3	1.38	100.0	1.38	221.36	133.14	39.78	41.78	1.00	0.00
6	1.88	100.0	1.88	212.94	126.16	38.35	42.12	2.65	0.00
8	2.64	97.8	2.58	209.45	125.62	35.34	42.21	6.60	0.00
10	3.68	98.7	3.63	189.47	118.51	28.19	39.20	15.94	3.54
12	5.24	99.6	5.22	169.64	113.25	19.67	31.06	28.07	6.77
15	8.43	99.6	8.39	118.25	53.51	31.53	30.54	46.55	9.06
17	9.75	99.2	9.67	94.76	23.85	31.28	38.44	55.29	10.97
20	11.9	98.4	11.70	52.46	5.44	13.83	32.92	66.20	9.79
22	12.96	98.7	12.80	42.22	8.81	6.26	26.71	84.55	9.75
24	13.38	98.2	13.13	30.85	10.17	1.73	18.45	93.62	9.17
27.5	13.44	97.2	13.06	15.45	10.27	1.16	3.50	101.91	8.52
29	12.28	97.9	12.03	17.79	9.89	1.58	5.83	101.72	8.48
34.5	13.84	91.8	12.70	74.65	10.96	24.68	38.47	87.05	10.54
41	15.07	88.1	13.28	103.92	9.79	35.15	58.49	76.55	11.92
45	16.55	87.3	14.44	109.82	10.05	36.00	63.27	78.05	12.27
55.5	25.38	85.8	21.77	90.79	9.06	26.51	54.77	78.68	10.63
65	31.55	78.1	24.65	86.97	9.96	24.13	53.78	85.65	10.74
69	33.26	77.5	25.79	84.46	8.77	23.21	52.05	89.24	10.55
77.5	39.1	76.1	29.75	89.47	8.65	25.69	54.69	82.53	10.47
82	45.22	72.1	32.60	86.47	7.65	24.76	53.68	82.22	10.36
87.5	47.8	70.5	33.71	88.25	7.36	25.78	54.75	79.23	10.59
93.5	54.27	65.4	35.51	99.64	7.75	30.35	61.15	77.54	11.25
100	56.17	62.6	35.17	110.41	9.17	33.35	67.43	80.43	12.11
105	54.85	65.9	36.16	112.46	7.90	37.16	67.01	76.72	11.73
111	64.85	62.3	40.40	111.24	7.92	33.90	69.02	81.30	12.52

Tabela V.3: Dados experimentais do processo batelada e batelada alimentada estendida para a temperatura de 34°C.

Tempo (h)	Xt	viab. (%)	Xv	S	Sac.	Gli.	Fru.	P	Gliol.
0	1.60	100.0	1.60	243.39	137.27	44.25	55.01	0.58	0.00
2.5	2.58	100.0	2.58	223.63	135.65	39.71	50.06	5.85	0.00
4.5	3.80	100.0	3.80	205.41	124.74	29.56	44.87	12.82	2.23
8	6.94	100.0	6.94	139.98	76.02	24.67	35.49	39.13	8.79
11	9.16	100.0	9.16	99.04	27.30	28.83	41.54	55.31	10.96
13	9.92	100.0	9.92	92.05	13.95	26.73	50.68	72.55	13.23
15	9.75	99.4	9.69	61.30	5.86	14.11	41.04	87.16	10.58
17	10.07	99.2	9.99	44.10	5.08	6.69	32.08	89.77	10.07
19.5	10.09	98.4	9.92	38.82	9.29	3.58	25.48	102.30	10.93
23	10.31	94.7	9.76	23.56	9.40	0.50	13.18	110.09	9.50
26	10.57	90.3	9.55	89.28	8.75	31.24	48.85	86.32	11.81
41	12.85	76.9	9.88	121.22	6.96	42.28	71.64	70.88	14.18
46	14.41	77.1	11.11	112.39	6.23	37.42	68.43	67.22	10.16
49.5	15.53	76.4	11.87	118.86	7.60	39.20	71.68	71.10	14.05
53	16.80	73.6	12.36	116.48	7.70	37.86	70.53	72.31	13.50
65.5	21.01	80.1	16.83	117.49	8.49	37.76	70.82	72.72	13.64
72.5	23.53	72.0	16.94	112.69	6.53	36.38	69.46	67.91	10.68
79.5	28.44	79.5	22.61	113.10	6.76	36.06	69.94	71.54	14.54
94.5	31.70	66.0	20.92	130.75	7.12	44.64	78.64	68.61	15.33
101.5	35.20	69.8	24.58	128.95	6.82	43.55	78.24	69.63	16.15
115	37.32	55.8	20.82	125.13	7.18	41.48	76.11	72.44	16.35
120	36.95	58.7	21.68	132.65	6.17	45.81	80.36	71.14	16.53

Tabela V.4: Dados experimentais do processo batelada e batelada alimentada estendida para a temperatura de 37°C.

Tempo (h)	Xt	viab. (%)	Xv	S	Sac.	Gli.	Fru.	P	Gliol.
0	0.65	100	0.65	271.98	159.80	48.07	56.12	0.00	0.00
4.5	1.57	100	1.57	250.28	145.42	44.28	53.31	8.91	0.00
7.5	2.66	100	2.66	219.13	131.03	34.30	47.24	18.61	12.75
11	5.53	100	5.53	169.52	81.96	33.56	49.90	35.74	13.62
15	6.79	100	6.79	126.17	16.24	40.64	68.48	56.70	15.90
18.5	7.31	100	7.31	89.69	4.43	24.37	60.67	66.10	11.51
22	7.58	96.5	7.31	73.03	5.03	14.80	52.95	76.84	13.84
25	7.61	96.1	7.32	65.94	8.17	11.01	46.35	84.21	12.78
30	7.64	95.0	7.26	46.61	7.84	4.26	34.13	66.98	11.61
44.5	8.11	72.0	5.84	176.33	5.00	74.20	96.88	44.10	14.77
50	9.06	62.9	5.70	169.01	4.28	69.77	94.74	39.63	15.87
54	11.43	70.7	8.08	156.30	5.70	60.84	89.47	40.14	14.00
68.5	17.68	72.5	12.82	118.76	7.28	39.99	71.12	45.11	12.77
77.5	18.15	68.0	12.34	113.43	7.04	37.84	68.21	44.80	12.83
93.5	28.4	69.2	19.66	125.30	9.30	42.60	72.94	50.00	17.02
101	29.72	66.5	19.76	127.17	8.53	43.85	74.37	48.80	16.71
117.5	30.72	66.8	20.54	127.96	7.84	45.86	73.87	46.68	17.86
122.5	34.73	70.2	24.38	129.79	8.07	46.19	75.13	46.86	16.51
126.5	30.32	69.0	20.92	126.27	7.22	45.37	73.31	46.06	16.49

Tabela V.5: Dados experimentais do processo batelada e batelada alimentada estendida para a temperatura de 40°C.

Tempo (h)	Xt	viab. (%)	Xv	S	Sac.	Gli.	Fru.	P	Gliol.
0	0.81	100.0	0.81	273.42	162.01	49.25	54.05	0.00	0.00
4.5	1.16	100.0	1.16	244.38	134.04	48.50	55.14	0.00	0.00
8	2.09	100.0	2.09	217.83	112.88	43.03	56.28	5.04	0.00
12.5	3.75	100.0	3.75	162.52	59.71	41.20	58.64	19.82	8.34
16.5	4.47	100.0	4.47	138.20	13.25	46.43	77.85	47.22	11.45
19.5	4.95	100.0	4.95	107.00	4.86	32.99	68.92	45.78	10.86
22.5	5.08	100.0	5.08	91.27	5.46	24.71	60.82	50.80	10.82
26	5.16	95.4	4.92	70.97	5.23	16.30	49.19	50.65	9.98
30.5	5.28	96.3	5.08	65.46	6.70	11.80	46.63	63.80	8.58
47	6.12	86.6	5.29	170.84	7.80	68.85	93.79	37.40	16.12
54.5	6.55	78.5	5.14	187.17	6.88	78.74	101.21	35.68	17.47
59	7.22	85.1	6.14	187.22	6.41	78.91	101.58	26.24	17.03
70.5	8.53	75.0	6.40	189.47	5.52	78.21	105.47	26.34	18.12
75.5	9.08	75.7	6.87	194.77	5.55	79.66	109.28	25.97	18.57
82	9.95	68.8	6.84	199.36	6.14	81.67	111.25	34.71	17.99
93.5	10.7	69.8	7.46	196.63	6.83	81.32	108.14	34.09	14.17
98.5	11.17	76.4	8.53	196.56	7.21	81.65	107.34	32.75	15.00
102.5	11.73	71.6	8.39	197.45	6.87	81.83	108.41	32.78	15.42
118.5	11.93	67.7	8.07	199.06	6.69	82.97	109.06	30.49	16.09
126	14.55	68.6	9.98	208.56	7.28	87.81	113.11	29.27	18.61
142.5	17.38	74.4	12.92	203.38	7.15	85.35	110.52	30.03	21.06
149.5	21.26	65.9	14.00	213.70	6.84	90.50	116.02	29.25	21.29

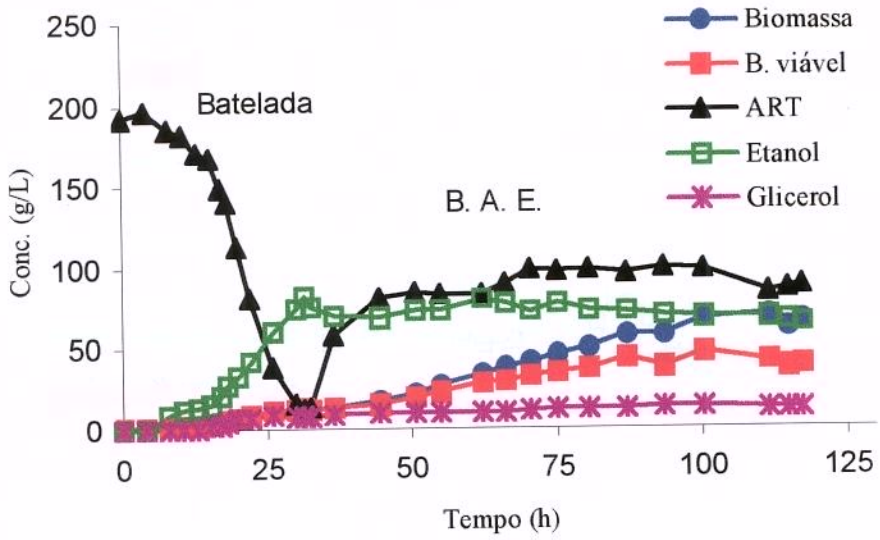


Figura V.1: Comportamento do sistema fermentativo na temperatura de 28°C.

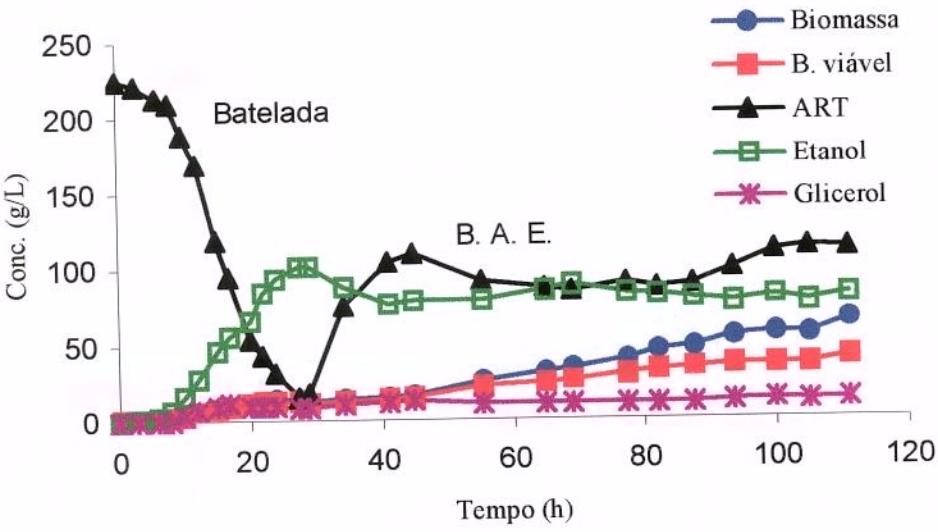


Figura V.2: Comportamento do sistema fermentativo na temperatura de 31°C.

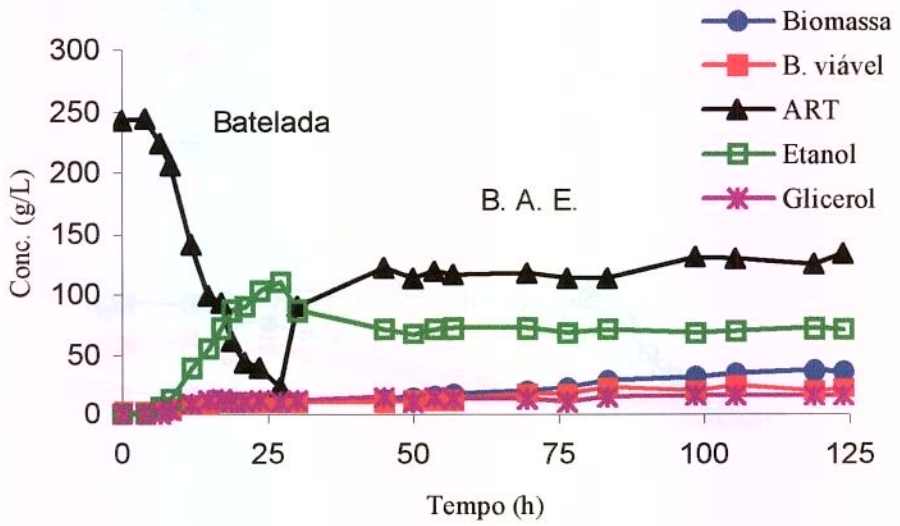


Figura V.3: Comportamento do sistema fermentativo na temperatura de 34°C.

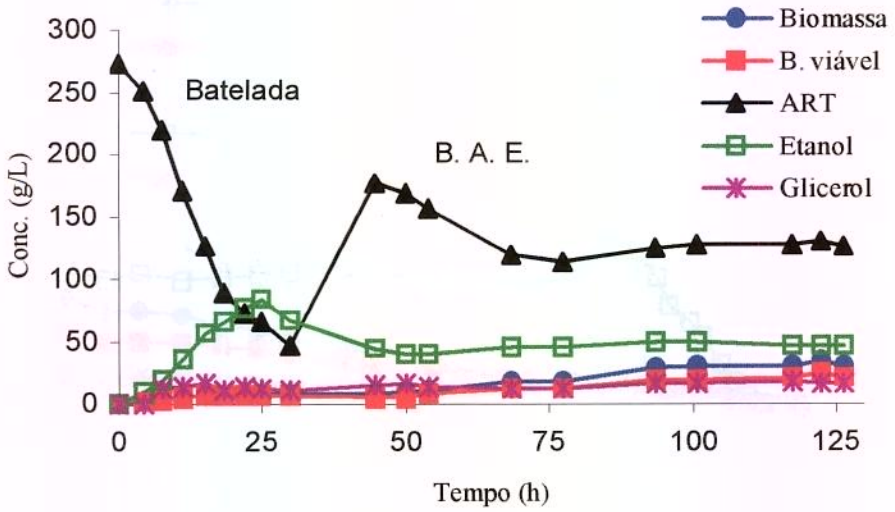


Figura V.4: Comportamento do sistema fermentativo na temperatura de 37°C.

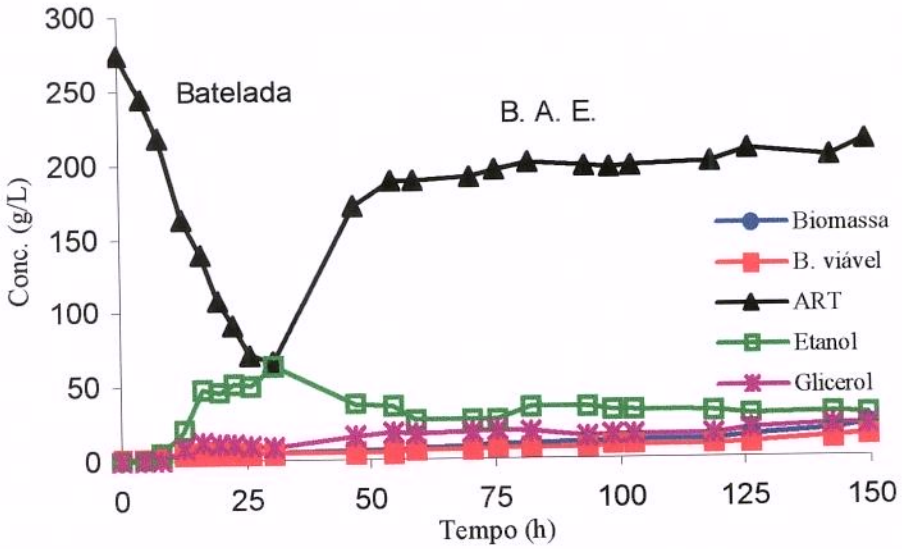


Figura V.5: Comportamento do sistema fermentativo na temperatura de 40°C.

Nas tabelas V.6 e V.7 são apresentados os valores da condições iniciais e finais de concentrações de açúcares, de etanol e de biomassa total e viável dos processos batelada e do processo batelada alimentada estendida nas faixas de temperaturas de 28°C a 40°C.

Tabela V.6: Quadro geral do processo batelada.

	Processo Batelada							
	Condição Inicial			Condição Final				Tempo Final (h)
	S	P	Xt	S	P	Xt	Xv	
28	196.41	0	1.53	12.11	82.18	13.3	13.16	27.5
31	224.79	0.21	1.16	15.45	101.91	13.44	13.06	27.5
34	241.33	0	1.17	23.56	110.09	10.31	9.76	30
37	271.98	0	0.59	46.61	66.98	7.51	7.13	30
40	273.60	0	0.81	65.92	63.80	5.28	5.08	30.5

Concentrações em g/L.

Tabela V.7: Quadro geral do processo batelada alimentada estendida.

	Processo Batelada Alimentada Estendida								
	Condição Inicial				Condição Final				Tempo
	S	P	Xt	Xv	S	P	Xt	Xv	Final (h)
28	12.87	75.26	21.41	19.29	88.72	65.08	66.50	39.22	117.5
31	74.65	87.05	13.84	12.70	111.24	81.30	64.85	40.40	111
34	89.28	86.32	10.57	9.55	132.65	71.14	36.95	21.68	124
37	176.33	44.10	8.00	5.76	126.27	46.06	29.98	20.69	126.5
40	170.84	37.40	6.12	5.30	213.70	29.25	21.26	14.00	149.5

Concentrações em g/L.

Com o auxílio das figuras V.1 e V.5 e da tabela V.6 pode-se verificar que o processo fermentativo batelada tem um tempo de duração médio de aproximadamente 28 horas e que durante esse processo, ocorre o consumo de substrato para formação de produto e de biomassa. O consumo de substrato é quase que total para temperaturas menores, sendo que a medida que a temperatura aumenta, este consumo diminui.

Com relação à formação de etanol, a maior quantidade de produto é obtida entre as temperaturas de 28°C a 34°C, diminuindo sensivelmente com o aumento da temperatura, sendo o mesmo fenômeno observado também para a formação de biomassa. Este fato era de certa forma esperado, pois segundo ALVES (1996) a temperatura ótima de crescimento celular para o microrganismo utilizado é ao redor de 32°C. A viabilidade celular alcançada neste processo permanece quase que 100% durante toda a batelada tendo uma ligeira queda ao final desta etapa, não baixando de 95%. Nota-se que o glicerol surge após algumas horas de fermentação atingindo um valor de aproximadamente 10g/L e permanecendo constante durante o processo fermentativo.

Analisando as figuras de V.1 e V.5 e a tabela V.7, nota-se que as observações realizadas para o processo batelada são também aplicadas para o processo batelada alimentada estendida, pois apesar do sistema de fermentação ter mudado, as características do microrganismo são as mesmas.

As figuras V.6 a V.13 trazem os dados experimentais apresentados em relação a concentração de biomassa, de substrato, de etanol e de glicerol separados pelo sistema de fermentação batelada e batelada alimentada estendido. Elas apresentam uma melhor visualização da discussão realizada anteriormente.

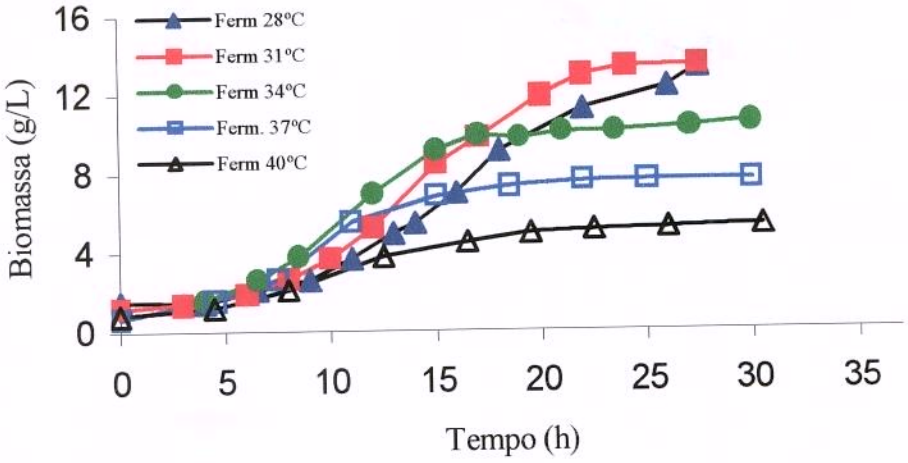


Figura V.6: Comportamento da concentração de biomassa total no processo batelada.

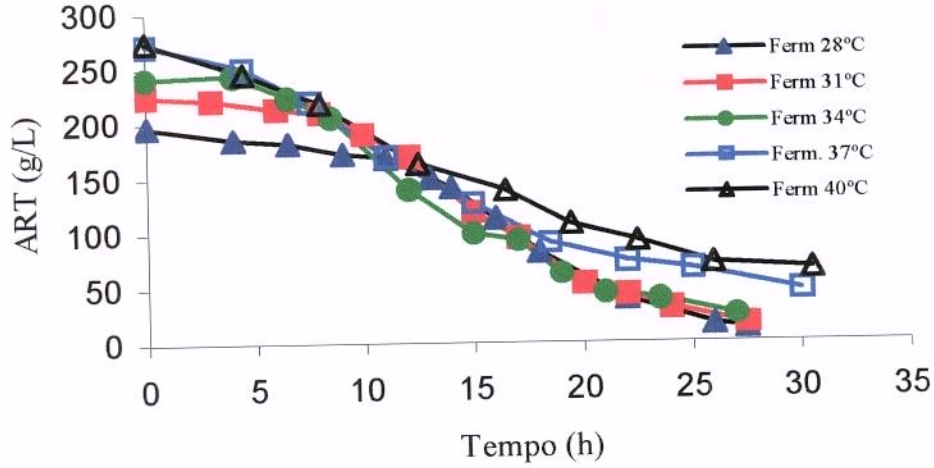


Figura V.7: Comportamento da concentração de substrato no processo batelada.

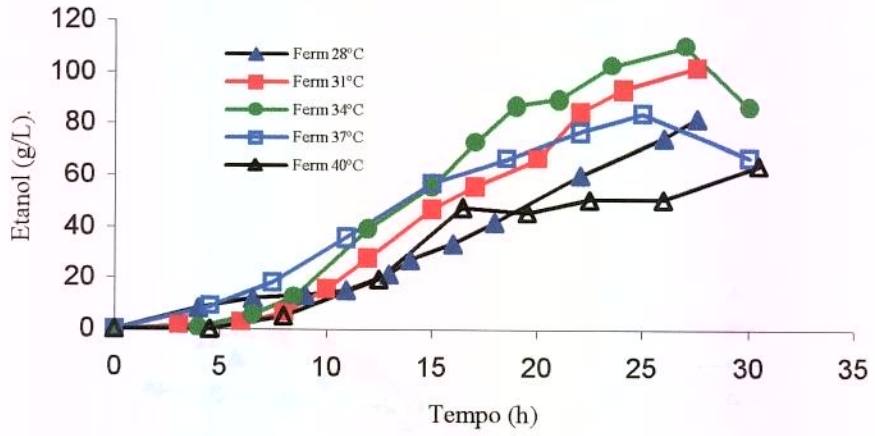


Figura V.8: Comportamento da concentração de etanol no processo batelada.

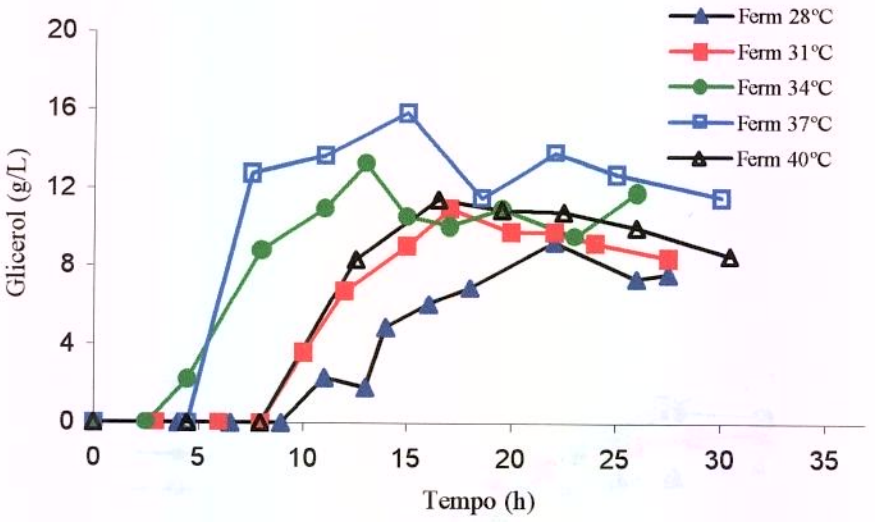


Figura V.9: Comportamento da concentração de glicerol no processo batelada.

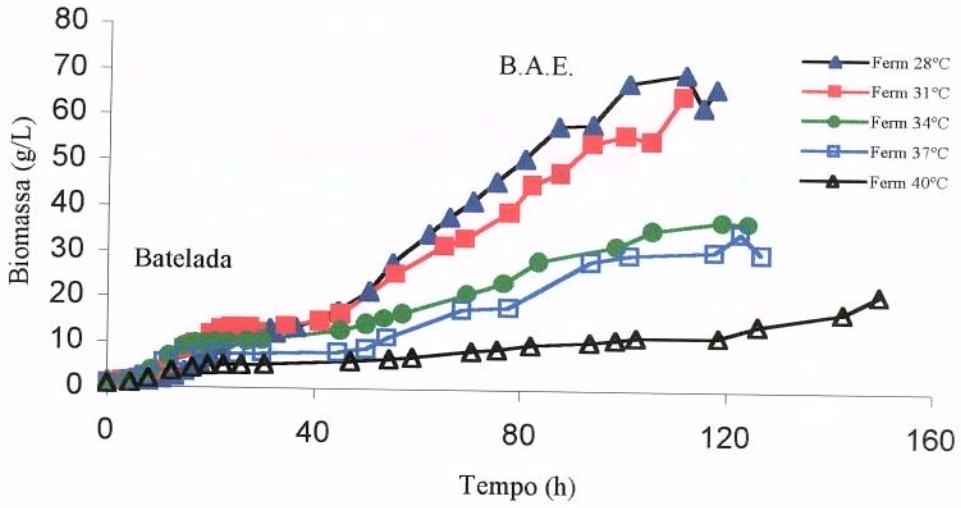


Figura V.10: Comportamento da concentração de biomassa total no processo batelada e batelada alimentada estendida.

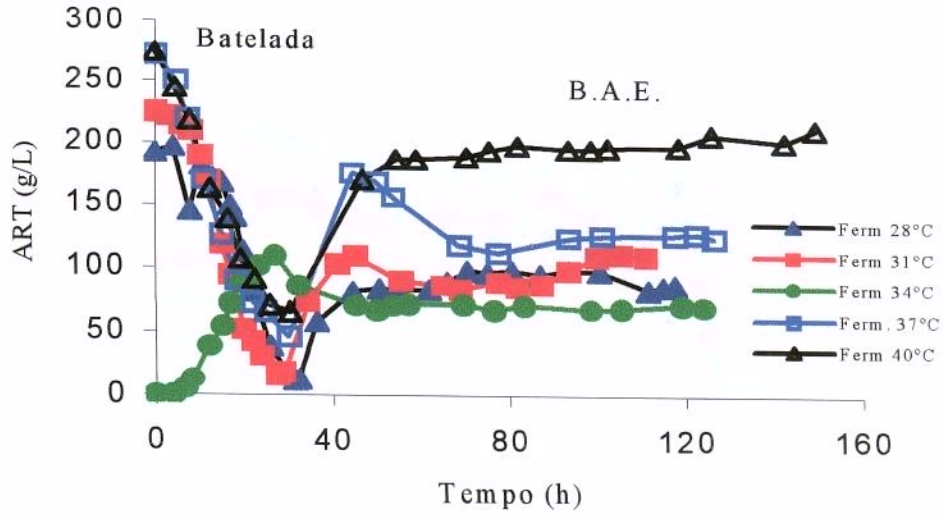


Figura V.11: Comportamento da concentração de substrato no processo batelada e batelada alimentada estendida.

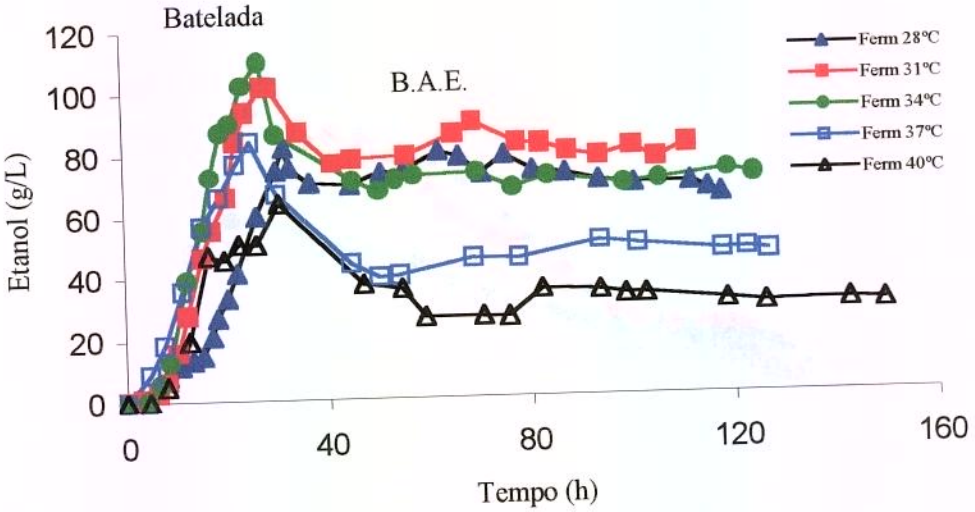


Figura V.12: Comportamento da concentração de etanol no processo batelada e batelada alimentada estendida.

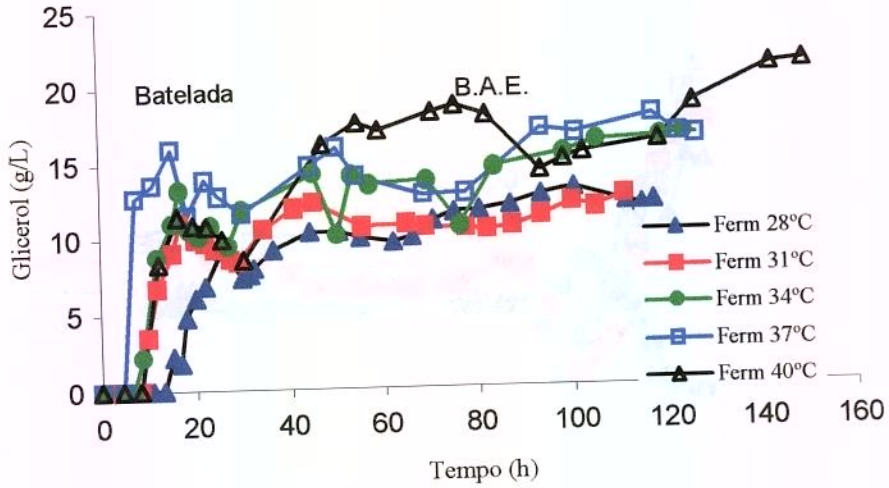


Figura V.13: Comportamento da concentração de glicerol no processo batelada e batelada alimentada estendida.

Através das figuras V.6 a V.13 pode-se notar que a faixa de temperatura compreendida entre 28°C e 34°C, é onde se obtêm os melhores resultados quando se trata de consumo de substrato, formação de biomassa e de produto. Segundo HUANG e CHEN (1988) a viabilidade, o rendimento celular e o rendimento na produção de etanol diminuem com o aumento de temperatura. Com relação ao glicerol, as figuras V.9 e V.13 demonstram

uma certa tendência do aumento da quantidade e glicerol com o aumento da temperatura, o que de certa forma é prejudicial, pois diminui deste modo, o rendimento do processo fermentativo.

As figuras V.14 a V.18 apresentam a evolução do consumo de substrato nas fermentações batelada e batelada alimentada estendida. Com a análise destas figuras e com o auxílio das tabelas tabelas V.1 a V.5 pode-se verificar que a sacarose é rapidamente hidrolisada e convertida em glicose e frutose durante a batelada alimentada estendida.

Segundo NWESIGYE e BARFORD (1994) a sacarose presente no meio migra para o interior da célula sem que primeiramente haja a hidrólise de seus constituintes monossacarídios, porém com o decorrer da fermentação, a viabilidade celular diminui e ocorre o rompimento da parede celular da levedura liberando para o meio enzimas hidrolíticas.

O rompimento da parede celular pode ocorrer devido ao atrito da célula com a parede dos filtros ou com o rotor da bamba, pela idade da levedura e pela quantidade de etanol intracelular. PANCHAL e STEWART (1979) em seus estudos verificaram que a redução da viabilidade celular ocorre quando existe altos níveis de etanol presente no interior da célula.

Com as figuras V.14 a V.18 pode-se verificar que as leveduras consomem preferencialmente a glicose restando no meio altas concentrações de frutose que são responsáveis por mais de 50% da quantidade de ART do meio. CASON *et al.* (1987) estudaram as diferentes taxas de utilização da glicose e frutose pala *Saccharomyces cerevisiae* e verificaram que a glicose é consumida mais rapidamente que a frutose quando estes dois açúcares estão presentes no meio fermentativo.

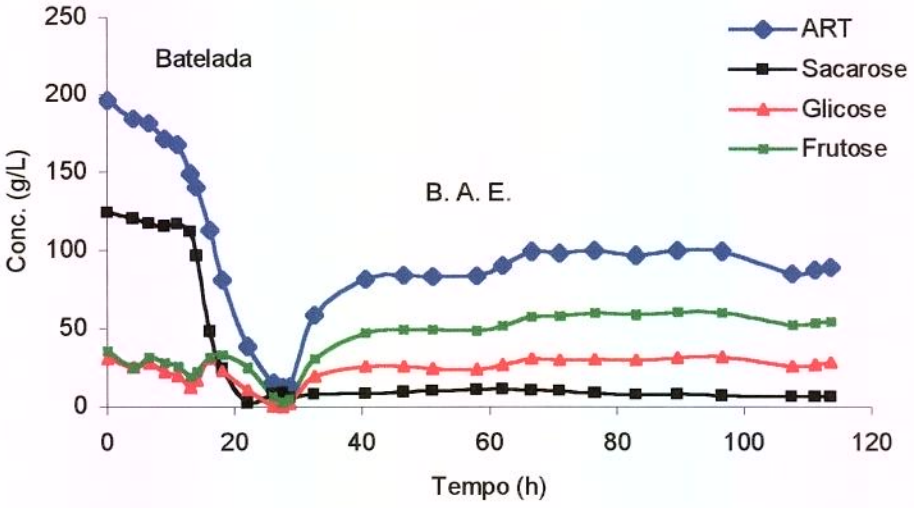


Figura V.14: Consumo de substrato no sistema batelada e batelada alimentada estendida na temperatura de 28°C.

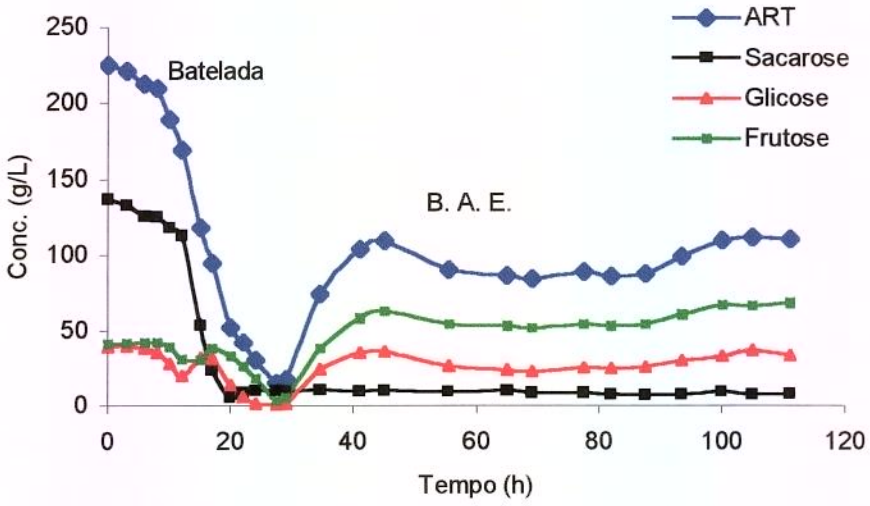


Figura V.15: Consumo de substrato no sistema batelada e batelada alimentada estendida na temperatura de 31°C.

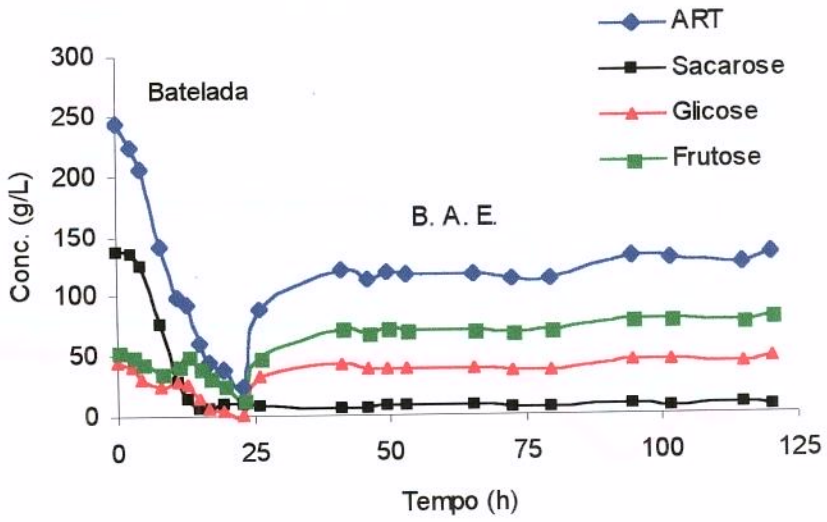


Figura V.16: Consumo de substrato no sistema batelada e batelada alimentada estendida na temperatura de 34°C.

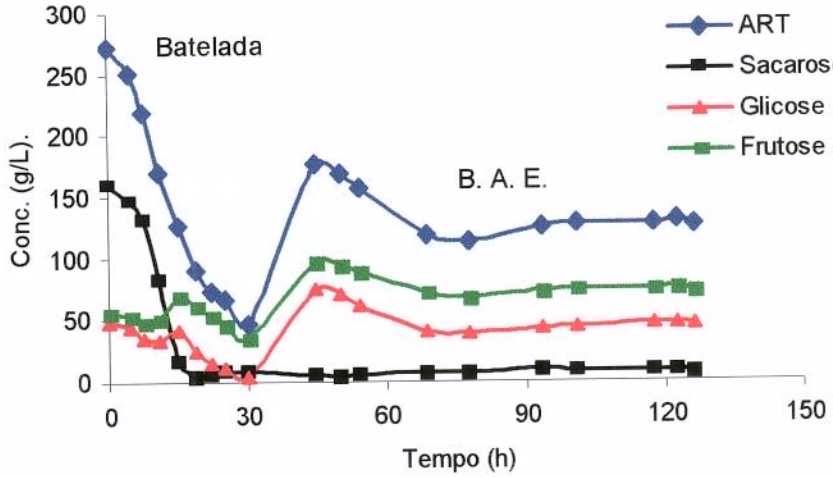


Figura V.17: Consumo de substrato no sistema batelada e batelada alimentada estendida na temperatura de 37°C.

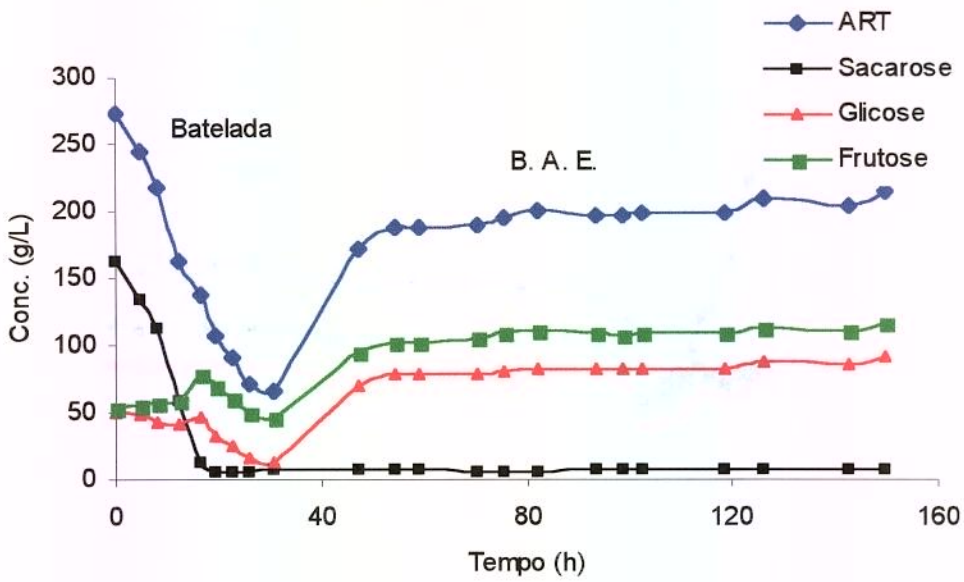


Figura V.18: Consumo de substrato no sistema batelada e batelada alimentada estendida na temperatura de 40°C.

V.2. AJUSTE DE PARÂMETROS E MODELAGEM MATEMÁTICA

Após uma prévia análise dos dados experimentais, realizou-se a modelagem cinética dos processos fermentativos. Para isso, tomou-se como base os parâmetros cinéticos determinados por ANDRIETTA (1994), ALVES (1996), CARVALHO (1996) e SIQUEIRA (1997) levando em consideração o efeito da temperatura. Porém, os parâmetros cinéticos Yx e mx foram estudados previamente através de análise de equações macroquímicas.

V.2.1. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS Yx, E mx ATRAVÉS DO SOFTWARE MACROBAL®.

Para exemplificar a determinação dos parâmetros cinéticos Yx e mx através do software Macrobal, a tabela V. 8 apresenta os dados iniciais referente ao processo batelada a temperatura de 34°C.

Tabela V. 8: Dados experimentais do processo batelada.

Tempo (h)	Xv (g/L)	Xv (cmol/L)	ART (g/L)	P (g/L)	Gliol (g/L)	CO_2 (mol/h)
0	1.17	0.046	241.335	0.000	0.000	0.000
4	1.6	0.064	243.391	0.583	0.000	0.249
6.5	2.58	0.103	223.626	5.850	0.000	0.430
8.5	3.8	0.151	205.409	12.817	2.228	0.538
12	6.94	0.276	139.977	39.133	8.793	0.577
15	9.16	0.364	99.036	55.310	10.956	0.515
17	9.92	0.394	92.053	72.545	13.227	0.374
19	9.69	0.385	61.301	87.159	10.584	0.271
21	9.99	0.397	44.099	89.770	10.065	0.254
23.5	9.92	0.394	38.817	102.304	10.929	0.284
27	9.76	0.388	23.558	110.090	9.503	0.330

Onde a medida de CO_2 foi obtida através do volume de água deslocado através do esquema apresentado pala figura IV.1. As transformações de unidade de g/L para mol/L seguem conforme os pesos moleculares e cada composto apresentado na tabela IV.1.

Com os dados da tabela V. 8, foi utilizado o software Table Curve 2D para o ajuste da função sigmoidal, conforme apresentada na equação (34). Esta função foi escolhida para o ajuste dos dados experimentais por ser simples, apresentar um bom ajuste dos dados experimentais e por ser facilmente derivada. A figura V.19 apresenta os ajustes dos dados experimentais através da função sigmoidal.

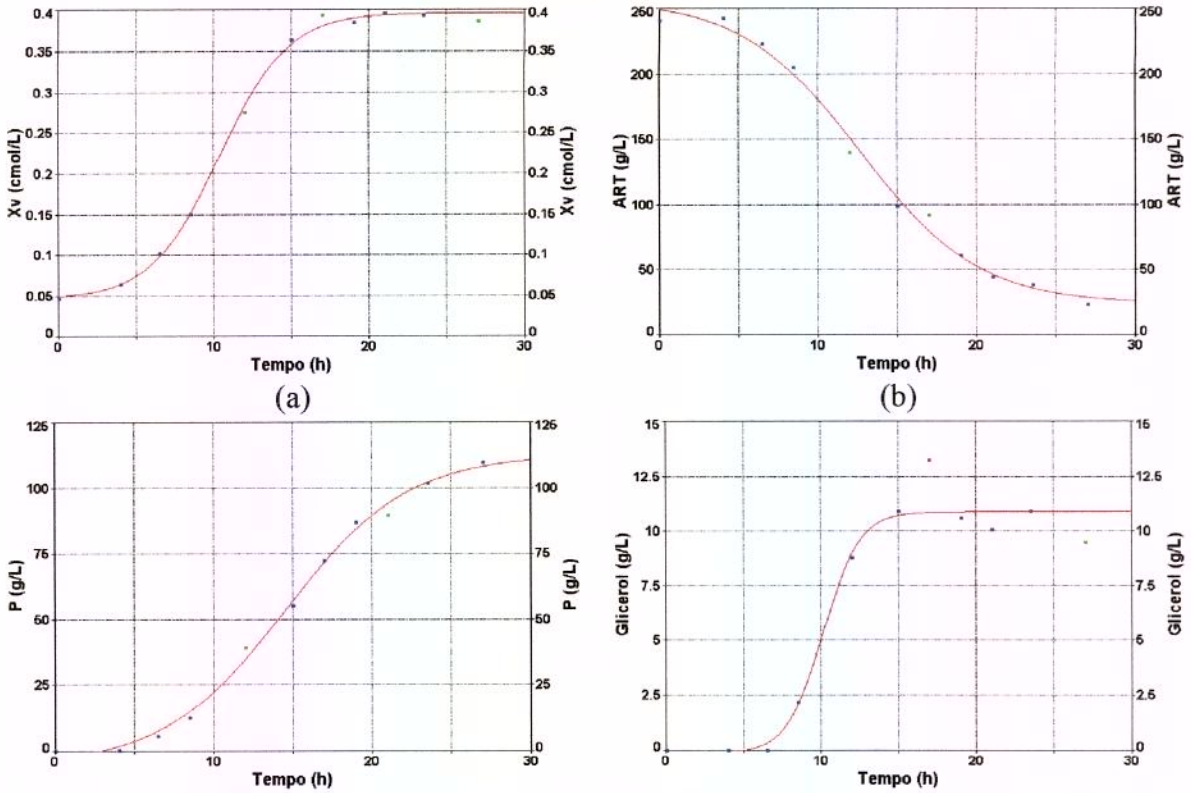


Figura V.19: Ajustes dos dados experimentais através da função sigmoidal em: (a) Biomassa viável por tempo; (b) Concentração de açúcares redutores totais por tempo; (c) concentração de etanol por tempo e (d) concentração de glicerol por tempo

Onde as constantes a, b, c e d da função sigmoidal são apresentados na tabela V. 9.

Tabela V. 9: Constantes da função sigmoidal utilizado no ajustes das variáveis

	Constantes			
Variáveis	a	b	c	d
Xv	0.0466	0.3501	10.387	2.177
ART	24.072	233.014	12.668	-3.70
P	-5.375	118.208	14.536	3.853
Glicerol	-0.1199	11.006	10.160	1.1668

Por definição:

$$\frac{dXv}{dt} = rx \tag{41}$$

$$\frac{dS}{dt} = -rs \tag{42}$$

$$\frac{dP}{dt} = rp \tag{43}$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = rco \tag{44}$$

$$\mu x = \frac{1}{Xv} \cdot \frac{dXv}{dt} \tag{45}$$

$$\mu s = \frac{1}{Xv} \cdot \frac{dS}{dt} \tag{46}$$

$$\mu p = \frac{1}{Xv} \cdot \frac{dP}{dt} \tag{47}$$

$$Ysx = \frac{rx}{-rs} \tag{48}$$

$$Ypx = \frac{rx}{rp} \tag{49}$$

Resolvendo as equações (41) a (44) obtêm-se os dados apresentados da tabela V.10

Tabela V.10: Velocidades de reações calculadas pelo Table Curve 3D.

Tempo (h)	Xv (cmol/L)	rs (g/L/h)	rp (g/L/h)	rx (cmol/L/h)	rs (mol/L/h)	rp (mol/L/h)	rco (mol/L/h)
0	0.050	-1.924	0.674	0.001	-0.011	0.015	0.000
3	0.058	-4.007	1.394	0.005	-0.022	0.030	0.070
6	0.088	-7.652	2.721	0.017	-0.043	0.059	0.121
9	0.168	-12.430	4.760	0.036	-0.069	0.103	0.151
12	0.284	-15.617	6.895	0.035	-0.087	0.150	0.162
15	0.359	-14.280	7.641	0.015	-0.079	0.166	0.145
18	0.386	-9.747	6.307	0.005	-0.054	0.137	0.105
21	0.394	-5.424	4.069	0.001	-0.030	0.088	0.076
24	0.396	-2.688	2.232	0.000	-0.015	0.049	0.071
27	0.397	-1.256	1.118	0.000	-0.007	0.024	0.080
30	0.397	-0.571	0.535	0.000	-0.003	0.012	0.093

Onde rco é o valor da velocidade de reação de CO_2 obtido pela divisão da taxa de produção pelo volume total do sistema fermentativo que foi de 3.56 L. Os dados da tabela V.10 foram os valores iniciais adotados para a estimativa das velocidades de reações no software Macrobal. O erro adotado para os valores iniciais foram de 5% exceto para a medida de glicerol que foi de 10%, pois esse foi o parâmetro que apresentou o pior ajuste.

Através de uma análise estatística o software estimava as velocidades de reações que são apresentada na tabela V.11

Tabela V.11: Velocidades de reações estimadas pelo Macrobal

Tempo (h)	Xv**	rx*	rp*	rco*	rs*
0	0.050	0.001	0.015	0.000	0.011
3	0.058	0.005	0.031	0.036	0.023
6	0.088	0.017	0.060	0.068	0.043
9	0.168	0.036	0.111	0.122	0.074
12	0.284	0.035	0.152	0.158	0.088
15	0.359	0.015	0.159	0.154	0.077
18	0.386	0.005	0.126	0.116	0.052
21	0.394	0.001	0.088	0.076	0.030
24	0.396	0.000	0.049	0.041	0.015
27	0.397	0.000	0.025	0.020	0.007
30	0.397	0.000	0.012	0.009	0.003

*(mol/L/h) **(cmol/L)

As equações (45) a (49) foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros cinéticos Yx e mx. Para isso, a tabela V.12 apresenta os valores em relação ao tempo dos parâmetros cinéticos das equações (36) a (40).

Tabela V.12: Parâmetros cinéticos

μx (g/g/h)	μs (g/g/h)	μp (g/g/h)	Ysx (g/g)	Ypx (g/g)	Ysp (g/g)	Ysx (g/g)	Ypx (g/g)	Yps (g/g)	μs-(μp/0.511)	1/Ysp-1/Ypx...
0.03	1.54	0.54	0.13	0.09	1.37	0.02	0.05	0.35	0.48	17.91
0.09	2.79	0.97	0.22	0.16	1.36	0.03	0.09	0.35	0.89	10.24
0.19	3.49	1.24	0.39	0.28	1.39	0.05	0.15	0.36	1.06	5.59
0.22	3.16	1.21	0.49	0.32	1.50	0.07	0.18	0.38	0.79	3.68
0.12	2.22	0.98	0.40	0.23	1.73	0.06	0.13	0.44	0.30	2.40
0.04	1.53	0.81	0.20	0.10	2.07	0.03	0.05	0.53	-0.05	-1.19
0.01	0.96	0.60	0.09	0.04	2.45	0.01	0.02	0.63	-0.21	-17.97
0.00	0.55	0.41	0.04	0.01	2.94	0.01	0.01	0.75	-0.26	-83.14
0.00	0.27	0.23	0.02	0.01	3.27	0.00	0.00	0.84	-0.17	-220.09
0.00	0.13	0.11	0.01	0.00	3.50	0.00	0.00	0.89	-0.09	-480.05
0.00	0.06	0.05	0.01	0.00	3.67	0.00	0.00	0.94	-0.05	-961.93

As figuras V.20 a V.23 apresentam os gráficos relacionados as equações (36) a (40). Nota-se que para a realização deste gráficos, foram considerandos somente os pontos da fase exponencial do processo fermentativo. Nos gráficos das figuras V.20 e V.21 não foi considerado a inclusão do produto, já nos gráficos das figuras V.22 e V.23 o produto foi considerado.

Nos gráficos das figuras V.20 e V.22, o termo angular refere-se ao inverso de Yx e o linear a mx. Nos gráficos das figuras V.21 e V.23, o termo angular refere-se ao parâmetro mx e o termo linear é o inverso do parâmetro Yx

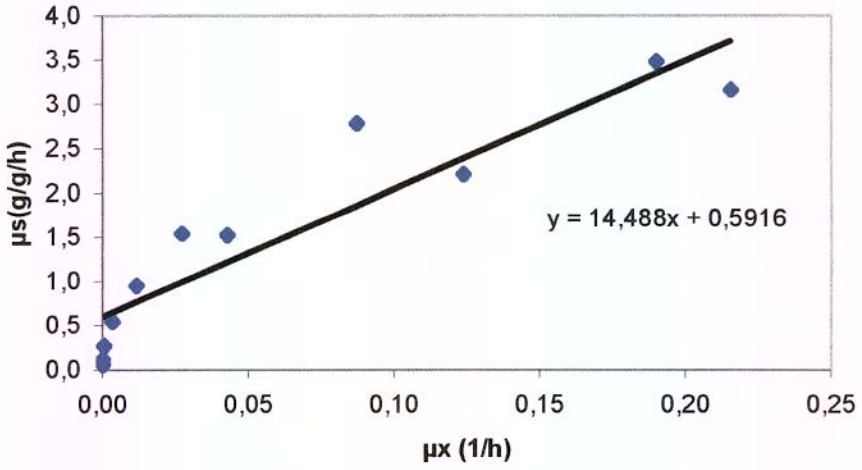


Figura V.20: Gráfico de μs versus μs não considerando produto.

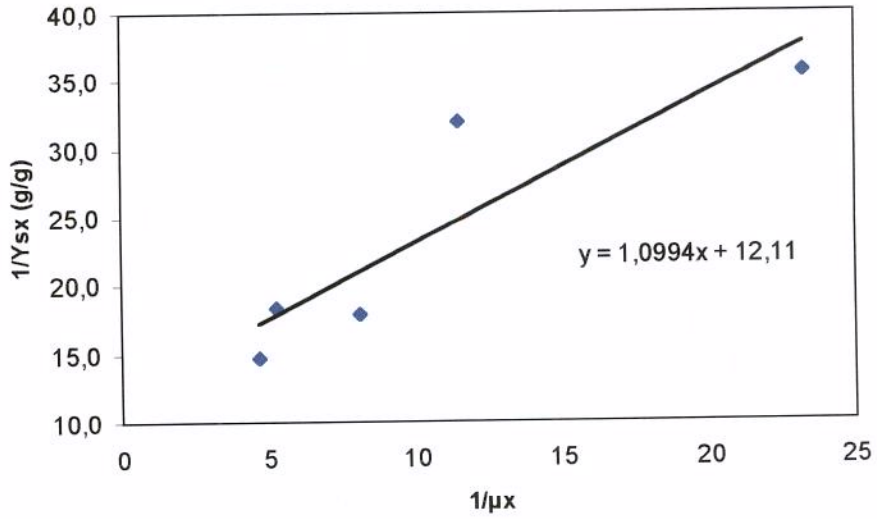


Figura V.21: Gráfico de 1/Ysx versus 1/μx não considerando produto

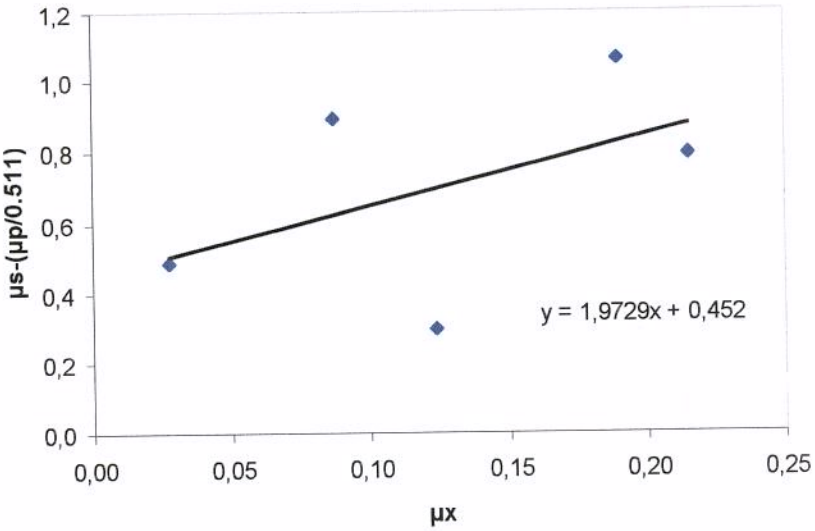


Figura V.22: Gráfico de μs versus μs considerando produto.

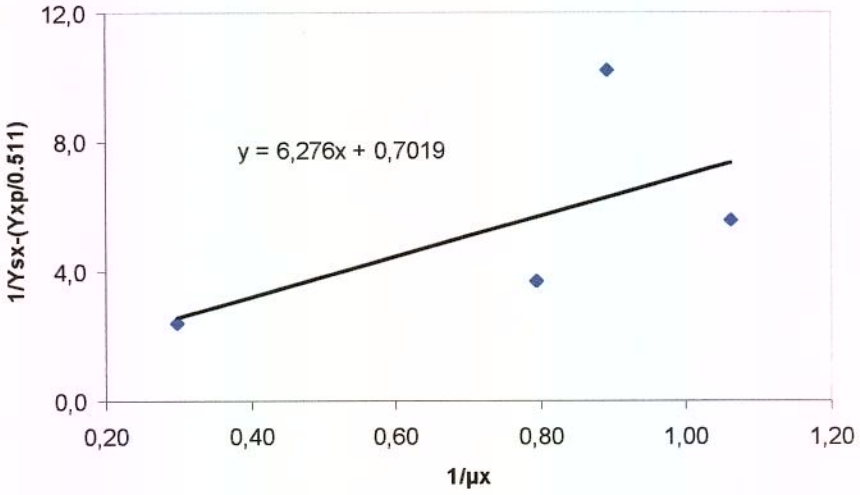


Figura V.23: Gráfico de 1/Ysx versus 1/μx considerando produto.

As tabelas V. 13 e V.14 apresentam os parâmetros Yx e mx, respectivamente, calculado para as diversas termperaturas do processo fermentativo.

Tabela V. 13: Parâmetro Yx calculado para o processo fermentativo

	Temperatura (°C)				
Gráfico	28	31	34	37	40
μs x μx	0,074	0,071	0,069	0,054	0,029
1/Ysx x 1/μx	0,072	0,065	0,083	0,055	0,030
μs-μp/0.511	0,227	0,362	0,507	0,258	0,043
1/Ysx-(Yxp/0.511)	1,002	1,018	1,425	0,194	0,046

Tabela V.14: Parâmetro mx calculado para o processo fermentativo

	Temperatura (°C)				
Gráfico	28	31	34	37	40
μs x μx	0,07	0,12	0,59	1,30	1,04
1/Ysx x 1/μx	0,16	0,14	1,10	1,16	0,69
μs-μp/0.511	0,04	0,03	0,45	0,99	0,70
1/Ysx-(Yxp/0.511)	6,75	4,90	6,28	3,51	4,09

V.2.2. PROCESSO BATELADA

A tabela V.15 apresenta os valores dos parâmetros utilizados na modelagem cinética do processo batelada. Os valores de μmax, Pmax e Xmax foram os mesmos utilizados por SIQUEIRA (1997) e ALVES (1996), exceto para temperatura de 40°C.

As figuras V.24 a V.28 apresentam a modelagem cinética do processo batelada. Foram utilizadas as equações de balanços descritas no item IV.4.1, onde as equações diferenciais foram integradas utilizando o método de Runge-Kutta de 4ª ordem e os parâmetros cinéticos foram ajustados através dos dados experimentais. Como no final da fermentação batelada a viabilidade celular foi de aproximadamente 100%, o termo de morte celular não foi incluído no modelo.

Tabela V.15: Parâmetros cinéticos da modelagem do processo batelada.

	Temperatura (°C)				
Parâmetros	28	31	34	37	40
μmax (h^{-1})	0.355	0.395	0.426	0.396	0.265
Ks (g/L)	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
Ki	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Xmax (g/L)	68.04	69.4	58.5	41	25
Pmax (g/L)	113.5	112.5	110.1	90	70
n	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
m	1	1	1	1	1
mx	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Yx	0.085	0.07	0.05	0.034	0.027
α	6	7.3	9.8	10.5	11.5
β	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

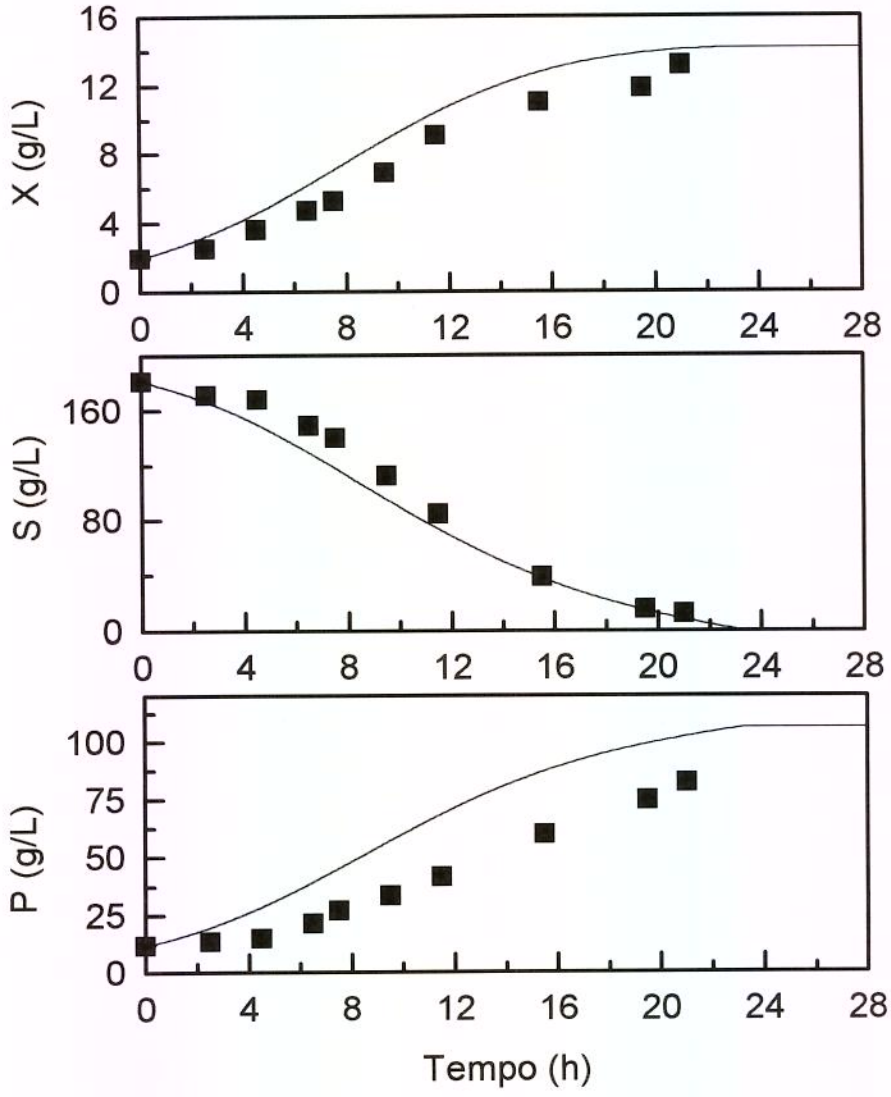


Figura V.24: Modelagem cinética do processo batelada na temperatura de 28°C.

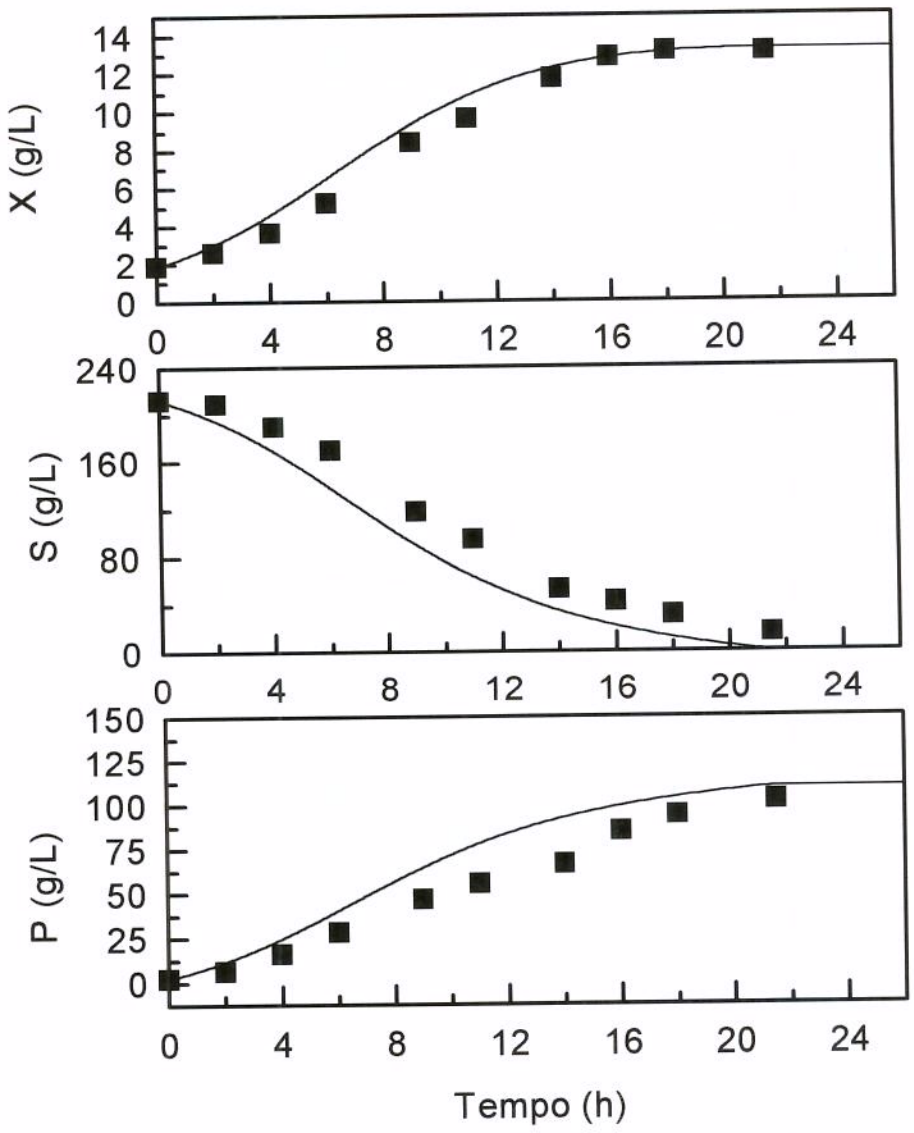


Figura V.25: Modelagem cinética do processo batelada na temperatura de 31°C.

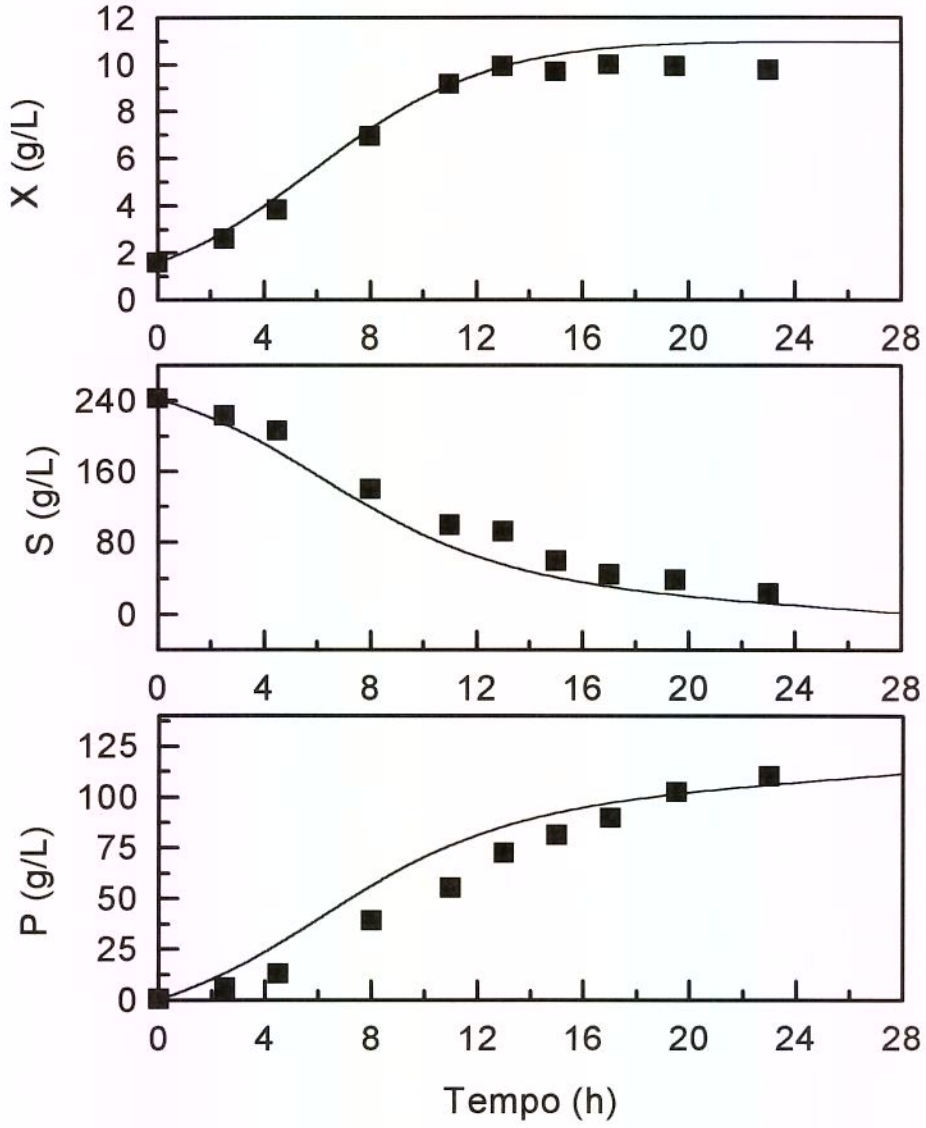


Figura V.26: Modelagem cinética do processo batelada na temperatura de 34°C.

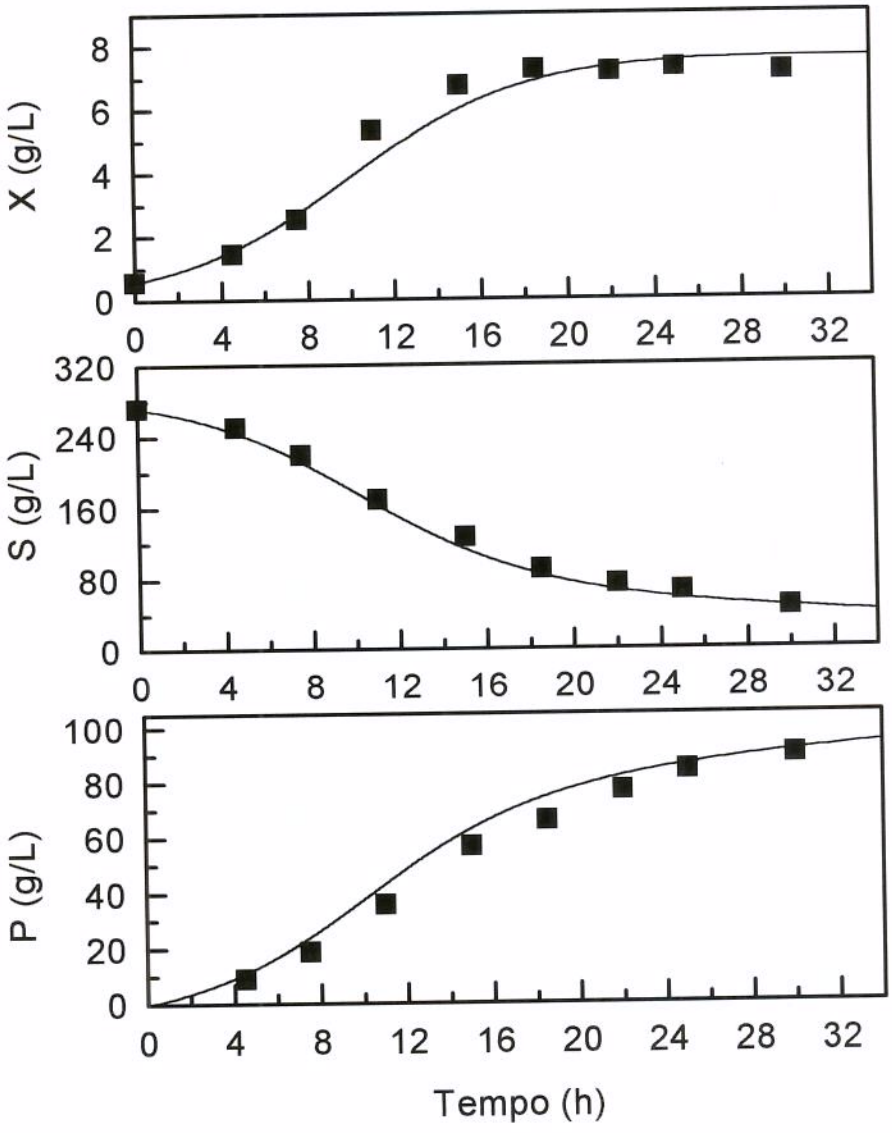


Figura V.27: Modelagem cinética do processo batelada na temperatura de 37°C.

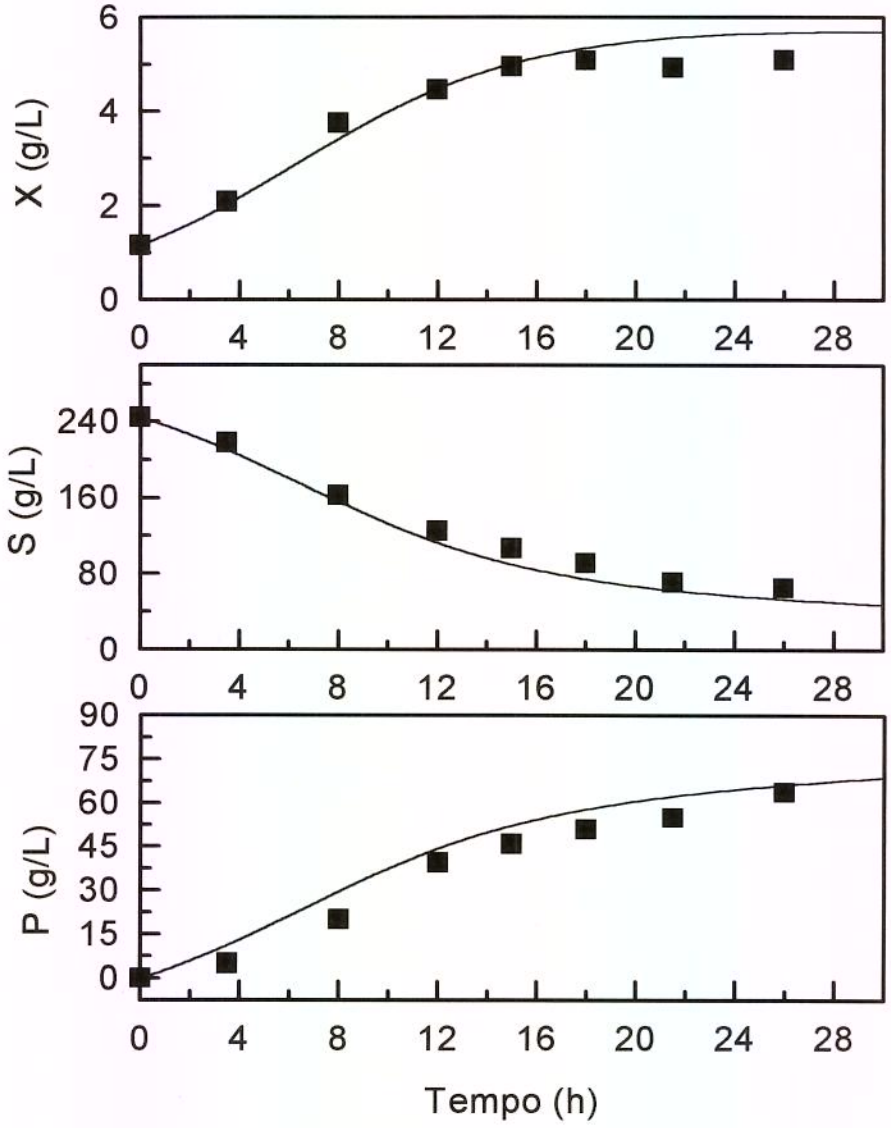


Figura V.28: Modelagem cinética do processo batelada na temperatura de 40°C.

Através das figuras V.29 a V.33 pode-se verificar a variação da velocidade específica máxima de crescimento (μmax), da concentração máxima de biomassa na qual cessa o crescimento celular (Xmax), da concentração máxima de etanol na qual cessa o crescimento celular (Pmax), do rendimento limite (Yx) e do coeficiente de produção de etanol associado ao crescimento celular (α) em função da temperatura, respectivamente.

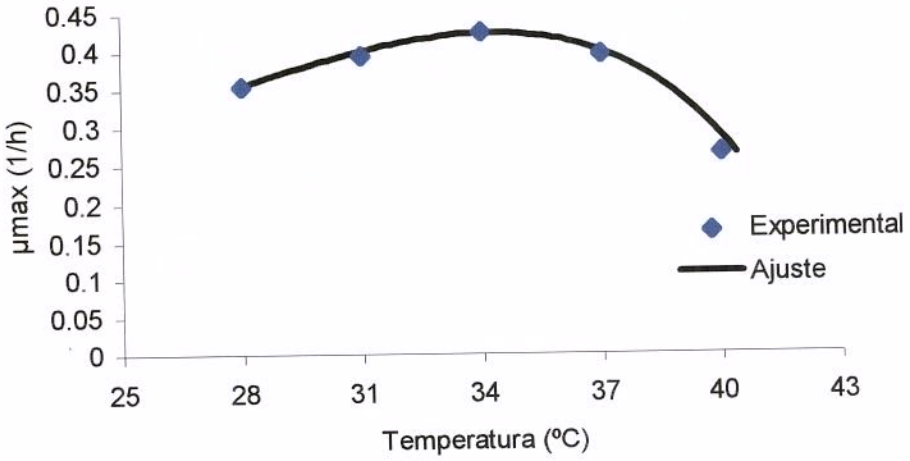


Figura V.29: Variação de μmax em relação à temperatura.

Com a figura V.29 é possível verificar que a temperatura onde se tem uma maior taxa específica de crescimento celular é de 34°C, consequentemente tem-se, nessa região, um maior rendimento de produção de etanol. Nota-se que μmax cresce vagarosamente até a temperatura ótima e logo depois diminuiu com o aumento de temperatura, sendo mais significativo na temperatura de 40°C.

A equação (50) apresenta a função de μmax utilizada na modelagem cinética do processo.

$$\mu\max = 1.57 \cdot \exp\left(-\frac{41.4714}{T}\right) - 12948.91 \cdot \exp\left(-\frac{431.39}{T}\right) \qquad (50)$$

As figuras V.30 e V.31 apresentam a variação de Xmax e Pmax com a temperatura. Nota-se que, em ambas figuras, os valores dos parâmetros cinéticos diminuem com o aumento de temperatura, indicando que os fenômenos inibitórios exercidos pela concentração de biomassa e de etanol são mais pronunciados em altas temperaturas.

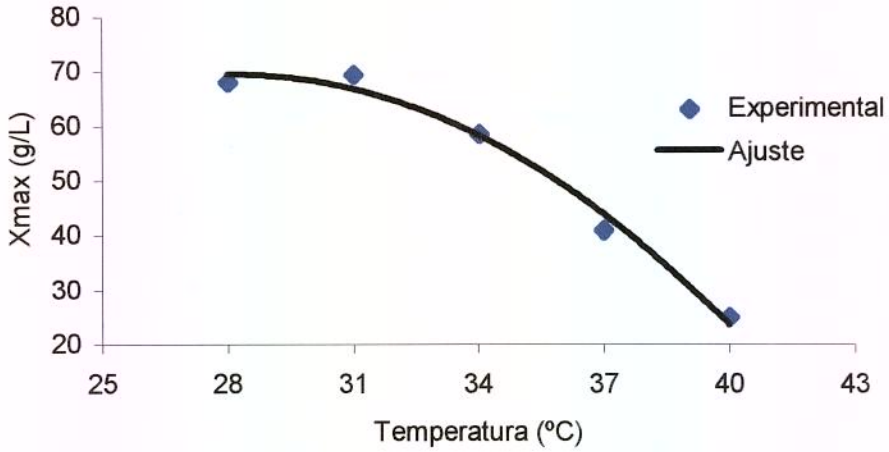


Figura V.30: Variação de Xmax em relação à temperatura.

A equação (51) apresenta a função de Xmax utilizada na modelagem cinética.

$$\text{Xmax} = -0.328 \cdot T^2 + 18.484 \cdot T - 191.06 \qquad (51)$$

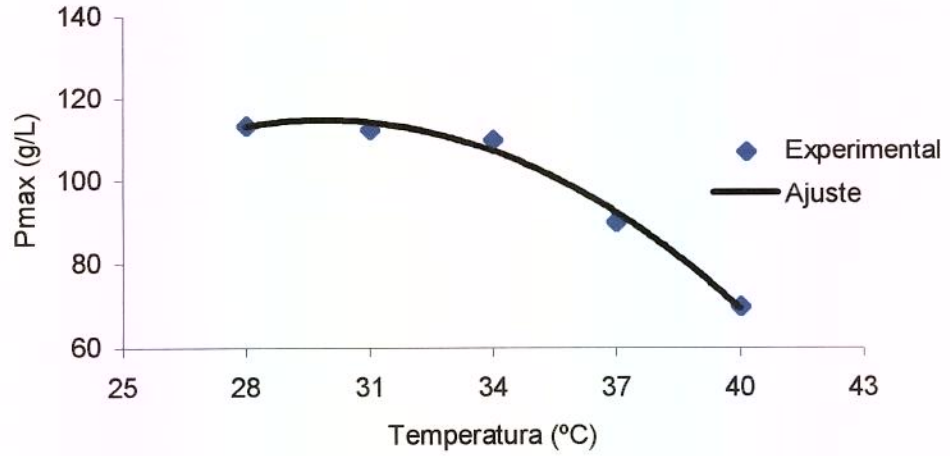


Figura V.31: Variação de Pmax em relação à temperatura.

A equação (52) apresenta a função de Pmax utilizada na modelagem cinética do processo.

$$\text{Pmax} = -0.4421 \cdot T^2 + 26.41 \cdot T - 279.75 \tag{52}$$

A variação de Yx é apresentada através da figura V.32. Nota-se que o rendimento limite diminui com o aumento da temperatura. Este parâmetro tem forte influencia no ajuste de concentração de substrato, e seu comportamento indica que com o aumento de temperatura, diminui a conversão de açúcar em produto e em biomassa.

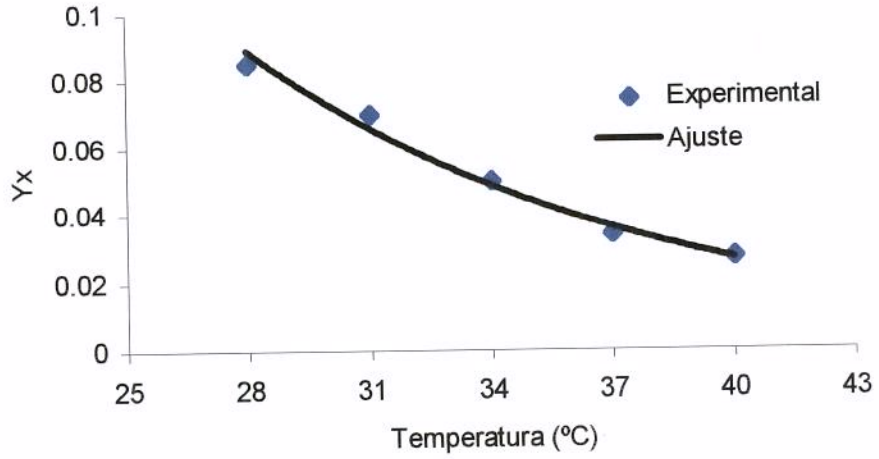


Figura V.32: Variação de Yx em relação à temperatura.

A função de Yx utilizada na modelagem cinética é apresentada na equação (53).

$$Yx = 1.484 \cdot \exp(-0.10053 \cdot T) \tag{53}$$

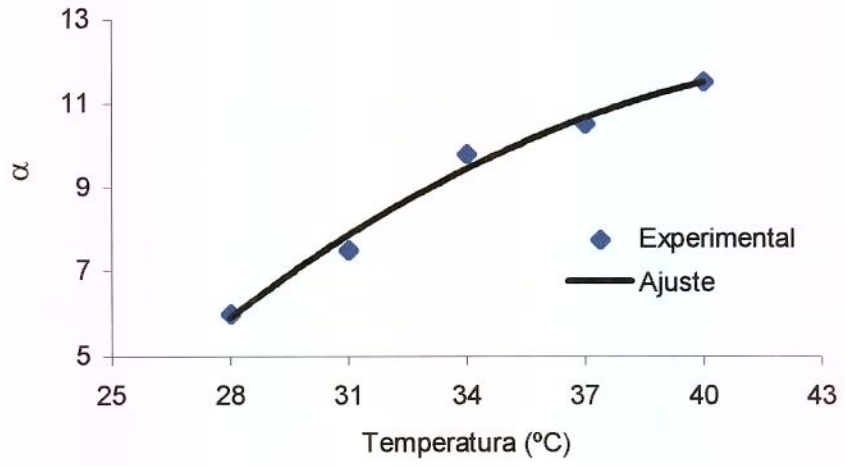


Figura V.33: Variação de α em relação à temperatura.

A variação de α em função da temperatura e apresentada pela figura V.33. Este parâmetro tem forte influência no ajuste dos dados experimentais em relação a biomassa total e a produção de etanol principalmente, pois o aumento de α diminui a biomassa total e aumenta a concentração de etanol no meio.

A função que demonstra a variação de α em relação a temperatura é apresentada pela equação

$$\alpha = -0.0048 \cdot T^2 + .857 \cdot T - 14.292 \qquad (54)$$

Para o cálculo do rendimento limite (Yx) e do coeficiente de manutenção (mx) utilizaram-se dados experimentais do processo batelada através de relações de rs e rx e entre rp e rs através de balanços de massas macromoleculares conforme descrito no item V.2.1. As figuras V.34 e V.35 apresentam os valores calculados de Yx e mx, respectivamente, em função da temperatura. considerando a inclusão e a ausência do produto no balanço de massa.

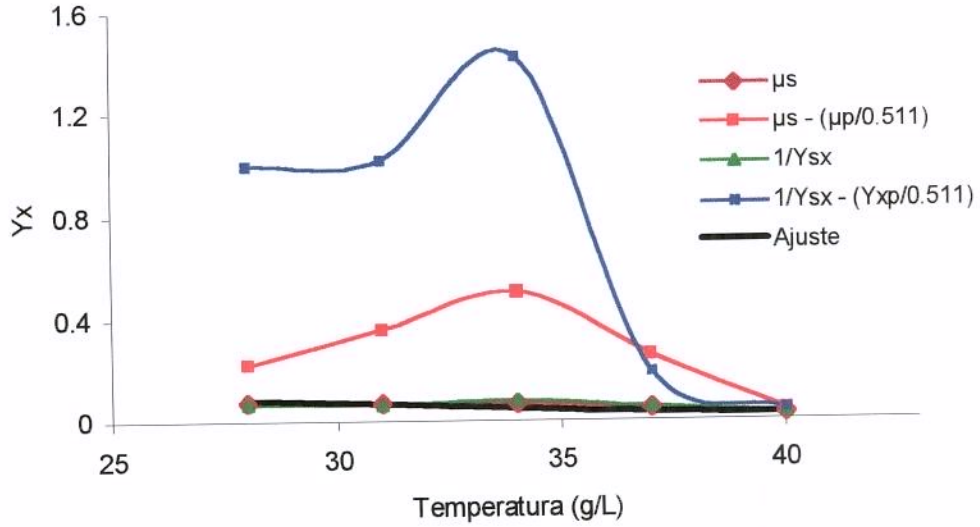


Figura V.34: Valores calculados de Yx em função da temperatura.

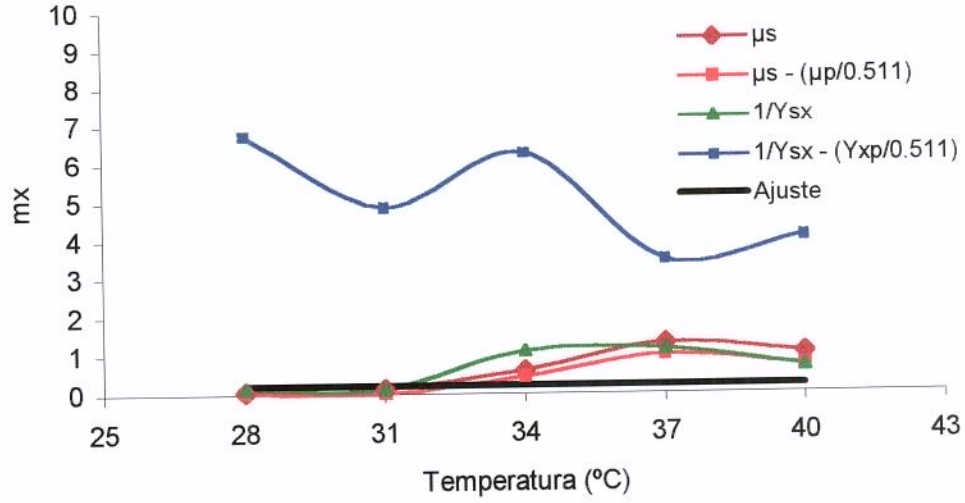


Figura V.35: Valores calculados de mx em função da temperatura.

Os dados plotados nas figuras V.34 e V.35, foram obtidos através do software Macrobal®, que estima as velocidades das reações a cada ponto a partir de dados calculados através de ajuste da função sigmoidal dos dados experimentais do processo batelada. No caso de Yx, os valores que desconsideraram o produto no balanço de massa foram os que mais se aproximaram dos valores ajustados na modelagem.

Em relação ao coeficiente de manutenção (mx), os valores calculados se diferenciaram do valor obtido na modelagem do processo. Os valores estimados pelo

Macrobal® apresentaram uma mesma tendência considerando ou não o produto, porem atingiram valores muito elevados de mx, o que não é observado na literatura. Existe uma grande controvérsia na literatura quanto à inclusão ou não de produto nestes balanços.

O modelo cinético obtido para o processo batelada teve um bom ajuste quando comparado com os dados experimentais, como foi mostrado nas figuras V.24 a V.28, com exceção para os resultados para a temperatura de 28°C onde o ajuste não foi muito bom com relação a formação de produto. As equações (50) a (60) apresentam o modelo cinético utilizado para descrever a formação de biomassa, consumo de etanol e formação de produto.

$$\frac{dX}{dt} = rx \tag{55}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-rs + \frac{S}{390} \cdot rx}{1 - \frac{X}{390}} \tag{56}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{rp + \frac{(1-0.78)}{390} \cdot rx \cdot P}{1 - \frac{X}{390} + \frac{0.78}{390} \cdot X} \tag{57}$$

$$rx = \mu\max(T) \cdot \left(\frac{S}{4.1+S}\right) \cdot \exp(-0.002 \cdot S) \cdot \left(1 - \frac{X}{\text{Xmax}(T)}\right)^{1} \cdot \left(1 - \frac{P}{\text{Pmax}}\right)^{1.5} \cdot X \tag{58}$$

$$rs = \frac{rx}{Yx(T)} + mx(T) \cdot X \tag{59}$$

$$rp = \alpha(T) \cdot rx + \beta \cdot X \tag{60}$$

$$\mu\max(T) = 1.57 \cdot \exp\left(-\frac{41.4714}{T}\right) - 12948.91 \cdot \exp\left(-\frac{431.39}{T}\right) \tag{50}$$

$$\text{Xmax(T)} = -0.328 \cdot T^2 + 18.484 \cdot T - 191.06 \tag{51}$$

$$Pmax(T) = -0.4421 \cdot T^2 + 26.41 \cdot T - 279.75 \quad (52)$$

$$Yx(T) = 1.484 \cdot \exp(-0.10053 \cdot T) \quad (53)$$

$$\alpha(T) = -0.0048 \cdot T^2 + .857 \cdot T - 14.292 \quad (54)$$

V.2.3. PROCESSO BATELADA ALIMENTADA ESTENDIDA

A tabela V.16 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos ajustados no processo batelada alimentada estendida. Como o microrganismo utilizado foi o mesmo que a do sistema batelada, mudando apenas o processo fermentativo, os valores dos parâmetros deverão ser praticamente os mesmos. Nota-se que os valores de μmax, Xmax, Pmax, Ks, n, m, mx e β são idênticos aos estimados no processo batelada, e os demais parâmetros são diferentes, porém com a mesma grandeza física.

As figuras V.36 a V.40 apresentam a modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida. Foram utilizadas as equações de balanços descritas no item IV.4.2, onde as equações diferenciais foram integradas utilizando o método de Runge-Kutta de 4ª ordem e os parâmetros cinéticos ajustados através dos dados experimentais.

Tabela V.16: Parâmetros cinéticos da modelagem do processo batelada alimentada estendida.

	Temperatura (°C)				
Parâmetros	28	31	34	37	40
μmax (h^{-1})	0.355	0.395	0.426	0.396	0.265
Ks (g/L)	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
Ki	0.0025	0.0028	0.0042	0.006	0.0077
Xmax (g/L)	68.04	69.4	58.5	41	25
Pmax (g/L)	113.5	112.5	110.1	90	70
n	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
m	1	1	1	1	1
mx	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Yx	0.08	0.06	0.05	0.03	0.018
α	5	8	11	13	20
β	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Kp	0.47	0.415	0.44	0.65	0.94

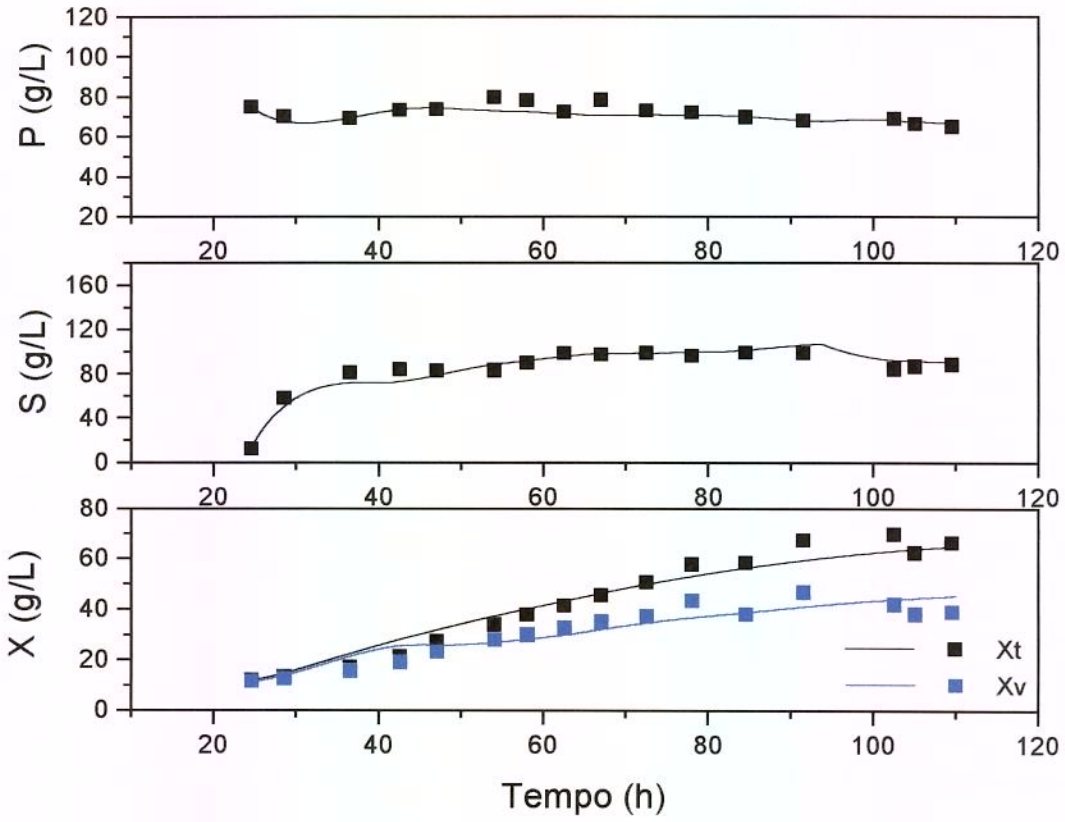


Figura V.36: Modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida na temperatura de 28°C.

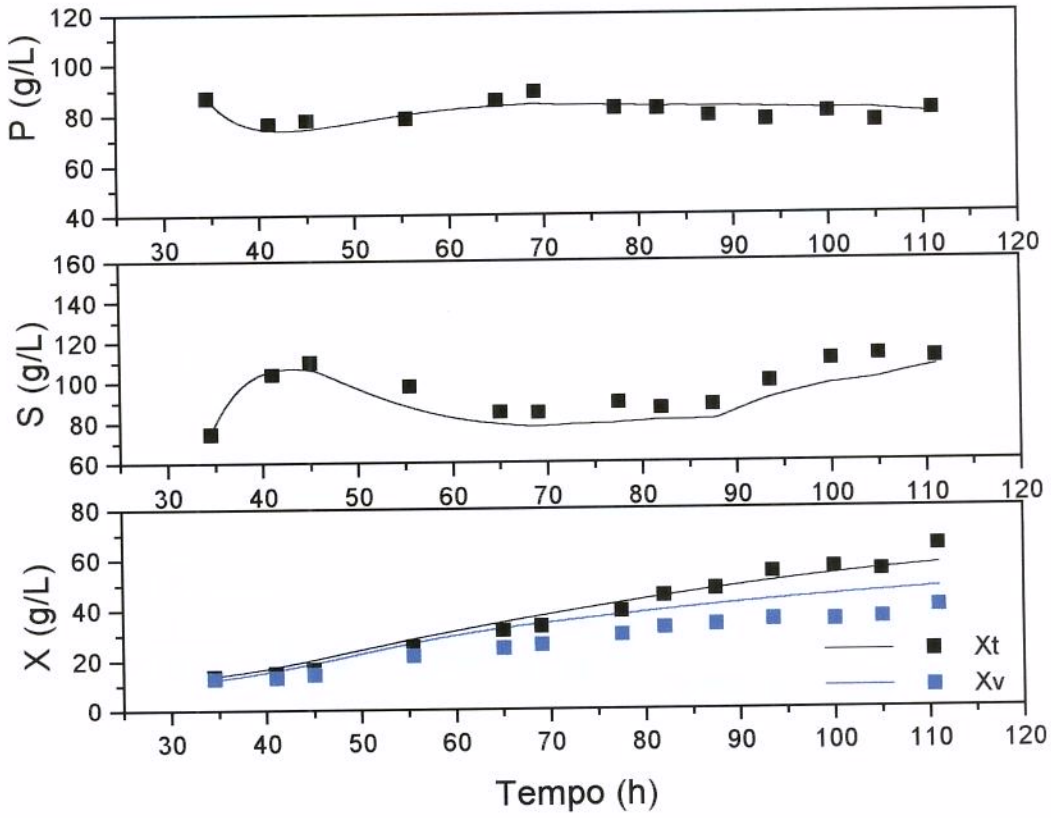


Figura V.37: Modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida na temperatura de 31°C.

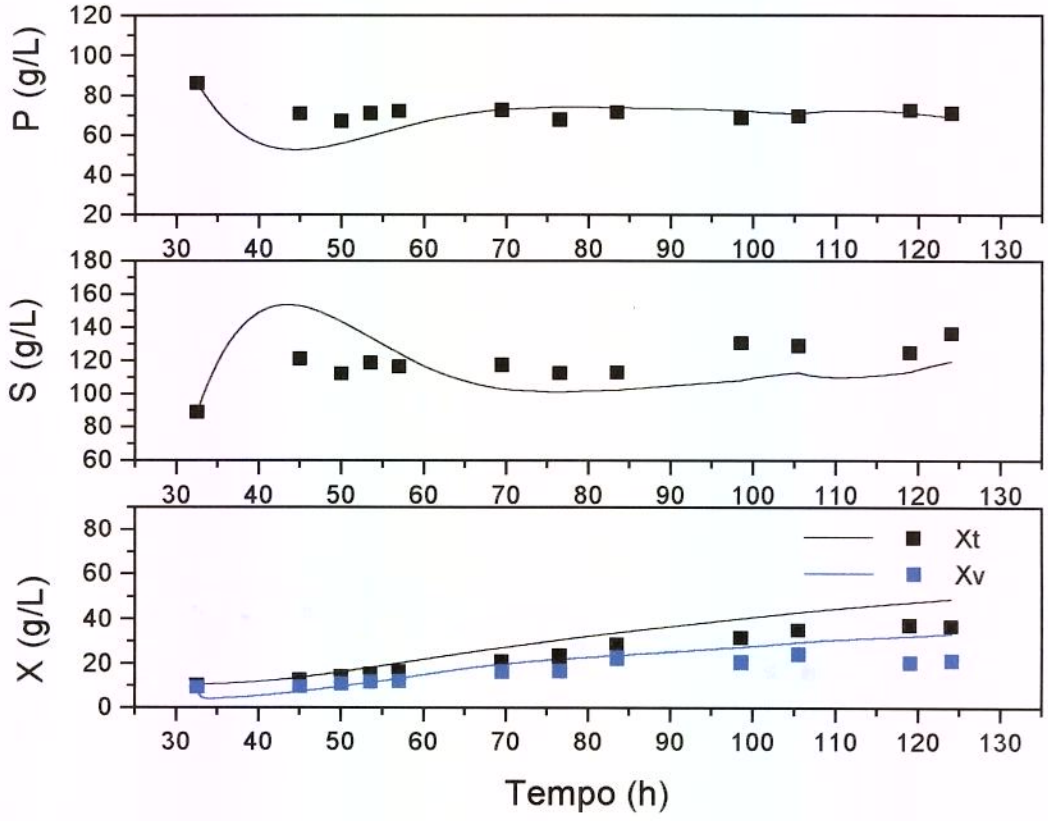


Figura V.38: Modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida na temperatura de 34°C.

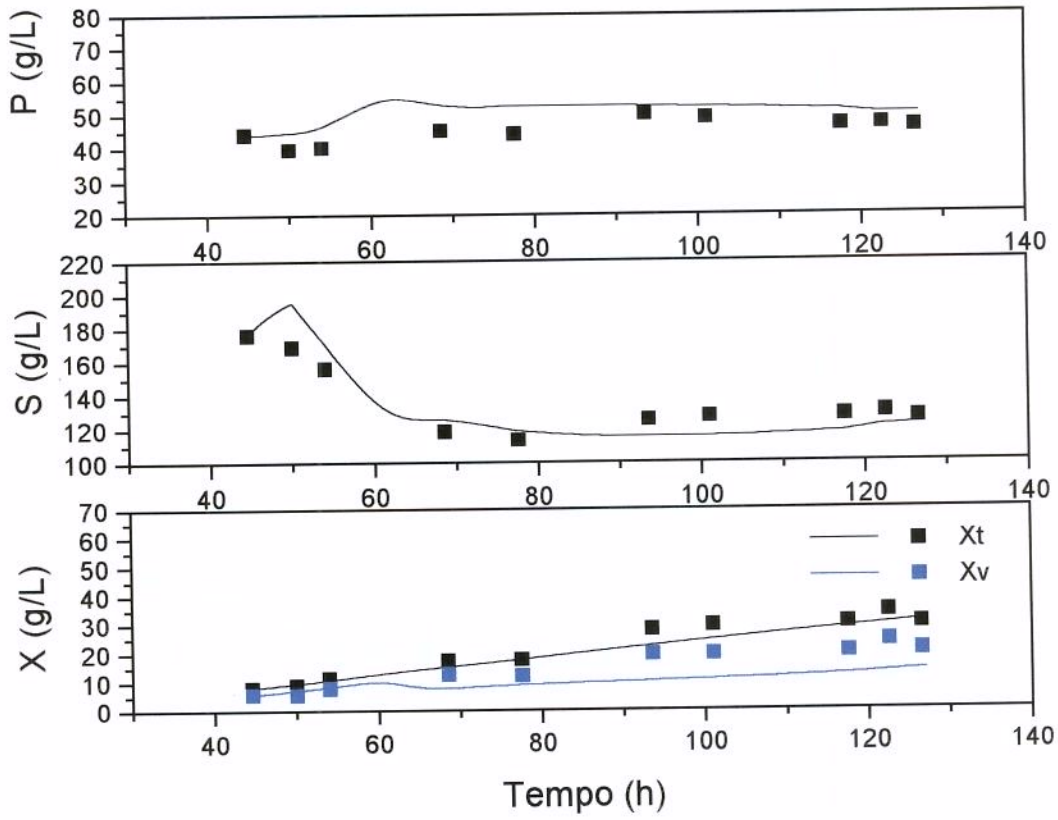


Figura V.39: Modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida na temperatura de 37°C.

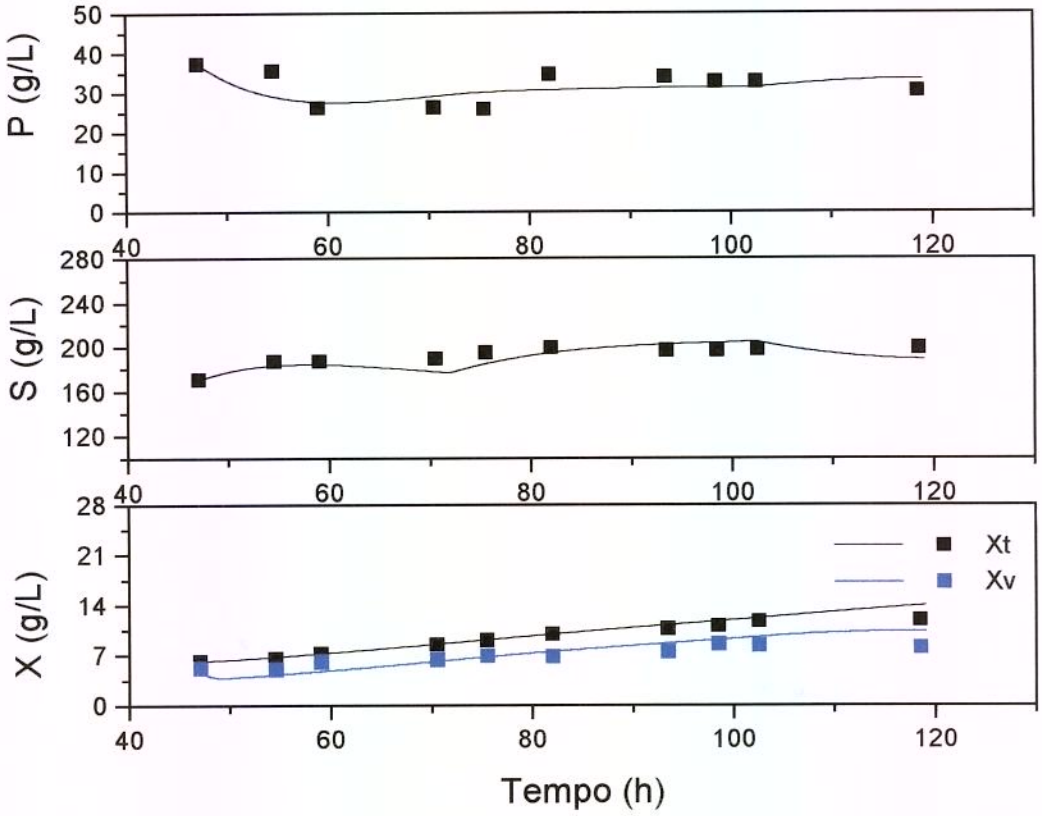


Figura V.40: Modelagem cinética do processo batelada alimentada estendida na temperatura de 40°C.

O modelo cinético obtido apresentou um bom ajuste aos dados experimentais como foi mostrado nas figuras V.36 a V.40. Através das figuras V.41 a V.43 pode-se verificar a variação da constante de inibição pelo substrato (Ki), do rendimento limite (Yx), do coeficiente de produção de etanol associado ao crescimento celular (α) e da constante de morte celular devido a concentração de etanol (Kp) expressa em função da temperatura, respectivamente.

A figura V.41 apresenta a variação de Ki com relação à temperatura. Nota-se que o valor de Ki aumenta com o aumento da temperatura, significando que a inibição exercida pela concentração de substrato aumenta com o aumento da temperatura, o que de certa forma é lógico, visto que a concentração de substrato presente no meio era elevada. Este parâmetro indica ter uma sensibilidade grande, pois está dentro de uma função exponencial,

apresentando uma grande variação nos resultados do modelo do processo para uma pequena variação de seu valor.

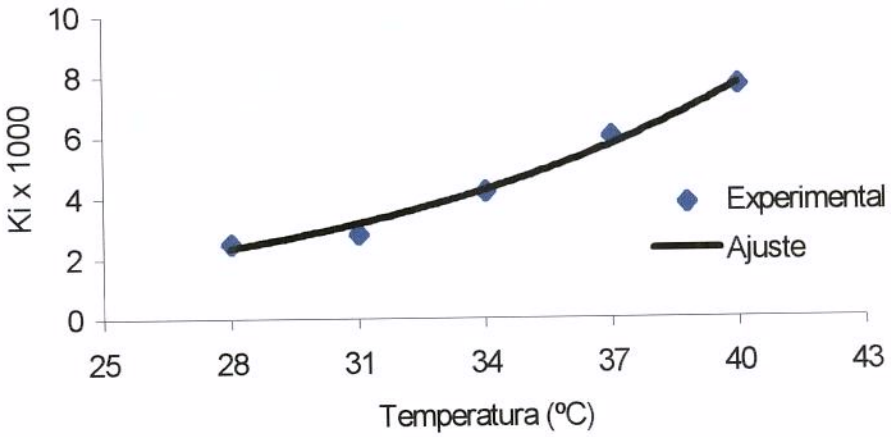


Figura V.41: Variação de Ki em relação à temperatura.

A equação (61) apresenta a função de Ki utilizada na modelagem do processo fermentativo expressa em função da temperatura.

$$Ki = 0.1393 \cdot 10^{-3} \cdot \exp(0.1004 \cdot T) \tag{61}$$

A variação de Yx e de α são mostradas pelas figuras V.42 e V.43. Estes parâmetros cinéticos possuem o mesmo comportamento demonstrado no processo batelada. Como dito anteriormente, apesar da mudança do sistema fermentativo, as características do microrganismo permanecem a mesma.

O parâmetro Yx possui também uma forte influência no ajuste da curva de consumo de substrato e o parâmetro α, assim como no sistema batelada, possui influência direta no ajuste da curva de formação de produto e influência inversa na curva de formação de biomassa.

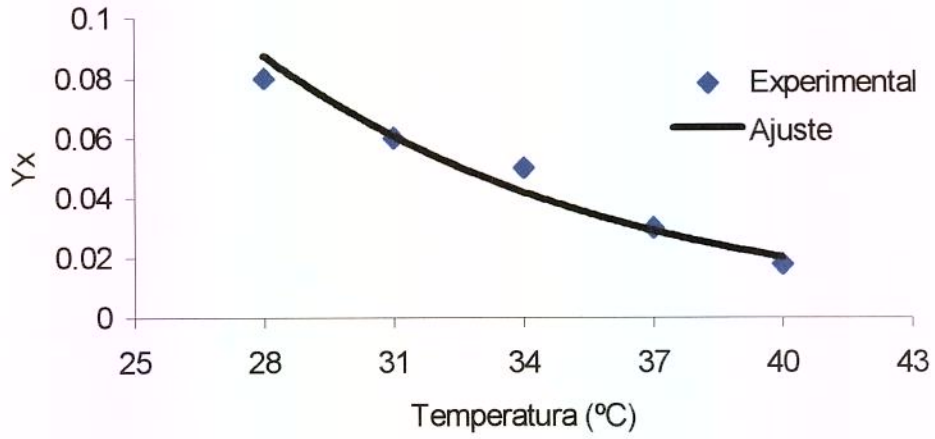


Figura V.42: Variação de Yx em relação à temperatura.

A equação (62) expressa a variação de Yx com relação a temperatura

$$Yx = 2.704 \cdot \exp(-0.1225 \cdot T) \tag{62}$$

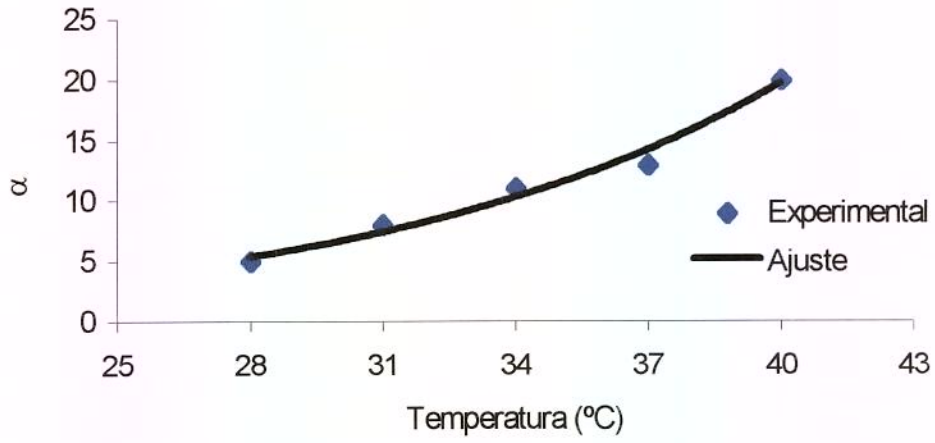


Figura V.43: Variação de α em relação à temperatura.

A variação de α em relação a temperatura é apresentada pela equação (63).

$$\alpha = 0.256 \cdot \exp(0.1086 \cdot T) \tag{63}$$

A figura V.44 apresenta a variação de Kp em relação à temperatura. Esta função indica que o termo de inibição devido à concentração de etanol aumenta com o aumento da temperatura e ela tem forte influência na viabilidade celular.

No ajuste dos parâmetros cinéticos, esta variável demonstrou ser a mais sensível, pelo mesmo motivo de Ki, por estar dentro de uma função exponencial. O intervalo de variação deste parâmetro é muito estreito, sendo que qualquer desvio entre o valor experimental e o ajustado ocasiona um grande desvio na modelagem em relação aos dados experimentais.

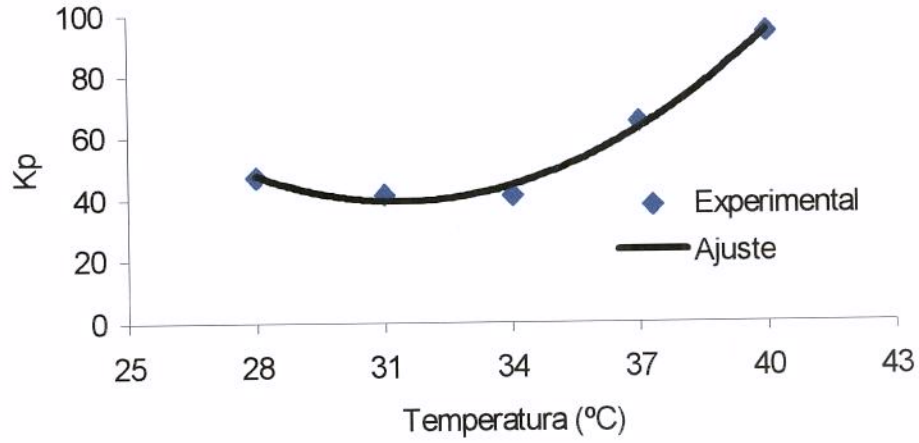


Figura V.44: Variação de Kp em relação à temperatura.

A equação (64) apresenta a variação de Kp em relação a temperatura.

$$Kp = 0.007421 \cdot T^2 - 0.465437 \cdot T + 7.69 \qquad (64)$$

O modelo cinético obtido apresentou um bom ajuste aos dados experimentais como foi mostrado nas figuras V.36 a V.40. Os desvios encontrados na modelagem são devidos principalmente ao parâmetro Kp, pois como dito anteriormente, ele exerce uma forte influência na modelagem do processo.

As equações (61) a (77) apresentam o modelo cinético utilizado para descrever a formação de biomassa, consumo de etanol e formação de produto no processo batelada alimentada estendida.

$$\frac{dXv}{dt} = rx - rd \tag{65}$$

$$\frac{dXd}{dt} = rd \tag{66}$$

$$\frac{dXt}{dt} = rx \tag{67}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{D \cdot (So - S) - rs + \frac{S}{390} \cdot rx}{1 - \frac{Xt}{390}} \tag{68}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{rp - D \cdot P + \frac{(1 - 0.78)}{390} \cdot rx \cdot P}{1 - \frac{Xt}{390} + \frac{0.78}{390} \cdot Xt} \tag{69}$$

$$rx = \mu\max(T) \cdot \left(\frac{S}{4.1 + S}\right) \cdot \exp(-Ki(T) \cdot S) \cdot \left(1 - \frac{Xt}{\text{Xmax}(T)}\right)^{1} \cdot \left(1 - \frac{P}{\text{Pmax}}\right)^{1.5} \cdot Xv \tag{70}$$

$$rs = \frac{rx}{Yx(T)} + mx(T) \cdot Xv \tag{71}$$

$$rp = \alpha(T) \cdot rx + \beta \cdot Xv \tag{72}$$

$$rd = Kt(T) \cdot \exp(Kp(T) \cdot P) \cdot Xv \tag{73}$$

$$\mu\max(T) = 1.57 \cdot \exp\left(-\frac{41.4714}{T}\right) - 12948.91 \cdot \exp\left(-\frac{431.39}{T}\right) \tag{74}$$

$$\text{Xmax(T)} = -0.328 \cdot T^2 + 18.484 \cdot T - 191.06 \tag{75}$$

$$\text{Pmax(T)} = -0.4421 \cdot T^2 + 26.41 \cdot T - 279.75 \tag{76}$$

$$Yx(T) = 2.7044 \cdot \exp(-0.1225 \cdot T) \tag{62}$$

$$\alpha(T) = 0.2559 \cdot \exp(0.1086 \cdot T) \tag{63}$$

$$Ki(T) = 0.1393 \cdot 10^{-3} \cdot \exp(0.1004 \cdot T) \tag{61}$$

$$Kp(T) = 0.007421 \cdot T^2 - 0.465437 \cdot T + 7.69 \tag{64}$$

$$Kt(T) = 4 \cdot 10^{13} \cdot \exp\left[-\frac{41947}{1.987 \cdot (T + 273.15)}\right] \tag{77}$$

V.3. SIMULAÇÕES DO PROCESSO FERMENTATIVO BATELADA ALIMENTADA ESTENDIDA

Com o modelo cinético obtido do processo é possível realizar várias simulações com a finalidade de se obter informações do comportamento do sistema fermentativo em diversas condições. A tabela V.17 lista as condições iniciais adotadas na simulação tendo como base os valores obtidos nas condições experimentais, sendo a concentração de substrato na alimentação de 220 g/L, a biomassa viável de 10g/L e a concentração de biomassa morta de 1 g/L

Tabela V.17: Condições iniciais utilizadas na simulação do processo.

Temperatura (°C)	S (g/L)	P (g/L)
28	15	80
29.5	30	80
31	70	90
32.5	80	80
34	90	80
35.5	150	60
37	170	50
38.5	170	45
40	170	40

A figura V.45 apresenta o comportamento da concentração de biomassa viável do sistema com as condições utilizadas na simulação. Para uma melhor visualização do comportamento desta variável, foi ajustada uma superfície sobre a resposta através de uma função polinomial utilizando-se o software Table Curve 3D V.3.0 da Jandel Scientific. Pode-se notar que altas concentrações celulares são obtidas em baixas temperaturas,

especialmente entre 28°C e 32°C. A concentração de biomassa viável diminui sensivelmente com o aumento da temperatura.

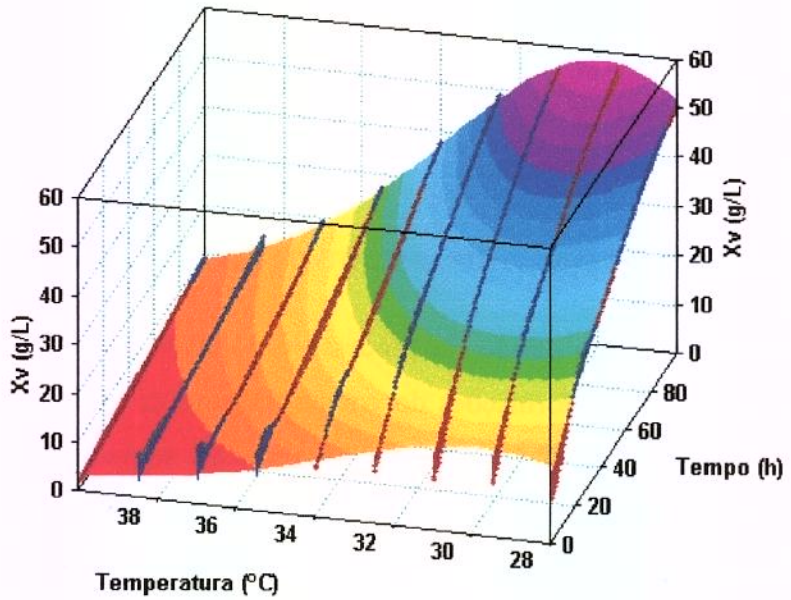


Figura V.45: Comportamento da concentração de biomassa viável na simulação do processo.

O comportamento do consumo de substrato no processo fermentativo, pode ser observado na figura V.46.

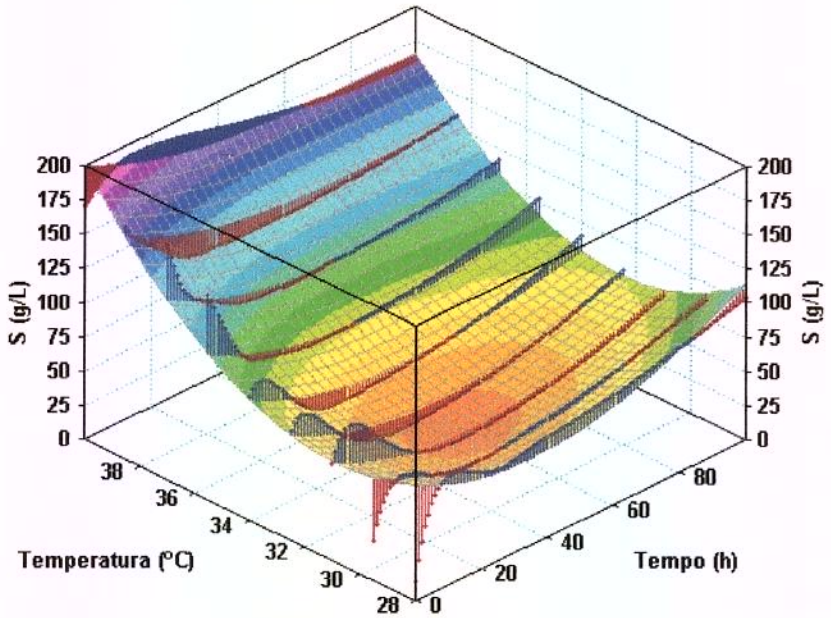


Figura V.46: Comportamento da concentração de substrato na simulação do processo.

A figura V.46 permite observar que em baixas temperaturas existe um consumo maior de substrato e que, com o aumento da temperatura, o efeito inibitório global aumenta, diminuindo assim, a conversão.

A figura V.47 apresenta o comportamento da formação de etanol no processo fermentativo. Assim como no comportamento da biomassa viável e da concentração de substrato do processo fermentativo, a concentração de etanol possui uma região de ótima entre as temperaturas de 28°C a 32°C. Com o aumento da temperatura, o efeito inibitório aumenta diminuindo a conversão.

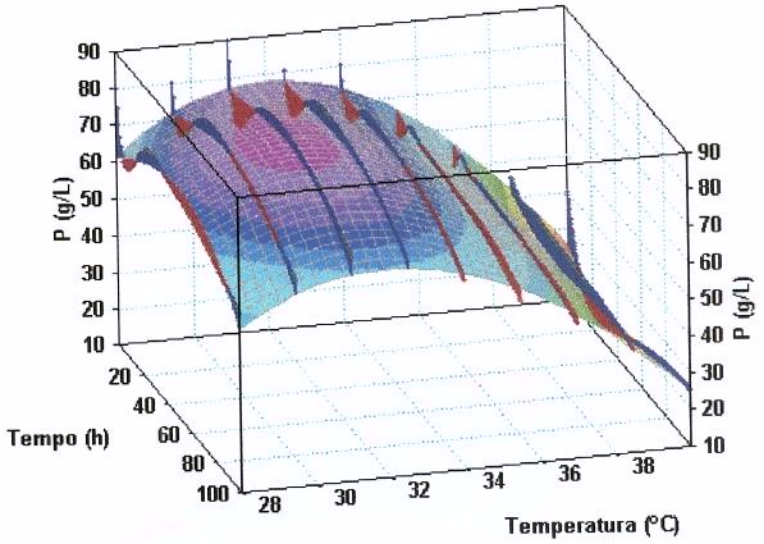


Figura V.47: Comportamento da concentração de etanol na simulação do processo.

Com o estudo dos comportamentos de Xv, S e P, em função da temperatura e do tempo, é possível prever que a região de alto rendimento, conversão e produtividade estejam situadas entre as temperaturas ideais dos processos anteriores. As figuras V.48 a V.50 apresentam o perfil do rendimento, conversão e da produtividade do processo fermentativo em diversas temperaturas. É importante notar que o máximo de rendimento, conversão e produtividade encontrado na simulação foi de aproximadamente 70%, 0.8 e 8 g/L/h, respectivamente, com um tempo de aproximadamente 50 horas.

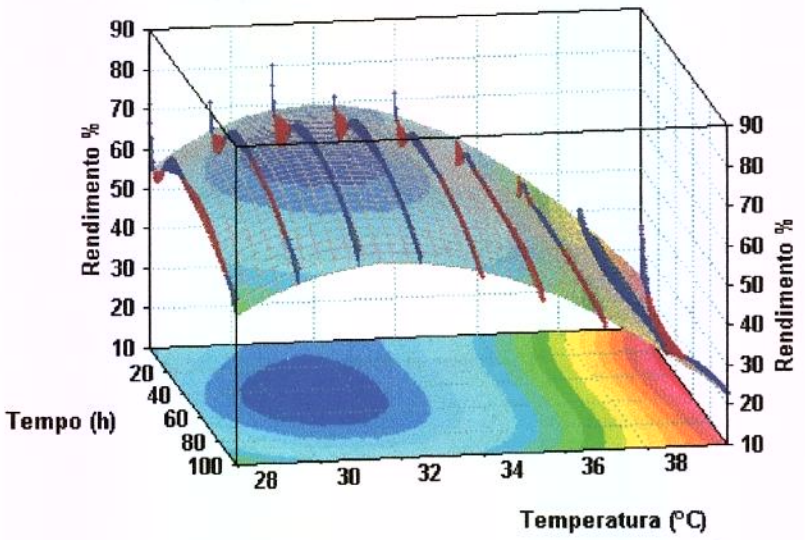


Figura V.48: Comportamento do rendimento na simulação do processo.

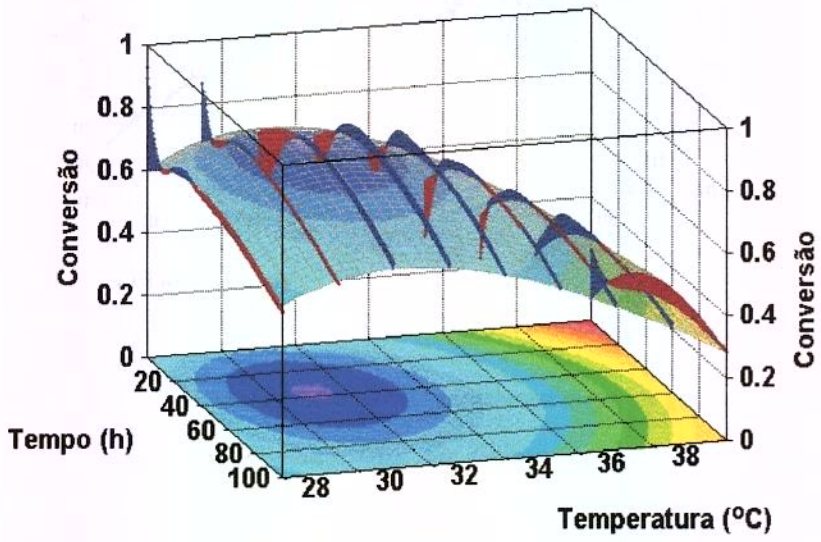


Figura V.49: Comportamento da conversão na simulação do processo

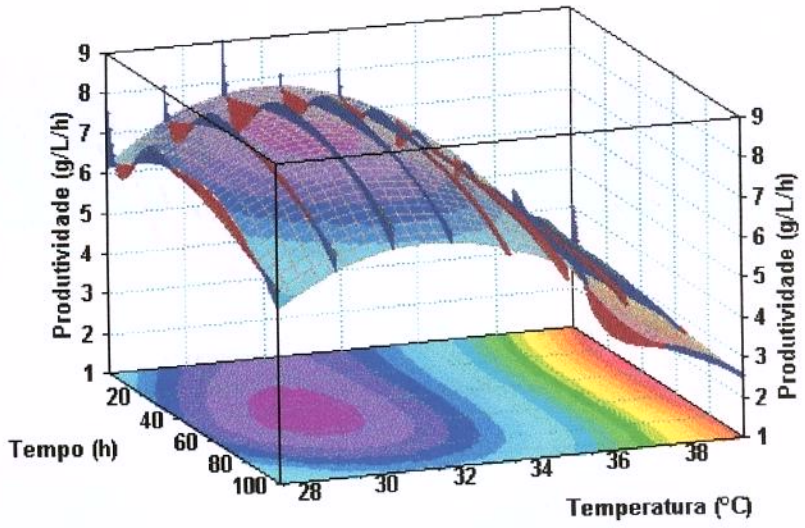


Figura V.50: Comportamento da produtividade na simulação do processo.

Para verificar a região em que se têm o maior rendimento, conversão e produtividade do processo, várias simulações foram realizadas. Para a realização desta simulação, foi estudada a variação da concentração de alimentação de substrato (300g/L a 130g/L), a taxa de diluição ($0,2h^{-1}$ a $0,06h^{-1}$) e a temperatura (28°C a 40°C). As figuras V.51 a V.53 apresentam as simulações realizadas para a otimização do rendimento, da conversão e da produtividade do processo.

Nas figuras V.51 (a) a (c) pode-se verificar que o rendimento aumenta com a diminuição da concentração de substrato na alimentação e com a temperatura e diminui com o tempo. Para So de 140g/L, o rendimento permanece em torno de 100% na faixa de temperatura de 28°C a 34°C durante todo o processo fermentativo. Analisando as figuras V.51 (d) e (e) verifica-se que o rendimento aumenta com a diminuição de So e que valores próximos a 100% são obtidos quando a concentração de substrato na alimentação é menor que 140 g/L.

As figuras V.51 (f) a (h) apresentam as simulações realizadas com a variação da taxa de diluição, onde é possível verificar que o rendimento aumenta com a diminuição de D e So e que atinge valores próximos a 100% quando a taxa de diluição for menor que $0,08h^{-1}$ com um So de 140g/h.

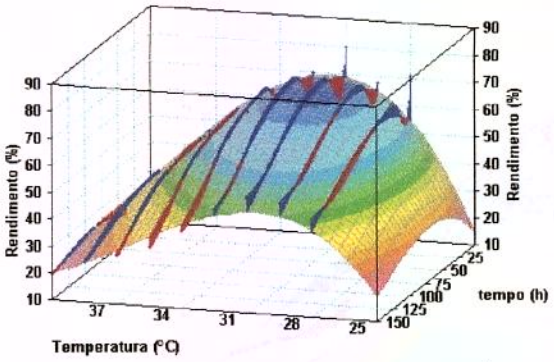


Fig.V.51 (a) - So = 220g/L e D = 0,1h^{-1}

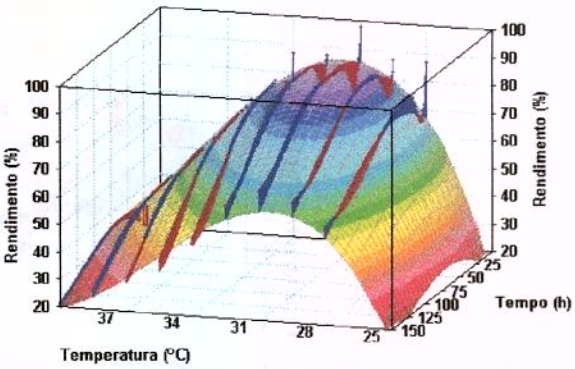


Fig.V.51 (b) - So = 180 g/L e D = 0,1 h^{-1}

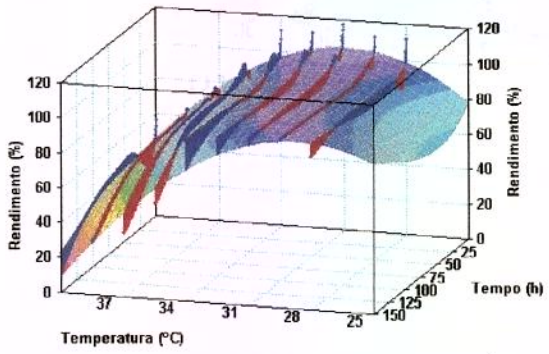


Fig. V.51 (c) - So = 140 g/L e D = 0,1 h^{-1}

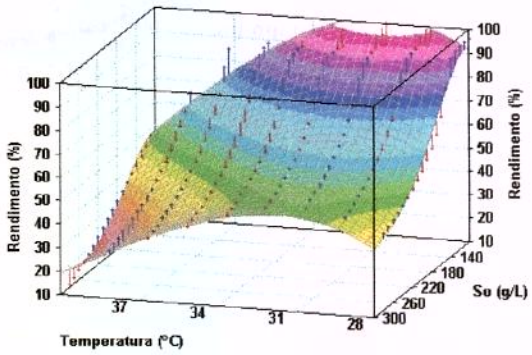


Fig. V.51 (d) - D = 0,1 h^{-1} e tempo = 100h

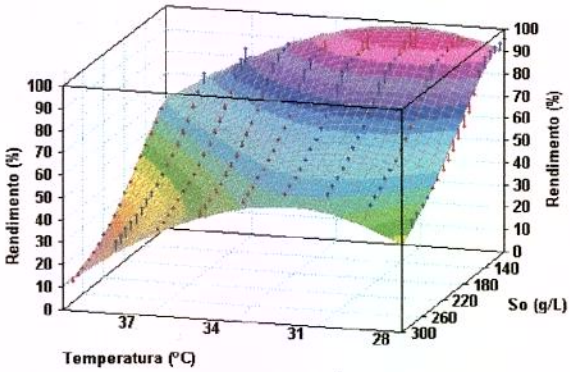


Fig. V.51 (e) - D = 0,1 h^{-1} e tempo = 75h

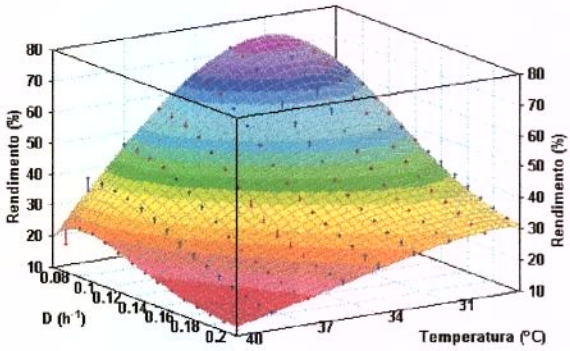


Fig. V.51 (f) - So = 220 g/L e tempo = 100h

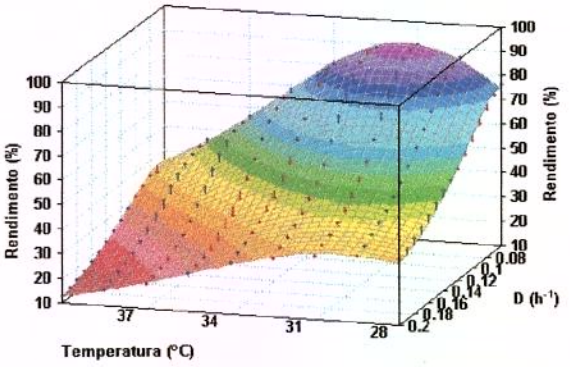


Fig.V.51 (g) - So = 180 g/L e tempo = 100h

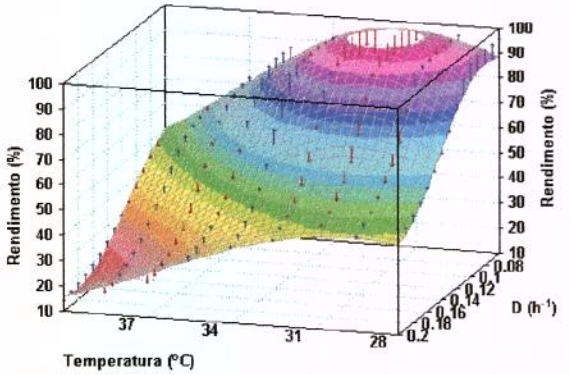


Fig.V.51 (h) - So = 140 g/L e tempo = 100h

Figura V.51: Otimização do rendimento do processo através da simulação.

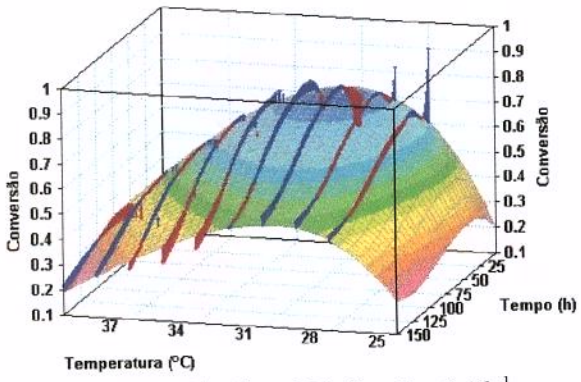


Fig.V.52 (a) - So = 220g/L e D = 0,1 h^{-1}

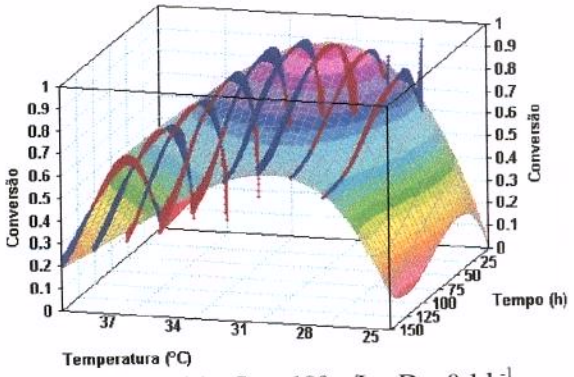


Fig. V.52 (b) - So = 180 g/L e D = 0,1 h^{-1}

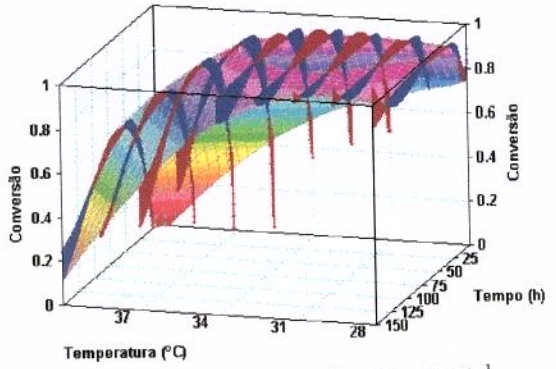


Fig.V.52 (c) - So =140 g/L e D = 0,1 h^{-1}

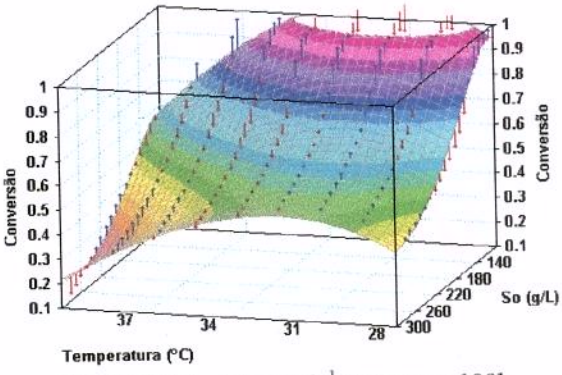


Fig.V.52 (d) - D = 0,1 h^{-1} e tempo = 100h

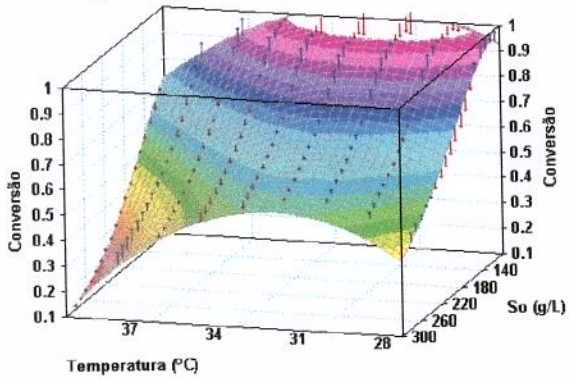


Fig. V.52 (e) - D = 0,1 h^{-1} e tempo = 75h

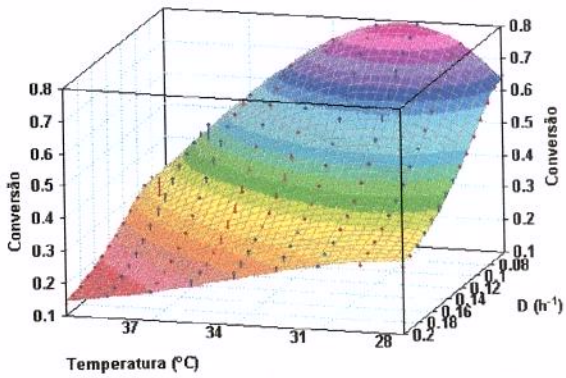


Fig.V.52 (f) - So = 220 g/L e tempo = 100h

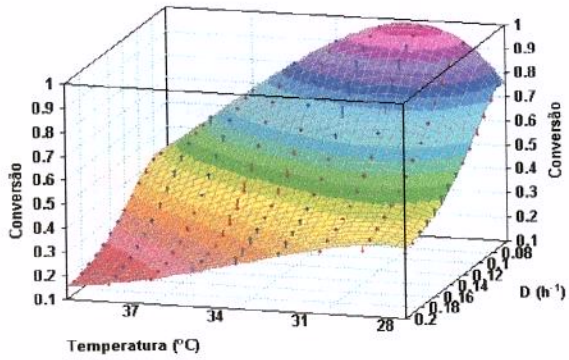


Fig.V.52 (g) - So = 180 g/L e tempo = 100h

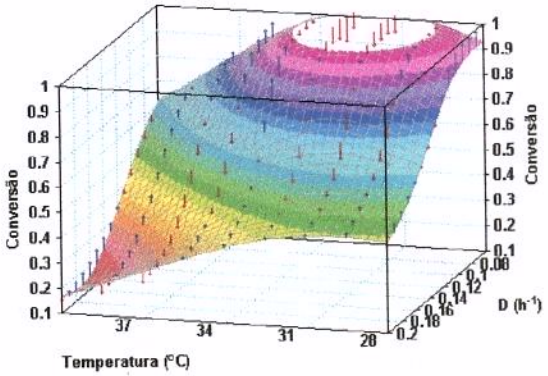


Fig.V.52 (h) - So = 140 g/L e tempo = 100h

Figura V.52: Otimização da conversão do processo através de simulação.

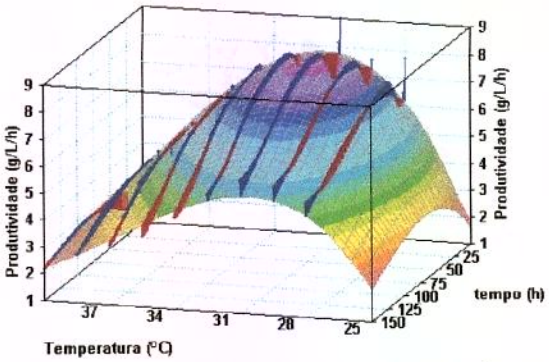


Fig.V.53 (a) - So=220 g/L e D = 0,1 h^{-1}

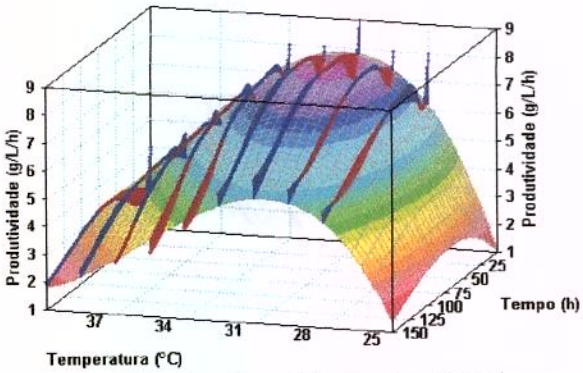


Fig.V.53 (b) - So = 180g/L e D = 0,1 h^{-1}

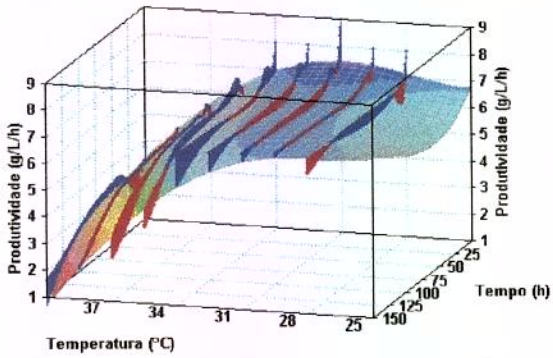


Fig.V.53 (c) - So=140 g/L e D = 0,1 h^{-1}

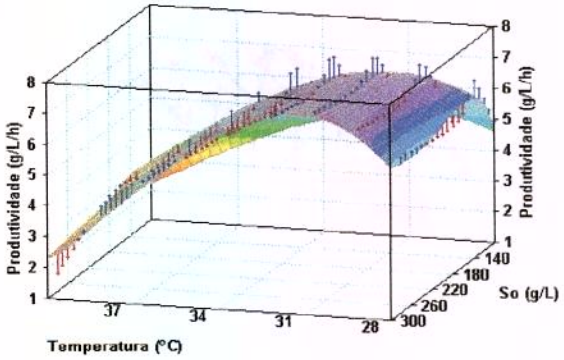


Fig.V.53 (d) - D = 0,1 h^{-1} e tempo = 100h

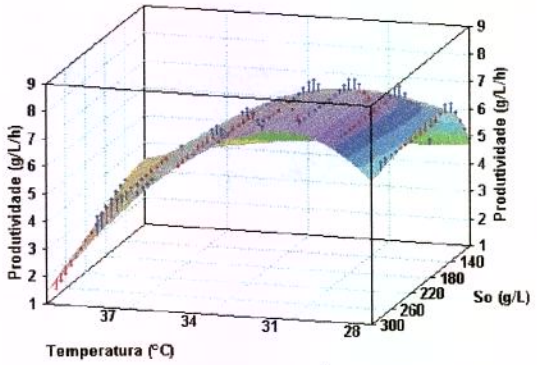


Fig.V.53 (e) - D = 0,1 h^{-1} e tempo = 75h

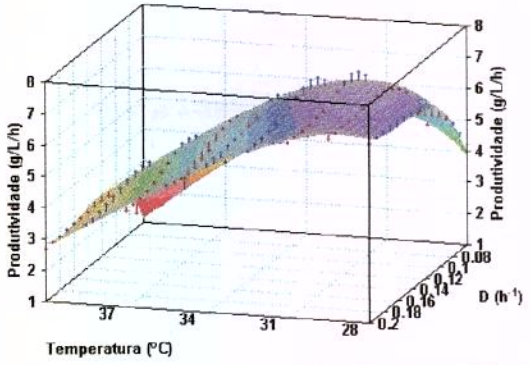


Fig.V.53 (f) - So = 220 g/L e tempo = 100h

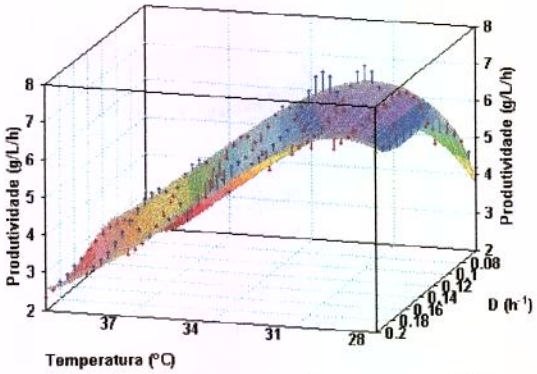


Fig.V.53 (g) - So = 180 g/L e tempo = 100h

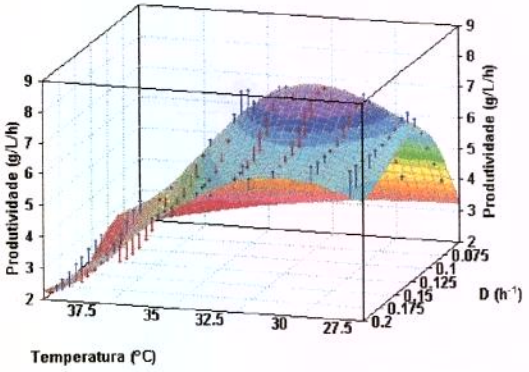


Fig.V.53 (h) - So = 140 g/L e tempo = 100h

Figura V.53: Otimização da produtividade do processo através da simulação.

Analisando a figura V.52 pode-se observar que ela possui comportamento semelhante a figura V.51, ou seja, na figura V.52 (a) a (c) a conversão aumenta com a diminuição da concentração de substrato na alimentação e com a temperatura e diminui com o tempo. Para So de 140g/L, a conversão permanece em torno de 1 na faixa de temperatura de 28°C a 34°C durante todo o processo fermentativo. Analisando as figuras V.52 (d) e (e) verifica-se que a conversão aumenta com a diminuição de So e que valores próximos a 1 são encontrados quando a concentração de substrato na alimentação é menor que 140 g/L.

As figuras V.52 (f) a (h) apresentam as simulações realizadas com a variação da taxa de diluição, onde é possível verificar que a conversão aumenta com a diminuição de D e So e que atinge valores próximos a 1 quando a taxa de diluição for menor que $0,08h^{-1}$ com um So de 140g/h.

Analisando a produtividade do processo, nota-se que as figuras V.53 (a) a (c) apresentam os mesmos comportamentos que as figuras V.51 (a) a (c). Através das figuras V.53 (d) e (e) observa-se que a produtividade do processo diminui com a temperatura e que independe de So entre 160 g/L a 300 g/L. Nota-se que a máxima produtividade prevista pelo modelo cinético é de aproximadamente 8 g/L/h. Com relação a taxa de diluição, ao contrário do rendimento e da conversão do processo fermentativo, a produtividade aumenta com o aumento de D até atingir um nível constante a partir de aproximadamente $0,15\ h^{-1}$, conforme pode ser observado nas figuras V.53 (f) a (h).

V.4. ESTUDO DA INLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO MODELO CINÉTICO

A análise do comportamento e da influência das variáveis do modelo cinético para estudos da implementação de controle é feita variando as condições operacionais, ou seja, variam-se as variáveis possíveis de serem manipuladas para se controlar o processo (vazão de alimentação, concentração de substrato na alimentação, temperatura, etc). O estudo do comportamento e da influência das variáveis do modelo cinético em relação aos parâmetros cinéticos é feito para se determinar quais influenciam mais no desempenho no modelo e, logo, quais deverem ser determinadas com mais cuidados na etapa de modelagem.

O modelo cinético obtido para o processo batelada alimentada estendida possui um total de 21 variáveis sendo 14 parâmetros cinéticos, 4 variáveis de estado (Xv, Xd, P e S onde Xt=Xv+Xd) e 3 variáveis operacionais (T, D e So). Para a análise destas 21 variáveis foi proposto um Planejamento Saturado de Plackett e Burman de 32 ensaios. Com este número de ensaios, é possível analisar até 31 fatores, porém, segundo BARROS NETO *et al.* (1996), é conveniente escolher um número menor de fatores, para que as colunas não utilizadas façam o papel de variáveis inertes e possam ser estimadas para determinar o erro associado aos efeitos de cada variável.

Para o estudo da influência das variáveis do modelo decidiu-se escolher a temperatura de 34°C como referência e variar todos os parâmetros do modelo ± 10% em relação ao valor original encontrado na temperatura de referência. A tabela V.18 lista todas as variáveis estudadas, bem como seu níveis.

Tabela V.18: Níveis das variáveis do planejamento saturado.

	Níveis		
Fatores	-1	0	1
T	30.6	34	37.4
D	0.09	0.1	0.11
Si	72	80	88
Xvi	9	10	11
Pi	36	40	44
μmax	0.383	0.426	0.469
Ks	3.69	4.1	4.51
Ki	0.00378	0.0042	0.00462
Xmax	52.65	58.5	64.35
Pmax	99.09	110.1	121.11
n	1.35	1.5	1.65
m	0.9	1	1.1
mx	0.18	0.2	0.22
Yx	0.045	0.05	0.055
α	9.9	11	12.1
β	0.09	0.1	0.11
Kp	0.396	0.44	0.484
So	198	220	242
ρ	351	390	429
γ	0.702	0.78	0.858
Xdi	0.9	1	1.1

Onde Si, Xvi, Pi e Xdi referem-se as condições iniciais.

As respostas foram obtidas através do modelo cinético em um tempo de 100 horas. Como resposta obtiveram-se: rendimento, conversão, produtividade, concentração de células viáveis, substrato e produto.

As tabelas V.19 e V.20 apresentam as matrizes do planejamento saturado de Plackett e Burman utilizado, bem como os valores das respostas obtidas.

Tabela V.19: Matriz do planejamento saturado de Plackett e Burman para 32 ensaios.

	Variáveis independentes																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
exp.	T	D	Si	Xvi	Pi	μmax	Ks	Ki	Xmax	Pmax	n	m	mx	Yx	α	β	Kp	So	ρ	γ	Xdi
1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1
2	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1
4	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1
7	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1
8	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1
9	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1
10	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1
11	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1
12	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1
13	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
14	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
15	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
16	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1
17	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
18	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1
19	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
20	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1
21	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
22	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1
23	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
24	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1
25	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1
26	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1
27	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1
28	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
29	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1
30	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1
31	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1
32	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela V.20: Matriz do planejamento saturado de Plackett e Burman - Respostas

	Respostas					
Exp.	rend	conv.	prod.	Xv	S	P
1	67.33	7.49	0.64	46.86	72.19	61.08
2	81.86	7.45	0.72	37.21	55.14	81.19
3	70.64	6.43	0.56	20.08	87.88	66.97
4	57.16	6.36	0.41	26.47	143.64	63.86
5	54.53	6.07	0.46	22.78	129.53	64.78
6	56.37	7.67	0.37	35.67	153.57	43.71
7	53.73	5.98	0.52	34.72	114.98	58.97
8	61.74	8.40	0.53	53.63	113.40	72.29
9	81.78	7.45	0.59	30.27	81.57	61.22
10	65.63	7.30	0.39	36.92	120.72	46.76
11	53.67	7.30	0.40	36.45	146.11	50.48
12	63.20	8.60	0.48	50.47	125.20	57.96
13	67.32	6.13	0.59	28.18	81.87	61.59
14	65.21	8.87	0.28	37.53	173.71	35.32
15	75.44	8.40	0.70	53.55	58.52	76.46
16	69.63	6.34	0.42	29.28	115.66	40.70
17	60.15	6.69	0.75	49.50	59.93	77.37
18	81.80	7.45	0.60	37.05	79.21	62.52
19	81.47	9.07	0.65	40.60	69.99	60.49
20	76.90	8.56	0.48	47.48	103.54	57.05
21	65.97	7.34	0.64	36.03	71.06	60.47
22	65.43	8.90	0.49	45.87	123.91	61.18
23	69.78	7.77	0.38	31.35	123.05	34.95
24	60.34	6.72	0.49	41.33	123.75	75.03
25	66.92	6.09	0.56	25.17	86.71	58.63
26	54.83	7.46	0.46	34.08	130.60	58.74
27	57.65	7.84	0.40	30.88	146.23	57.13
28	65.90	7.33	0.55	31.83	109.47	76.80
29	69.66	7.75	0.52	37.98	94.25	56.61
30	57.65	6.42	0.58	30.28	101.47	61.05
31	64.18	7.14	0.51	41.53	119.62	53.95
32	78.37	7.14	0.70	48.03	58.44	67.90
33	66.85	7.52	0.53	37.43	103.58	61.28

A tabela V.21 apresenta os valores dos efeitos estimados para a resposta rendimento. Os parâmetros em vermelho são estatisticamente significativos a um intervalo de confiança de 95%. É importante notar que os parâmetros So e Kp são os que apresentam maiores efeitos, ou seja, uma pequena variação de seu valor altera a curva de resposta sensivelmente. Os parâmetros Xmax e Pmax possuem efeito positivo sobre a resposta, ou seja, a produtividade aumenta com o aumento dos valores destes parâmetros. O inverso é observado com D, Ks, n, Kp e So.

Tabela V.21: Tabela de efeitos estimados para a resposta rendimento.

	Efeito	Erro padrão	t(11)	p
Média	66.335	0.299	221.716	0.000
T	0.520	0.608	0.856	0.410
D	-1.354	0.608	-2.228	0.048
Si	0.641	0.608	1.054	0.314
Xvi	-1.179	0.608	-1.940	0.078
Pi	-0.834	0.608	-1.372	0.197
μmax	1.125	0.608	1.851	0.091
Ks	-1.547	0.608	-2.546	0.027
Ki	-0.403	0.608	-0.664	0.521
Xmax	1.365	0.608	2.246	0.046
Pmax	3.762	0.608	6.191	0.000
n	-1.913	0.608	-3.148	0.009
m	-0.891	0.608	-1.466	0.171
mx	0.021	0.608	0.034	0.974
Yx	-0.601	0.608	-0.989	0.344
α	0.104	0.608	0.172	0.867
β	0.684	0.608	1.126	0.284
Kp	-8.748	0.608	-14.396	0.000
So	-13.672	0.608	-22.499	0.000
ρ	-0.472	0.608	-0.777	0.454
γ	-0.083	0.608	-0.136	0.894
Xdi	0.212	0.608	0.349	0.734

$R^2 = 0.986$

MS residual = 2.95

A tabela V.22 apresenta os valores dos efeitos estimados para a resposta conversão. É importante notar que, de mesmo modo que a resposta rendimento, os parâmetros So e Kp são os que apresentam maiores efeitos. Os parâmetros Xmax e mx possuem efeito positivo sobre a resposta. Os parâmetros T, D, Xvi, μmax, Pmax, Yx, So e Kp possuem efeitos negativos.

Tabela V.22: Tabela de efeitos estimados para a resposta conversão.

	Efeito	Erro padrão	t(11)	p
Média	0.525	0.006	94.619	0.000
T	-0.030	0.011	-2.677	0.022
D	-0.075	0.011	-6.689	0.000
Si	0.002	0.011	0.166	0.871
Xvi	-0.034	0.011	-2.989	0.012
Pi	0.004	0.011	0.345	0.736
μmax	-0.040	0.011	-3.579	0.004
Ks	0.012	0.011	1.035	0.323
Ki	0.003	0.011	0.295	0.774
Xmax	0.100	0.011	8.851	0.000
Pmax	-0.081	0.011	-7.148	0.000
n	0.033	0.011	2.946	0.013
m	-0.001	0.011	-0.054	0.958
mx	0.061	0.011	5.396	0.000
Yx	-0.032	0.011	-2.839	0.016
α	-0.020	0.011	-1.778	0.103
β	-0.022	0.011	-1.943	0.078
Kp	-0.094	0.011	-8.355	0.000
So	-0.091	0.011	-8.089	0.000
ρ	-0.001	0.011	-0.062	0.951
γ	-0.014	0.011	-1.257	0.235
Xdi	0.011	0.011	0.999	0.339

$R^2 = 0.973$

MS residual = 0.001

A tabela V.23 apresenta os valores dos efeitos estimados para a variável produtividade. Os parâmetros D, Xmax e Pmax possuem efeito positivo enquanto D e Kp possuem os maiores efeitos sendo ambos negativo. Nota-se que a taxa de diluição (D) possui efeito contrário quando comparado com o rendimento e conversão, ou seja, para se ter um alto rendimento ou conversão deve-se diminuir D enquanto para se ter uma alta produtividade deve-se aumentar D.

Tabela V.23: Tabela de efeitos estimados para a resposta produtividade.

	Efeito	Erro padrão	t(11)	p
Média	7.377	0.031	238.508	0.000
T	0.062	0.063	0.979	0.348
D	1.345	0.063	21.413	0.000
Si	0.070	0.063	1.122	0.286
Xvi	-0.018	0.063	-0.282	0.783
Pi	-0.089	0.063	-1.419	0.184
μmax	0.128	0.063	2.041	0.066
Ks	-0.161	0.063	-2.562	0.026
Ki	-0.042	0.063	-0.666	0.519
Xmax	0.148	0.063	2.349	0.039
Pmax	0.424	0.063	6.753	0.000
n	-0.195	0.063	-3.108	0.010
m	-0.108	0.063	-1.711	0.115
mx	0.000	0.063	-0.007	0.994
Yx	-0.071	0.063	-1.134	0.281
α	0.004	0.063	0.064	0.950
β	0.073	0.063	1.168	0.268
Kp	-0.962	0.063	-15.321	0.000
So	-0.026	0.063	-0.412	0.688
ρ	-0.049	0.063	-0.787	0.448
γ	-0.016	0.063	-0.249	0.808
Xdi	0.016	0.063	0.255	0.803

$R^2 = 0.986$
MS residual = 0.0315

A tabela V.24 apresenta os valores dos efeitos estimados para a concentração de biomassa viável. Nota-se que vários fatores são sensíveis quando a resposta é biomassa viável. Os efeitos indicam que D, n e So têm influência positiva e que T, μmax, Pmax, α, β e Kp possuem efeitos negativos.

Tabela V.24: Tabela de efeitos estimados para a resposta biomassa viável.

	Efeito	Erro padrão	t(11)	p
Média	37.166	0.383	97.082	0.000
T	-3.505	0.778	-4.508	0.001
D	7.603	0.778	9.778	0.000
Si	0.082	0.778	0.105	0.918
Xvi	0.268	0.778	0.345	0.737
Pi	-0.326	0.778	-0.419	0.683
μmax	-1.814	0.778	-2.332	0.040
Ks	-0.256	0.778	-0.329	0.748
Ki	-0.250	0.778	-0.322	0.754
Xmax	-0.625	0.778	-0.804	0.439
Pmax	-5.048	0.778	-6.493	0.000
n	1.835	0.778	2.361	0.038
m	1.258	0.778	1.619	0.134
mx	-0.605	0.778	-0.777	0.453
Yx	-0.112	0.778	-0.144	0.888
α	-5.756	0.778	-7.403	0.000
β	-2.172	0.778	-2.794	0.017
Kp	-12.277	0.778	-15.789	0.000
So	1.061	0.778	1.365	0.200
ρ	-0.327	0.778	-0.420	0.682
γ	-1.020	0.778	-1.312	0.216
Xdi	1.083	0.778	1.393	0.191

$R^2 = 0.978$

MS residual = 4.836

A tabela V.25 apresenta os valores dos efeitos estimados para a concentração de substrato. Os parâmetros assinalados em vermelho são estatisticamente significativos em um intervalo de confiança de 95%. Dos parâmetros significativos, So e Kp têm os maiores efeitos. Xmax, n e mx tem efeito negativo enquanto os demais possuem efeito positivo sobre a resposta.

Tabela V.25: Tabela de efeitos estimados para a resposta substrato.

	Efeito	Erro padrão	t(11)	p
Média	105.410	1.179	89.378	0.000
T	6.893	2.395	2.878	0.015
D	17.324	2.395	7.233	0.000
Si	-0.744	2.395	-0.310	0.762
Xvi	5.342	2.395	2.230	0.048
Pi	-0.872	2.395	-0.364	0.723
μmax	8.956	2.395	3.739	0.003
Ks	-2.727	2.395	-1.138	0.279
Ki	-0.744	2.395	-0.311	0.762
Xmax	-21.875	2.395	-9.133	0.000
Pmax	17.414	2.395	7.270	0.000
n	-8.968	2.395	-3.744	0.003
m	0.207	2.395	0.086	0.933
mx	-13.825	2.395	-5.772	0.000
Yx	6.534	2.395	2.728	0.020
α	5.748	2.395	2.400	0.035
β	5.068	2.395	2.116	0.058
Kp	19.984	2.395	8.343	0.000
So	40.958	2.395	17.099	0.000
ρ	0.240	2.395	0.100	0.922
γ	3.110	2.395	1.298	0.221
Xdi	-2.960	2.395	-1.236	0.242

R2 = 0.983
MS residual = 45.9

A tabela V.26 apresenta os valores dos efeitos estimados para a concentração de etanol. Nota-se que todos os parâmetros significativos têm efeito negativo sobre a resposta exceto Xmax e β. Assim como nas demais respostas analisadas, Kp foi significativo e possui, neste caso, o maior efeito. O fato de Kp ser significativo e possuir uma grande influência sobre as respostas analisadas, foi percebido no ajuste dos parâmetros na modelagem cinética.

Tabela V.26: Tabela de efeitos estimados para a resposta etanol.

	Efeito	Erro padrão	t(11)	p
Média	60.137	0.695	86.556	0.000
T	-4.082	1.411	-2.893	0.015
D	-8.864	1.411	-6.282	0.000
Si	1.329	1.411	0.942	0.366
Xvi	-3.127	1.411	-2.216	0.049
Pi	-0.688	1.411	-0.488	0.635
μmax	-4.494	1.411	-3.185	0.009
Ks	1.822	1.411	1.291	0.223
Ki	0.349	1.411	0.247	0.809
Xmax	11.754	1.411	8.330	0.000
Pmax	-8.510	1.411	-6.031	0.000
n	3.010	1.411	2.133	0.056
m	-0.111	1.411	-0.079	0.939
mx	-0.463	1.411	-0.328	0.749
Yx	1.457	1.411	1.032	0.324
α	2.385	1.411	1.690	0.119
β	5.668	1.411	4.017	0.002
Kp	-9.526	1.411	-6.751	0.000
So	0.877	1.411	0.621	0.547
ρ	-0.369	1.411	-0.262	0.798
γ	-1.257	1.411	-0.891	0.392
Xdi	1.232	1.411	0.873	0.401

$R^2 = 0.956$
MS residual = 15.92

A tabela V.27 e as figuras V.54 e V.55 apresentam os efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas analisadas. Nota-se os parâmetros Si, Pi, Ki, m, ρ, γ e Xvi não foram significativos em nenhum caso. Já os parâmetros D, Pmax e Kp foram significativos em todas as respostas estudadas. É importante observar que So é significativo para rendimento e conversão e não exerce influência sobre a produtividade, sendo este fato observado na simulação do processo.

O parâmetro Kp é na maioria dos casos, a variável de maior significância, ou seja, ela altera sensivelmente a curva da resposta analisada. Esta análise demonstra que os parâmetros significativos devem ser bem ajustados, pois uma pequena variação de seus valores pode comprometer a modelagem do processo.

Tabela V.27: Tabela geral de efeitos das variáveis estudadas.

	Rend.	Conv.	Prod.	Xv	S	P
T	0.520	-0.030	0.062	-3.505	6.893	-4.082
D	-1.354	-0.075	1.345	7.603	17.324	-8.864
Si	0.641	0.002	0.070	0.082	-0.744	1.329
Xvi	-1.179	-0.034	-0.018	0.268	5.342	-3.127
Pi	-0.834	0.004	-0.089	-0.326	-0.872	-0.688
μmax	1.125	-0.040	0.128	-1.814	8.956	-4.494
Ks	-1.547	0.012	-0.161	-0.256	-2.727	1.822
Ki	-0.403	0.003	-0.042	-0.250	-0.744	0.349
Xmax	1.365	0.100	0.148	-0.625	-21.875	11.754
Pmax	3.762	-0.081	0.424	-5.048	17.414	-8.510
n	-1.913	0.033	-0.195	1.835	-8.968	3.010
m	-0.891	-0.001	-0.108	1.258	0.207	-0.111
mx	0.021	0.061	0.000	-0.605	-13.825	-0.463
Yx	-0.601	-0.032	-0.071	-0.112	6.534	1.457
α	0.104	-0.020	0.004	-5.756	5.748	2.385
β	0.684	-0.022	0.073	-2.172	5.068	5.668
Kp	-8.748	-0.094	-0.962	-12.277	19.984	-9.526
So	-13.672	-0.091	-0.026	1.061	40.958	0.877
ρ	-0.472	-0.001	-0.049	-0.327	0.240	-0.369
γ	-0.083	-0.014	-0.016	-1.020	3.110	-1.257
Xdi	0.212	0.011	0.016	1.083	-2.960	1.232

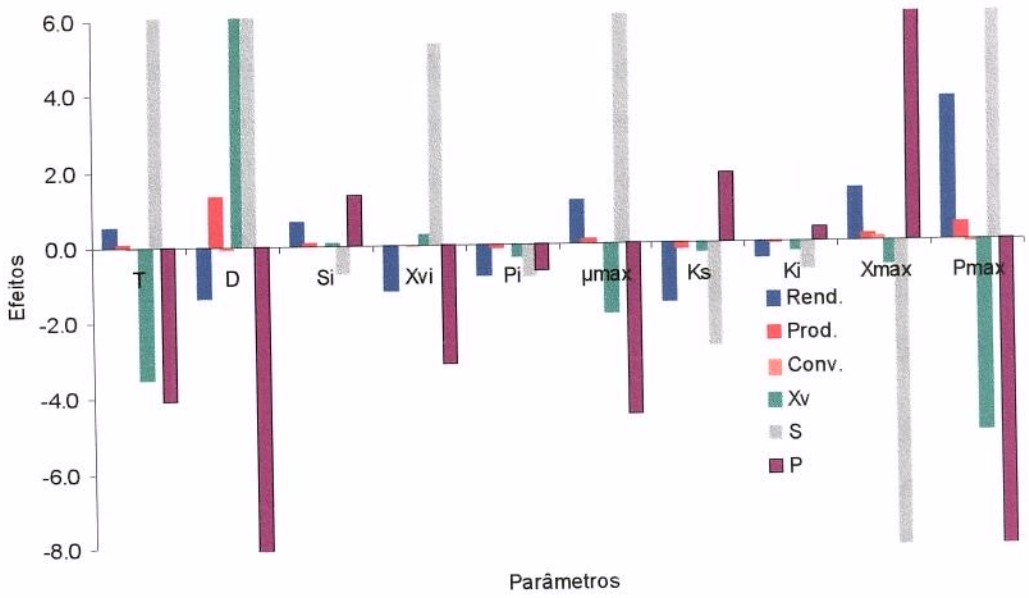


Figura V.54: Efeitos das variáveis analisadas no Planejamento saturado

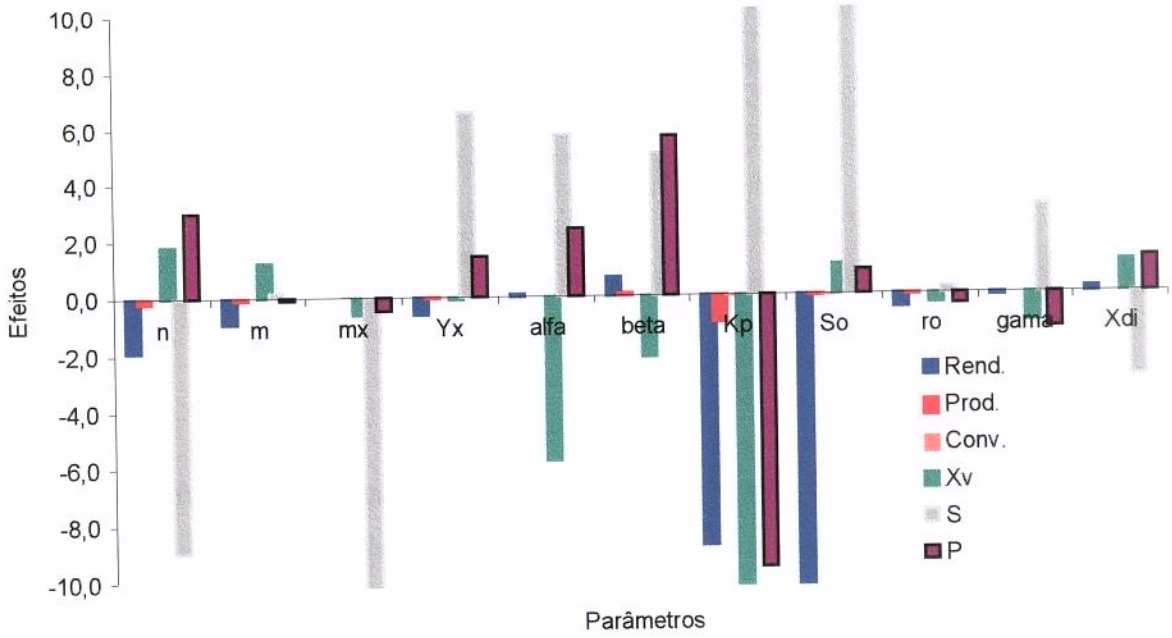


Figura V.55: Efeitos das variáveis analisadas no Planejamento saturado

V.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

Os parâmetros que relacionam as variáveis de estado e operacional (Xv, S, P, So, D e T) são influenciados por fatores externos e merecem maiores estudos e cuidados. Para isso, foi realizado um planejamento fatorial fracionário com a finalidade de verificar a influência de cada parâmetro sobre a resposta rendimento, conversão, produtividade, concentração de células viáveis, concentração de substrato e produto visando uma futura otimização do processo.

A tabela V.28 apresenta os níveis das variáveis de estudo. Pode-se notar que, mais uma vez, a temperatura de referência utilizada foi de 34°C e que os parâmetros cinéticos variaram ± 10% em relação aos parâmetros na temperatura de referência. O dados do planejamento foram obtidos através de simulação considerando 100 horas do processo

Tabela V.28: Níveis dos fatores do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2}.

	Níveis		
Fatores	-1	0	1
T	30.6	34	37.4
D	0.09	0.1	0.11
Xvi	9	10	11
Si	72	80	88
Pi	31.5	35	38.5
So	198	220	242

A tabela V.29 apresenta a matriz do planejamento fatorial fracionário com as respostas obtidas. A coluna do fator Pi é a multiplicação das colunas dos fatores T, D e Xvi e a coluna So é a multiplicação dos fatores D, Xvi e Si.

Tabela V.29: Matriz do planejamento fatorial fracionário

	Fatores						Respostas					
ensaio	T	D	Xvi	Si	Pi	So	Rend	Conv.	Prod	Xv	S	P
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	82.62	0.94	7.52	37.81	21.89	83.59
2	1	-1	-1	-1	1	-1	48.98	0.58	4.46	8.08	81.49	49.55
3	-1	1	-1	-1	1	1	65.01	0.74	8.84	47.72	74.13	80.39
4	1	1	-1	-1	-1	1	39.05	0.49	5.31	12.67	129.92	48.29
5	-1	-1	1	-1	1	1	66.96	0.81	7.45	38.46	68.29	82.80
6	1	-1	1	-1	-1	1	39.97	0.47	4.45	10.12	126.17	49.43
7	-1	1	1	-1	-1	-1	79.24	0.90	8.82	49.10	30.39	80.18
8	1	1	1	-1	1	-1	47.88	0.58	5.33	11.81	85.10	48.44
9	-1	-1	-1	1	-1	1	67.18	0.80	7.48	37.76	67.50	83.08
10	1	-1	-1	1	1	1	39.48	0.49	4.39	9.39	127.89	48.82
11	-1	1	-1	1	1	-1	79.84	0.87	8.89	47.55	28.76	80.78
12	1	1	-1	1	-1	-1	48.27	0.59	5.37	11.05	83.90	48.84
13	-1	-1	1	1	1	-1	82.28	0.92	7.49	38.41	23.08	83.25
14	1	-1	1	1	-1	-1	48.25	0.54	4.39	8.65	83.51	48.81
15	-1	1	1	1	-1	1	64.44	0.75	8.77	49.24	76.03	79.69
16	1	1	1	1	1	1	38.81	0.47	5.28	13.48	131.04	47.99
17	0	0	0	0	0	0	64.82	0.83	7.29	25.77	59.53	72.87

As tabelas V.30 a V.35 apresentam os valores dos efeitos sobre a resposta, sendo os parâmetros assinalados em vermelhos, significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela V.30: Tabela de efeitos estimados para rendimento.

	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p
Média	56.434	1.083	52.088	0.000
T	-32.032	2.234	-14.341	0.000
D	-0.184	2.234	-0.083	0.936
Xvi	-0.401	2.234	-0.180	0.861
Si	0.409	2.234	0.183	0.858
Pi	0.831	2.234	0.372	0.718
So	-11.776	2.234	-5.272	0.000

$R^2 = 0.958$ MS residual = 19.95

Tabela V.31: Tabela de efeitos estimados para conversão.

	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p
Média	0.691	0.013	54.137	0.000
T	-0.316	0.026	-11.993	0.000
D	-0.018	0.026	-0.687	0.508
Xvi	-0.007	0.026	-0.263	0.798
Si	-0.009	0.026	-0.329	0.749
Pi	-0.003	0.026	-0.132	0.898
So	-0.111	0.026	-4.217	0.002

$R^2 = 0.942$ MS residual = 0.0027

Tabela V.32: Tabela de efeitos estimados para produtividade.

	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p
Média	6.281	0.112	56.124	0.000
T	-3.546	0.231	-15.369	0.000
D	1.216	0.231	5.269	0.000
Xvi	-0.036	0.231	-0.157	0.878
Si	0.054	0.231	0.234	0.820
Pi	0.077	0.231	0.332	0.747
So	-0.075	0.231	-0.323	0.753

$R^2 = 0.963$ MS residual = 0.213

Tabela V.33: Tabela de efeitos estimados para formação de biomassa viável.

	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p
Média	37.137	0.381	97.465	0.000
T	-38.506	0.786	-49.020	0.000
D	8.040	0.786	10.236	0.000
Xvi	0.641	0.786	0.816	0.433
Si	0.031	0.786	0.039	0.969
Pi	-0.057	0.786	-0.073	0.943
So	0.803	0.786	1.022	0.331

$R^2 = 0.996$ MS residual = 2.47

Tabela V.34: Tabela de efeitos estimados para consumo de substrato.

	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p
Média	102.199	0.788	129.727	0.000
T	40.631	1.624	25.018	0.000
D	17.551	1.624	10.807	0.000
Xvi	2.908	1.624	1.791	0.104
Si	0.081	1.624	0.050	0.961
Pi	0.077	1.624	0.048	0.963
So	43.011	1.624	26.483	0.000

$R^2 = 0.993$ MS residual = 10.55

Tabela V.35: Tabela de efeitos estimados para formação de produto.

	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p
Média	55.901	0.444	125.964	0.000
T	-24.930	0.915	-27.249	0.000
D	-7.439	0.915	-8.131	0.000
Xvi	-1.139	0.915	-1.245	0.242
Si	-0.029	0.915	-0.032	0.975
Pi	-0.026	0.915	-0.029	0.978
So	0.603	0.915	0.659	0.525

$R^2 = 0.988$ MS residual = 3.35

Pelas Tabelas V.30 a V.35 pode-se verificar que as variáveis que definem o estado do processo (Xv, S, P) não foram significativas em nenhum caso. Já as variáveis operacionais (T, D e So) exercem uma grande influência sobre as respostas, sendo a temperatura significativa em todas os casos. Na tabela V.36 e na figura V.56 pode-se visualizar melhor este fato.

Tabela V.36: Tabela geral de efeitos das variáveis estudadas.

	Rend.	Conv.	Prod.	Xv	S	P
Média	56.434	0.691	6.281	37.137	102.199	55.901
T	-32.032	-0.316	-3.546	-38.506	40.631	-24.930
D	-0.184	-0.018	1.216	8.040	17.551	-7.439
Xvi	-0.401	-0.007	-0.036	0.641	2.908	-1.139
Si	0.409	-0.009	0.054	0.031	0.081	-0.029
Pi	0.831	-0.003	0.077	-0.057	0.077	-0.026
So	-11.776	-0.111	-0.075	0.803	43.011	0.603

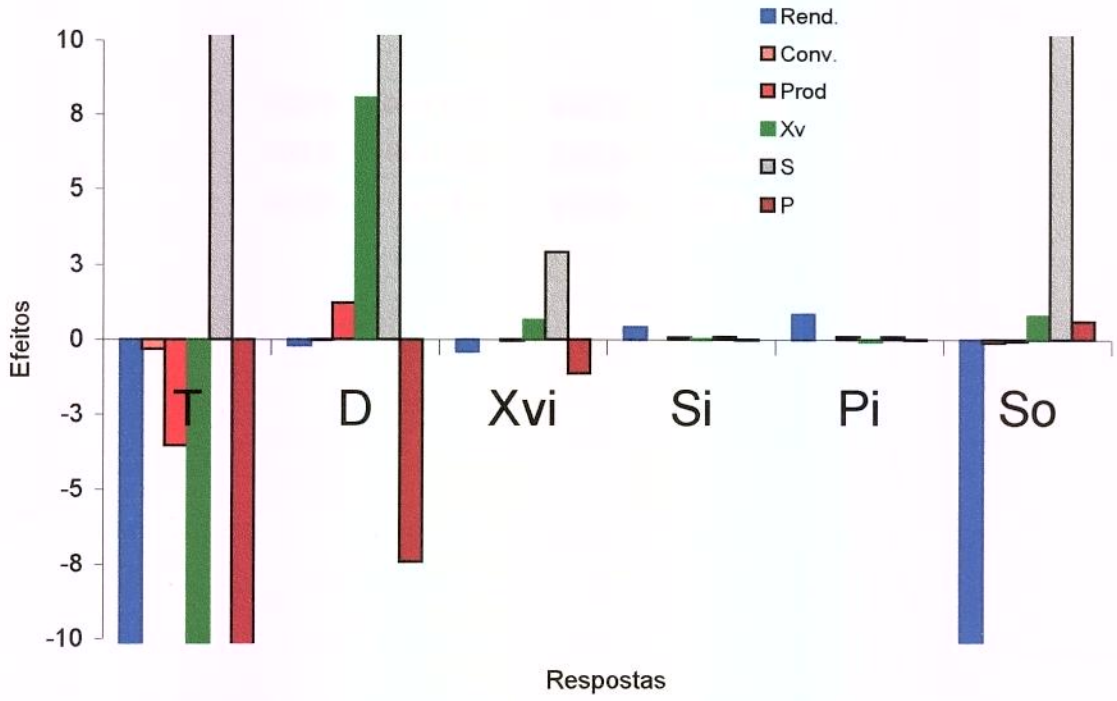


Figura V.56: Efeitos das variáveis analisadas no planejamento fatorial fracionário.

É importante observar que para aumentar o rendimento e a conversão do processo, este planejamento indica que se devem diminuir a temperatura, a taxa de diluição e a concentração de substrato na alimentação do processo fermentativo. Por outro lado, a diminuição da temperatura e o aumento da taxa de diluição aumentam a produtividade. Nota-se que em um processo fermentativo deseja-se ter alto rendimento, conversão e produtividade, porem a taxa de diluição é uma propriedade antagônica neste caso.

Com as informações obtidas no planejamento fatorial fracionário, pode-se verificar que somente as variáveis operacionais foram significativas. Para otimizar o processo fermentativo utilizou-se a técnica de superfície de resposta através da realização de um planejamento fatorial composto central. Neste tipo de planejamento o número de níveis aumenta de 3 para 5, possibilitando assim verificar efeitos de segunda ordem na resposta, além de ampliar a faixa de estudo das variáveis e permitir verificar efeitos de interação entre os fatores.

As variáveis estudadas no planejamento foram T, D e So e como respostas rendimento, conversão e produtividade, sendo estas, obtidas através do modelo cinético do processo batelada alimentada estendida em um tempo de 100h. Neste tempo o processo fermentativo apresentava-se em estado pseudo-estacionário. A tabela V.37 apresenta os níveis dos fatores utilizados no planejamento.

A escolha do estudo da otimização somente das respostas rendimento, conversão e produtividade é devida ao fato de que nos processos industriais estes são os principais fatores de interesse e as demais respostas estão intimamente ligadas com estes fatores.

Tabela V.37: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fracionário composto central

	Níveis				
Fatores	-1.68	-1	0	1	1.68
T	28	30.43	34	37.57	40
D	0.07	0.086	0.11	0.134	0.15
So	160	184.28	220	255.71	280

A matriz do planejamento fatorial composto central bem como as respostas obtidas na modelagem são apresentadas na tabela V.38.

Tabela V.38: Matriz do planejamento fatorial composto central.

	Fatores			Respostas		
Ensaio	T	D	So	Rend	Conv.	Prod
1	-1	-1	-1	88.60	0.85	7.17
2	1	-1	-1	51.31	0.57	4.16
3	-1	1	-1	77.85	0.55	9.82
4	1	1	-1	49.28	0.35	6.22
5	-1	-1	1	63.42	0.59	7.13
6	1	-1	1	37.02	0.40	4.16
7	-1	1	1	55.28	0.40	9.68
8	1	1	1	35.12	0.29	6.15
9	-1.68	0	0	60.85	0.49	7.53
10	1.68	0	0	25.13	0.25	3.11
11	0	-1.68	0	66.48	0.70	5.23
12	0	1.68	0	58.70	0.34	9.90
13	0	0	-1.68	87.68	0.84	7.89
14	0	0	1.68	50.07	0.43	7.88
15	0	0	0	64.02	0.50	7.92

As tabelas V.39 a V.41 apresentam os valores dos efeitos na resposta rendimento, conversão e produtividade. Nota-se que, como visto anteriormente, a taxa de diluição possui efeito contrário em relação a produtividade. A concentração de substrato na alimentação de não é significativa quando a resposta é produtividade, porem ela exerce grande influência negativa sobre o rendimento e conversão, ou seja, a diminuição de So aumenta significativamente o rendimento e a conversão do processo.

A temperatura em ambos os casos é significativa possuindo efeito negativo na resposta e efeito de segunda ordem, indicando que existe uma região ótima de rendimento, conversão e produtividade em temperaturas menores.

Para se obter um modelo estatístico que descreva o comportamento do sistema sobre diversas condições, é necessário realizar a análise de variância do processo que é apresentada nas tabelas V.42 a V.44. Nota-se que os fatores que não foram significativos na resposta foram ignorados sendo seus valores analisados nos resíduos.

Tabela V.39: Tabela de efeitos estimados para rendimento.

	Efeitos	Erro Padrão	t(5)	p
Média	47.377	4.634	10.225	0.000
T (L)	-19.752	2.525	-7.824	0.001
T (Q)	-9.256	3.794	-2.440	0.050
D (L)	-17.561	2.525	-6.956	0.001
D (Q)	0.290	3.794	0.076	0.942
So (L)	-17.815	2.525	-7.056	0.001
So (Q)	8.114	3.794	2.139	0.085
T x D	4.990	3.297	1.513	0.191
T x S	5.131	3.297	1.556	0.180
D x S	4.619	3.297	1.401	0.220

$R^2 = 0.974$ MS residual = 21.74

Tabela V.40: Tabela de efeitos estimados para conversão.

	Efeitos	Erro Padrão	t(5)	P
Média	0.499	0.044	11.217	0.000
T (L)	-0.174	0.024	-7.187	0.001
T (Q)	-0.095	0.036	-2.606	0.048
D (L)	-0.208	0.024	-8.574	0.000
D (Q)	0.012	0.036	0.336	0.750
So (L)	-0.193	0.024	-7.986	0.000
So (Q)	0.092	0.036	2.533	0.050
T x D	0.040	0.032	1.266	0.261
T x S	0.048	0.032	1.507	0.192
D x S	0.055	0.032	1.750	0.141

$R^2 = 0.978$ MS residual = 0.002

Tabela V.41: Tabela de efeitos estimados para produtividade.

	Efeitos	Erro Padrão	t(5)	P
Média	5.841	0.372	15.710	0.000
T (L)	-2.304	0.203	-11.375	0.000
T (Q)	-1.096	0.304	-3.600	0.016
D (L)	0.390	0.203	1.924	0.048
D (Q)	-0.383	0.304	-1.259	0.264
So (L)	-0.093	0.203	-0.458	0.666
So (Q)	0.595	0.304	1.955	0.108
T x D	0.014	0.265	0.053	0.960
T x S	0.186	0.265	0.703	0.514
D x S	0.239	0.265	0.905	0.407

$R^2 = 0.972$ MS residual = 0.134

Na tabela V.39 foi considerado no modelo o termo quadrático de So, pois apesar de não ser significativo a 95%, explica a resposta com 90% de intervalo de confiança. Na tabela V.41 foi considerado o termo quadrático de D, pois na simulação do processo verificou-se a existência de uma curvatura na região correspondente ao nível –1.68.

Tabela V.42: Análise de variância da resposta rendimento

	SQ	GL	MQ	F calc.	F(0.95,5,9)
Regressão	4068.28	5	813.66	28.84	3.48
Erro	253.96	9	28.22		
Total	4322.24	14		F calc. / F tab	8.28

$R^2 = 0.941$

Tabela V.43: Análise de variância da resposta conversão

	SQ	GL	MQ	F calc.	F(0.95,5,9)
Regressão	0.45	5	0.09	33.45	3.48
Erro	0.02	9	0.00		
Total	0.47	14		F calc. / F tab	9.612112

$R^2 = 0.943$

Tabela V.44: Análise de variância da resposta produtividade

	SQ	GL	MQ	F calc.	F(0.95,4,10)
Regressão	24.013	4	6.00	41.44	3.48
Erro	1.448	10	0.14		
Total	25.461	14		F calc. / F tab	11.91

$R^2 = 0.948$

Um modelo estatístico para ser válido deve possuir uma correlação elevada e uma relação entre o F calculado e o tabelado superior a 4 vezes. Nas tabelas V.42 a V.44 pode-se verificar que estas condições foram satisfeitas. As equações (78) a (80) apresentam os modelos estatísticos com as variáveis codificadas significativas obtidos neste planejamento.

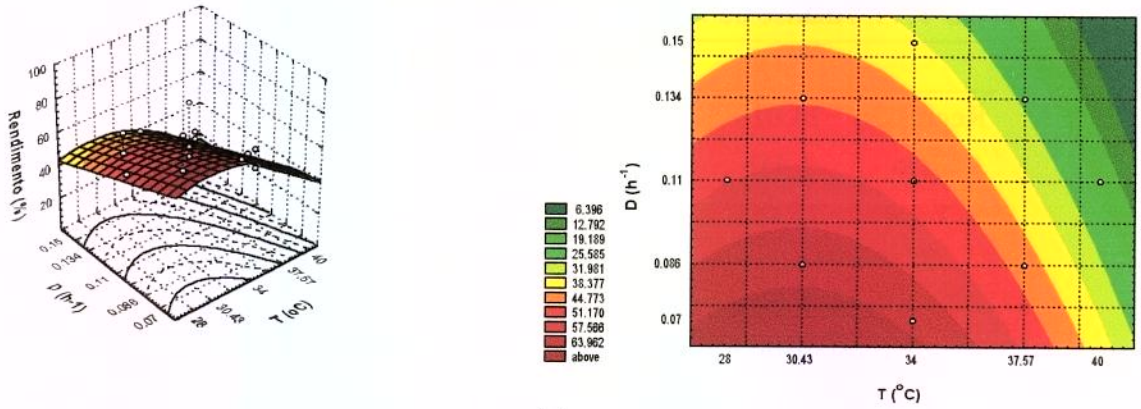
$$\text{Rend} = 47.67 \cdot -9.87 \cdot T - 4.72 \cdot T^2 - 8.78 \cdot D - 8.9 \cdot So + 3.96 \cdot So^2 \quad (78)$$

$$\text{Conv} = 0.511 \cdot -0.087 \cdot T - 0.051 \cdot T^2 - 0.104 \cdot D - 0.096 \cdot So + 0.042 \cdot So^2 \quad (79)$$

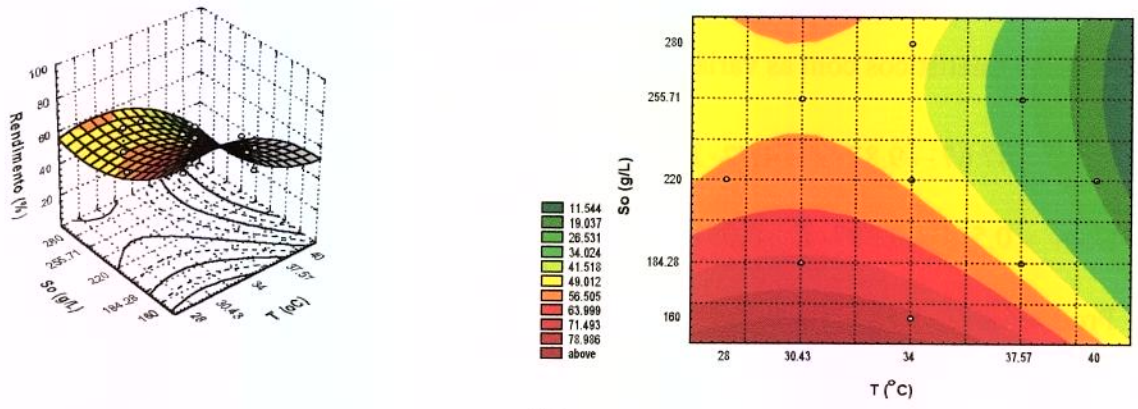
$$\text{Prod} = 6.44 \cdot -1.152 \cdot T - 0.737 \cdot T^2 + 0.195 \cdot D - 0.376 \cdot D^2 \quad (80)$$

As figuras V.57 a V.61 apresentam as superfícies de respostas obtidas neste estudo. Na figura V.57 bem como na figura V.58, pode-se verificar que o rendimento e a conversão aumentam com a diminuição da taxa de diluição e com a diminuição da concentração de substrato na taxa de alimentação. Com relação à temperatura, o rendimento e a conversão possuem um intervalo ótimo situado entre as temperaturas de 28°C e 34°C. Utilizando as condições ótimas obtidas neste estudo, é possível trabalhar com rendimentos acima de 90%, e conversão superior a 0.93 como pode ser observado nas figuras V.59 e V.60, respectivamente.

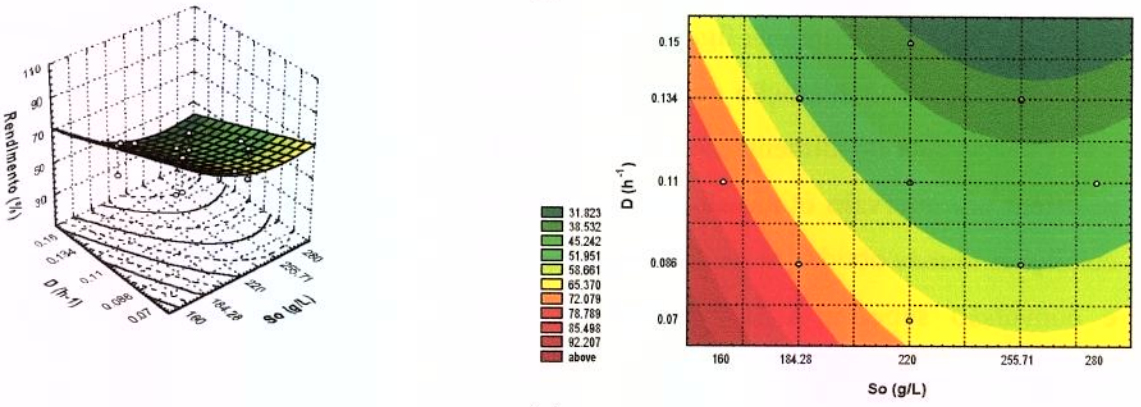
Para o estudo da produtividade do processo, somente a variável temperatura e taxa de diluição foram significativas. A figura V.61 apresenta a superfície de resposta obtida para a produtividade do processo, onde pode-se notar que existe uma região ótima de produtividade localizada entre as temperaturas de 28°C a 34°C e entre as taxas de diluição de 0.086 h^{-1} a 0.15h^{-1}.



(a)



(b)



(c)

Figura V.57: Superfícies de respostas para o rendimento em função da: (a) temperatura e da taxa de diluição com So no nível 0; (b) concentração de substrato na alimentação e da temperatura com D no nível 0 e (c) concentração de substrato na alimentação e da taxa de diluição com T no nível 0

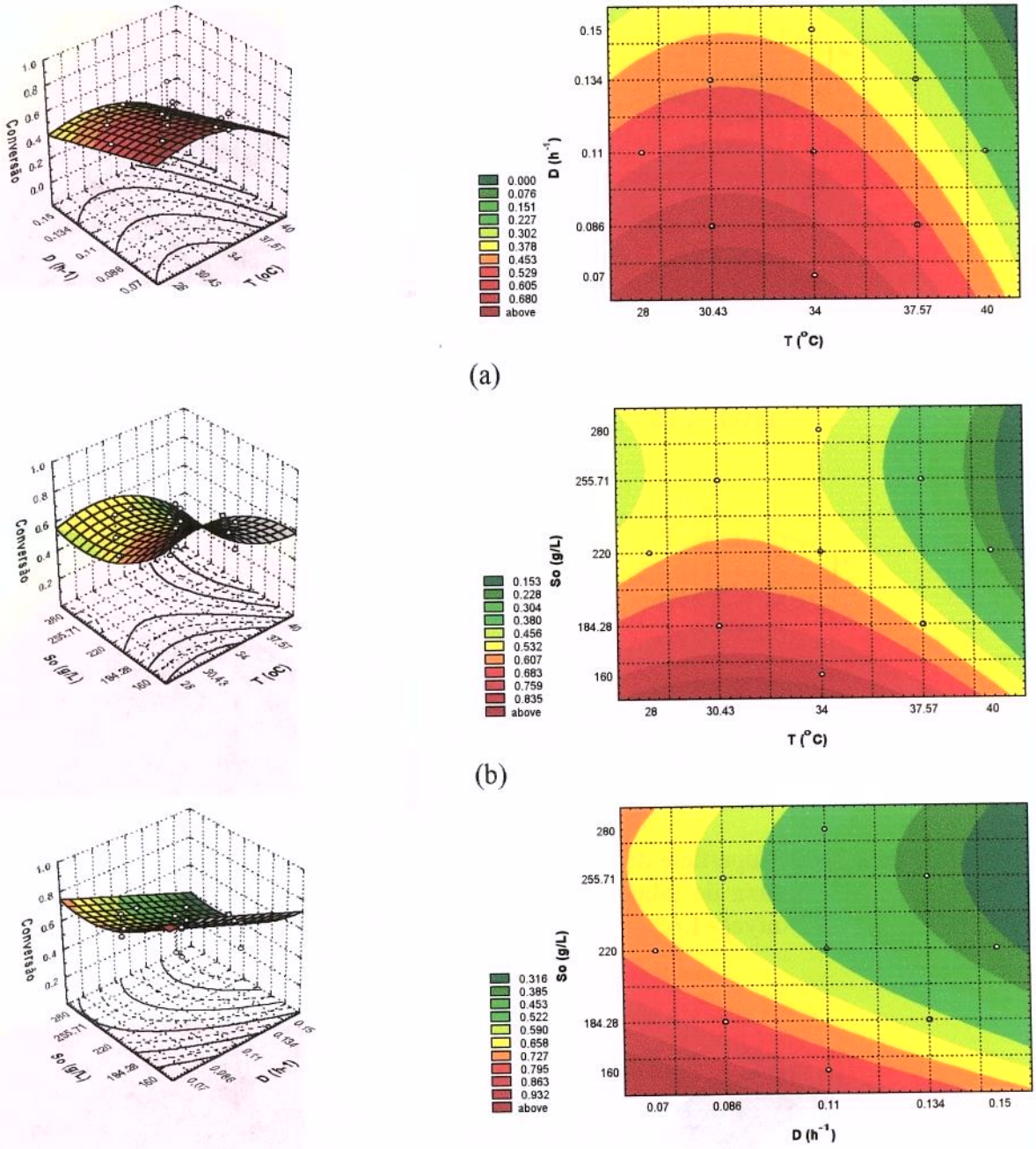


Figura V.58: Superfícies de respostas para a conversão em função da: (a) temperatura e da taxa de diluição com So no nível 0; (b) concentração de substrato na alimentação e da temperatura com D no nível 0 e (c) concentração de substrato na alimentação e da taxa de diluição com T no nível 0

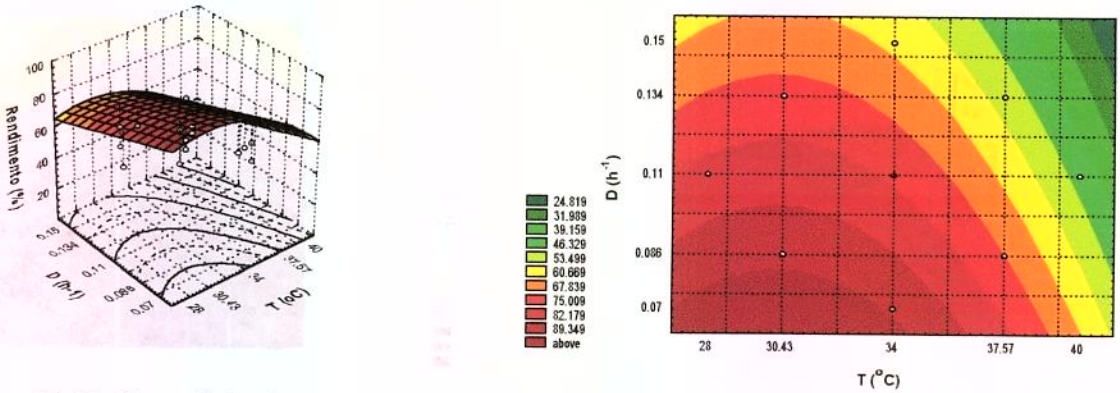


Figura V.59: Superfície de resposta para o rendimento em função da temperatura e da taxa de diluição com a concentração de substrato na alimentação no nível –1.68

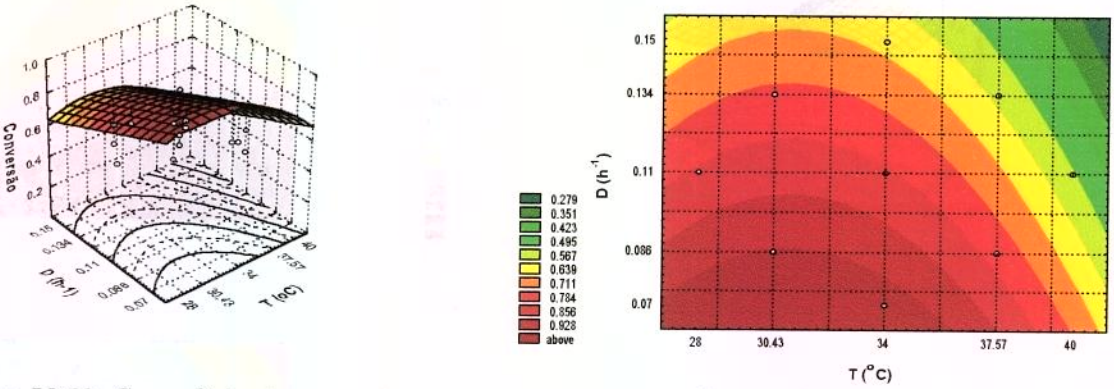


Figura V.60: Superfície de resposta para a conversão em função da temperatura e da taxa de diluição com a concentração de substrato na alimentação no nível –1.68

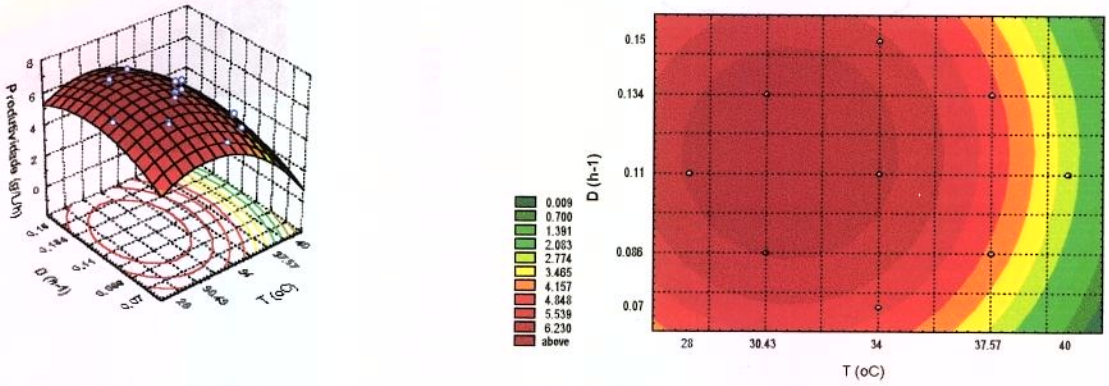


Figura V.61: Superfície de resposta para a produtividade em função da temperatura e da taxa de diluição.

Para se tentar otimizar as respostas rendimento, conversão e produtividade, deve-se analisar os gráficos onde são plotados seus valores em função da temperatura e da taxa de diluição, visto que a concentração de substrato na alimentação não é significativa para produtividade. Os gráficos das figuras V.59 a V.61 são mostrados de modo sobreposto na figura V.62.

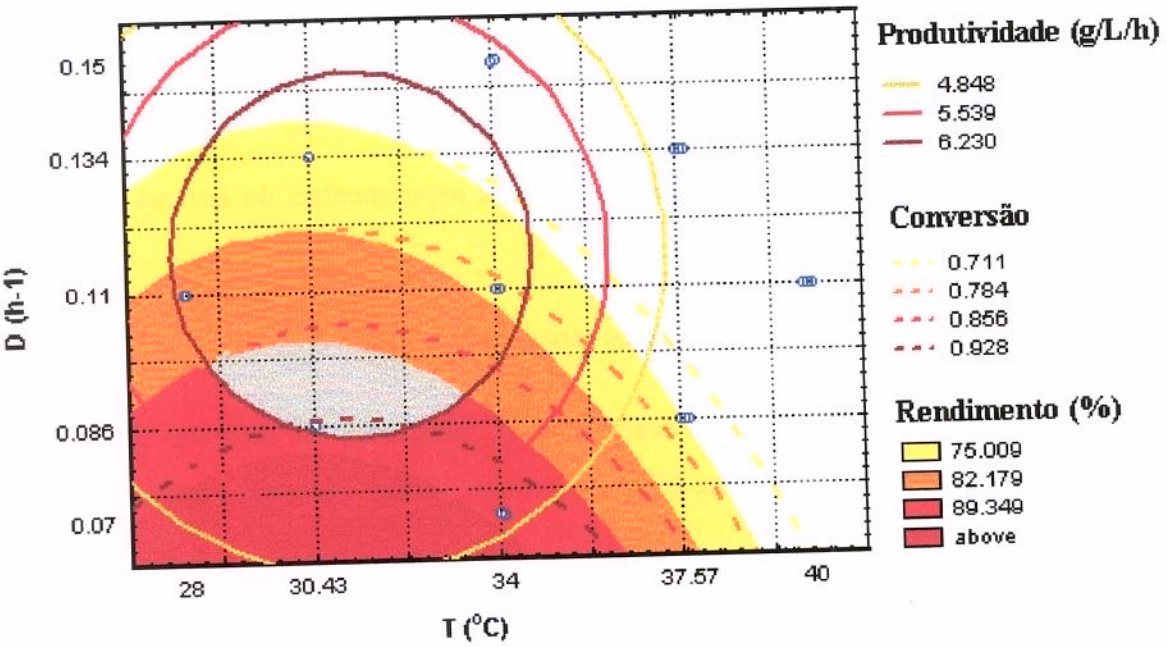


Figura V.62: Otimização das resposta de rendimento e produtividade.

Os resultados obtidos no planejamento fatorial composto central foram previstos na simulação do processo, porem com a vantagem de realizar um número menor de simulações.

Na zona em cinza do gráfico da figura V.62 é possível observar a região em que o rendimento, a conversão e a produtividade permanecem elevados, atingindo valores superiores a 90%, 0.93 e 6.2g/L/h, respectivamente após 100 horas de fermentação. Esta região indica quais as faixas de trabalho que devem ser adotadas no processo fermentativo. É importante salientar que na simulação do processo fermentativo, a região de máximo rendimento, conversão e produtividade foram alcançados com um tempo de aproximadamente 50 horas, alcançando valores superiores a 8g/L/h de produtividade.

VI. CONCLUSÕES

Através da análise dos dados experimentais obtidos neste trabalho bem como a modelagem, simulação e otimização do processo foi possível concluir que:

- Altas densidades celulares foram conseguidas somente em temperaturas inferiores a 34°C, pois o efeito inibitório exercido pela concentração de substrato e de etanol em altas temperaturas foi elevado.

- O modelo cinético ajustou-se bem aos dados experimentais do sistema batelada e batelada alimentada estendida.

- Os parâmetros cinéticos encontrados são coerentes.

- O modelo cinético permite a realização de simulações do processo em diversas situações operacionais possibilitando assim, obter diversas informações do processo.

- Com o estudo da influência das variáveis do modelo pode-se observar que os parâmetros Si, Pi, Ki, m, ρ, γ e Xvi não foram significativos em nenhum caso. Já os parâmetros D, Pmax e Kp foram significativos em todas as respostas estudadas.

- É importante observar que So é significativo para rendimento e conversão e não exerce influência sobre a produtividade, sendo este fato observado na simulação do processo.

- O parâmetro Kp é na maioria dos casos, a variável de maior significância, ou seja, ela altera sensivelmente a curva da resposta analisada.

- Das variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário as variáveis que definem o estado do processo não foram significativas em nenhuma resposta estudada.

- Na otimização do processo visando maximizar rendimento, conversão e produtividade todas a variáveis foram significativas exceto a concentração de alimentação de substrato para a resposta produtividade.

- As análises de superfícies de respostas permitiram verificar que, para aumentar o rendimento e a conversão do processo, deve-se diminuir a temperatura, a taxa de diluição e a concentração de substrato na alimentação. Para otimizar a resposta produtividade, deve-se diminuir a temperatura e aumentar a taxa de diluição.

- A região que possui altos rendimentos, conversão e produtividade está localizada entre as temperaturas de 28°C a 34°C e entre as taxas de diluições de 0.09 a 0.13 h^{-1} com rendimentos, conversão e produtividade superiores a 90%, 0.93 e 6.2g/L/h.

VII. SUGESTÕES

Para a realização de trabalhos futuro, sugere-se:

- Realizar fermentações com quantidade menores de açúcares na alimentação
- Simular outros processos fermentativos com o modelo cinético obtido neste estudo.
- Realizar um estudo enzimático do processo fermentativo
- Implementar controles no processo fermentativo batelada alimentada estendida
- Testar no modelo os parâmetros calculados pelas equações macroquímicas
- Realizar um estudo do processo fermentativo acoplado a um sistema extrativo do tipo flash.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. G. L. F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*.** Campinas - SP., 1996. 69p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ANDRIETTA, S. R. **Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica em escala industrial.** Campinas - SP, 1994. 178p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ANDRIETTA, S. R. e STUPELLO, J. P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica (I) Batelada alimentada. **STAB - Tecnologia/Pesquisa**, v.Maio/Agosto, p.36-40, 1990.

ANDRIETTA, S. R.; STUPELLO, J. P.; MAUGERI, F.; FIORIM, F.; FABRO, J. L.; PALMER, C. L. S. e GAMBARO, V. V. Fermentação contínua - Projeto, controle e aspectos operacionais (Usina Guarani). **STAB - Tecnologia/Pesquisa**, v.Maio/Junho, n.5, p.26-30, 1994.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos.** 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. 299p.

BAYLEY, E. J. e OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals.** 2.ed. Singapore: McGraw-Hill International Editions, 1986. 984p.

BAZUA, C. D. e WILKE, C. R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.7, p.105-118, 1977.

CARVALHO, B. S. **Efeito da temperatura na cinética de morte celular e em fermentação alcoólica contínua com reciclo de células.** Campinas - SP., 1996. 83p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CASON, D. T.; REID, G. C. e GATNER, E. M. S. On the differing rates of fructose and glucose utilisation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Inst. Brew.**, v.93, p.23-25, 1987.

CHANG, H. N.; LEE, W. G. e KIM, B. S. Cell retention culture with an internal filter module: continuous ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, n.6, p.677-81, 1993.

CHANG, H. N.; YOO, I. K. e KIM, B. S. High density cell culture by membrane-based cell recycle. **Biotechnol.Adv**, v.12, n.3, p.467-87, 1994.

CYSEWSKI, G. R. e WILKE, C. R. Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, n.9, p.1421-1444, 1978.

DAUGULIS, A. J. e SWAINE, D. E. Examination of substrate and product inhibition kinetics on the production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, n.5, p.639-645, 1987.

DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U. e SEVELY, Y. Modeling and static optimization of the ethanol production in a cascade reactor: I. Modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, n.2, p.187-94, 1987.

FRANCO, R. M. Álcool x Petróleo. **Correio Popular**, Campinas - SP, 08 jan. 1999. Caderno Terramérica, p.10-11.

GHOSE, T. K. e TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I. Batch versus continuous systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.1387-1400, 1979.

HUANG, S. Y. e CHEN, J. C. Analysis of the kinetics of ethanol fermentation with Zymomonas mobilis consedering temperature effect. **Enzyme Microb. Technol.**, v.10, n.7, p.431-439, 1988.

JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J. e Goma, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeasts concetration. **Biotechnology and Bioengineering**, v.34, p.1225-1230, 1989.

JIMENEZ, J. e VAN UDEN, N. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, n.11, p.1596-1598, 1985.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F. e RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design optimization. **Process Biochemistry**, v.35, p.539-550, 2000.

LAFFORGUE, D. C.; DELORME, P. e GOMA, G. Continuous alcoholic fermentation with Saccharomyces cerevisiae recycle by tangential filtration: key points for process modelling. **Biotechnology Letters**, v.16, n.7, p.741-46, 1994.

LAFFORGUE, D. C.; MALINOWSKI, J. e GOMA, G. High yeast concentration in continuous fermentation with cell recycle obtained by tangential microfiltration. **Biotechnology Letters**, v.9, n.5, p.347-52, 1987.

LEE, C. W. e CHANG, H. N. Kinetics of ethanol fementations in membrane cell recycle fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, n.9, p.1105-12, 1987.

LEVENSPIEL, O. The Monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.22, p.1671-1687, 1980.

LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, n.3, p.280-85, 1985.

MELO CRUZ, M. R. e BORZANI, W. Fermentação alcoólica de melaço e caldo de cana - de açúcar por *Zimomonas mobilis*. **Revista Brasileira de Tecnologia**, v.11, n.2, p.517, 1980.

MELZOCH, K.; RYCHTERA, M.; MARKVICHOV, N. S.; POSPICHALOVA, V.; BASAROVA, G. e MANAKOV, M. N. Application of a membrane recycle bioreactor for continuous ethanol production. **Appl.Microbiol.Biotechnol**, v.34, n.4, p.469-72, 1991.

MONBOUQUETTE, H. G. Modeling high-biomass-density cell recycle fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, n.5, p.498-503, 1992.

NWESIGYE, P. K. e BARFORD, J. P. Transport os sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Fermentation and Bioengineering**, v.77, n.6, p.687-690, 1994.

PANCHAL, C. J. e STEWART, G. G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by brewing yeast strain. **J. Inst. Brew.**, v.86, p.207-210, 1979.

PLACKETT, R. L. e BURMAN, J. P. The design optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v.33, p.305-325, 1946.

RODRIGUES, M. I. **Modelagem, simulação e controle de um processo contínuo de purificação de enzimas.** Campinas - SP., 1993. 208p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SIQUEIRA, E. P. F. **Efeito da temperatura na cinética da fermentação alcoólica com alta densidade celular.** Campinas - SP., 1997. 87p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

VAN WIE, B. J.; BROUNS, T. M.; ELLIOTT, M. L. e DAVIS, W. C. A novel continuous centrifugal bioreactor for high-density cultivation of mammalian and microbial cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, n.10, p.1190-202, 1991.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. e AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Tibtech**, v.17, p.482-487, 1999.