

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS**

**PROCEDIMENTO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO
MATEMÁTICO ROBUSTO PARA O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

Autor: Rafael Ramos de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química**

Campinas-SP

Agosto 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

An24p Andrade, Rafael Ramos de
 Procedimento para o desenvolvimento de um modelo
 matemático robusto para o processo de fermentação
 alcoólica / Rafael Ramos de Andrade.--Campinas, SP:
 [s.n.], 2007.

 Orientador: Aline Carvalho da Costa, Rubens Maciel
 Filho
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

 1. Fermentação. 2. Modelos matemáticos. 3. Álcool. 4.
 Cinética química. 5. Batelada simples. 6. *Saccharomyces*
 cerevisiae. I. Costa, Aline Carvalho da. II. Maciel Filho,
 Rubens. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Procedure for development of a robust mathematical
model for alcoholic fermentation process

Palavras-chave em Inglês: Alcoholic fermentation, Modeling, Ethanol,
Kinetic parameters, Batch mode, Fed-batch mode.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

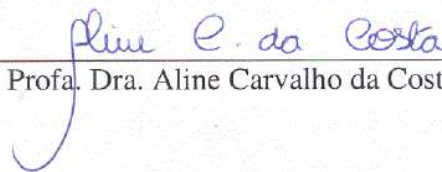
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho, Carlos Eduardo Vaz Rossell

Data da defesa: 07/08/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

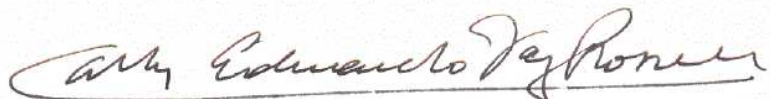
Dissertação de Mestrado defendida por Rafael Ramos de Andrade e aprovada em 07 de agosto de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa – Orientadora

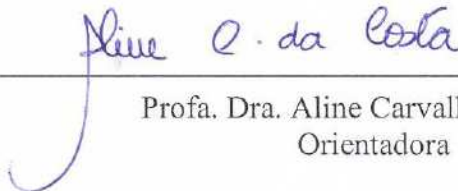


Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho



Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.



Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa
Orientadora



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho
Orientador

**Dedico este trabalho a minha avó
Dorothea Soria Ramos (in memoriam), que
sempre deu incentivo aos meus estudos.**

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pela vida.
- À minha orientadora Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa e co-orientador Prof. Dr. Rubens Maciel Filho pela amizade, atenção, confiança e excelente orientação.
- Em especial ao Dr. Daniel Ibrain Pires Atala por tanto ter colaborado com o desenvolvimento deste trabalho, não somente na parte experimental, como nas sugestões em relação à escrita e organização do mesmo, participando também da comissão julgadora do exame de qualificação.
- Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho por colaborar com este trabalho e ceder espaço físico para o desenvolvimento dos experimentos.
- Ao amigo Dr. Elmer Copa Rivera pela atenção dada na modelagem do processo e na elaboração de artigos científicos.
- À Dra. Fátima Costa pela atenção e pela valiosa colaboração.
- Ao Prof. Dr. Sílvio Andrietta pelas valiosas sugestões dadas.
- Aos meus pais, tios e outros familiares pelo apoio e paciência.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro
- Aos amigos do LEB/FEA, Geraldo, Elizama, Mônica, Raquel, Bernardo, Olga, e pessoal do LOPCA.

RESUMO

Entre os principais problemas relacionados à produção de etanol está a falta de robustez da fermentação em presença de flutuações na qualidade de matéria-prima, o que leva a mudanças no comportamento cinético com impacto no rendimento, produtividade e conversão. Esta falta de robustez pode ser levada em conta através de ajustes operacionais e de controle, que pode ser melhorado com o uso de um modelo matemático preciso.

Neste trabalho, um procedimento para o desenvolvimento de um modelo matemático robusto, válido em uma grande faixa de condição operacional foi estabelecido.

Este modelo considera o efeito da temperatura na cinética. Experimentos foram executados em modo batelada. O microrganismo utilizado foi *Saccharomyces cerevisiae* e o meio de cultura, melaço de cana de açúcar.

O objetivo foi avaliar a dificuldade em atualizar os parâmetros cinéticos quando se tem mudanças nas condições de fermentação. Rendimento e produtividade foram analisados como funções de temperatura e concentração inicial de substrato.

Neste trabalho foi executada também a otimização dos parâmetros cinéticos no processo de fermentação alcoólica. Parâmetros cinéticos foram determinados como função da temperatura para fermentações em batelada na faixa de temperatura de 30 até 38°C. Baseado em dados experimentais, um modelo diferencial que consiste em expressões para taxa de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto foi proposto. O objetivo foi desenvolver um procedimento para atualizar os parâmetros cinéticos sempre que mudanças nas condições de fermentação ocorrerem.

Mudanças em condições operacionais são muito comuns em plantas de fermentação alcoólica, elas ocorrem não somente devido a variações na qualidade da matéria-prima, mas também devido a variações nas leveduras dominantes no processo.

Também, o processo de fermentação alcoólica é exotérmico e pequenos desvios na temperatura podem deslocar o processo da condição de operação ótima. Assim, está claro que a principal dificuldade nas técnicas baseadas em modelos para definição de estratégias operacionais, controle e otimização, é o problema de obter um modelo preciso.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, modelagem, etanol, parâmetros cinéticos, modo batelada, modo batelada alimentada.

ABSTRACT

Among the main current problems related to industrial ethanol production is the lack of robustness of the fermentation in presence of fluctuations in the quality of raw material, which leads to changes in the kinetic behavior with impact on yield, productivity and conversion. This lack of robustness can be taken into account through operational and control adjustments, which can be aided by the use of an accurate mathematical model.

In this work, a procedure to develop a robust mathematical model, valid in a large range of operational conditions, was established. This model considers the effect of temperature on the kinetics. Experiments were performed in batch mode. The microorganism used was *Saccharomyces cerevisiae* and the culture media, sugar-cane molasses.

The objective was to assess the difficulty in updating the kinetic parameters when there are changes in fermentation conditions. Yield and productivity were analyzed as functions of temperature and initial substrate concentration.

In this work we perform kinetic parameters optimization in alcoholic fermentation process. Kinetic parameters were determined as functions of temperature from batch fermentations at temperatures from 30 to 38°C. Based on experimental data, a differential model consisting of rate expressions for cell growth, substrate consumption and product formation was proposed. The objective is to develop a procedure to update the kinetic parameters always that changes in fermentation conditions occur.

The lack of robustness of the fermentation in the presence of fluctuations in the quality of the raw material, which leads to changes in the kinetic behavior with impact on yield, productivity and conversion, is among the main current problems related to the alcoholic fermentation process. Changes in the operational conditions are quite common in plants of alcoholic fermentation; they occur not only due to the variations in the quality of the raw material but also due to variations of dominant yeast in the process. Also, the alcoholic fermentation process is exothermic and small deviations in temperature can dislocate the process from optimal operational conditions. Thus, it is clear that the main difficulty in model-based techniques for definition of operational strategies, control and optimization, is the problem of obtaining an accurate model.

Key-words: alcoholic fermentation, modeling, ethanol, kinetics parameters, batch mode, fed batch mode.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO-----	1
1.1. Objetivos-----	3
1.2-Organização do trabalho-----	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	5
2.1 PRODUÇÃO DE ETANOL E CUSTOS-----	5
2.2 MATÉRIA-PRIMA UTILIZADA EM FERMENTAÇÕES ALCOÓLICAS--	8
2.3 PROCESSO DE DESTILAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL-----	11
2.4 EFEITO DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA-----	11
2.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA-----	13
2.6 MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO-----	14
2.6.1. Esterilização através do calor úmido-----	14
2.6.2. Esterilização em autoclave-----	14
2.6.3. Esterilização por ultravioleta-----	15
2.7 BIORREATORES UTILIZADOS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS---	15
2.8 FORMAS DE CONDUÇÃO DE PROCESSOS FERMENTATIVOS-----	17
2.8.1 Processos em Batelada-----	17
2.8.2 Processos em Batelada Alimentada “Fed-batch”-----	18
2.8.3 Processos contínuos-----	20
2.9 BALANÇO DE MASSA-----	20
2.9.1 Balanço de massa para processo em batelada-----	20
2.9.2 Balanço de massa para processos em batelada alimentada-----	22
2.10 MODELAGEM DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA-----	22
2.10.1 Abordagem conceitual para modelos cinéticos-----	22
2.10.2 Modelos matemáticos-----	23
2.10.3 Modelos fenomenológicos-----	24
2.10.4 Modelos matemáticos para fermentação alcoólica-----	24
2.10.5 Modelos matemáticos para formação de produto-----	28
2.10.5.1 Modelos não-estruturados para formação de produto-----	29
2.10.5.2 Modelos não-estruturados para inibição pelo produto-----	29

2.10.6 Parâmetros cinéticos-----	30
2.11 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS-----	31
2.11.1 Planejamento de Plackett e Burman-----	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS-----	34
3.1 Materiais-----	34
3.1.1 Fermentador-----	37
3.2 Métodos Analíticos-----	39
3.2.1 Determinação de Concentração de Substâncias Redutoras Totais, Etanol e Glicerol-----	40
3.2.2 Determinação de Concentração de Células Totais-----	41
3.2.3 Determinação de Viabilidade Celular-----	42
3.3 Método Matemáticos-----	42
3.3.1 Algoritmo de otimização para o cálculo dos parâmetros cinéticos e simulação do processo-----	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	44
4.1 VALIDAÇÃO DO MODELO-----	56
4.2 METODOLOGIA DE PLACKETT-BURMAN (PB) PARA A SELEÇÃO DOS PARAMETROS SIGNIFICATIVOS PARA O PROBLEMA DE RE-ESTIMAÇÃO-----	57
4.3 RE-ESTIMAÇÃO DE PARAMETROS COM NOVOS DADOS EXPERIMENTAIS-----	63
4.4 EXPERIMENTO EM BATELADA ALIMENTADA E AJUSTE DO MODELO CINÉTICO PARA NOVA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL-----	69
4.5 DESVIOS DO MODELO EM RELAÇÃO AOS DADOS EXPERIMENTAIS-----	72
4.6 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO E TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO NO RENDIMENTO EM ETANOL, BIOMASSA, PRODUTIVIDADE E CONVERSÃO-----	73
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS-----	79
5.1 Conclusões-----	79
5.2 Sugestões para trabalhos futuros-----	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS-----	81
APÊNDICE A-----	87

NOMENCLATURA

ART	acúcares redutores totais (Kg/m^3)
c_i	concentração do componente “i”
c_{if}	concentração do componente “i” na alimentação
F	vazão volumétrica de alimentação (m^3/h)
$F(t)$	vazão de alimentação no reator em função do tempo (m^3/h)
K_{dp}	coeficiente de morte por etanol, m^3/kg
K_{dT}	coeficiente de morte pela temperatura, h^{-1}
K_i	constante de inibição pelo substrato (m^3/Kg)
K_p	coeficiente de morte pelo etanol (m^3/Kg)
K_s	constante de saturação (kg/m^3)
K_t	coeficiente de morte pela alta temperatura (h^{-1})
m	parâmetro para descrição da inibição celular
m_p	produção de etanol associada ao crescimento ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)
m_x	parâmetro de manutenção ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)
n	parâmetro para inibição por produto
P	concentração de produto (kg/m^3)
$P_{\max}$	concentração de produto quando o crescimento cessa (kg/m^3)
r_d	taxa cinética de morte ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
r_{fi}	taxa cinética do componente “i” ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
r_p	taxa cinética de formação de produto ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
r_s	taxa cinética de consumo de substrato ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
r_x	taxa cinética de crescimento microbiano ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
S	concentração de substrato no reator (kg/m^3)
S_F	concentração de substrato na alimentação (kg/m^3)
t	tempo (h)
T	temperatura do meio de fermentação ($^{\circ}\text{C}$)
V, V_R	volume do reator (m^3)
X	concentração de biomassa (kg/m^3)
X_d	concentração de células mortas ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)

$X_{\max}$	concentração de biomassa quando o crescimento celular cessa (kg/m^3)
X_t	concentração de células mortas no reator (kg/m^3)
X_v	concentração de células viáveis ($\text{kg}/[\text{m}^3 \cdot \text{h}]$)
Y_{px}	rendimento de produto baseado em células (kg/kg)
Y_x	rendimento celular limite (kg/kg)

Letras Gregas

μ	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
$\mu_{\max}$	velocidade máxima específica de crescimento celular (h^{-1})
β	produção de etanol associada ao crescimento celular
ρ	densidade (Kg/m^3)
v	velocidade específica de obtenção de produto (h^{-1})

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Ultimamente, muita atenção tem sido dirigida à utilização de biomassa para a produção de energia por conta da redução de reservas de combustíveis fósseis e aquecimento global. O etanol tem sido citado como uma boa alternativa para resolver problemas ambientais e de energia. Segundo BOTERO (2006), etanol é a fonte de energia alternativa mais promissora para ser utilizado como combustível ou ainda misturado com a gasolina.

A produção de álcool a partir de melaço ou matéria-prima lignocelulósica é de grande interesse em pesquisas sobre energia. Esforços nesta área estão sendo realizados com o objetivo de reduzir a emissão de gases que colaboram com o aumento do efeito estufa e diminuir a dependência dos combustíveis fósseis.

O Brasil é um dos maiores produtores de etanol no mundo. Os custos de fabricação do álcool etílico no Brasil a partir do melaço de cana de açúcar são menores que a metade dos custos nos Estados Unidos, o qual utiliza milho como matéria-prima. Estimativas prevêem que o desenvolvimento de novas técnicas de produção de etanol a partir de resíduos agrícolas (resíduos de cana de açúcar), como bagaço, poderá reduzir seus custos de produção.

Um inventário realizado por MACEDO (2003) sobre a quantidade de CO₂ que é assimilada durante a cultura da cana de açúcar, e a produzida pelos processos agroindustriais e queima de combustível, concluiu que a cultura de cana remove CO₂ da atmosfera. O balanço entre a energia gerada pelo etanol e o consumo da mesma em processos é positivo, sendo um ponto positivo aos princípios do Protocolo de Quioto. Com a escassez de combustíveis fósseis e advento de veículos bi-combustíveis no Brasil, o aumento na produção de etanol combustível torna-se uma necessidade para atender o mercado interno. Muitas vantagens estão associadas ao consumo de etanol quando comparado à gasolina, devido à redução de alguns poluentes como CO, SO_x, e VOC (“volatile organic compounds”), como resultado de queima de fósseis.

O Proálcool foi criado no Brasil em 1975 com o objetivo aumentar a oferta de empregos e resolver as desigualdades sociais. Além disso, o preço do barril de petróleo passou de 2,91 dólares em 1973 para 12,45 dólares em 1975. Esforços foram realizados

com a finalidade de superar o problema da alta do petróleo, o que levou os setores agrícolas e industriais a um grande desenvolvimento tecnológico na década. Assim, o Brasil alcançou imensuráveis benefícios econômicos e ambientais. Nos dias atuais, existem 700 mil trabalhadores relacionados à produção de álcool, distribuídos em 350 estabelecimentos.

De acordo com BOTERO (2006), atualmente Brasil produz $2,6 \times 10^8$ toneladas de cana de açúcar, que são processadas em 324 moinhos. A matéria-prima é dividida entre produção de açúcar e etanol. A região centro-sul do país, que equivale somente a 17,6 % da sua área, é responsável por 74 % da produção total de açúcar. Este dado mostra o alto potencial que o Brasil possui para o cultivo de cana. Somente o estado de São Paulo é responsável por 76 % da produção do centro-sul.

O Brasil tem boas perspectivas para a produção de etanol, já que os preços dos combustíveis fósseis têm crescido drasticamente. O setor agroindustrial tem ganhado eficiência, o que leva o preço do etanol a tornar-se menor que o da gasolina.

Em processos industriais, mudanças em condições operacionais são bastante comuns, e o desenvolvimento de um modelo matemático robusto aperfeiçoaria o controle e otimização dos processos.

A falta de robustez da fermentação na presença de flutuações na qualidade da matéria-prima, o que leva à mudança no comportamento cinético, com impacto no rendimento, produtividade e conversão, é um dos principais problemas relacionados ao processo industrial de produção de etanol. Mudanças em condições operacionais são muito comuns em plantas de fabricação de etanol, estas ocorrem não somente devido a variações na qualidade da matéria-prima, mas também a variações de leveduras dominantes no processo, já que em grandes escalas torna-se difícil manter a esterilidade. Além disso, o processo de fermentação alcoólica é exotérmico, e pequenos desvios na temperatura podem tirá-lo da condição ótima de operação. O grande problema no processo torna-se então a obtenção de um modelo matemático robusto para que o mesmo possa ser utilizado como simulador.

1.1-Objetivos

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo matemático robusto que representasse o processo frente a alterações nas condições de fermentação, como concentração de matéria-prima, linhagem de microrganismo, temperatura, metabolismo microbiano e outros. Para isso, algumas etapas foram realizadas:

- Realização de experimentos em batelada com a finalidade de obter dados de concentração de biomassa, substrato (ART) e etanol ao longo do experimento.
- Modelagem matemática do processo com a determinação dos parâmetros cinéticos considerando o efeito da temperatura, através do método de otimização Quasi-Newton.
- Determinação dos parâmetros mais sensíveis do modelo utilizando o planejamento de PLACKETT-BURMAN (1946) e simulação através do modelo matemático obtido.
- Determinação de um procedimento de otimização que permita re-estimar os parâmetros que são mais sensíveis do modelo.
- Realização de um experimento em batelada alimentada, com diferentes condições, como melaço de safra diferente, microrganismo de lote diferente.
- Re-estimação dos parâmetros cinéticos mais importantes do modelo para que o mesmo seja capaz de descrever o experimento em batelada alimentada

1.2-Organização do trabalho

O capítulo 2, “Revisão Bibliográfica”, trouxe a realidade atual sobre produção de etanol, fatores que influenciam o processo de fermentação alcoólica, matéria-prima utilizada, efeito da temperatura, processo de destilação, métodos de esterilização em geral, tipos de biorreatores, modos de operação, modelagem matemática de fermentações, trazendo diversos tipos de modelos, bem como considerações sobre os mesmos. Os balanços de massa para bioreatores do tipo batelada e batelada alimentada foram também tratados. Posteriormente, no mesmo capítulo foi abordada a teoria sobre planejamento de experimentos.

No capítulo 3, “Materiais e Métodos”, foi apresentada toda a metodologia experimental envolvida no trabalho, detalhando descrições dos equipamentos utilizados, e metodologia matemática para o ajuste de parâmetros cinéticos do modelo.

No capítulo 4, “Resultados e Discussões”, foram mostrados os resultados das fermentações, ajuste de parâmetros cinéticos em função da temperatura, avaliação da influência dos parâmetros cinéticos na qualidade do modelo através da metodologia de Plackett-Burman, validação do modelo e re-estimação dos parâmetros mais relevantes para representar novas condições operacionais para processos em batelada e batelada alimentada. Com a simulação do modelo original, foi analisada a influência da concentração inicial de substrato e temperatura na produtividade, rendimento em etanol e biomassa para o processo em batelada.

No capítulo 5, “Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros”, discutiu-se as vantagens da aplicação do modelo utilizado para representar o processo de fermentação alcoólica, assim como da metodologia do planejamento de experimentos na avaliação da relevância dos parâmetros no modelo. Por final, tratou-se da importância da técnica de re-estimação para representar processos industriais com qualidade mesmo frente a mudanças em condições operacionais.

Capítulo 6, “Referências Bibliográficas”, citou-se todos os trabalhos anteriores, nos quais a presente dissertação foi baseada.

No “Apêndice A”, tem-se um artigo publicado na revista “Applied Biochemistry and Biotechnology” em 2007, com resultados preliminares deste trabalho, abordando o ajuste de parâmetros cinéticos e re-estimação para novas condições operacionais.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE ETANOL E CUSTOS.

O uso do etanol se iniciou na Europa na época da Segunda Guerra Mundial. De 1939 a 1945, ocorreu a falta da gasolina, o que fez necessária a substituição deste combustível por álcool etílico, porém no final da guerra, pela retomada da importação de gasolina, o combustível perdeu sua importância. (BASSO *et al.*, 2001)

Da década passada para os dias de hoje, o preço do petróleo tem aumentado, favorecendo então o interesse em desenvolver novas tecnologias de fermentação. Comparando com outros combustíveis, o etanol apresenta enormes vantagens ligadas não só às questões ambientais, mas também por poder ser misturado à gasolina, o que ajuda a aumentar o índice de octanagem da mesma, o que não requer ajustes nos motores para a quantidade até abaixo de 10 % de álcool. A capacidade calorífica do etanol chega a 2/3 em relação à gasolina, segundo BAILEY *et al.* (1986), o que demonstra o seu potencial como combustível.

As matérias-primas para produção de etanol no mundo são as mais diversas, incluindo melaço de cana de açúcar, caldo de cana, mandioca, grãos, madeira, resíduos de agricultura, palha, resíduos domésticos, urbanos e industriais, como jornal (BASSO *et al.*, 2001).

Em processos de produção de etanol, algumas modificações podem ser realizadas ao longo dos anos com a finalidade de obter melhorias em relação à taxa de reação, sendo que processos que levam muito tempo para ocorrer (baixa produtividade), necessitam de equipamentos maiores para obter uma quantidade de produto apreciável. A matéria-prima utilizada na fermentação é também responsável por grande parte dos custos. Outro fator a ser considerado é a recuperação de subprodutos, como leveduras, por exemplo, sendo que estas podem ser utilizadas como suplemento alimentar. A produção de etanol por processos fermentativos apresenta grande potencial econômico no Brasil devido à localização geográfica do país, tipo de solo e à grande variedade de matéria-prima disponível. Vale lembrar ainda que o cultivo de cana é possível em quase todo o território nacional por todo o ano (BASSO *et al.*, 2001).

Alguns melhoramentos têm sido realizados ultimamente visando aumentar a produtividade de etanol, como a utilização de um sistema contínuo de fermentação com extração do produto do meio fermentativo a vácuo, e conseqüentemente reduzindo a inibição pelo etanol, resultando em melhor desempenho que em processos industriais convencionais. Além disso, o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes tem reduzido custos de produção e impactos ambientais por possibilitar a manutenção do processo em condições definidas como ótimas (COSTA *et al.*, 2002).

Pode-se citar ainda um processo alternativo para a obtenção de álcool etílico, por *Zimomonas mobilis*, que é considerado um microorganismo mais promissor para a produção de etanol que leveduras em processos industriais. Ainda, a aplicação de reatores de membrana tem resultado em aumento de produção de forma bastante significativa (BOTERO *et al.*, 2006).

Ultimamente, técnicas de hidrólise do bagaço têm sido desenvolvidas. Autores como SUN e CHENG (2002) citam que a matéria-prima é responsável por mais de 40% dos custos de produção de etanol, e o desenvolvimento de um processo economicamente viável deste tipo depende da utilização otimizada de açúcares presentes nas frações de celulose e hemicelulose.

As leveduras, segundo CLARK (1996), são os microrganismos produtores de etanol que possuem bom crescimento e alta tolerância ao produto, além de alcançar altos rendimentos nas fermentações. A inibição ao crescimento microbiano ocorre para a maioria das leveduras a 110 g/L de etanol, porém as *Saccharomyces sake* toleram concentrações de até 160 g/L de etanol. Os volumes de inóculo mais utilizados estão em torno de 2 a 5 % do volume do fermentador. A produtividade dos processos em batelada estão em torno de 1,9 g etanol/L.h, porém a variante Melle-Boinot alcança valores bem mais altos, em torno de 6 g etanol/L.h, realizando um reciclo de células de até 80 % da levedura final, tendo como resultado a redução do tempo de fermentação.

Pode-se conseguir a produção de etanol por via destilatória, por via sintética e por via fermentativa. A primeira não tem significação econômica no Brasil. Na sintética, o etanol é obtido por reações a partir de hidrocarbonetos não saturados (eteno e etino), e de gases de petróleo e da hulha. A via fermentativa é a mais importante no país para obter álcool etílico. A fermentação alcoólica é um processo bioquímico, no qual, por vias metabólicas, substrato é metabolizado a álcool etílico, gás carbônico e glicerol, sob a ação enzimática das leveduras. Uma vez iniciada a fermentação alcoólica, surgem as

transformações inerentes ao processo, ou seja, desprendimento de gás carbônico, produção de álcool etílico e elevação da temperatura do mosto em fermentação. (BASSO *et al.*, 2001).

Para produzir álcool por via fermentativa, deve-se passar por fases distintas, desde o preparo do meio até a destilação. Segundo BASSO *et al.* (2001), a formação de etanol ocorre em 12 reações em seqüência, sendo que cada reação é catalisada por uma enzima (Figura 2.1). Estas estão no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa. As enzimas glicolíticas são influenciadas por fatores tais como nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros. Alguns desses tendem a inibir e outros a estimular a ação enzimática, afetando assim o desempenho dos processos fermentativos.

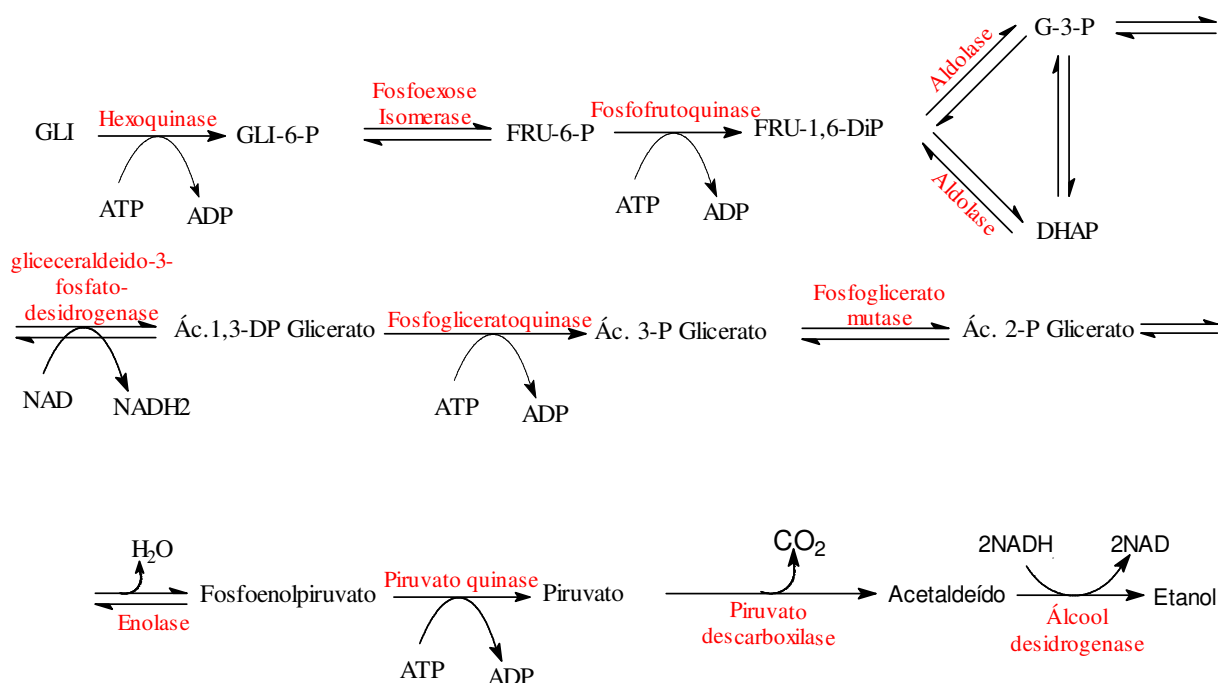


Figura 2.1 – Esquema da via metabólica de obtenção do etanol.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um aeróbio facultativo. As condições do ambiente nas quais as leveduras estão irão influenciar de forma muito significativa os produtos obtidos a partir do metabolismo. Em processos anaeróbicos, a maior parte dos açúcares são metabolizados, formando assim etanol e CO₂, caracterizando desta forma a fermentação alcoólica. Em aerobiose os açúcares são transformados em biomassa, CO₂ e

H₂O. Os carboidratos considerados substratos para a fermentação, tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como glicogênio e trealose) ou exógenos, como a sacarose, glicose, frutose e outros, que devem ser fornecidos ao microrganismo. A função principal na fermentação alcoólica é a geração de ATP a partir do açúcar. Esta forma de energia então deve estar disponível para funções básicas das células, como crescimento, multiplicação e manutenção da vida (BASSO *et al.*, 2001).

2.2 MATÉRIA-PRIMA UTILIZADA EM FERMENTAÇÕES ALCOÓLICAS.

Utilizam-se diferentes matérias-primas nesta fermentação, como cana-de-açúcar, grãos amiláceos, açúcar de beterraba, resíduos agrícolas, sorgo, milho e outros. Podem-se diferenciar as matérias-primas entre fermentescíveis e não diretamente fermentescíveis. As primeiras são as que contêm monossacarídeos. As não diretamente fermentescíveis são as que contêm os dissacarídeos, e devem passar por hidrólise anteriormente, por o microrganismo não conseguir desdobrar o dissacarídeo. A hidrólise pode ser uma sacarificação. Observam-se facilmente diferentes composições de matérias-primas. Estas variam com algumas características das mesmas, como a idade, a região onde são cultivadas, clima e outros (BASSO *et al.*, 2001)

Segundo PHISALAPHONG (2006), a concentração inicial de açúcares em fermentações tem efeito na ativação ou repressão do metabolismo celular. O mesmo autor ainda estudou a influência desta nos parâmetros como a velocidade máxima de crescimento microbiano.

A fermentação varia com diferentes condições de cultivo, como temperatura, pressão, pH do meio, oxigênio presente, substrato, espécie do microrganismo, linhagem, presença de contaminação e outros. Devido a estes fatores, observam-se distintas eficiências da conversão de açúcar em etanol (BASSO *et al.*, 2001)

A fermentação alcoólica pode ser dividida em etapas distintas. Na fase preliminar ocorre grande multiplicação celular, pequena elevação de temperatura e pequeno desprendimento de CO₂. Nesta etapa garante-se a produção de grande quantidade de células. Na segunda fase, tumultuosa, acontece o desprendimento de dióxido de carbono de forma intensa, devido ao grande número de células presentes no meio que desdobram os açúcares fermentescíveis do mosto em etanol, sendo a fase de maior tempo de duração. A temperatura eleva-se rapidamente, a densidade do mosto reduz-se e aumenta-se a

porcentagem de álcool e acidez. A elevação da temperatura deve ser corrigida com um sistema de refrigeração. Na fase complementar observa-se a diminuição da intensidade do desprendimento do dióxido de carbono, até encerramento da fermentação (BASSO *et al.*, 2001)

A fermentação alcoólica industrial é um processo bastante rústico, que certas vezes se processa em condições tecnicamente adversas. Canas cortadas há muitos dias, secas, infeccionadas com diversos tipos de microrganismos, mostos sujos de terra, são fatos muito mais comuns em uma destilaria do que se possa pensar. A rusticidade do processo se deve, inegavelmente, à capacidade biológica das leveduras, bastando que se lhes dêem condições de concentração adequada, nutrientes e alguns desinfetantes, para que o processo se desenvolva satisfatoriamente. Entretanto, as contaminações apresentam-se com frequência, prejudicando o rendimento econômico. Esse inconveniente contorna-se com supervisão constante, para evitar ou suprimir as infecções. O controle das fermentações faz-se por tópicos, citados por LIMA (2001), conforme se discute a seguir.

- Tempo de fermentação: Nos processos fermentativos descontínuos, a medida de sua duração média varia de acordo com a forma como se conta o tempo, se ao entrar o mosto em contacto com o inóculo ou após encher as dornas (LIMA, 2001). O tempo é mais curto em mostos de melaço e de caldo de cana e mais longo nos mostos de amiláceos. Fixando-se os tempos médios gastos numa destilaria, de acordo com os procedimentos técnicos que se adotam, uma alteração para mais ou menos, é um sinal de importância relevante na observação da fermentação.
- Odor de fermentação: O aroma das fermentações puras é penetrante, ativo, e tende para odor de frutas maduras. Cheiro ácido, a ranço, ácido sulfídrico e outros, indicam irregularidade (LIMA, 2001).
- Aspecto de espuma: Embora varie com a natureza do mosto, temperatura e a estirpe da levedura, a espuma apresenta-se com aspecto típico e característico, nas mesmas condições de fermentação. Alterações nessas características indicam irregularidade (LIMA, 2001).
- Drosófilas: Segundo LIMA (2001), quando há infecção acética, aparecem “moscas do vinagre” em número proporcional à contaminação.
- Temperatura: Já se viu que durante as fases de fermentação a temperatura varia. Nota-se que a temperatura de um mosto aumenta no decorrer do processo, tendo-se que usar

dispositivos de refrigeração para mantê-la nos níveis adequados até o final. Alterações importantes na curva de temperatura, do início ao final da fermentação, são um indício de possíveis defeitos.

- Densidade do mosto: Durante a fermentação a densidade do mosto decresce segundo uma curva condizente com as fases da fermentação. De sua observação percebem-se as alterações da marcha fermentativa.
- Açúcares no mosto: Consomem-se de acordo com a curva da densidade. A irregularidade no consumo indica defeitos na fermentação.
- Acidez no substrato em fermentação: Do começo ao final da fermentação nota-se um acréscimo na acidez titulável. Não deve haver grande diferença entre a final e a inicial. Quando a acidez final for maior que o dobro da inicial é sinal de má fermentação (LIMA, 2001).

Segundo CARVALHO (2001), nos processos descontínuos distinguem-se quatro tipos de fermentações industriais, que se denominam de sistema de cortes, sistema de reaproveitamento do inóculo (ou “pé de cuba”), sistema com culturas puras e sistemas de recuperação de leveduras, também denominado de reciclagem ou de reciclo de leveduras.

No sistema de cortes, depois que se faz a primeira fermentação, divide-se o volume de mosto fermentado por dois recipientes, completam-se os dois e deixa-se fermentar. Um envia-se para a destilaria e o outro serve para produzir o inóculo (ou “pé”) para mais dois, e assim por diante. Já no de reaproveitamento do inóculo, após a fermentação deixa-se decantar as leveduras, retira-se o substrato fermentado para a destilação, trata-se o inóculo precipitado no fundo da dorna, ao qual se denomina de pé-de-cuba, e se realimenta com novo mosto (CARVALHO, 2001).

No sistema clássico, também denominado de cultura pura, parte-se de um tubo de cultura pura para cada ciclo de fermentação, seguindo-se de todas as fases de preparo do inóculo, nas etapas de laboratório e industrial, até às dornas de fermentação, nas quais se juntam o inóculo e o mosto. É uma técnica trabalhosa, que não se usa a não ser em trabalhos experimentais. Nesse sistema não ocorre o problema de substituição de linhagens, apontado anteriormente. A técnica de recuperação de leveduras, posta em prática nos meados da década de 1930 e amplamente usada no Brasil, após a fermentação passa-se todo o vinho por centrífugas, nas quais se separa um líquido espesso, com a aparência de um creme, que recebe a denominação de creme ou de leite de leveduras. Esse leite, que

corresponde a 10 a 20% do volume da dorna, envia-se para purificação em um tanque onde se dilui com mesmo volume de água e coloca-se em agitação por 3 a 4 horas, após o tratamento com ácido sulfúrico até pH 2,2 a 3,2. Depois do tratamento envia-se o leite tratado para outra dorna, na qual se reinicia nova fermentação após realimentação com novo mosto. (CARVALHO, 2001)

2.3 PROCESSO DE DESTILAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL

A destilação é um método de separação que se baseia no equilíbrio líquido-vapor de misturas. Para que destilação seja um método eficaz é necessário que os componentes apresentem volatilidades diferentes. Entre os processos de destilação está o fracionamento, sendo que o processo consiste em um refeedor, condensador, balão de recolhimento de condensado e coluna de destilação. O líquido após aquecimento passa para fase vapor e alcança partes mais altas da coluna, onde se resfria condensando novamente, indo para a região inferior mais quente do equipamento. O efeito de condensação e vaporização ocorre de forma repetida. Obstáculos podem ser colocados dentro da coluna para promover maior contato entre as fases, o que aumenta a separação. Este efeito é o mesmo de várias separações “flash”.

Este processo de separação não pode ser aplicado a misturas azeotrópicas, sendo estas definidas como a mistura entre duas substâncias que em certa composição apresentam ponto de ebulição constante, apresentando o mesmo comportamento de substâncias puras. A composição do líquido e vapor do azeótropo é a mesma, o que impossibilita a separação por destilação convencional, necessitando assim de outras técnicas chamadas de quebra de azeótropo.

Durante a destilação dos vinhos, para a obtenção do álcool, há formação de mistura azeotrópica, que impede a obtenção de etanol puro apenas pela destilação. (BASSO *et al.*, 2001)

2.4 EFEITO DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Muitos fatores podem afetar fermentação alcoólica, como temperatura, composição da matéria-prima e concentração do inóculo. Temperatura influencia muitos aspectos como crescimento celular, metabolismo e viabilidade.

As atividades celulares possuem valores mínimo e máximo que ocorrem a temperaturas diferentes.

De acordo com HUANG e CHEN (1988), a viabilidade, os rendimentos de células e de etanol diminuem com a temperatura em fermentações em batelada. A inibição causada pelo produto é maior a altas temperaturas, o que modifica o consumo de substrato, formação de etanol e crescimento microbiano.

Segundo DALE *et al.* (1990), a temperatura tem grande influência na velocidade máxima específica de crescimento microbiano, descrita pela equação do tipo Arrhenius.

Segundo JIMENEZ e VAN UDEN (1985), citados por ATALA (2000), a tolerância do etanol pela *S. cerevisiae* diminui quando o valor da temperatura é aumentado. Em uma faixa de 12 a 28° C, a tolerância é constante, porém acima de 28°C, ela decresce.

Alguns autores como SANCHEZ *et al.* (2004), citado por PHISALAPHONG *et al.* (2005), explicam a dependência da velocidade máxima de crescimento com a temperatura como uma superposição entre a energia de ativação de crescimento e morte celular. Este mesmo autor propõe a representação de parâmetros cinéticos em função da temperatura através de equação do tipo Arrhenius.

Já DALSENER *et al.* (2005) acreditam que a velocidade máxima específica de crescimento não está diretamente ligada à temperatura, porém o comportamento que ela apresenta em função de tal variável é explicado pelos componentes presentes na biomassa cuja síntese e desnaturação está ligada à temperatura na qual o sistema é submetido.

PHISALAPHONG *et al.* (2005) encontraram que a produção de etanol e biomassa, passando de uma temperatura de fermentação de 30 para 33 °C, aumentavam; porém acima de 35 °C, estas voltavam a diminuir.

PHISALAPHONG *et al.* (2005) interpretam a inibição ao crescimento microbiano que ocorre em fermentações a altas temperaturas, como resultado da influência desta variável no transporte celular e ainda a saturação de solutos e solventes que estão presentes dentro das células, o que poderia resultar em um aumento da concentração de etanol no interior das células, ou ainda de outras substâncias tóxicas à mesma.

Outra explicação dada pelos mesmos autores é o fato da alta temperatura exercer influência na desnaturação de algumas proteínas e ribossomos e ainda na fluidez de membranas, o que teria influência indireta no crescimento celular.

De acordo com CLARK (1997), a queda do rendimento celular ocorre a altas temperaturas devido a a desnaturação de enzimas presentes levando a alguma morte celular.

Segundo STECKELBERG (2001), fermentações realizadas a altas temperaturas estão mais sujeitas a contaminação microbiana. A temperatura ótima de produção de etanol decresce quando se acumulam altas concentrações desse produto no reator, o que leva à necessidade de controle da mesma em processos industriais, e resfriamento das dornas de fermentação conforme o etanol é formado.

2.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Os efeitos da concentração inicial de açúcares redutores totais nos parâmetros cinéticos têm sido estudados por diversos autores, bem como a ativação de repressão causada por este. Segundo PHISALAPHONG *et al.* (2005), a concentração inicial de substrato apresenta certa influência na velocidade máxima específica de crescimento microbiano em relação à temperatura na faixa de 17 a 22 % de substrato (peso/volume), porém o mesmo não ocorre para a velocidade específica máxima de produção de etanol, ou na taxa específica de morte dos microrganismos. A relação entre a constante de saturação para crescimento celular (K_s) e concentração inicial de açúcares redutores totais é negativa. A influência da concentração inicial de substrato na redução do rendimento em células e produto, representados por $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$, e aumento do coeficiente de manutenção celular ocorre de forma significativa somente para concentrações iniciais de açúcares em torno de 22 % (peso/volume), sendo que abaixo deste valor, quase não há influência em função de temperatura.

Em altas concentrações de substrato, há ocorrência de maior pressão osmótica na célula, o que reduziria o transporte pela membrana. Isso resultaria em um aumento da morte celular e crescimento microbiano. O autor encontrou ainda que a pressão osmótica cresce em relação à temperatura de forma linear.

2.6 MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

2.6.1 Esterilização através do calor úmido

URENHA *et al.* (2001) citam que a esterilização por calor úmido é um método bastante eficiente na destruição de microorganismos devido à alta atividade da água, que associada à elevada temperatura, realiza mudanças conformacionais em moléculas de proteína, resultando assim em desnaturação desse composto, considerado essencial para a multiplicação celular, sobrevivência e síntese de enzimas, levando conseqüentemente à morte celular. O mesmo autor ainda comenta a ação deste método de esterilização nos carboidratos, que devido ao calor são caramelizados, o que muitas vezes leva a geração de produtos tóxicos às células.

O calor úmido é bastante utilizado devido ao seu baixo custo (vapor saturado), comparando com os demais (URENHA *et al.*, 2001). Devido a altas pressões e temperatura nas caldeiras, este ambiente é considerado estéril. A distribuição dos geradores de vapor saturado para os equipamentos geralmente é realizada através de tubulações de aço. Em algumas situações, implanta-se ainda um filtro em cartuchos com a finalidade de impedir que contaminações sejam carregadas para o reator ao injetar vapor saturado no sistema. A esterilização pode ser realizada com o reator vazio ou cheio de meio de cultivo.

2.6.2 Esterilização em Autoclave

A esterilização em autoclaves é realizada de forma bastante simples, porém possui limitações quanto ao tamanho dos equipamentos, sendo comumente utilizadas para reatores com volume útil de até 30 L, segundo URENHA *et al.* (2001). As autoclaves verticais possuem uma porta na parte superior, enquanto que as horizontais podem ter até duas. O vapor pode ser gerado dentro da própria autoclave, ou por uma caldeira acoplada a mesma. Se a produção ocorrer na autoclave, alguns cuidados devem ser tomados em relação ao nível de água indicado e ainda aconselha-se uso de água destilada, evitando assim incrustações no interior do equipamento.

Na primeira etapa de esterilização, abre-se a válvula no mesmo momento em que a resistência é ligada na posição de aquecimento máximo. Espera-se um tempo até que todo o ar seja expulso da autoclave, identificado pelo momento no qual apresenta saída contínua

de vapor. Após esta etapa, fecha-se a saída de ar, e aguarda-se o momento no qual o sistema alcança a pressão de 1 atm e 121°C. O próximo passo é reduzir a potência na chave, com a finalidade de manter condições constantes durante todo o processo de esterilização. O tempo de esterilização para objetos pequenos, como erlenmeyers e tubos de ensaio, é geralmente de 15 a 30 minutos (URENHA *et al.*, 2001), porém para reatores maiores, leva-se mais tempo para que interior do fermentador alcance a temperatura de 121 ° C. O tempo máximo de esterilização não pode ser ultrapassado para que não ocorra destruição excessiva de nutrientes presentes no meio de cultivo (DORAN, 2002)

No final de esterilização alguns cuidados devem ser tomados, como despressurização da autoclave de forma lenta, evitando assim danos a sensores de pH e oxigênio (URENHA *et al.*, 2001). A despressurização brusca pode levar à possível desconexão de mangueiras e outros, e vazamento de meio de cultivo pelo esterilizador.

As autoclaves funcionam através de aquecimento por resistência elétrica, ou a gás. Uma vantagem é que este processo de esterilização não altera muito o volume de meio de cultivo no fermentador (URENHA *et al.*, 2001). Já a injeção direta de vapor no meio leva à diluição do mesmo na faixa de 10 a 20 % devido ao condensado formado (DORAN, 2002).

2.6.3 Esterilização por ultravioleta

Segundo URENHA *et al.*, (2001), a radiação ultravioleta é bastante útil para pequenos materiais, ainda que somente na superfície dos mesmos devido ao baixo poder de penetração deste tipo de radiação. Alguns cuidados devem ser tomados, como manutenção freqüente da lâmpada emissora de radiação e não exposição de pessoas à mesma.

A eficácia deste método é devido ao efeito da radiação ultravioleta causar mudanças no DNA e RNA de microrganismos, impedindo então que os mesmos se reproduzam e mantenham-se vivos (URENHA *et al.*, 2001).

2.7 BIORREATORES UTILIZADOS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS

Segundo SCHMIDELL e FACCIOITI (2001), os bioreatores podem ser divididos em reatores enzimáticos e os que trabalham com células vivas, chamados de reatores biológicos. Desde a década de 40, os reatores de células vivas vêm sendo utilizados em

processos fermentativos em escalas industriais para produção de diversos produtos, bem como no tratamento de efluentes orgânicos industriais e domésticos.

O uso de reatores com alta densidade celular “high cell density cultures”, citado por SCHMIDELL e FACCIOTTI (2001), tem como grande vantagem a maior velocidade de conversão do substrato em produto, sendo este de grande interesse industrial. Em alguns casos de fermentação alcoólica, alcança-se a concentração de biomassa de 30 g/L, como peso seco.

Segundo SCHMIDELL e FACCIOTTI (2001), cerca de 90% dos reatores usados em processos industriais são reatores de mistura, variando desde pequenas dimensões, em processos que utilizam microorganismos patogênicos, até os maiores, mais característicos de processos de fermentação alcoólica, sendo que estes não exigem condição de assepsia, podendo ter dimensão de milhares de metros cúbicos. A necessidade de equipamentos de grandes dimensões na produção está relacionada também ao valor agregado, sendo que na produção de produtos de maior valor agregado, como vacinas e proteínas recombinantes, faz-se uso de reatores de dimensão menor.

Muito utilizado em fermentações alcoólicas, o reator STR (“stired tank reactor”), é um tanque de forma cilíndrica, possuindo chicanas com a finalidade de impedir formação de vórtices. A agitação geralmente é realizada através de turbinas de pás planas “flat blade turbine”, devido à alta resistência que fungos apresentam à tensão de cisalhamento, o que não reduz a viabilidade de forma significativa com estes tipos de microorganismos. A relação mais comum entre a altura e diâmetro destes tanques é de 3:1 ou 2:1. (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001)

Para se alcançar alta produtividade, emprega-se muito o uso de sistemas que trabalham a altas concentrações celulares. Isso pode ser realizado através de reciclo de células ou ainda células imobilizadas, chegando até a concentração de 30 g/L de massa seca. SCHMIDELL e FACCIOTTI (2001) citam que em alguns trabalhos, reatores de células imobilizadas foram desenvolvidos para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* de forma contínua.

Segundo STECKELBERG (2001), em processos industriais o problema de contaminação poderia não existir com a aplicação de métodos de esterilização dos meios de cultivo, porém esta prática torna-se inviável devido ao alto gasto de energia necessário.

2.8 FORMAS DE CONDUÇÃO DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os modos de operação de bioreatores são bastante variados, sendo que cada um deles tem grandes efeitos sobre a produtividade de um determinado processo. Nem sempre as fermentações descontínuas em batelada são a melhor forma de se operar o equipamento. Em diversos casos, outras formas tornam-se mais viáveis.

De acordo com SCHMIDELL e FACCIOITI (2001), entre as formas de operação de reatores biológicos, tem-se a descontínua, semi-contínua ou descontínua alimentada. Estas modalidades podem ter recirculação de células ou não. Além destas, a fermentação contínua pode ser realizada, com utilização de um ou vários reatores, com ou sem recirculação de células.

O modo de operação em batelada é de importância na obtenção de dados da cinética do processo. Outros modos de operação são mais interessantes que os em batelada, pois resultam em maior produtividade. Em situações nas quais se exige a manutenção das condições de assepsia por todo o processo, a operação em batelada é preferível. Assim, antes de cada fermentação realizada, o reator é esterilizado com um novo meio e é feita a partir daí uma nova inoculação. O reciclo das células visa reduzir o tempo gasto em certas etapas como de preparação de um inóculo. Neste caso, faz-se a separação das células, geralmente com o auxílio de uma centrífuga, e estas são alimentadas ao reator. A preparação de inóculos a cada fermentação leva a um grande dispêndio de tempo, além de ter excesso de manipulação (SCHMIDELL e FACCIOITI, 2001).

O modo de operação contínuo é bastante interessante, pois possibilita o reciclo de células continuamente, se o fermentador é acoplado a uma centrífuga, membrana ou sedimentador. Se fermentadores são ligados em série, pode-se ainda escolher o equipamento no qual será realizado o reciclo. O meio com produto é mandado para o sistema de purificação. A saída de um reator é a entrada de outro, sendo que cada reator pode trabalhar em uma condição distinta (SCHMIDELL e FACCIOITI, 2001).

2.8.1 Processos em Batelada

Segundo CARVALHO (2001), no modo de operação em batelada, durante o tempo de fermentação, não há entrada de meio no sistema. Pode-se ainda acrescentar anti-espumante, e oxigênio, no caso de reações aeróbias. Se não ocorrer retirada de amostras, ou

evaporação de produto, o volume reacional permanece constante durante todo o tempo. Este tipo de processo apresenta sérias desvantagens, como o tempo gasto para encher, esvaziar e esterilizar o equipamento, porém maior flexibilidade devido ao fato do mesmo equipamento estar disponível para produção de diversos produtos, de acordo com a necessidade. A alta concentração do substrato no início da fermentação pode causar inibição no crescimento do microrganismo e até mesmo repressão, levando a baixos valores de rendimento e produtividade. Assim, parte do substrato adicionado pode produzir de produtos sem interesse.

2.8.2 Processos em Batelada Alimentada “Fed-batch”

Segundo CARVALHO e SATO (2001), este tipo de processo consiste na adição de um ou mais nutrientes no fermentador durante o processo de cultivo e os produtos formados permanecem por todo o tempo de processo. Pode-se realizar o controle da vazão de substrato com a finalidade de manter sua concentração fixa no reator e deslocar o metabolismo microbiano para uma determinada via de interesse, na qual ocorre maior formação de certo produto. Uma vazão de alimentação é estabelecida de forma que no final do processo, seja completado o volume útil do reator.

BAILEY *et al.* (1986) citam que em certos casos a operação em batelada alimentada pode resultar em grandes ganhos na produção, possibilitando o uso de baixas concentrações de substrato e evitando assim a repressão catabólica. Pode permitir o uso de indutores ou precursores de um produto ao longo do processo fermentativo e, ainda, a adição de um componente pode prolongar a fase estacionária, resultando em grandes ganhos, principalmente se o produto de interesse for produzido durante esta fase.

Como em batelada alimentada adicionam-se alguns componentes ao processo, as equações apresentam termo de fluxo, da seguinte forma:

$$\frac{d}{dt}[V_R \cdot c_i] = V_R \cdot r_{fi} + F(t) \cdot c_{if} \quad (2.1)$$

O balanço de massa total no reator, se a densidade do fluido de entrada for igual a do meio presente no mesmo, é representado por:

$$\frac{d}{dt}[\rho \cdot V_R] = \rho \cdot F(t) \quad (2.2)$$

Se durante o processo a densidade não passa por variações significativas, a equação 2.2 torna-se:

$$\frac{dV_R}{dt} = F(t) \quad (2.3)$$

Com a equação 2.3, esta se torna usual para batelada alimentada.

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F(t)}{V_R} [c_{if} - c_i] + r_{fi} \quad (2.4)$$

Uma variação para batelada alimentada, segundo SCHMIDELL e FACCIOTTI (2001), é o modo descontínuo alimentado repetido. Este consiste de uma batelada alimentada no final da qual parte do meio é retirado e um novo meio é alimentado. Nem sempre este processo funciona, sendo que depende do microorganismo, e o mesmo deve ficar ativo por todo o tempo de fermentação. O processo deve ser realizado até que o sistema continue com alta produtividade e sem ocorrência de contaminações.

O modo de operação em batelada alimentada pode ser chamado também de Melle-Boinot, e a concentração de substrato no reator não deve ultrapassar um limite (TOSETTO, 2002).

Segundo ALMEIDA (1960), citado por TOSETTO (2002), entre as vantagens da utilização do processo de Melle-Boinot, estão:

- Menor consumo de substrato, pois a reprodução celular é menor, o que aumenta o rendimento em etanol;
- Separação da levedura por centrifugação, o que ajuda a reduzir as contaminações no vinho;
- Maior pureza na fermentação, sendo que as leveduras são submetidas a tratamento ácido;
- Redução de trabalhos excessivos em processos industriais devido a não necessidade de utilização de cultura pura no pé de cuba.

2.8.3 Processos contínuos

É a forma de operação de fermentação alcoólica que produz melhores resultados, como maior rendimento e produtividade, segundo RODRIGUES *et al.* (1992).

Entre as grandes vantagens do modo contínuo de operação, citadas por FACCIOITI (2001), estão:

- redução de tempos mortos, levando a um aumento na produtividade;
- obtenção de um meio fermentado mais uniforme, o que facilita o projeto do processo de recuperação do produto;
- grande facilidade de utilização de controladores;
- manutenção das células em um mesmo estado, permitindo o estudo de regulação metabólica e otimização de composição de meios de cultivo;
- redução de mão-de-obra empregada no processo.

FACCIOITI (2001) cita que a fermentação alcoólica como exemplo clássico de processos contínuos em escala industrial, pois leva a maiores rendimentos e produtividades quando realizados com reciclo de células ou em sistemas de múltiplos estágios.

Segundo ATALA *et al.* (2001) o processo contínuo permite obter maior rendimento, melhor controle e aumento de produtividade. Esta última pode ser incrementada com uso de sistemas que aumentam a concentração celular, como centrifugação, filtração por membranas e processos que envolvem levedura de floculação, como “settler”.

2.9 BALANÇO DE MASSA

2.9.1 Balanço de massa para processo em batelada

No reator em batelada, considera-se que nada é adicionado ao mesmo durante a fermentação, exceto anti-espumantes, controladores de pH e outros. Concentrações de nutrientes, células e produto variam ao longo do tempo e crescimento microbiano.

Considerando um componente *i* em um reator operando em batelada, a variação do mesmo com o tempo é dada pela derivada que é numericamente igual à taxa de formação do mesmo, como consequência de reações. Isso pode ser escrito da forma apresentada na equação 2.5 (BAILEY *et al.*, 1986):

$$\frac{d}{dt}(V_R \cdot C_i) = V_R \cdot r_{fi} \quad (2.5)$$

V_R é o volume reacional

C_i é a concentração molar do componente i no reator (moles de i/unidade de volume)

r_{fi} é a velocidade de formação do componente i devido a reação (moles/volume.tempo)

Considerando que não há variação significativa de volume no reator durante o processo, sendo que nada é adicionado e a quantidade de amostra retirada é desprezível, assim como a quantidade de gás que deixa o reator, considera-se volume constante, e a equação 2.5 torna-se:

$$\frac{dC_i}{dt} = r_{fi} \quad (2.6)$$

O termo r_{fi} , segundo BAILEY *et al.* (1986), está diretamente ligado às condições do microrganismo utilizado na fermentação e ao estado da população, como morfologia, composição e distribuição de idade das células. Ainda, isto está relacionado aos parâmetros ambientais que influenciam as reações, modificando conseqüentemente as taxas.

Para o modo em batelada, das equações de balanço de massa para células viáveis, mortas, consumo de substrato (ART) e formação de produto, tem-se:

$$\frac{dX_v}{dt} = r_x - r_d \quad (2.7)$$

$$\frac{dX_d}{dt} = r_d \quad (2.8)$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \quad (2.9)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p \quad (2.10)$$

As equações (2.7-2.10) se integradas no tempo dão o comportamento do consumo de substrato, crescimento celular e formação de produto durante toda a fermentação em batelada.

2.9.2 Balanço de massa para processos em batelada alimentada

Segundo WANG (2000), processos de fermentação alcoólica operados em batelada alimentada incluem termos de diluição em seus balanços de massa, sendo representado pelas equações (2.11-2.15).

Balanço de células viáveis

$$\frac{dX_v}{dt} = r_x - r_d - \frac{F}{V} X_v \quad (2.11)$$

Balanço de células mortas

$$\frac{dX_d}{dt} = r_d - \frac{F}{V} X_d \quad (2.12)$$

Balanço de substrato, representado por ART

$$\frac{dS}{dt} = r_s + \frac{F}{V} (S_f - S) \quad (2.13)$$

Balanço de produto

$$\frac{dP}{dt} = r_p - \frac{F}{V} P \quad (2.14)$$

Variação de volume do reator

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (2.15)$$

Os modelos em batelada não são capazes de representar processo em batelada alimentada, já que o fluxo de entrada causa mudanças no comportamento morfológico dos microrganismos (WANG, 2000).

2.10 MODELAGEM DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

2.10.1 Abordagem conceitual para modelos cinéticos

Pelo ponto de vista conceitual, a descrição da fase celular em um modelo pode ser feita com diferentes graus de complexidade. Uma classificação pode ser feita de acordo com o número de componentes usado na representação celular e também com a consideração das células como uma coleção heterogênea de entidades discretas ou como uma espécie de “célula média”, que é quase o mesmo que considerar as células como um

componente em solução. Representações celulares multicomponentes são chamadas estruturadas e representações das células como um único componente são não estruturadas. Considerar as células como heterogêneas e discretas é uma abordagem segregada e considerar propriedades médias das células é uma abordagem não segregada (BAILEY *et al.*, 1986).

De acordo com BAILEY *et al.* (1986), se a heterogeneidade das células não influencia significativamente a cinética, podemos introduzir a simplificação de propriedades médias e usar a abordagem não segregada. Ainda, numa situação denominada de crescimento balanceado, todas as atividades de síntese celular são coordenadas de forma que a composição celular média não é afetada pela proliferação da população. Neste caso, modelos que ignoram a natureza multicomponente das células são adequados (não estruturados). Segundo os autores na maioria das vezes o crescimento da população celular é descrito por modelos não estruturados e não-segregados. Modelos segregados e estruturados oferecem melhor descrição sobre o comportamento cinético, porém com um grande esforço computacional e maior complexidade de lidar com dados experimentais. Em fermentações em batelada, modelos cinéticos devem levar em conta a inibição causada por substrato, produto e células. O último está relacionado com a dificuldade na transferência de oxigênio e substrato no meio, que ocorre em alta densidade celular.

De acordo com PHISALAPHONG *et al.* (2005), a modelagem matemática de processos estabelece uma relação entre parâmetros cinéticos e ambientais, e esta geralmente é representada por um modelo tipo Monod (1942) modificado. Este modelo deve representar a inibição por substrato e produto, já que em linhagens utilizadas em processos industriais, estas apresentam grande efeito no crescimento celular.

A concentração de oxigênio não é expressa nos modelos cinéticos em fermentação alcoólica, pois a mesma não é considerada um fator limitante ao crescimento microbiano (PHISALAPHONG *et al.*, 2005). Os fatores limitantes e inibidores nestes tipos de processos são a concentração de substrato e produto, respectivamente.

2.10.2 Modelos matemáticos

Os modelos matemáticos que descrevem o comportamento de sistemas microbiológicos são aplicados em otimização e controle de processos (WANG, 2000). Segundo o mesmo autor, a estimação de parâmetros cinéticos é útil para diversas áreas da

ciência, bem como engenharia. Em problemas relacionados à área de engenharia bioquímica, é comum a estimação de parâmetros de equações algébricas ou diferenciais não lineares.

2.10.3 Modelos fenomenológicos

Estes modelos são determinados baseados em relações matemáticas que são realizadas entre as variáveis de interesse no estudo, em algumas leis de conservação de massa e energia. Isso dá certa segurança em casos de extrapolações, se comparado com um modelo que é baseado somente em fatos empíricos. Sabe-se que o crescimento celular envolve várias reações complexas, ocorrendo várias regulações. Tendo o conhecimento dos fenômenos metabólicos, constrói-se um modelo matemático que descreve as leis que os regem, como de Michaelis-Menten para reações enzimáticas, e outras.

A construção de modelos fenomenológicos envolve o uso de equações divididas em vários tipos, como de balanço ou conservação de massa, energia, quantidade de movimento, e termodinâmicas e de velocidade, sendo que estas últimas não são gerais como as demais, porém específicas de processos fermentativos, conhecida como modelo cinético (BONONI e SCHIMIDELL, 2001).

2.10.4 Modelos Matemáticos para Fermentação Alcoólica

Existem vários modelos que representam o crescimento microbiano na literatura. O mais simples deles é o de MONOD (1942), que faz uma relação entre velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_x) e substrato:

$$\mu_x = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{(K_s + S)} \quad (2.16)$$

Sendo que $\mu_{\max}$ é a velocidade máxima específica de crescimento e K_s a constante de saturação. Na equação de MONOD (1942), se $S=K_s$, então

$$\mu_x = \frac{\mu_{\max}}{2} \quad (2.17)$$

Ou seja, o K_s é a concentração de substrato quando a velocidade específica de crescimento é a metade da máxima.

No começo da fermentação, onde a concentração de substrato é alta, S é muito maior que K_s, e desta forma, a velocidade específica de crescimento atinge um valor máximo, e este valor perdura durante uma boa fase do processo. Conforme o substrato limitante é consumido, μ se reduz com o tempo.

Mesmo que este valor de velocidade específica máxima de crescimento seja calculado, na prática, este pode não ser alcançado. Os métodos para determinação deste parâmetro estão sujeitos a erros.

Além do modelo de MONOD (1942), que não considera a inibição por substrato e produto, outros citados por BONOMI *et al.* (2001) são apresentados a seguir:

$$\mu_x = \mu_{\max} \cdot \left(1 - e^{-\frac{S}{K_s}} \right) \quad \text{Equação de TEISSIER} \quad (2.18)$$

$$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s \cdot X + S} \quad \text{CONTOIS e FUGIMOTO} \quad (2.19)$$

$$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{(K_s + K_D) + S} \quad \text{POWELL} \quad (2.20)$$

Segundo HISS (2001), em processos em batelada, a ausência de inibição é pouco provável, pois durante o processo os produtos vão se acumulando no meio. Para minimizar este problema, pode-se trabalhar com concentrações baixas de substrato, e conseqüentemente de produtos que se formam durante o processo. Em processos industriais não é interessante trabalhar com baixas concentrações de substrato, pois seria economicamente inviável. Portanto, a inibição não pode ser desconsiderada. A inibição pelo substrato impede o μ de alcançar um valor máximo a altas concentrações de S.

Para corrigir este problema, foi proposto por HISS (2001), um novo modelo que leva em conta um parâmetro para inibição por substrato:

$$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{K_{IS}}{K_{IS} + S} \quad (2.21)$$

Esta equação (2.21) leva em conta somente o substrato agindo como inibidor o que na fermentação alcoólica não é verdade. Assim outras equações são encontradas na literatura.

Se o valor de K_{IS} for muito maior que S , o 3º termo da equação anterior é 1, e a inibição pelo substrato não existe (HISS, 2001).

Entre alguns modelos citados por MOSER (1985), tem-se o seguinte que considera inibição por produto, dada por:

$$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{K_{IP}}{K_{IP} + P} \quad (2.22)$$

Ainda, o modelo de ANDREWS (1968):

$$\mu_x = \frac{\mu_a \cdot S}{K_s + S + \frac{S}{K_i}} \quad (2.23)$$

PIRT (1966) levou em consideração no seu estudo o crescimento com consumo de substrato limitante que é utilizado não só para crescimento celular, mas também para manutenção, que corresponderia ao substrato gasto para realizar funções básicas das células:

$$\mu_s = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu_x + m_x \quad (2.24)$$

Como modelos para metabólito inibitório pode-se citar os de AIBA e SHODA (1969), representados pelas equações 2.25 e 2.26:

$$\mu_x = \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S} \cdot \frac{K_p}{K_p + P} \quad (2.25)$$

$$\mu_p = \frac{\mu'_m \cdot S}{K'_s + S} \cdot \frac{K'_p}{K'_p + P} \quad (2.26)$$

Por AIBA *et al.* (1968):

$$\mu_x = \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S} \cdot e^{-K_p \cdot P} \quad (2.27)$$

$$\mu_p = \frac{\mu'_m \cdot S}{K'_s + S} \cdot e^{-K'_p \cdot P} \quad (2.28)$$

O modelo de GHOSE (1979) é escrito da seguinte forma:

$$\mu_x = \frac{\mu'_m \cdot S}{K'_s + S} \left(1 - \frac{P}{P'_m} \right) \quad (2.29)$$

$$\mu_p = \frac{\mu'_m \cdot S}{K'_s + S} \cdot \left(1 - \frac{P}{P'_m} \right) \quad (2.30)$$

Para o crescimento do microorganismo utilizado na fermentação alcoólica *Saccharomyces cerevisiae*, é conhecido o modelo de SEVELEY (1980), citado por DOURADO *et al.* (1987), que coloca o crescimento específico do microrganismo em função do substrato e produto:

$$\begin{aligned}\mu &= \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + P} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) \\ v_s &= -\frac{v_p}{Y_{ps}} - \frac{\mu}{Y_x} \\ v_p &= \alpha \mu + \beta\end{aligned}\tag{2.33}$$

α representa a produção de produto associada ao crescimento celular, e β associada à massa celular presente. K_s e K_p são parâmetros cinéticos, e Y_{ps} é a taxa de formação de produto em relação ao substrato consumido.

Alguns modelos podem ainda ser mais específicos, levando em conta a inibição pela alta concentração de células.

O modelo de DAGLEY é dado por:

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) (1 - k \cdot p)\tag{2.34}$$

Neste, conforme aumenta a concentração de etanol ocorre redução da velocidade específica de crescimento.

O modelo de LEVENSPIEL é representado por:

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n\tag{2.35}$$

O modelo de LEE *et al.* (1981) é descrito pelas seguintes equações:

$$\mu = \mu_0 \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)^m \quad \text{para o crescimento microbiano}\tag{2.36}$$

$$v_s = -\frac{\mu}{Y_{xs}} \quad \text{para o consumo de substrato}\tag{2.37}$$

$$v_p = \frac{\mu}{Y_{XP}} \quad \text{para a formação de produto} \quad (2.38)$$

Uma equação para crescimento microbiano baseada na proposta por LEVENSPIEL (1980), foi utilizada por SIQUEIRA (1997), ALVES (1996), CARVALHO (1996) e ANDRIETTA (1994) e mais recentemente por ATALA *et al.* (2001), considera a concentração de substrato como inibidor e limitante, e inibição por produto e concentração de biomassa, representado pela equação 2.39.

$$r_x = \mu_{\max} \cdot \exp(-K_i S) \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n X \quad (2.39)$$

2.10.5 Modelos matemáticos para formação de produto

2.10.5.1 Modelos não-estruturados para formação de produto

A representação da formação de produtos pode ser realizada de forma mais simples, segundo BAILEY *et al.* (1986), quando existe uma relação estequiométrica entre produto formado e crescimento microbiano ou consumo de substrato. Nestes casos, pode-se escrever a taxa de formação de produtos da seguinte forma, respectivamente:

$$r_p = -Y_{P/X} r_x \quad (2.40)$$

$$r_p = -Y_{P/S} r_s \quad (2.41)$$

Segundo BAILEY (1986), no caso de fermentação alcoólica em processos em batelada, a formação do produto acontece junto com o crescimento microbiano, sendo esta cinética chamada de associada ao crescimento. Diferente disso, quando o produto de interesse é um metabólito secundário, este começa a se concentrar no meio reacional em um tempo após a fase exponencial de crescimento, na fase estacionária. A produção de etanol segue o primeiro caso, sendo que maior quantidade de produto é formada na fase exponencial de crescimento microbiano, ou seja, a cinética para o produto está associada ao crescimento.

A equação de LEUDEKING-PIRET (1959) apresenta bom ajuste para amplos tipos de fermentações, sendo que leva em conta termos de contribuição associado ou não ao crescimento.

$$r_p = Y_{px} r_x + m_p X \quad (2.42)$$

Na equação 2.42, o primeiro e segundo termos podem ser interpretados como a produção de etanol relacionado ao crescimento microbiano e biomassa existente, respectivamente.

2.10.5.2 Modelos não estruturados para inibição pelo produto

Segundo CLARK (1996), o produto causa a inibição do crescimento celular devido a vários mecanismos, o que acaba reduzindo a taxa de formação dos próprios produtos. Os álcoois como etanol, butanol, propanol e isopropanol são os principais causadores dos efeitos de inibição não-competitiva, que ocorre na região hidrofóbica da membrana plasmática das células. Os álcoois reduzem o potencial da membrana, bem como a saída de prótons da célula, o que diminui o potencial de prótons. Além disso, a inibição pode ocorrer sobre as enzimas presentes nas células, reduzindo então o metabolismo microbiano, o transporte de açúcares e aminoácidos, constituintes de proteínas.

Alguns modelos de inibição pelo produto, citados por CLARK (1996) apresentam as formas a seguir:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \cdot \frac{K_P}{K_P + P} \quad (2.43)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \cdot e^{-K_P P} \quad (2.44)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) \quad (2.45)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^{\beta} \quad (2.46)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{\max}} \right)^\gamma \right) \quad (2.47)$$

Segundo CLARK (1996), as equações 2.43 a 2.47 consideram que o crescimento microbiano quase não é afetado a baixa concentração de etanol, porém quando a concentração de produto se aproxima de um valor máximo, representado por $P_{\max}$, a velocidade específica de crescimento tende a cair de forma bastante rápida, chegando a um valor nulo em $P_{\max}$.

A expressão 2.46 pode ainda ser escrita de forma diferente, expandindo o fator exponencial como uma forma de série de Taylor, considerando que a concentração de produto não alcança valores muito altos e truncando a mesma a partir do primeiro termo da expressão, tem-se:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \cdot (1 - K_p P) \quad (2.48)$$

2.10. 6 Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos para batelada e batelada alimentada estendida, determinados por ATALA (2000) para o processo de fermentação alcoólica estão representados na tabela 2.1. Alguns destes são escritos como uma função de temperatura, como mostra a tabela 2.1:

Tabela 2.1: parâmetros cinéticos determinados por ATALA (2000)

Parâmetros	Batelada	Batelada alimentada estendida
$\mu_{\max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$1,57 \exp\left(\frac{-41,47}{T}\right) - 1,29 \cdot 10^4 \exp\left(\frac{-431,4}{T}\right)$	$1,57 \exp\left(\frac{-41,47}{T}\right) - 1,29 \cdot 10^4 \exp\left(\frac{-431,4}{T}\right)$
$X_{\max} \text{ (g/L)}$	$-0,3279 \cdot T^2 + 18,484 \cdot T - 191,06$	$-0,3279 \cdot T^2 + 18,484 \cdot T - 191,06$
$P_{\max} \text{ (g/L)}$	$-0,4421 \cdot T^2 + 26,41 \cdot T - 279,75$	$-0,4421 \cdot T^2 + 26,41 \cdot T - 279,75$
$Y_X \text{ (g/g)}$	$1,4847 \exp(-0,1005 \cdot T)$	$2,704 \exp(-0,1225 \cdot T)$
$Y_{pX} \text{ (g/g)}$	$-0,0048 \cdot T^2 + 0,8571 \cdot T - 14,292$	$0,2556 \exp(0,1086 \cdot T)$
$K_S \text{ (g/L)}$	4,1	4,1
$K_i \text{ (g/L)}$	0,002	$1,393 \cdot 10^{-4} \exp(0,1004 \cdot T)$
$m_p \text{ (g/(g.h))}$	0,1	0,1
$m_X \text{ (g/(g.h))}$	0,2	0,2
M	1	1
N	1,5	1,5
$K_{dP} \text{ (L/g)}$	-	$7,421 \cdot T^2 - 0,4654 \cdot T + 7,69$
$K_{dT} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	-	$4 \cdot 10^{13} \exp\left(-\frac{41947}{1,987 \cdot (T + 273,15)}\right)$

2.11 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

2.11.1 Planejamento de Plackett e Burman

O planejamento de experimentos é útil na determinação de alguns fatores que influenciam as variáveis de interesse (respostas). Estas podem ser não somente quantitativas, mas também qualitativas (BRUNS *et al.*, 2003).

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado desta modificação na resposta. Isto implica em se realizar ensaios em pelo menos dois níveis deste fator. Um planejamento fatorial em que todos os efeitos são estudados em apenas dois níveis é, portanto, o mais simples de todos. Havendo k fatores, isto é, k variáveis controladas pelo experimentador, o planejamento de dois níveis irá

requerer a realização de 2^k ensaios diferentes, sendo por isso chamado de planejamento fatorial 2^k . A partir da análise do planejamento fatorial completo podem-se obter os efeitos principais de todos os fatores e os efeitos de interação entre eles. Esta tarefa, porém, exige a execução de grandes números de experimentos, sendo que alguns fatores podem não ter influência nas respostas. Assim, torna-se mais prático a realização de uma triagem inicial com o objetivo de determinar os efeitos significativos realizando poucos experimentos (BRUNS *et al.*, 2003).

Segundo KALIL *et al* (2000), o planejamento de Plackett Burman é bastante útil na seleção de fatores de interesse contidos em uma grande lista de candidatos. A metodologia considera que os efeitos principais possuem importância muito maior que os de interação entre 2 fatores, assim, os efeitos principais e de interação tendem a se misturar.

Ainda, segundo HAALAND (1989), citado por KALIL *et al.* (2000), o número de ensaios necessários requeridos para aplicação do planejamento de Plackett Burman é menor que para um planejamento fatorial completo.

Quando o número de fatores aumenta, o número de efeitos de interação entre os diferentes fatores aumenta drasticamente. Muitas vezes esses efeitos têm valores baixos e não são muito importantes na resposta desejada. Como na analogia da expansão em série de uma função, os efeitos principais são maiores do que as interações de dois fatores, que acabam sendo maiores que os outros. Isso ocorre principalmente com efeitos de ordem mais elevada. Como esses efeitos em geral não são significativos, não há necessidade de fazer todos os ensaios de um planejamento completo só para determiná-los. Nos planejamentos fatoriais fracionários, então, alguns efeitos de interação são desconsiderados, de forma que os efeitos principais possam ser calculados com um número menor de experimentos. (BRUNS *et al.*, 2003)

Através dos planejamentos fatoriais fracionários, podem-se estudar muitos fatores com poucos ensaios. Isso, é claro, tem um limite, e dado um certo número de ensaios (N), existe um número máximo de fatores (k) que podem ser estudados, que é igual ao número de ensaios menos um. Quando este limite é alcançado, dizemos que o planejamento está saturado (BRUNS *et al.*, 2003).

Segundo MONTGOMERY (1983), uma classe importante de planejamentos saturados são os planejamentos de Plackett e Burman. Estes são planejamentos ortogonais saturados para casos em que $k+1$ é um múltiplo de quatro. As matrizes de planejamento para $k+1 = 4, 8, 12, 16, 20 \dots 100$ estão listadas em PLACKETT e BURMAN (1946).

Na verdade, somente as primeiras linhas das matrizes são listadas, já que o restante das linhas pode ser gerado a partir destas.

O planejamento fatorial fracionário é bastante útil quando se deseja verificar entre muitas variáveis, as que têm influência no processo, podendo assim excluir as que têm pouco ou nenhum efeito nas respostas. (MONTGOMERY, 1983)

BRUNS *et al.* (2003) recomendam que o número de fatores reais num planejamento de Plackett e Burman não ultrapasse o número de ensaios menos quatro (N-4). Desta forma as colunas não usadas podem fazer o papel de variáveis inertes, sendo aplicadas no cálculo dos erros.

O planejamento de PLACKETT e BURMAN (1946) pode ser usado na determinação dos parâmetros cinéticos de um modelo que mais influenciam nas variáveis de estado. Assim, poderíamos re-estimar apenas os parâmetros mais sensíveis para atualizar o modelo, sendo os outros fixos. Os fatores são os parâmetros cinéticos, tendo como respostas as concentrações de biomassa, substrato e etanol produzido.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O microrganismo utilizado foi *Sacchamomyces cerevisiae* cultivado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, e obtido de uma planta industrial.

O meio utilizado para ativação do microrganismo apresenta a composição mostrada na tabela 3.1.

Tabela 3.1: composição do meio de ativação para cultivo de *S. cerevisiae*.

Composto	Concentração (Kg/m ³)
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3
Peptona	5
Glicose	10

Para o preparo do meio semi-sólido para ativação da levedura, foi adicionado ao meio apresentado na tabela 3.1, 20 Kg/m³ de ágar-ágar.

O meio de crescimento para o inóculo tem a composição apresentada na tabela 3.2 a seguir:

Tabela 3.2: composição do meio de crescimento utilizado para inóculo.

Composto	Concentração (Kg/m ³)
Sacarose	20
Extrato de levedura	5
K ₂ HPO ₄	5
NH ₄ Cl	1,5
KCl	1,15
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,65

O pH do meio de crescimento foi ajustado para 6,8 utilizando reagente HCl. O crescimento dos microrganismos foi realizado em erlenmeyers aletados, mantidos em agitação por 24 horas a 150 rpm e 30 °C em shaker.

O meio de produção utilizado foi melão de cana de açúcar diluído, com 77 % de pureza, cuja composição é apresentada na tabela 3.3. Não se acrescentou nenhum componente adicional ao melão diluído, com o objetivo de representar condições de fermentação mais próximas das utilizadas em processos industriais no Brasil.

Tabela 3.3: composição do melão original utilizado na definição do modelo (a 200 g/L)

Componente/ Propriedade	Resultados analíticos
Carbono	6,0 % m/m
Nitrogênio	< 0,5 % m/m
Fenóis totais	87,5 mg/Kg
Ferro	< 0,020 % m/m
Magnésio	0,024 % m/m
Potássio	0,313 % m/m
Zinco	16 mg/Kg
Pureza	77 %
pH	6,12

A esterilização do meio juntamente com o leitor de pH e reator foi realizada através de vapor saturado a 121 ° C por 20 minutos em autoclave marca PHOENIX. A câmara de fluxo laminar teve suas superfícies esterilizadas através de álcool etílico 70° GL e radiação ultravioleta por 30 minutos, antes de toda manipulação de material na mesma.

Primeiramente fez-se a ativação da *Saccharomyces cerevisiae* da cultura estoque transferindo-a para um tubo de ensaio contendo meio (composição descrita na Tabela 3.1) com ágar inclinado, sendo este mantido a 30° C por 24 horas em uma incubadora. Após este período, transferiu-se parte da levedura, no interior de câmara de fluxo laminar, para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio sintético (descrito na Tabela 3.1), mantendo as mesmas condições de temperatura e tempo de cultivo. Na próxima etapa, fez-se o repique do microrganismo para um meio sintético (descrito na Tabela 3.2) contido em erlenmeyer

aletado. Colocou-se em um shaker por mais 24 horas a 30°C em agitação de 150 rpm. Após o período, verteu-se o conteúdo do inóculo para um erlenmeyer de volume maior, totalizando 600 mL contendo meio industrial. Os passos para preparação do inóculo são apresentados na figura 3.1.

Após a fase de preparação, transferiu-se o meio contendo microrganismos para um inoculador previamente esterilizado e, através deste as células foram adicionadas ao fermentador.

O tamanho do inóculo foi em torno de 10 % em relação ao volume total de meio reacional com a finalidade de reduzir a fase “lag” de crescimento durante o início do processo.

A fermentação foi conduzida utilizando 5L de melaço diluído, com 77% de pureza e com concentração inicial de substrato definida na tabela 3.4. A esterilização da cuba de vidro do reator foi feita em autoclave juntamente com o meio.

Previamente à fermentação, retirou-se uma amostra do meio sem inóculo e posteriormente iniciou-se o processo pelo acréscimo do microrganismo, passando a um intervalo de amostragem a aproximadamente cada 2 horas através de um amostrador manual, e depois as alíquotas foram congeladas para análise.

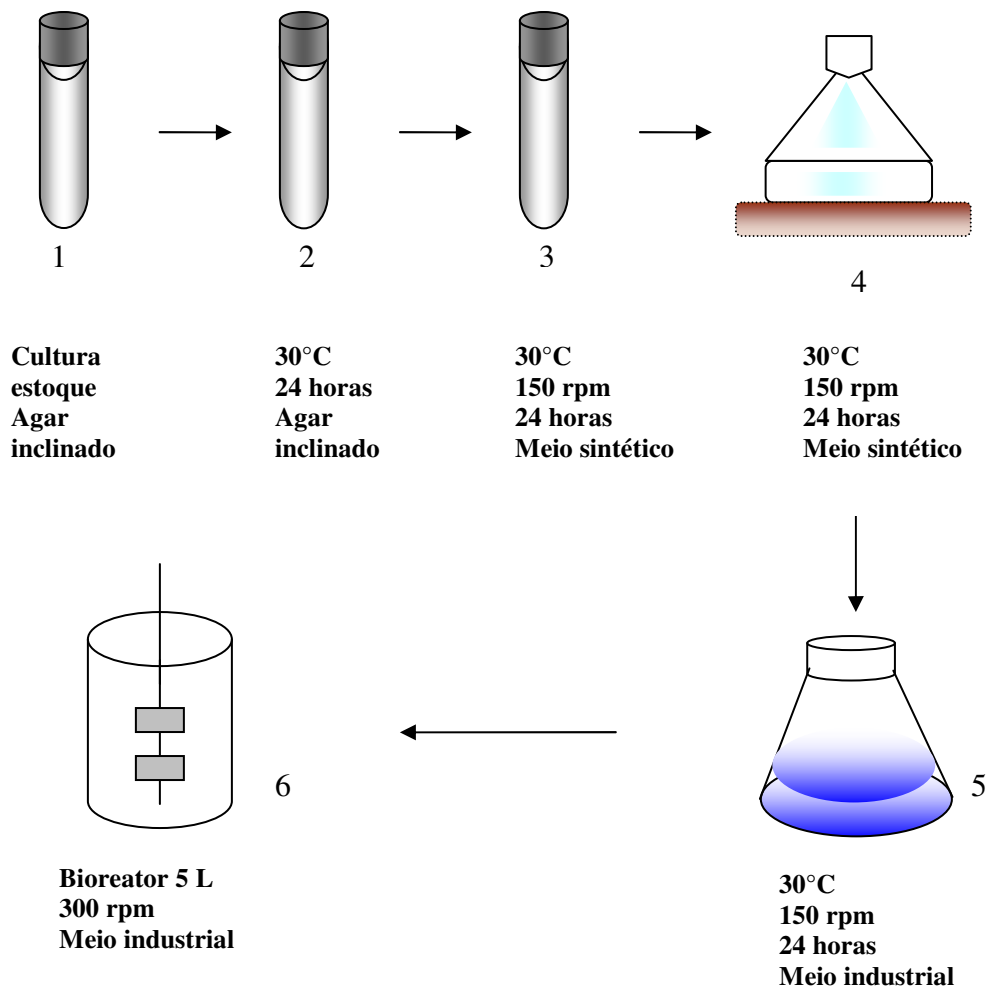
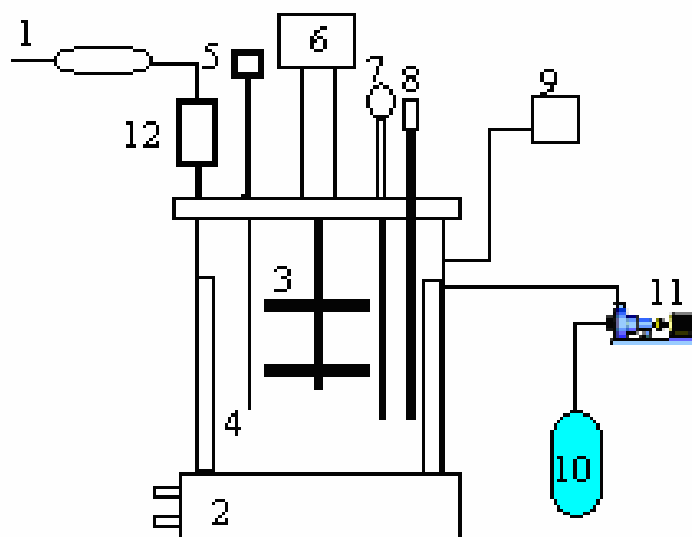


Figura 3.1: Esquema das etapas de preparo do inóculo para a fermentação.

3.1.1 Fermentador

A fermentação ocorreu em um Fermentador Bioflo III - New Brunswick Scientific Co., Inc., apresentado nas Figuras 3.2 e 3.3, com volume de trabalho de 5 L. Foram realizadas fermentações em um tanque agitado em batelada com controle de temperatura e agitação, fixada em 300 rpm, com sistema do tipo turbina de pás planas. O bioreator possui controle de temperatura por recirculação de água na parte externa da cuba encamisada. O sistema ainda possuía medidores on-line de vazão de CO₂, pH e turbidez.



- 1 – filtro de lã de vidro na saída de CO₂
- 2 – camisa de resfriamento
- 3 – agitador tipo turbina de 6 pás planas
- 4 – chicanas
- 5 – termopar
- 6 – motor do agitador
- 7 – eletrodo de pH
- 8 – turbidímetro
- 9 – inoculador
- 10 – reservatório de meio industrial (para o processo em batelada alimentada)
- 11 – bomba peristáltica (batelada alimentada)
- 12 – condensador

Figura 3.2: Esquema do sistema de fermentação.

A temperatura foi mantida constante durante todo o tempo para cada experimento. As temperaturas e concentrações de substrato inicial em cada experimento estão mostradas na tabela 3.4.

Tabela 3.4. Concentração inicial de substrato e temperatura para os experimentos.

Experimento	T (°C)	S ₀ (Kg/m ³)	Experimento	T (°C)	S ₀ (Kg/m ³)
1	30,0	127,618	5	36,8	84,611
2	34,0	168,115	6	38,0	118,813
3	34,0	119,093			
4	31,2	86,810			

Os experimentos de 1 a 5, representados na tabela 3.4 foram utilizados para obtenção dos parâmetros cinéticos do modelo como função da temperatura. A validação do modelo foi feita com o experimento 2.



Figura 3.3 - Fermentador Bioflo III.

3.2 Métodos Analíticos

A medida de concentração dos microrganismos foi feita por gravimetria (peso seco), e as concentrações de etanol, sacarose, glicose, frutose e glicerol foram determinadas por sistema de cromatografia líquida (HPLC) marca Varian. As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 3300 rpm em temperatura ambiente através de uma centrífuga Modelo NT 810 (Nova Técnica) a 3300 rpm por 15 minutos.

Separou-se o sobrenadante para análise de açúcares redutores, glicerol e etanol e o precipitado para determinação de massa seca, como descritos nas seções a seguir.

3.2.1 Determinação de Concentração de Substâncias Redutoras Totais, Etanol e Glicerol.

O sobrenadante resultante da centrifugação do meio reacional foi diluído, filtrado com membrana microporo de éster de celulose (diâmetro de poro de 0,22 μm) e colocado em “vials” para injeção automática para análise de açúcares redutores totais, etanol e glicerol.

O cromatógrafo líquido modelo Varian 9010 (HPLC- “high performance liquid chromatography”), foi operado através do uso de uma fase móvel, sendo uma solução de H_2SO_4 com pH de 1,4; preparada com água ultra-pura (Milli-Q), cuja vazão pela coluna foi de 0,7 mL/min. Para estabilização da mesma, esperou-se aproximadamente 12 horas antes da injeção das amostras. A figura 3.4 mostra o sistema HPLC acoplado a um computador para a coleta de dados das análises.

A coluna para separação dos componentes foi Aminex HPX 87-H (coluna de exclusão iônica), mantida em um forno com circulação de ar e temperatura controlada a 30 °C. Utilizou-se um detector de índice de refração a temperatura de 40 °C.



- 1 – Sistema de distribuição de solvente.
- 2 – Injetor automático de amostras tipo carrossel.
- 3 – Coluna cromatográfica com forno.
- 4 – Sistema de leitura de absorvância.
- 5 – Detector de índice de refração.
- 6 – Computador com software Millenium para quantificação.

Figura 3.4: Foto de equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Varian modelo 9010, utilizado nas análises.

A preparação da solução padrão foi feita com uma mistura de glicose, sacarose, frutose, glicerol e etanol, e a curva de calibração utilizada apresentava coeficiente de correlação em torno de 0,98, alcançado através do uso de um diluidor de alta precisão. A faixa de concentração da curva padrão utilizada foi de 0,1 a 40 Kg/m³.

3.2.2 Determinação de Concentração de Células Totais

A análise gravimétrica de peso seco foi realizada após centrifugação da amostra e lavagem do precipitado por 2 vezes com água destilada e transferência do material sólido para tubos de ensaio previamente tarados. Fez-se a medida de massa até obter peso constante. A secagem do precipitado foi feita em uma estufa com circulação de ar e temperatura mantida a 70° C. Para análise gravimétrica, fez-se uso de balança analítica.

O cálculo da concentração celular foi realizado pela equação 3.1:

$$\text{Concentração de biomassa} = (\text{Massa}_{\text{tubo+ material celular}} - \text{Massa}_{\text{tubo vazio}}) / \text{volume do líquido centrifugado.} \quad (3.1)$$

3.2.3 Determinação de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada através da técnica de redução do azul de metileno, citada por YOSHIDA *et al* (1999). Este método baseia-se no fato das células viáveis reduzirem o corante azul de metileno a azul leucometileno, tornando-se incolores, sendo que as células não viáveis não apresentam esta capacidade, e continuam azuis quando observadas no microscópio. A viabilidade foi calculada pela equação 3.2:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{número de células viáveis (brancas)} / \text{número de células totais}) * 100 \quad (3.2)$$

Durante processos em batelada, a viabilidade geralmente é próxima de 100 %, devido ao tempo de fermentação relativamente curto.

3.3 Métodos Matemáticos

3.3.1 Algoritmo de otimização para o cálculo dos parâmetros cinéticos e simulação do processo.

Todo o trabalho computacional foi realizado em um processador AMD Athlon 2,4 Ghz com 256 Mb de memória RAM e HD de 40 Gigabytes.

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos do modelo foi aplicado o algoritmo Quasi-Newton de otimização, utilizando o software COMPAQ VISUAL FORTRAN versão 6.6.

O software Microcal Origin 6.0 foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais a uma expressão sigmoidal, de forma com que a função obtida e seus parâmetros fossem utilizados no FORTRAN para representação dos dados experimentais. Assim, os valores obtidos pelo modelo cinético eram comparados com os da curva sigmoidal e minimizados através do programa de otimização. Desta forma, os parâmetros cinéticos ótimos para cada temperatura eram os que forneciam um valor mínimo para a equação 3.4.

Através do Microcal Origin 6.0, ajustou-se uma expressão dupla exponencial do tipo Arrhenius aos parâmetros cinéticos otimizados em função das temperaturas nas quais os mesmos foram obtidos, representada pela equação 3.3:

$$\text{parâmetros dependentes da temperatura} = A \exp(B/T) + C \exp(D/T) \quad (3.3)$$

O termo θ na equação 3.4 é o vetor que contém os parâmetros dependentes da temperatura do modelo cinético. O problema de otimização consiste em encontrar um valor da variável θ que minimiza a função $E(\theta)$, representada pela equação 3.4.

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[\frac{(X_n - Xe_n)^2}{Xe_{\max}^2} + \frac{(S_n - Se_n)^2}{Se_{\max}^2} + \frac{(P_n - Pe_n)^2}{Pe_{\max}^2} \right] = \sum_{n=1}^{np} \varepsilon_n(\theta) \quad (3.4)$$

Para a otimização pelo método de Quasi-Newton, citado por RIVERA *et al.* (2006) e WANG (2000), os valores de Xe_n , Se_n e Pe_n são dados experimentais de concentração nos tempos de amostragem, representados por n , e X_n , S_n e P_n , os valores de concentração calculados pelo modelo nos tempos de amostragem. A variável np representa o número de amostras colhidas em cada experimento, e os subscritos Max correspondem à maior concentração para cada variável, X, S e P, medidas experimentalmente.

A partir dos valores calculados dos parâmetros para o modelo utilizado por ATALA *et al.* (2001), (equações 2.24, 2.39 e 2.42), e integração das equações 2.7, 2.9 e 2.10, traçou-se os perfis de concentrações de substrato, representado por ART, biomassa e produto durante o tempo de fermentação. Para se integrar as equações 2.7, 2.9 e 2.10, utilizou-se o método de Runge Kutta de 4ª ordem, contido na biblioteca IMSL rotina DBCONF do software FORTRAN. Os parâmetros otimizados e o modelo escolhido foram aplicados para traçar os perfis da fermentação como função do tempo.

Um problema de programação não linear pode ser escrito como:

Minimizar a equação 3.4

Sujeito as condições $l_p \leq x_p \leq u_p, p=1, \dots, 5$,

sendo que x_p é cada um dos parâmetros dependentes da temperatura, e l_p e u_p são os valores mínimo e máximo para cada uma destas variáveis, respectivamente.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para ensaios em batelada nas devidas condições iniciais de substrato e temperatura, chegou-se em perfis de concentração celular, etanol, glicerol e ART, apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Dados experimentais da fermentação em batelada a 30,0 ° C e $S_0 = 127,62$ g/L (experimento 1 da tabela 3.4).

<i>t (h)</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>	<i>Etanol (g/L)</i>	<i>Glicerol (g/L)</i>	<i>ART (g/L)</i>	<i>Glicose (g/L)</i>	<i>Frutose (g/L)</i>
0	1,17	3,192	0,000	127,618	30,588	16,440
2	1,31	3,120	0,000	122,927	50,340	43,128
4	1,89	4,248	0,000	111,727	49,908	49,320
6	2,73	9,942	1,560	91,049	38,472	47,424
8	3,42	15,156	2,838	77,892	31,056	46,836
10	4,55	14,784	3,276	61,512	21,744	39,768
12	5,29	21,174	4,194	52,218	15,828	36,390
14	5,50	22,698	3,366	31,608	7,836	23,772
16	6,02	26,382	5,220	29,832	5,670	24,162
18	6,15	28,542	5,472	17,688	0,000	17,688
20	6,26	29,718	5,568	9,942	0,000	9,942
24	6,30	42,243	7,566	0,000	0,000	0,000

Na tabela 4.1, foi detectada a presença de etanol no meio desde o primeiro instante de fermentação. Esta quantidade foi proveniente da transferência do inóculo, o qual contém o produto, para o biorreator.

O melaço utilizado apresentava grande quantidade de glicose e frutose na sua composição no início, sendo que neste caso a taxa de consumo pela levedura é maior que para meios mais ricos em sacarose.

O fenômeno da diauxia trata-se do consumo preferencial de um substrato em relação aos demais. Isto foi observado claramente na tabela 4.1, sendo que a glicose é preferencial pelo microrganismo em relação à frutose, que por sua vez leva mais tempo para ser metabolizada.

Tabela 4.2: Dados experimentais da fermentação em batelada a 34,0° C e $S_0 = 168,115$ g/L (experimento 2 da tabela 3.4).

<i>t (h)</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>	<i>Etanol (g/L)</i>	<i>Glicerol (g/L)</i>	<i>ART (g/L)</i>	<i>Glicose (g/L)</i>	<i>Frutose (g/L)</i>
0,00	0,45	3,780	0	168,115	32,964	7,236
2,00	0,23	6,252	0	170,215	29,964	6,036
4,00	0,35	4,668	0	166,750	31,644	8,892
6,00	0,78	6,042	1,716	154,199	29,334	12,114
8,00	1,35	8,976	2,046	140,702	23,394	10,662
9,98	2,05	12,726	2,484	121,637	25,464	17,574
12,00	3,85	27,630	3,936	109,310	29,454	29,796
14,00	3,99	34,716	4,482	94,962	27,216	32,724
16,00	4,99	45,060	5,262	72,954	21,144	33,534
18,00	5,24	52,218	5,97	50,346	17,004	33,342
20,00	5,99	57,402	6,732	41,964	11,904	30,06
22,00	6,46	67,914	7,206	30,186	6,672	23,514
24,48	5,95	71,508	7,308	17,928	0	17,928
26	6,18	79,872	7,812	8,586	0	8,586
27,15	5,93	78,366	8,46	0	0	0
30	6,24	76,008	8,229	0	0	0

Na tabela 4.2, trabalhou-se com uma concentração muito baixa de células no início da fermentação, o que fez com que a concentração de sacarose se tornasse alta durante um

longo período do processo, pois a concentração de enzima invertase no meio provavelmente era baixa. Em cultivos a altas concentrações de células, a inversão total da sacarose ocorre de forma muito rápida, sendo que a mesma torna-se presente somente nas primeiras horas.

Tabela 4.3: Dados experimentais da fermentação em batelada a 34,0° C e $S_0 = 119,093$ g/L (experimento 3 da tabela 3.4).

<i>t (h)</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>	<i>Etanol (g/L)</i>	<i>Glicerol (g/L)</i>	<i>ART (g/L)</i>	<i>Glicose (g/L)</i>	<i>Frutose (g/L)</i>
0,00	0,70	3,900	0,000	119,093	51,192	41,844
0,75	0,71	6,156	0,000	118,840	51,204	41,844
2,00	0,76	6,936	0,000	104,826	53,172	51,654
4,10	2,00	12,804	1,884	93,690	43,764	49,926
5,18	2,70	17,958	2,478	86,232	37,494	48,738
6,00	3,50	21,894	3,006	75,150	30,870	44,280
8,00	4,27	32,016	4,164	61,680	21,510	40,170
10,00	4,32	36,444	4,344	42,276	12,054	30,222
13,00	5,08	46,128	5,166	20,940	3,726	17,214
14,15	5,32	52,338	5,850	12,360	0,000	12,360
16,00	5,74	52,152	6,510	3,669	0,000	3,669
17,67	4,89	54,909	6,798	0,000	0,000	0,000
19,67	4,94	53,100	6,516	0,000	0,000	0,000

Tabela 4.4: Dados experimentais da fermentação em batelada a 31,2° C e $S_0 = 86,810$ g/L (experimento 4 da tabela 3.4).

<i>t (h)</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>	<i>Etanol (g/L)</i>	<i>Glicerol (g/L)</i>	<i>ART (g/L)</i>	<i>Glicose (g/L)</i>	<i>Frutose (g/L)</i>
0,00	0,40	3,708	0,000	86,810	26,832	14,328
2,08	0,59	4,656	0,000	83,467	27,588	16,920
2,95	0,60	5,460	0,000	84,832	28,800	18,900
4,25	0,98	7,470	0,600	81,083	29,028	24,732
4,95	1,05	6,984	0,468	70,072	25,224	22,458
6,95	1,42	12,708	1,260	66,474	21,792	23,766
8,95	2,62	19,638	2,202	55,934	16,128	22,632
10,95	3,07	23,760	2,496	39,733	8,946	15,138
12,95	3,26	27,966	2,832	27,863	6,036	10,002
14,95	3,14	32,808	3,516	19,499	4,908	5,550
17,05	3,81	32,658	3,684	12,687	4,062	3,528
18,95	4,04	36,000	4,761	5,355	2,511	2,844
20,95	4,00	40,959	5,127	1,212	0,000	1,212
21,57	3,98	39,882	4,761	0,000	0,000	0,000

Tabela 4.5: Dados experimentais da fermentação em batelada a 36,8° C e $S_0 = 84,611$ g/L (experimento 5 da tabela 3.4).

<i>t (h)</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>	<i>Etanol (g/L)</i>	<i>Glicerol (g/L)</i>	<i>ART (g/L)</i>	<i>Glicose (g/L)</i>	<i>Frutose (g/L)</i>
0,00	0,29	4,836	0	84,611	27,408	15,144
1,75	0,41	6,000	0	76,464	26,508	16,692
4,00	0,75	8,778	0,408	73,246	26,214	23,262
6,00	1,09	13,674	0,906	58,644	19,524	22,104
8,00	2,15	15,618	0,858	34,250	9,840	14,538
10,00	2,37	24,600	0,954	32,047	7,692	15,144
12,00	2,92	32,598	2,646	10,146	0,000	10,146
13,92	3,12	37,284	3,000	4,200	0,000	4,200
16,17	3,34	36,327	3,804	1,449	0,000	1,449
17,83	3,35	36,438	3,807	0,000	0,000	0,000

Tabela 4.6: Dados experimentais da fermentação em batelada a 38,0° C e $S_0 = 118,813$ g/L (experimento 6 da tabela 3.4).

<i>t (h)</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>	<i>Etanol (g/L)</i>	<i>Glicerol (g/L)</i>	<i>ART (g/L)</i>	<i>Glicose (g/L)</i>	<i>Frutose (g/L)</i>
0,00	1,01	5,028	0,000	118,813	59,520	49,452
1,00	0,81	5,616	0,000	120,152	59,856	51,312
3,12	1,51	9,504	0,000	104,189	50,382	50,562
5,87	3,12	20,130	3,042	80,664	35,232	45,432
7,00	3,34	23,514	3,150	68,184	27,564	40,620
9,00	4,02	31,110	3,672	54,198	19,200	34,998
11,00	3,94	34,500	3,768	39,450	11,574	27,876
12,77	4,25	43,374	4,464	30,246	7,512	22,734
15,00	4,69	48,594	4,980	14,880	0,000	14,880
17,03	4,59	50,040	5,739	7,335	0,000	7,335
19,00	4,58	52,200	5,691	0,000	0,000	0,000

Para ajuste dos parâmetros cinéticos foram utilizados os 5 experimentos apresentados na tabela 3.4. Nesta etapa todos os ensaios foram realizados com a mesma linhagem de levedura e matéria-prima (melaço diluído) retirada de um mesmo lote, tendo, portanto a mesma composição. A diferença entre estes experimentos foi somente a concentração inicial de melaço e temperatura do sistema reacional, definidos pela tabela 3.4.

O modelo matemático computado consiste no sistema de equações (2.7, 2.9, 2.10, 2.24, 2.39 e 2.42). O ajuste de parâmetros através do algoritmo de otimização por Quasi-Newton e posterior simulação, permite obter perfis de substrato (ART), células e etanol que visam bom ajuste aos dados experimentais. Resultados de boa qualidade são obtidos quando os parâmetros escolhidos para o modelo minimizam a função objetivo, representada pela equação 3.4.

Através deste método, descrito anteriormente, obteve-se os valores dos 11 parâmetros, apresentados na tabela 4.7 para diferentes temperaturas de processo. Os parâmetros dependentes da temperatura $\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x and Y_{px} foram determinados para cada temperatura. Por sua vez, os parâmetros não dependentes foram fixados conforme um trabalho anterior (ATALA *et al.*, 2001), como segue: $K_s = 4,1$ (Kg/m³), $m_p = 0,1$, $m_x = 0,2$, $m = 1,0$ and $n = 1,5$. O valor de k_i foi baseado no obtido pelo mesmo autor ($k_i=0,002$ Kg/m³), porém nesta modelagem foi fixado em $0,004$ Kg/m³ por ajustar aos dados experimentais de forma mais apropriada para o melaço no qual se trabalhou.

Tabela 4.7: parâmetros cinéticos otimizados através do método Quasi-Newton para temperaturas distintas.

Parâmetros	Temperatura (°C)				
	30,00	31,20	34,00	36,80	38,00
$\mu_{\max} (h^{-1})$	0,224	0,275	0,390	0,377	0,300
$X_{\max} (Kg/m^3)$	79,9367	54,000	43,000	38,000	37,000
$P_{\max} (Kg/m^3)$	129,915	79,990	75,000	76,000	78,000
Y_{px}	3,967	8,551	9,932	9,957	10,200
Y_x	0,045	0,044	0,039	0,037	0,036
$K_s (Kg/m^3)$	4,100	4,100	4,100	4,100	4,100
$K_i (Kg/m^3)$	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
m_x	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
m	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
n	1,500	1,500	1,500	1,500	1,500
m_p	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100

Os parâmetros dependentes da temperatura foram ajustados por funções do tipo Arrhenius (equação 3.3), com dupla exponencial e 4 constantes, A, B, C e D. O algoritmo de Levenberg–Marquardt (LM) foi utilizado com este propósito, através do Software MICROCAL ORIGIN versão 6.0 Os resultados são apresentados na tabela 4.8.

Tabela 4.8: Valores das constantes da equação 3.3 e coeficiente de determinação (r^2) de ajuste de parâmetros como funções de temperaturas para modelo em batelada, otimizado pelo método Quasi-Newton.

Param.	(r^2)	A	B	C	D
$\mu_{\max}$	0,999	-297871,000	-304,442	281511,800	-302,181
$X_{\max}$	0,999	7,200E-18	1284,402	10,236	48,577
$P_{\max}$	0,999	6,010E-22	1588,051	106,327	-12,017
Y_x	0,999	-2,980E-17	1194,149	11,730	-5,600
Y_{px}	0,997	-4,100E-78	5111,339	0,014	33,718

Pode-se observar que o coeficiente de determinação foi alto para todos os ajustes, sendo o valor mínimo de 0,997 para o Y_{px} . A qualidade deste ajuste é muito importante para utilização do modelo em simulações, pois alguns parâmetros podem ser muito significativos nos perfis da fermentação, e assim, pequenos desvios nesses valores poderiam levar a grande erro na predição de dados experimentais pelo modelo.

Com os valores de A, B, C e D da tabela 4.8, traçou-se os perfis de parâmetros μ_{max} , X_{max} , P_{max} , Y_x and Y_{px} , em função da temperatura, como apresentados nas figuras (4.1 a 4.5).

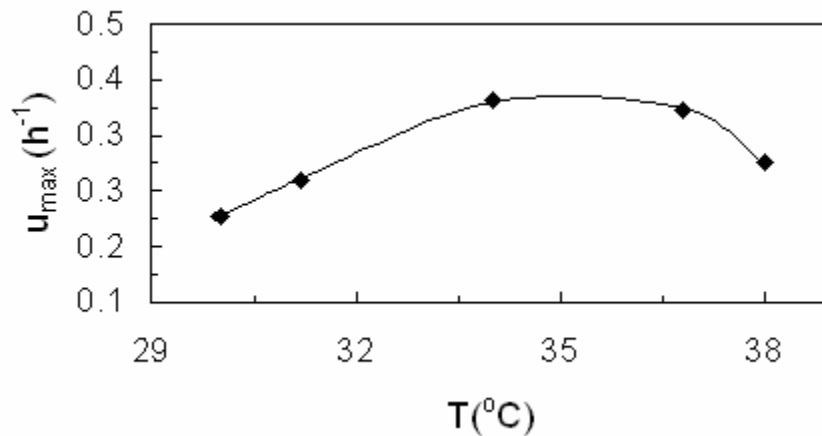


Figura 4.1: Dependência de μ_{max} , com temperatura. O símbolo (♦) representa os valores otimizados para cada temperatura usando o algoritmo Quasi-Newton e as linhas a descrição pela equação de Arrhenius.

Em processos industriais, o valor de μ_{max} é útil na comparação do desempenho de uma cepa em relação à outra, e o valor desejável é que este parâmetro fique em torno de 0,50 (L/h), sendo então a linhagem considerada satisfatória para a fermentação (STECKELBERG, 2001).

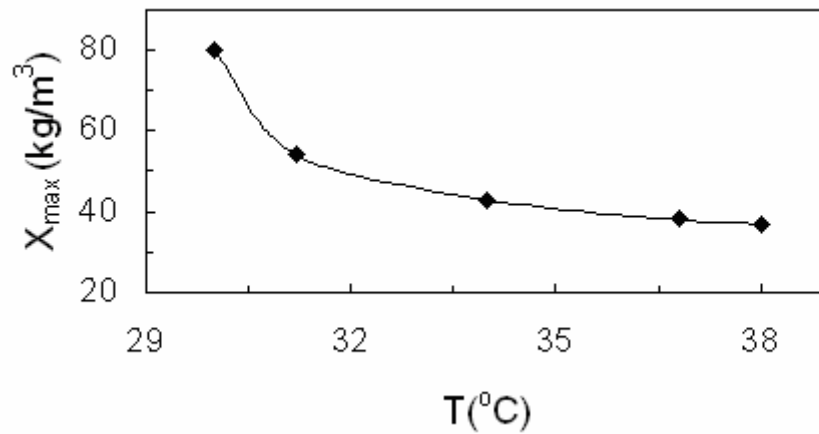


Figura 4.2: Dependência de $X_{\max}$ com temperatura. O símbolo (♦) representa os valores otimizados para cada temperatura usando o algoritmo Quasi-Newton e as linhas a descrição pela equação de Arrhenius.

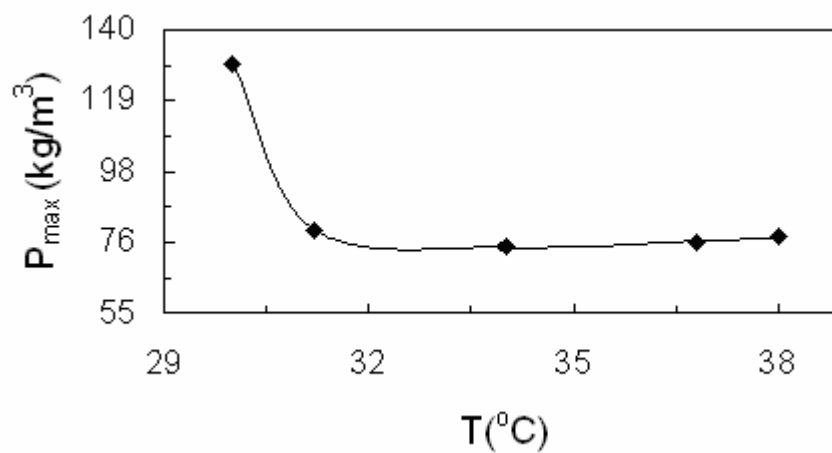


Figura 4.3: Dependência de $P_{\max}$ com temperatura. O símbolo (♦) representa os valores otimizados para cada temperatura usando o algoritmo Quasi-Newton e as linhas a descrição pela equação de Arrhenius.

O valor de $P_{\max}$ apresentou um valor bastante alto abaixo de 32°C, mostrando não existir muita inibição pelo produto a baixas temperaturas, porém acima deste valor, a levedura passa a ter uma taxa de formação mais baixa com a presença de etanol no meio.

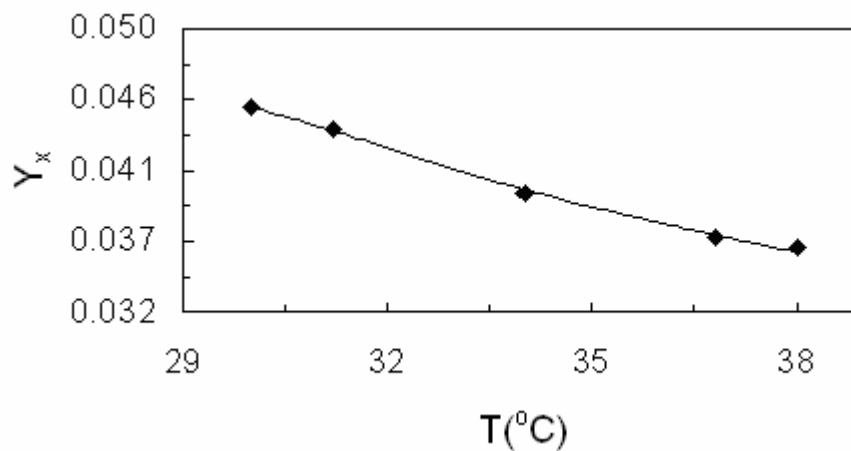


Figura 4.4: Dependência de Y_x , com temperatura. O símbolo (♦) representa os valores otimizados para cada temperatura usando o algoritmo Quasi-Newton e as linhas a descrição pela equação de Arrhenius.

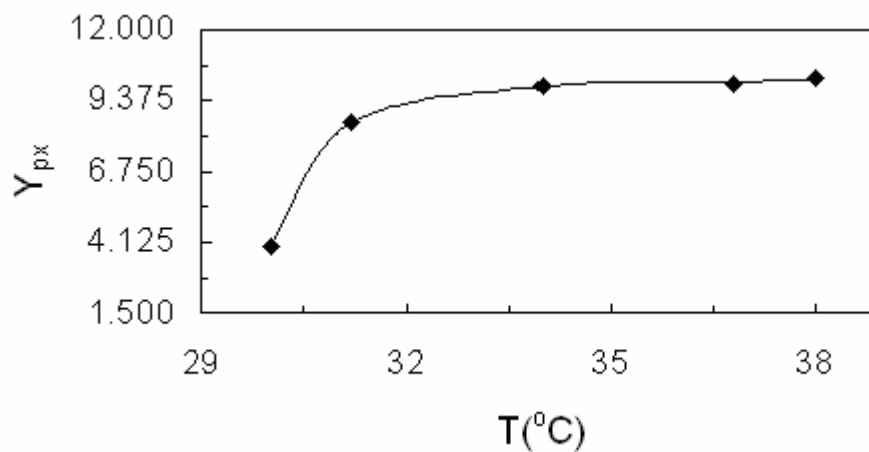


Figura 4.5: Dependência de Y_{px} com temperatura. O símbolo (♦) representa os valores otimizados para cada temperatura usando o algoritmo Quasi-Newton e as linhas a descrição pela equação de Arrhenius.

Pelo parâmetro Y_{px} , em temperaturas acima de 32°C, a levedura passa a produzir muito mais etanol em relação à biomassa existente, sendo que abaixo desse valor, o metabolismo é desviado para a produção de biomassa.

Pode-se observar que o modelo com os 11 parâmetros cinéticos ajustados representa bem os dados experimentais para substrato, biomassa e produto, como pode ser visto nas figuras de 4.6 a 4.10.

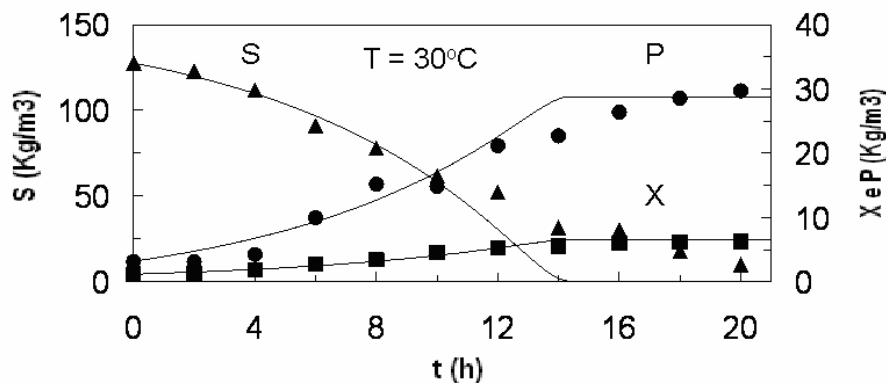


Figura 4.6: Dados experimentais e simulados (QN —) para 30,0 °C. Dados experimentais são para concentração de substrato, S(▲); biomassa, X(■) e etanol, P(●).

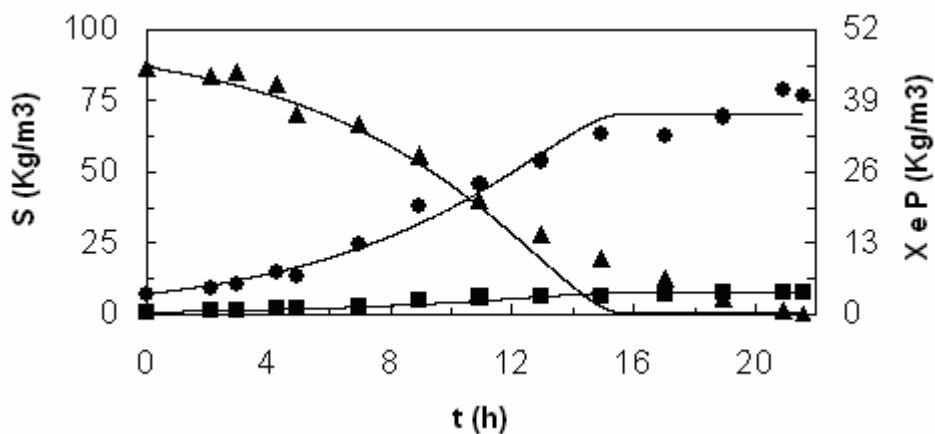


Figura 4.7: Dados experimentais e simulados (QN —) para 31,2 °C. Dados experimentais são para concentração de substrato, S(▲); biomassa, X(■) e etanol, P(●).

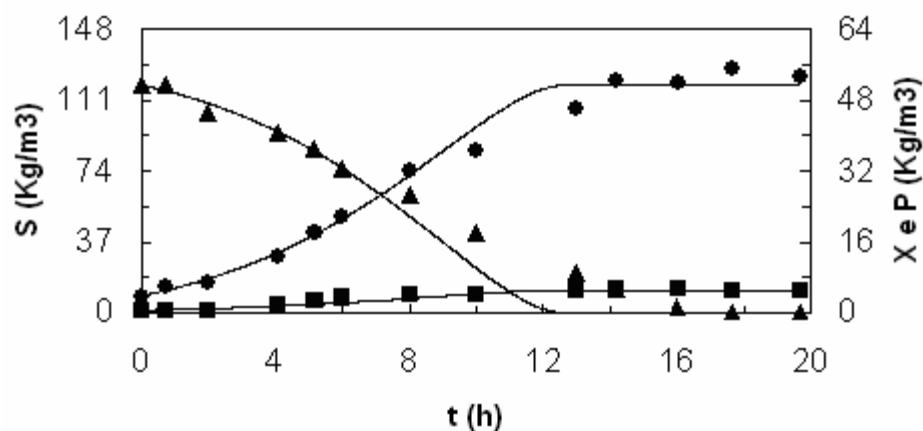


Figura 4.8. Dados experimentais e simulados (QN —) para 34 °C. Dados experimentais são para concentração de substrato, S(▲); biomassa, X(■) e etanol, P(●).

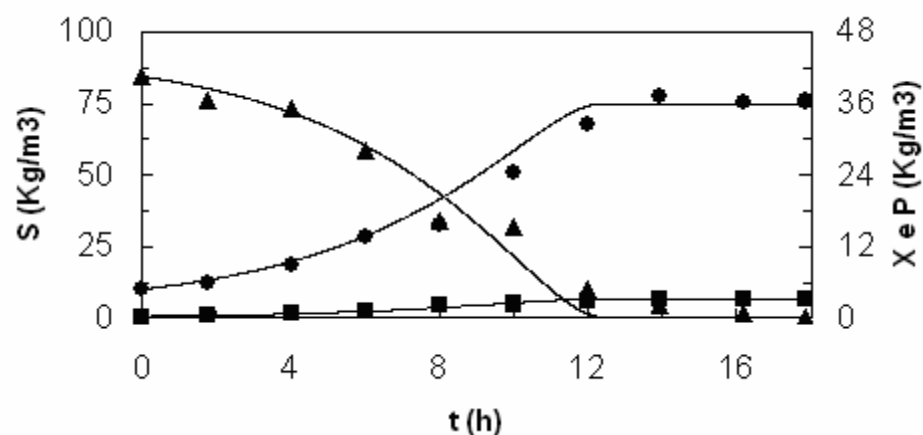


Figura 4.9. Dados experimentais e simulados (QN —) para 36,8 °C. Dados experimentais são para concentração de substrato, S(▲); biomassa, X(■) e etanol, P(●).

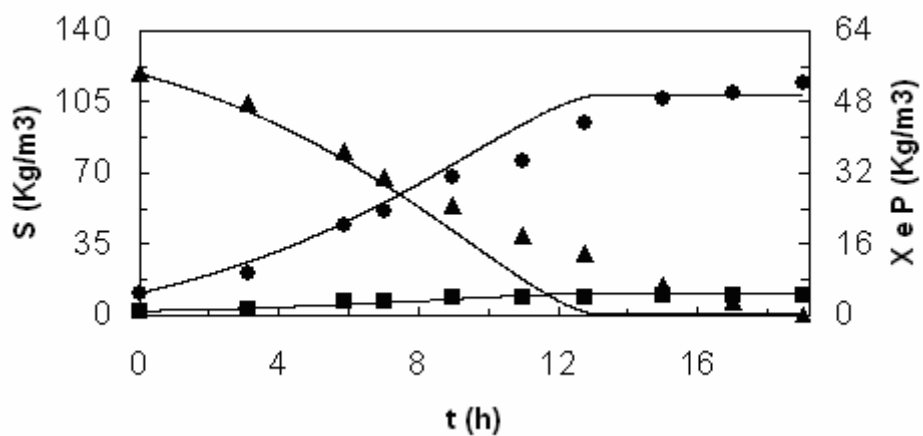


Figura 4.10. Dados experimentais e simulados (QN —) para 38,0 °C. Dados experimentais são para concentração de substrato, S(▲); biomassa, X(■) e etanol, P(●).

Este modelo pode então ser utilizado para posterior otimização e controle de processos. Deve-se citar, entretanto, que quando ocorrem mudanças operacionais resultantes de matéria-prima obtida de safra distinta ou microrganismo de linhagem diferente, os parâmetros cinéticos do modelo necessitam de re-estimação para representar os dados experimentais, apesar de esta prática consumir tempo considerável. É importante ressaltar também a dificuldade de re-estimação dos parâmetros ser resultante da interação entre os mesmos (correlação cruzada).

4.1 VALIDAÇÃO DO MODELO

A Figura 4.11 mostra os resultados do experimento 2, descrito na tabela 3.4, bem como os perfis preditos pelo modelo. Os dados experimentais deste ensaio não foram utilizados no procedimento de estimação dos parâmetros apresentados anteriormente, porém somente para validação.

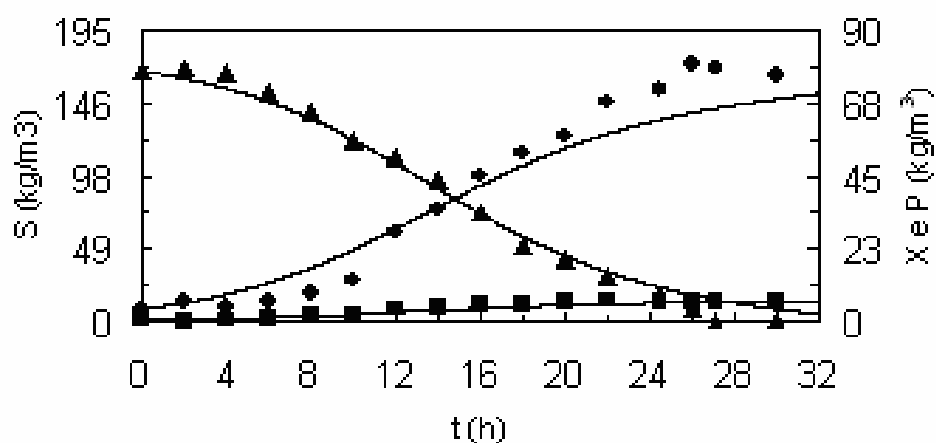


Figura 4.11: Validação do modelo. Dados experimentais e simulados para o experimento 2 da tabela 4. Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); massa celular, X (■) e etanol, P (●).

4.2 METODOLOGIA DE PLACKETT-BURMAN (PB) PARA A SELEÇÃO DOS PARÂMETROS SIGNIFICATIVOS PARA O PROBLEMA DE RE-ESTIMAÇÃO.

O planejamento de Plackett-Burman pode ser aplicado para avaliar a influência de um grande número de fatores em algumas dadas respostas (BARROS NETO *et al.*, 1996). Com 20 corridas, 19 variáveis podem ser analisadas no máximo em um determinado resultado. Com a escolha de um número de fatores menor que 19 torna-se possível o cálculo do erro através de colunas não utilizadas da tabela, que se comportam como variáveis inertes para os experimentos.

Neste trabalho esta técnica é utilizada para fazer a seleção dentre os 11 parâmetros cinéticos e verificar os que têm grande influência nos perfis gerados pelo modelo, de forma que os não significativos são mantidos constantes durante a etapa de re-estimação para uma nova condição.

Neste trabalho, as respostas escolhidas para representar o experimento em batelada foram o tempo de fermentação (t) necessário para consumo dos açúcares redutores (ART), a concentração de produto (P) e a concentração de células (X). Para aplicação da metodologia, foram escolhidos os valores de parâmetros obtidos para o experimento a 34 ° C, na tabela 4.7. Estes valores foram variados e testados em dois níveis distintos, baixo (-) e alto (+), de acordo com a tabela 4.9. A diferença entre esses níveis e os valores no ponto central a 34 ° C foi de 10 %.

Tabela 4.9: nível superior (+) e inferior (-) dos parâmetros para 34 ° C para planejamento de PLACKETT E BURMAN (1946).

Parâmetros	Nível (-1)	Nível (+1)
$\mu_{\max}$	0,3510	0,4290
$X_{\max}$	38,7000	47,3000
$P_{\max}$	67,5000	82,5000
Y_x	0,0356	0,0436
Y_{px}	8,9393	10,9258
K_s	3,6900	4,5100
K_i	0,0036	0,0044
m_x	0,1800	0,2200
m	0,9000	1,1000
n	1,3500	1,6500
m_p	0,0900	0,1100

A matriz de planejamento para Plackett- Burman foi construída com 20 linhas e colunas, como apresentado na tabela 4.10. 20 simulações utilizando os valores de parâmetros correspondentes aos apresentados na tabela 4.9 foram realizadas. Como o efeito de somente 11 parâmetros é avaliado, as colunas restantes são formadas por variáveis inertes, que são utilizadas na estimação do erro. Este valor de erro, no entanto, não tem significado físico, já que em simulação não há erro experimental.

Tabela 4.10: Matriz de planejamento de Plackett-Burman contendo 11 parâmetros cinéticos.

exp	mi	x_{max}	p_{max}	y_{px}	y_x	k_s	k_i	n	m	beta	m_x
1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1
7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1
12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
15	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1
17	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1
18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Através de simulação usando o modelo matemático, valores de t , X e P foram obtidos para cada fermentação e usados como respostas no Planejamento de Plackett-Burman. Condições iniciais de X , S e P foram fixadas em 0,7; 119,93 e 3,9 Kg/m³, respectivamente, para todas as simulações, pois se sabe que estas influenciam os perfis de concentração dos componentes. Os resultados são apresentados na tabela 4.11.

Tabela 4.11: Resultados das simulações de fermentações utilizando valores de parâmetros para nível superior (+1) e inferior (-1).

simulação	t (h)	X (Kg/m ³)	P(Kg/m3)
1	13,2900	4,6631	50,2255
2	19,2500	5,3362	61,9861
3	14,2800	5,4746	50,2569
4	14,3100	4,6939	50,8021
5	24,5200	5,1836	60,7191
6	17,1200	5,4232	51,2039
7	10,7400	4,7576	43,0712
8	12,6900	4,6687	50,8805
9	18,5600	5,3124	59,4927
10	14,3700	5,5107	61,4445
11	23,0300	5,1419	60,7421
12	14,0000	5,4702	50,2588
13	20,3100	4,5586	51,2221
14	17,3800	5,4624	52,1338
15	19,4500	4,4948	51,4202
16	18,1200	5,3443	51,4044
17	12,9900	4,6532	43,0752
18	11,6900	4,6962	42,2689
19	13,1600	4,7139	43,4297
20	13,6700	4,7017	42,8289

A ferramenta de Planejamento Fatorial de PLACKETT-BURMAN (1946) contida no Software STATISTICA versão 7.0 foi utilizada para seleção dos parâmetros mais relevantes no comportamento do modelo, como mostrado nas tabelas 4.12 a 4.14. Os valores dos efeitos nas respostas foram estimados com confiança estatística de 95 %. Resultados apresentados em negrito seriam os estatisticamente significativos em caso de trabalho experimental. Em caso de simulação, não se pode falar em significância estatística, já que mesmo os parâmetros com valores baixos não podem ser atribuídos a erros experimentais. Vamos, no entanto, considerar os parâmetros em negrito como aqueles que apresentam maior influência nas respostas.

Tabela 4.12: Estimativa dos efeitos dos parâmetros cinéticos do modelo no tempo para consumo total do substrato, representado pelo tempo de fermentação. Resultados obtidos através do planejamento de PLACKETT-BURMAN (1946).

Fatores	Efeito em t	t (8)	p	-95 %	+ 95 %
média	16,1465	46,5302	0,0000	15,3463	16,9467
$\mu_{\max}$	-2,1610	-3,1137	0,0144	-3,7614	-0,5606
$X_{\max}$	-0,1270	-0,1830	0,8593	-1,7274	1,4734
$P_{\max}$	-3,7370	-5,3845	0,0006	-5,3374	-2,1366
Y_x	3,8330	5,5228	0,0005	2,2326	5,4334
Y_{px}	3,6630	5,2779	0,0007	2,0626	5,2634
K_s	-0,1730	-0,249	0,8094	-1,7734	1,4274
K_i	1,0650	1,5345	0,1634	-0,5354	2,6654
m_x	0,6730	-0,9697	0,3606	-2,2734	0,9274
m	-0,0870	-0,1254	0,9033	-1,6874	1,5134
n	1,7430	2,5114	0,0363	0,1426	3,3434
m_p	-0,0570	-0,0821	0,9366	-1,6574	1,5434

Tabela 4.13: Estimativa dos efeitos dos parâmetros cinéticos do modelo na concentração de biomassa. Resultados obtidos através do planejamento de PLACKETT-BURMAN (1946).

Fatores	Efeito	em t (8)	p	-95 %	+ 95 %
	X				
média	5,0130	378,5407	0,0000	4,9825	5,0436
$\mu_{\max}$	0,0464	1,7530	0,1177	-0,0146	0,1075
$X_{\max}$	-0,0094	-0,3575	0,7299	-0,0705	0,0516
$P_{\max}$	0,1193	4,5069	0,0019	0,0583	0,1804
Y_x	0,7058	26,6469	0,0000	0,6447	0,7668
Y_{px}	-0,1133	-4,2784	0,0027	-0,1744	-0,0522
K_s	0,0096	0,3635	0,7256	-0,0514	0,0707
K_i	-0,0306	-1,1565	0,2808	-0,0917	0,0304
m_x	-0,0422	-1,5951	0,1493	-0,1033	0,0188
m	0,0185	0,6996	0,5040	-0,0425	0,0796
n	-0,037918	-1,4316	0,1901	-0,0989	0,0231
m_p	-0,0093	-0,3538	0,7326	-0,0704	0,0517

Tabela 4.14: Estimativa dos efeitos dos parâmetros cinéticos do modelo na concentração de produto. Resultados obtidos através do planejamento de PLACKETT-BURMAN (1946).

Fatores	Efeito em	t (8)	p	-95 %	+ 95 %
	P				
média	51,4433	658,4143	0,0000	51,2632	51,6235
$\mu_{\max}$	0,1400	0,8964	0,3962	-0,2203	0,5004
$X_{\max}$	0,0241	0,1546	0,8809	-0,3362	0,3845
$P_{\max}$	-0,4875	-3,1198	0,0142	-0,8479	-0,1272
Y_x	9,0418	57,8622	0,0000	8,6814	9,4021
Y_{px}	8,9003	56,9568	0,0000	8,5399	9,2606
K_s	-0,1873	-1,1984	0,2651	-0,5476	0,1731
K_i	-0,1861	-1,1907	0,2679	-0,5464	0,1742
m_x	-0,8816	-5,6418	0,0005	-1,2419	-0,5213
m	-0,1092	-0,6989	0,5044	-0,4696	0,2511
n	-0,1195	-0,7645	0,4665	-0,4798	0,2409
m_p	1,0309	6,5971	0,0002	0,6705	1,3912

De acordo com as tabelas 4.12-4.14, $\mu_{\max}$ e n foram estatisticamente significativos para tempo de fermentação; m_x e m_p para concentração de etanol. Um alto efeito dos parâmetros $P_{\max}$, Y_x e Y_{px} foi observado no modelo para todas as respostas. Os demais parâmetros que não possuem significância são mantidos constantes durante a etapa de re-estimação.

4.3 RE-ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS COM NOVOS DADOS EXPERIMENTAIS.

Para testar o desempenho do modelo na presença de flutuações na composição da matéria-prima um experimento foi realizado. Durante o trabalho, parte do melaço de cana utilizado nos experimentos sofreu inversão, fato que foi detectado na análise via HPLC, o que comprovou a falta da sacarose na composição e grande presença de glicose e frutose. Isso pode ser explicado pelo alto tempo de armazenamento do melaço durante os experimentos e, conseqüentemente sua degradação.

Desta forma, os experimentos realizados com esta nova condição foram utilizados na fase de reajuste de parâmetros com o objetivo de representar uma condição distinta. Para

este teste, foi realizada uma comparação entre o ajuste do modelo aos dados experimentais com parâmetros cinéticos utilizados no desenvolvimento do modelo e com a re-estimação dos parâmetros mais sensíveis, como segue.

Com a finalidade de testar a capacidade de predição do modelo frente a flutuações na matéria-prima utilizou-se primeiramente um experimento a 36,8°C e os resultados foram comparados, sem e com re-estimação de parâmetros mais sensíveis.

Os resultados são apresentados na tabela 4.15:

Tabela 4.15: Dados experimentais da fermentação em batelada a 36,8° C e $S_0 = 132,924$ g/L com novas condições de melaço.

<i>t (h)</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>	<i>Etanol (g/L)</i>	<i>ART (g/L)</i>	<i>Glicose (g/L)</i>	<i>Frutose (g/L)</i>
0,00	0,29	0,000	132,924	73,704	59,220
3,00	0,85	0,000	127,812	69,492	58,320
5,42	2,40	10,332	141,666	72,852	68,814
7,80	2,96	20,946	112,902	51,930	60,972
8,18	3,60	19,866	107,406	48,606	58,800
9,18	4,05	26,904	96,936	40,284	56,652
11,18	4,25	37,542	72,072	23,736	48,336
12,50	4,53	39,582	50,478	11,970	38,508
14,50	4,63	51,060	36,954	2,844	34,110
16,50	5,18	58,098	25,380	0,000	25,380
18,50	5,36	61,614	15,510	0,000	15,510
20,50	5,15	67,908	4,896	0,000	4,896
22,57	5,53	73,602	0,000	0,000	0,000
24,53	5,42	72,363	0,000	0,000	0,000
25,02	5,88	73,617	0	0,000	0,000

Pela tabela 4.15, pode-se perceber que todo o açúcar redutor total está representado em glicose e frutose, sendo que neste caso não há presença de sacarose no meio, confirmando o processo de inversão do melaço.

Sem re-estimação de parâmetros, obtém-se o seguinte resultado apresentado na figura 4.12.

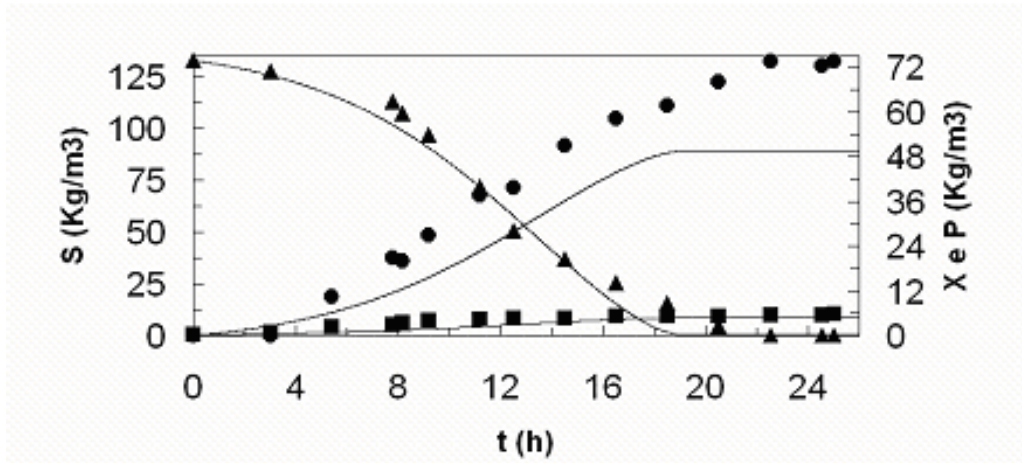


Figura 4.12: predição de nova condição operacional sem re-estimação de parâmetros. Dados experimentais e simulação (—). Dados experimentais são para concentração de substrato, S(▲); biomassa X(■) e etanol P(●).

Na figura 4.12, pode-se observar que a simulação do modelo cujos parâmetros foram definidos para as condições de melaço contendo sacarose não representa bem a produção para a fermentação com melaço invertido. Isso ocorre porque em meios contendo sacarose é necessário primeiramente o microrganismo produzir invertase para posterior fermentação da glicose e frutose, o que requer mais tempo para a fermentação. Já para meios contendo glicose e frutose somente, o substrato está pronto para ser metabolizado, e a taxa formação de etanol é maior, bem como de consumo de substrato. Vale lembrar que a linhagem de microrganismo foi a mesma para ambos.

De acordo com a avaliação dos efeitos nas tabelas de 4.12 a 4.14, no problema de re-estimação a 36,8 °C, os parâmetros menos significativos foram mantidos fixos, $X_{\max}=38 \text{ Kg/m}^3$; $K_s=4,1 \text{ Kg/m}^3$; $K_i=0,004 \text{ m}^3/\text{Kg}$; $m_p=0,1$; $m=1,0$; $n=1,5$ e $m_x=0,2$, e somente 4 parâmetros foram re-estimados, $\mu_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x e Y_{px} , obtendo novos valores que representam melhor esta nova condição experimental ($\mu_{\max}=0,52 \text{ h}^{-1}$, $P_{\max}=76 \text{ Kg/m}^3$, $Y_x=0,0509$ e $Y_{px}=11,1436$). Os resultados são apresentados na figura 4.13.

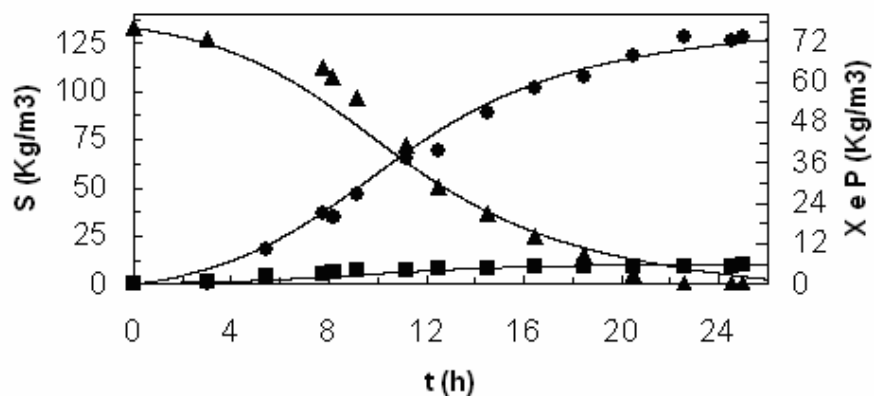


Figura 4.13: predição de nova condição operacional com re-estimação de parâmetros. Dados experimentais e simulação (—). Dados experimentais são para concentração de substrato, S(▲); biomassa X(■) e etanol P(●).

Um novo experimento foi realizado a 31,2°C com mesma linhagem de levedura, e melaço obtido de uma planta industrial em outro período distinto do original. Os resultados são mostrados na tabela 4.16.

Tabela 4.16: Dados experimentais da fermentação em batelada a 31,2° C e $S_0 = 89,484$ g/L com novas condições de melaço.

<i>t (h)</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>	<i>Etanol (g/L)</i>	<i>ART (g/L)</i>	<i>Glicose (g/L)</i>	<i>Frutose (g/L)</i>
0,00	0,33	2,376	89,484	0	0
2,00	0,65	3,012	73,608	2,4	2,028
4,00	1,09	4,896	63,408	2,856	4,632
6,00	1,49	7,152	60,852	6,072	8,916
8,00	2,38	8,484	59,000	2,874	7,692
10,00	2,66	16,872	58,638	6,276	14,394
12,00	3,34	22,182	53,580	5,37	15,846
14,00	3,31	21,672	33,564	2,268	12,318
16,00	3,37	24,060	34,026	1,998	14,16
18,00	3,77	27,426	19,800	0	10,812
20,00	3,81	28,568	18,874	0	8,364
22,00	3,84	29,757	17,1	0,579	10,128
24,00	4,08	32,889	10,587	0	7,377
26,00	4,25	41,169	8,712	0	6,564
28,00	4,31	43,758	5,058	0	4,332
30,00	4,61	41,703	1,506	0	1,506

Na tabela 4.16 consta que as concentrações de glicose e frutose no início da fermentação são nulas, o que confirmou a grande diferença na matéria-prima. Provavelmente existe uma quantidade mesmo que pequena desses componentes no melaço que não foi detectada pelo HPLC devido à alta diluição utilizada nesta faixa (1:12).

Foi testada a capacidade de predição do modelo original (sem re-estimação dos parâmetros) para esta fermentação, como na figura 4.14.

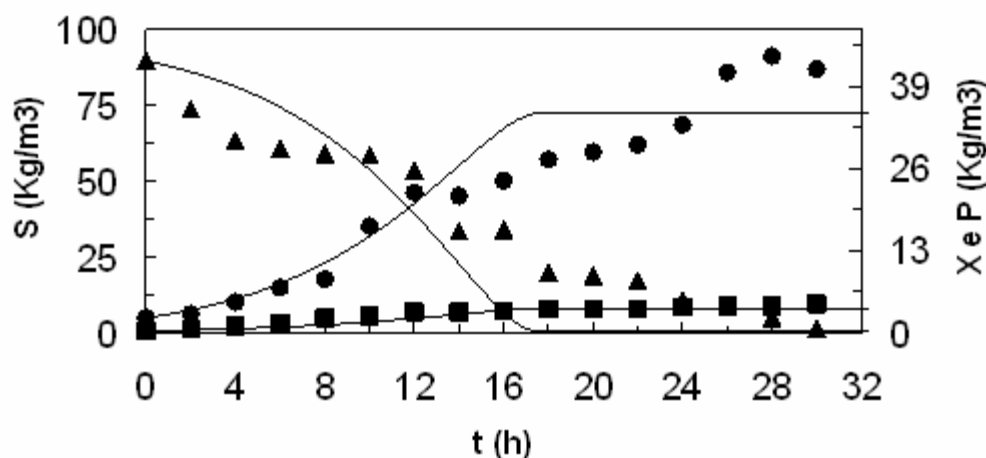


Figura 4.14: predição de nova condição operacional sem re-estimação de parâmetros. Dados experimentais e simulação (—). Dados experimentais são para concentração de substrato, S(▲); biomassa X(■) e etanol P(●).

Na figura 4.14, o resultado da simulação do modelo mostra que este não pode prever os resultados experimentais sem re-estimação. Segundo o modelo original, a fermentação terminaria em torno de 17 h para a concentração inicial de substrato de 89,484 Kg/m³, enquanto na realidade isso irá ocorrer somente com 30 horas. Isso mostra a grande influência das condições de processo nas taxas de consumo de substrato e formação de biomassa e etanol.

Após re-estimação dos parâmetros mais sensíveis do modelo, como descrito anteriormente, tem-se o seguinte comportamento do mesmo ao longo da fermentação, como apresentado na figura 4.15.

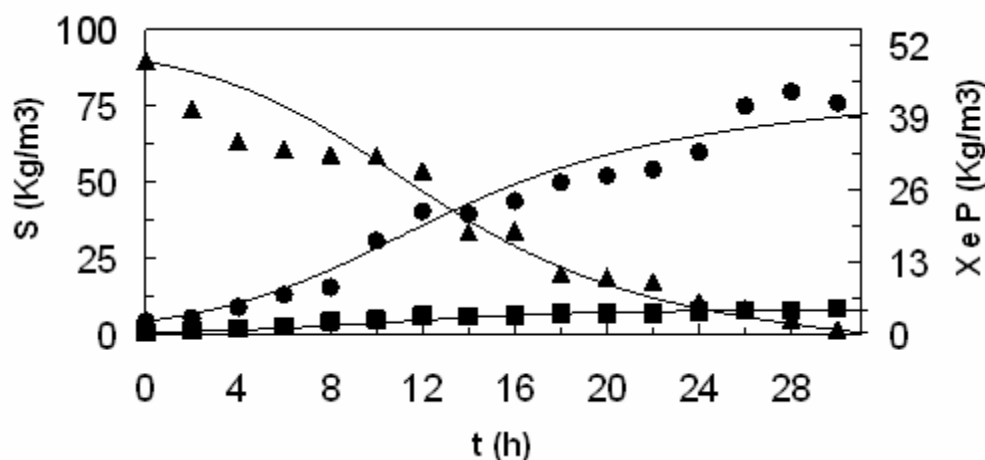


Figura 4.15: predição de nova condição operacional com re-estimação de parâmetros. Dados experimentais e simulação (—). Dados experimentais são para concentração de substrato, S(▲); biomassa X(■) e etanol P(●).

Assim, a re-estimação de poucos parâmetros possibilita a obtenção de um modelo com boa qualidade de predição para novas condições experimentais, com esforço computacional reduzido. Os novos valores obtidos dos parâmetros mais significativos foram: $\mu_{\max} = 0,36 \text{ h}^{-1}$, $P_{\max} = 40,96 \text{ Kg/m}^3$, $Y_x = 0,05594$ e $Y_{px} = 7,135$.

4.4 EXPERIMENTO EM BATELADA ALIMENTADA E AJUSTE DO MODELO CINÉTICO PARA NOVA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL

Visando testar a capacidade de predição do modelo para condições de processo bastante distintas da qual ele foi estabelecido, foi realizado um experimento em batelada alimentada, sendo que para este foi envolvida no processo uma levedura floculante da linhagem ATCC 26698, e melaço diferente do original.

Durante os experimentos, apesar de ser mantida a agitação no bioreator em 300 rpm, foi utilizada somente uma turbina de pás planas, pois se iniciou o processo com um volume pequeno de meio, e o uso de 2 turbinas poderia resultar em grande formação de espuma quando o nível do meio em um determinado tempo de alimentação alcançasse a altura da turbina superior. Sabe-se que a agitação tem grande influência sobre o processo de fermentação alcoólica.

A condução do experimento em batelada alimentada teve sua vazão de alimentação variável visando obter concentração de substrato constante ao longo do processo, o que permitiria trabalhar em condições ótimas de produtividade mantendo fixa a concentração açúcares. Para isso também foi escolhida a temperatura a $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a qual é considerada ótima para a produção de etanol. O volume inicial no reator foi de 2,75 L e final de 5,23 L.

As técnicas analíticas para quantificação das amostras neste experimento foram as mesmas descritas para o processo em batelada. A análise de viabilidade celular foi realizada pelo método do azul de metileno, citada por YOSHIDA *et al.* (1999). Os resultados são apresentados na tabela 4.17.

Tabela 4.17: Dados experimentais da fermentação em batelada alimentada a 34,0° C e $S_0=84,571$ g/L com novas condições de melaço e levedura flocculante.

t (h)	X_t (g/L)	X_v (g/L)	<i>Etanol</i> (g/L)	<i>ART</i> (g/L)
0	2,79	2,792	31,572	84,571
4,16	2,93	2,933	35,040	78,107
7,66	3,08	3,054	25,080	66,931
11,33	4,10	4,018	25,308	55,616
15,66	4,28	4,153	25,800	42,915
18,91	4,01	3,812	26,412	35,456
23,50	3,91	3,642	29,988	32,369
29,83	3,37	3,204	31,584	28,274
33,16	2,68	2,364	38,388	29,673

Pela tabela 4.17, pode-se notar que a concentração de açúcares redutores totais não ficou constante durante a fermentação em batelada alimentada, efeito a principio desejável, mas sim apresentou um valor decrescente ao longo do processo. Isto se deve ao fato da determinação da vazão de alimentação ser definida pela simulação da mesma utilizando os parâmetros do modelo original a 34 °C com outra linhagem de microrganismo e diferente meio de cultivo, o que não representa bem a realidade deste processo. O ajuste dos parâmetros ótimos para o experimento em batelada alimentada foi realizado através do FORTRAN de forma similar aos em batelada, porém foi acrescentada uma equação de vazão de alimentação e volume em função do tempo fermentativo (obtido pela integração da vazão com o tempo) que era informado ao programa, e ainda termos de diluição na equação do modelo, como nas equações de 2.11 a 2.15. Além disso, foi considerada a expressão para cinética de morte, pois a viabilidade em processos industriais tende a cair com longos tempos de cultivo. Essa perda de viabilidade é influenciada pela presença de etanol no meio e temperatura, como mostrado na equação 4.1:

$$rd = (K_{dT} \cdot \exp(Kdp \cdot P)) \cdot X_v \quad (4.1)$$

Então, foi feita a re-estimação somente dos parâmetros mais sensíveis do modelo, obtendo os seguintes valores, $\mu_{\text{máx}}=0,4028 \text{ h}^{-1}$, $P_{\text{máx}}=51,59 \text{ Kg/m}^3$, $Y_x=0,036$ e $Y_{px}=1,40$ (Kg/Kg) , mantendo $X_{\text{máx}}=43,00$ (Kg/L) constante para 34 °C bem como os demais

parâmetros que não são dependentes da temperatura. Os valores dos parâmetros relacionados à cinética de morte (equação 4.1) otimizados pela rotina desenvolvida em FORTRAN foram $K_{dt}=10^{-12} \text{ (h}^{-1}\text{)}$ e $K_{dp} = 0,7814 \text{ (L/g)}$.

Assim, a predição dos dados experimentais em batelada alimentada pelo modelo cinético considerado é apresentada na figura 4.16 como segue:

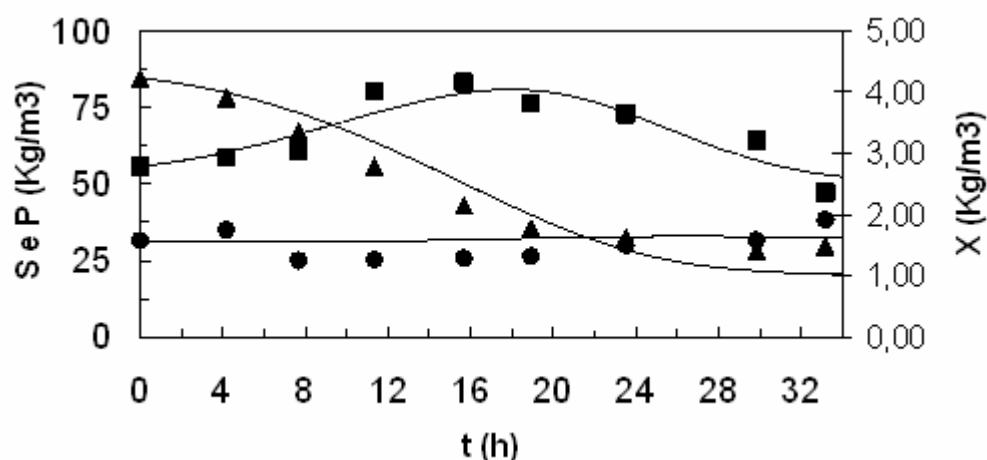


Figura 4.16: predição de experimento em batelada alimentada com levedura floculante com re-estimação de parâmetros cinéticos. Dados experimentais e simulação (—). Dados experimentais são para concentração de substrato, S(▲); biomassa X(■) e etanol P(●).

Nos momentos iniciais da batelada alimentada, a taxa de alimentação de substrato era bem baixa, provavelmente menor que o consumo deste pelo microrganismo, o que levou uma queda do mesmo até aproximadamente 20 horas. Posteriormente o comportamento dos açúcares redutores totais ficou constante.

A concentração microbiana por sua vez aumentou no mesmo período, e depois das 20 horas passou a cair significativamente devido a uma grande taxa de alimentação ao longo do processo, de forma que o microrganismo não conseguisse crescer na mesma velocidade. O perfil de etanol permaneceu praticamente constante ao longo da fermentação, a um valor bastante baixo de forma que não inibisse o crescimento das leveduras, o que colaboraria para redução da inibição pelo produto, o que é desejável em processos industriais.

A figura 4.16 também mostra que é possível com o modelo utilizado, fixando os parâmetros menos relevantes e re-estimando os demais, predizer o comportamento do processo em batelada alimentada, com boa qualidade de ajuste, mesmo variando a linhagem microbiana, melão e número de turbinas no reator. Isso comprova a robustez do modelo.

4.5 DESVIOS DO MODELO EM RELAÇÃO AOS DADOS EXPERIMENTAIS.

O desvio padrão residual, representado pela equação 4.2, escrito como a percentagem da média dos valores experimentais, representa a medida usada para caracterizar a qualidade de predição do modelo (ATALA et al., 2001)

$$RSD(\%) = \left(\frac{\sqrt{RSD}}{\bar{d}_p} \right) 100 \quad (4.2)$$

Sendo que $RSD = \frac{1}{np} \sum_{p=1}^{np} (d_p - x_p)^2$, no qual x_p e d_p são, respectivamente, o valor predito pelo modelo matemático e valor experimental, $\bar{d}_p$ é a média dos valores experimentais e np , o número de pontos experimentais.

Os resíduos para o modelo em batelada e alimentada otimizado pelo método Quasi-Newton (QN) são mostrados na tabela 4.18. As concentrações de biomassa, substrato e etanol calculadas usando o modelo matemático apresentaram desvios menores que 23,3 para os experimentos, exceto para os modelos sem re-estimação.

Tabela 4.18. Desvio padrão residual para todos os experimentos, com e sem re-estimação de parâmetros.

RSD(%)			
Experimento	X	S	P
T=30°C	9,5	23,3	14,6
T=31.2°C	15,6	10,4	11,0
T=34°C	18,6	8,2	6,3
T=36.8°C	9,6	12,9	4,9
T=38°C	12,1	14,1	4,9
T=34°C (validação)	16,6	8,0	18,4
T=36,8°C (sem re-estimação)	13,3	8,3	37,8
T=36,8°C (com re-estimação)	9,1	10,2	7,5
T=31.2°C (sem re-estimação)	19,8	35,8	22,3
T=31.2°C (com re-estimação)	12,8	19,4	13,1
Batelada alimentada (com re-estimação)	6,9	13,0	15,5

4.6 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO E TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO NO RENDIMENTO EM ETANOL, BIOMASSA, PRODUTIVIDADE E CONVERSÃO.

Para otimização do processo, pode-se ainda avaliar a influência de variáveis como temperatura e concentração de substrato no rendimento em etanol e biomassa, produtividade e conversão.

Com os parâmetros cinéticos encontrados para o modelo inicial, fez-se a simulação de diferentes condições iniciais de processo definidas por um planejamento experimental 2^2 + pontos axiais, variando os fatores S_0 e T , como na tabela 4.19.

Tabela 4.19: Condições iniciais (T e S_0) de processo em batelada, utilizadas na simulação do modelo original (sem re-estimação de parâmetros).

Simulação	$T(^{\circ}\text{C})$	$S_0 (\text{Kg/m}^3)$
p1	32,00	130,00
p2	36,83	110,00
p3	34,00	138,28
p4	34,00	110,00
p5	32,00	90,00
p6	34,00	81,72
p7	31,17	110,00
p8	36,00	130,00
p9	34,00	110,00
p10	36,00	90,00

Para as simulações (10) utilizou-se o software FORTRAN 90, com os valores de T e S_0 definidos na tabela 4.19. O valor de concentração inicial de biomassa foi fixo para todas as simulações, pois pode afetar na velocidade de consumo de substrato e consequentemente na formação de produto, resultando em valores distintos de produtividade. A presença de etanol no fermentador, resultante da presença deste componente no inóculo, age como inibidor no crescimento celular, modificando os perfis de concentração. Para minimizar esses efeitos descritos nas respostas, X e P foram fixados em 1 e 3 Kg/m^3 , respectivamente. Assim foram calculadas as respostas (produtividade, rendimento em etanol e rendimento

em biomassa), através de expressões utilizadas por FERREIRA (2005), baseadas nos perfis de concentração de S, X e P obtidos. Os resultados são mostrados na tabela 4.20.

Tabela 4.20: Resultados de rendimento em etanol e biomassa e produtividade para simulações em batelada nas condições iniciais definidas.

Simulação	T(°C)	S ₀ (Kg/m ³)	X (Kg/m ³)	P (Kg/m ³)	Produtividade (Kg/m ³ .h)	Rendimento em etanol	Rendimento biomassa
p1	32,00	130,00	1,00	3,00	2,8914	0,3875	0,0365
p2	36,83	110,00	1,00	3,00	3,7872	0,3600	0,0331
p3	34,00	138,28	1,00	3,00	3,4156	0,3835	0,0347
p4	34,00	110,00	1,00	3,00	3,7988	0,3809	0,0355
p5	32,00	90,00	1,00	3,00	3,1596	0,3841	0,0376
p6	34,00	81,72	1,00	3,00	3,9108	0,3794	0,0360
p7	31,17	110,00	1,00	3,00	2,7709	0,3629	0,0381
p8	36,00	130,00	1,00	3,00	3,7881	0,3671	0,0335
p9	34,00	110,00	1,00	3,00	3,7988	0,3809	0,0355
p10	36,00	90,00	1,00	3,00	4,0847	0,3647	0,0341

Através do software STATISTICA versão 7.0, traçou-se a superfície de resposta para a produtividade em função de temperatura, e concentração inicial de substrato (figura 4.17). Na figura 4.18 são mostradas as curvas de nível.

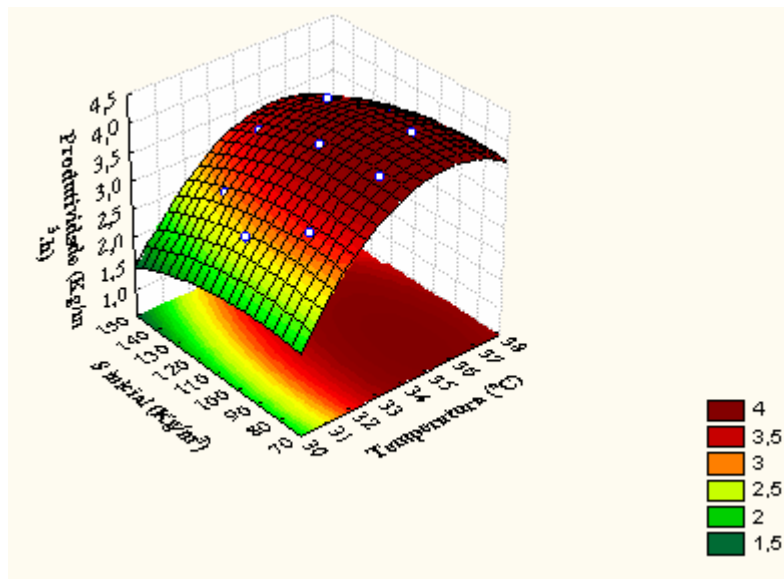


Figura 4.17: Superfície de resposta para produtividade em função de concentração inicial de substrato e temperatura para o processo em batelada.

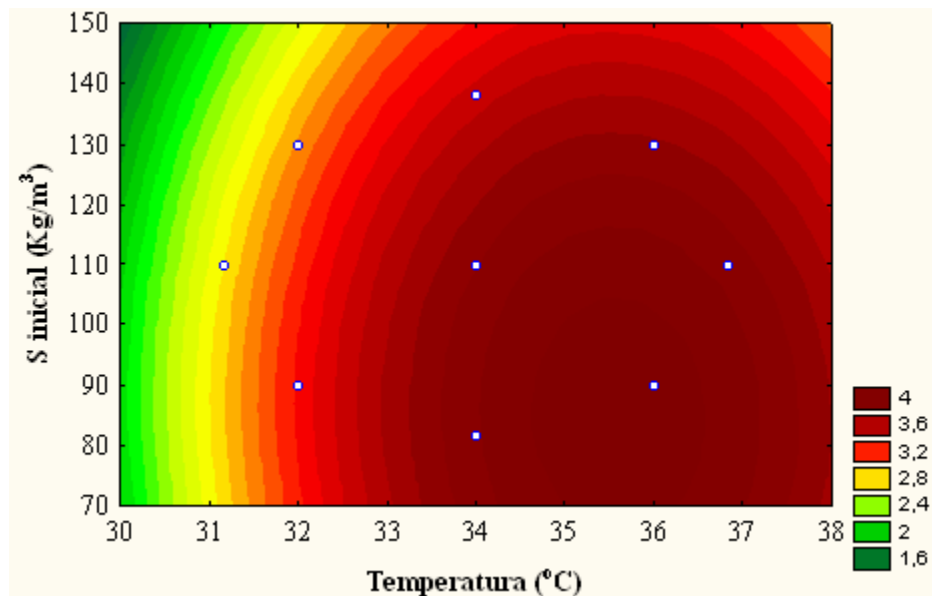


Figura 4.18: Curva de nível para produtividade em função de concentração inicial de substrato e temperatura para o processo em batelada.

Nota-se que a máxima produtividade obtida foi em torno de $4 \text{ Kg/m}^3\cdot\text{h}$ para a temperatura de 34°C , que coincide com a temperatura na qual o microrganismo apresenta máxima velocidade específica de crescimento bastante alta, na figura 4.1. Abaixo deste valor, ocorre uma queda brusca de produtividade.

Pode-se observar ainda que a concentração inicial de substrato na faixa estudada quase não apresentou influência nesta variável, sendo que para a mesma temperatura os valores de produtividade ficaram bem próximos. O fato de a produtividade ser baixa para altas concentrações de substrato inicial não era esperada na faixa de concentração estudada.

O desejável em plantas industriais é a maximização da produtividade, sendo que a mesma quantifica a velocidade da formação de etanol pelo metabolismo do açúcar, e ainda pode ser utilizada para qualificar a linhagem de levedura aplicada no processo (STECKELBERG, 2001).

A superfície de resposta obtida para o rendimento em etanol é representada na figura 4.19, como segue. A figura 4.20 mostra a curva de nível.

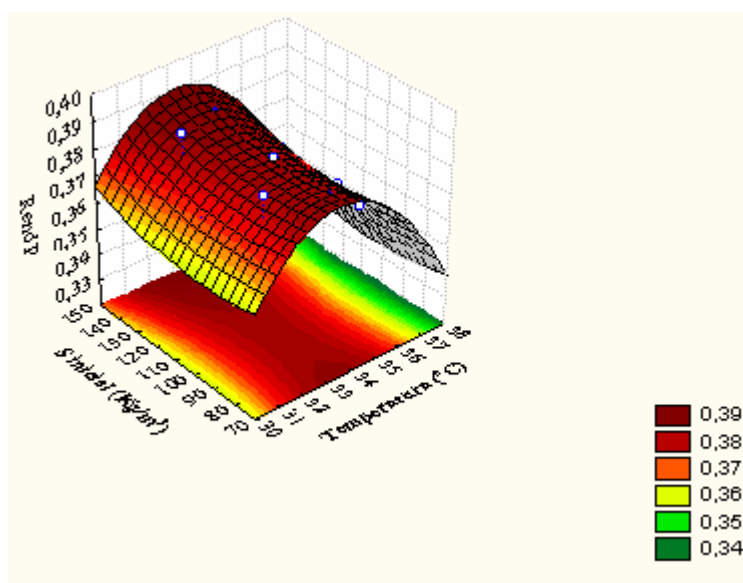


Figura 4.19: Superfície de resposta para rendimento em etanol em função de concentração inicial de substrato e temperatura para o processo em batelada.

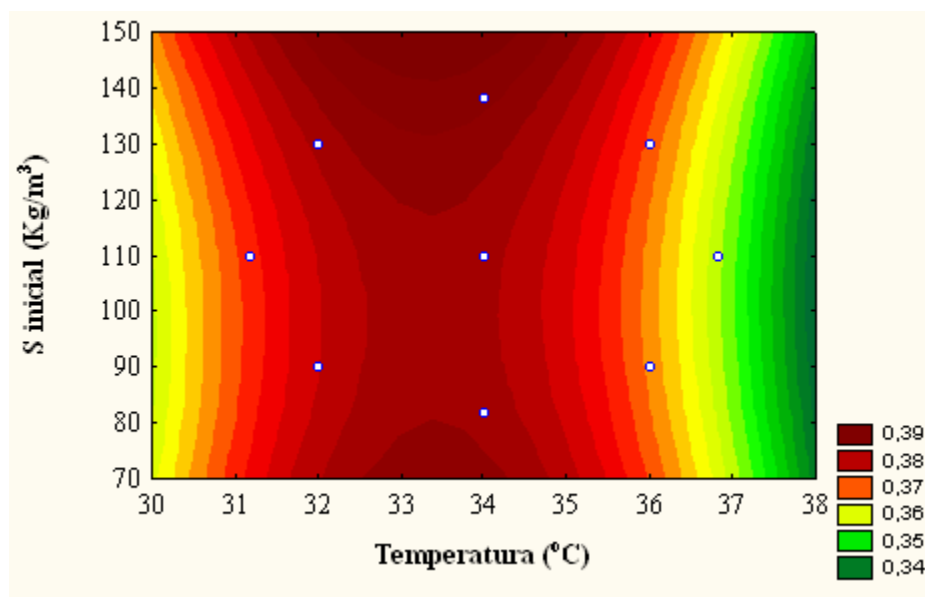


Figura 4.20: Curva de nível para rendimento em etanol em função de concentração inicial de substrato e temperatura para o processo em batelada.

O valor máximo de rendimento em etanol foi encontrado para temperatura em torno de 34°C. e apresenta comportamento similar ao da produtividade do processo em função da temperatura. Para a faixa estudada de concentração inicial de substrato em batelada, o S_0 não teve muita influência no rendimento em etanol.

Para o rendimento em biomassa, têm-se as figuras 4.21 e 4.22.

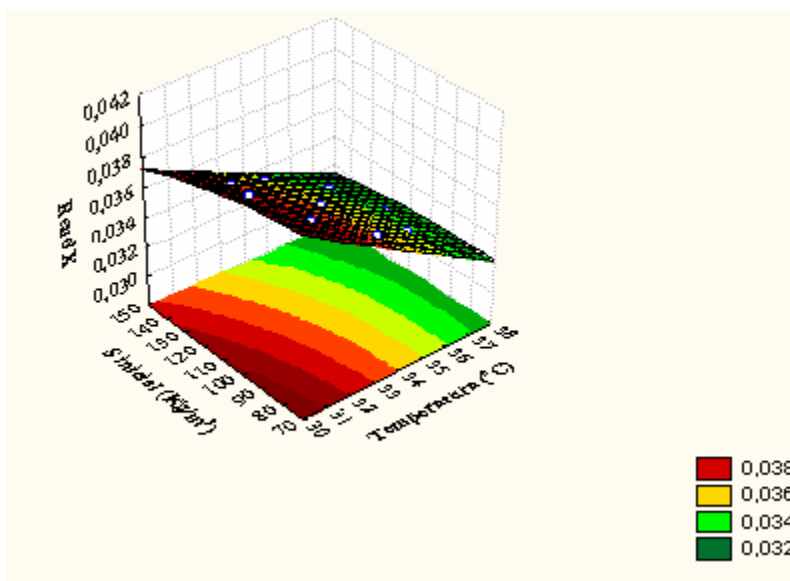


Figura 4.21: Superfície de resposta para rendimento em biomassa em função de concentração inicial de substrato e temperatura para o processo em batelada.

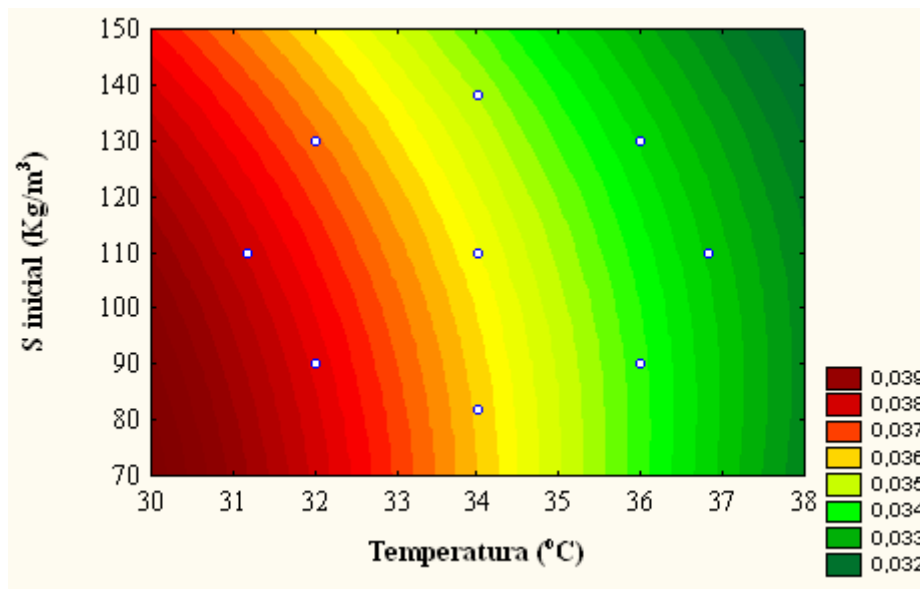


Figura 4.22: Curva de nível para rendimento em biomassa em função de concentração inicial de substrato e temperatura para o processo em batelada.

A alta influência da temperatura no rendimento em biomassa é facilmente notada. O máximo rendimento em microrganismos ocorreu a 31,17°C, sendo que o mínimo aconteceu na extremidade superior de temperatura do intervalo estudado. Apesar deste ultimo valor não ser favorável ao crescimento microbiano, muitos processos de fermentação alcoólica trabalham a altas temperaturas devido às condições climáticas das regiões brasileiras nas quais plantas deste tipo estão localizadas.

O valor de crescimento microbiano máximo coincide com a temperatura na qual os microrganismos são mantidos na fase de preparação do inóculo.

Ainda, pela figura 4.22, a altas temperaturas, o metabolismo microbiano é desviado para maior produção de etanol, e para realizar funções básicas das células. Então, o rendimento em biomassa tende a cair com o aumento desta variável de forma significativa. Em altas temperaturas, a inibição do crescimento microbiano pelo etanol também é maior, o que resulta em menor concentração de biomassa formada.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusões

O modelo para crescimento microbiano utilizado considera, além da biomassa e produto, a inibição pelo substrato. Devido a isso, o modelo é capaz de representar com sucesso dados experimentais a altas concentrações iniciais de substrato quando comparado com o de SEVELEY (1980), citado por DOURADO *et al.* (1987).

A máxima velocidade específica de crescimento microbiano ($\mu_{\max}$) ocorre a 34 °C. Este parâmetro para valores de temperatura acima de 36,8 °C decresce fortemente. Para temperaturas abaixo de 34 °C, esta dependência é menor, e a inclinação da curva é mais suave. Com isso, fica claro que desvios de temperatura para valores maiores de 36,8 °C, levam a uma queda drástica no crescimento microbiano, resultando a uma menor formação de produto, considerando que a produção de etanol está relacionada ao crescimento, e o rendimento de produto relacionado no crescimento celular tem comportamento quase constante acima de 31,2 °C.

A tolerância da *S. cerevisiae* pelo etanol e concentração de biomassa mostrou ser alta a 31,2 °C, e acima deste valor de temperatura, tende a decrescer.

A metodologia de atualização de parâmetros proposta foi capaz de predizer uma nova condição operacional utilizando uma linhagem microbiana distinta e melaço de cana obtido a partir de matéria-prima de colheitas diferentes, o que é bastante comum em plantas industriais.

Estudos realizados confirmam que modelos desenvolvidos para processos de fermentação alcoólica que não têm seus parâmetros re-estimados para novas condições operacionais, não apresentam boa capacidade de predição de dados experimentais de processos industriais. Tendo isso em mente, este trabalho desenvolve uma metodologia para ser utilizada sempre que a re-estimação de parâmetros se faz necessária. A grande vantagem observada na utilização do planejamento Fatorial de PLACKETT-BURMAN (1946) é a seleção de parâmetros que necessitam de re-estimação (4 em um total de 11), o que diminui o tempo gasto nesta tarefa.

A redução do número de parâmetros que precisam ser re-estimados é muito útil principalmente na modelagem de processos em batelada alimentada, já que neste caso a expressão para morte celular é utilizada, o que complica ainda mais o modelo e o problema da interação entre o grande número de parâmetros existentes (correlação cruzada). Tendo em vista esta dificuldade, a tarefa de estimação simultânea de 13 parâmetros para esse processo seria uma tarefa muito complicada e praticamente impossível, já que existe a necessidade de informar uma boa estimativa inicial ao programa de otimização para o cálculo dos valores para que o mesmo possa convergir. Isto exige bastante experiência e conhecimento de metabolismo microbiano para obtenção de resultados com significância física.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Aumentar a abrangência desse modelo cinético investigando sua capacidade de predição de dados experimentais via re-estimação de somente parâmetros mais sensíveis para fermentações alcoólicas com mistura de melaço e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar em várias proporções, e ainda para processos nos quais a diluição do melaço é realizada com a própria vinhaça, substituindo a grande quantidade de água utilizada no processo e reduzindo a geração de efluentes.

A partir de um trabalho mais abrangente poderia desenvolver um modelo matemático para crescimento microbiano mais simples que considerasse apenas os parâmetros mais sensíveis investigados neste trabalho.

Para uma abordagem mais detalhada do fenômeno físico, poderia levar em conta na modelagem o etanol presente intracelular, bem como tomar uma abordagem intrínseca para cultivos a altas concentrações de biomassa, o que permitiria avaliar se a manutenção do $X_{máx}$ acontece para esses processos.

Avaliar a técnica de re-estimação do modelo proposto para processo contínuo extrativo de fermentação alcoólica com mudança em condições operacionais.

Realizar modificações na rotina de otimização para que a mesma pudesse ajustar automaticamente todos os parâmetros cinéticos em função de temperatura para várias fermentações de forma simultânea a uma função dupla exponencial.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S. & SHODA, M. Reassenssment of product of inhibition in alcohol fermentation. **J. Ferment. Technol.** 1969. v.47. p.790-794.

AIBA, S. and SHODA, M. Reassessment of product inhibition in alcohol fermentation. **J. Ferment. Technol.** 1969. v.47, p. 790-794.

AIBA, S., SHODA, M. and NAGATANI, M. Kinetics of product formation in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering.** 1968. v.10, p845-864.

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

ANDREWS, J.F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, 1968. v 10, p 707-723.

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

ATALA, D.I.P. Fermentação alcoólica com alta densidade celular: modelagem cinética, convalidação de parâmetros e otimização do processo. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2000. 135p.

ATALA, D.I.P., COSTA, A.C., MACIEL FILHO, R.,MAUGERI FILHO, F. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. **Applied biochemistry and biotechnology.** 2001.v 91-93. p 353-364.

BAILEY, J.E. & OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. Second Edition. **Mc Graw-Hill**. New York, 1986. 984 p.

BARROS NETO *et al.* Planejamento de otimização de experimentos. 2. ed. **Editora da Unicamp**. Campinas, 1996.

BASSO *et al.* In. LIMA, U. A.; BASSO, L.C. e AMORIM. Biotecnologia Industrial – Vol. 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos. **Editora Edgard Blücher LTDA**. São Paulo, 2001. p.82.

BONOMI, A. & SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In. BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. Vol. 2. **Editora Edgard Blücher**. São Paulo, 2001. p.123-178.

BOTERO, A.M.; GARHYAN, P. e ELNASHAIE, S.S.E.H. Non-linear characteristics of a membrane fermentor for ethanol production and their implications. **Nonlinear Analysis: Real World Applications**. 2006. v. 7, p 432-457.

BRUNS, R.E.; BARROS NETO, B.; SCARMINO, I.S. Como fazer experimentos. 2.ed. **Editora da Unicamp**. Campinas, 2003. 401 p.

CARDOSO, M. G., editado por. Produção de Aguardente de cana-de-açúcar. **Editora UFLA**. Lavras, 2001. 264p.

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

CARVALHO, J.C.M. e SATO, S. Fermentação descontínua. In LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial – Volume 2: Engenharia Bioquímica. **Editora Edgard Blücher LTDA**. São Paulo, 2001. p.193-199.

CLARK, D.S & BLANCH, H.W. Biochemical Engineering. **Marcel Dekker, Inc.** New York, 1996. p 2005-2008 and 618-620.

COSTA, A.C.; MELEIRO, L.A.C. e MACIEL FILHO, R. Non-linear predictive control of an extractive alcoholic fermentation process. **Process Biochemistry**. 2002. v. 38. p 743-750.

DALSENTER, F.D.H., VICCINI, G., BARGA, M.C., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N.A. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process Biochem**. 2005. 40. 801-807.

DORAN, P. M. Bioprocess engineering principles. **Academic Press**. San Diego, 2002. p. 377-80.

DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; e SEVELY, Y. Modeling end static optimization of the ethanol production in a cascade bioreactor: I. Modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, 1987. V. 29-2, p 187-194.

FACCIOTTI, M.C.R. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial – Vol. 2. **Editora Edgard Blucher**, São Paulo, 2001. P. 223-225.

FERREIRA, E. Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2005. 86p.

GHOSE, T.K. and TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate.II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. **Biotechnology and Bioengineering**. 1979. v.21, p.1401-1420.

HAALAND, P.D. Experimental Design in Biotechnology. Marcel Dekker, N. Y, 1989.

HISS, H. Cinética de Processo Fermentativos. In LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial – Volume 2: Engenharia Bioquímica*. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, 2001. p.93-122.

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

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

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

LEE, S.S., ROBINSON, F.M. e WANG, H.Y. Rapid determination yeast viability. **Biotechnol Bioeng. Symp**, 1981. 11. p 641-649.

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

LIMA, U. A. Aguardentes. In. AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. *Biotecnologia Industrial – Volume 4: Biotecnologia na Produção de Alimentos*. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, 2001. p.145-182.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. Produção de etanol. In. LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial – Volume 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, 2001. p.1-43.

LIMA, U.A. Operações de instalações industriais de fermentação. In LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial – Volume 2: Engenharia Bioquímica*. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, 2001. p.431-439.

LUEDEKING, R. e PIRET, E.L. Transient and steady states in continuous fermentation. Theory and experiment. **Biochem. Microbiol. Technol. Eng.** 1959. 1. p 431-450.

MACEDO, I. Estado da arte e tendências das tecnologias para energia. **Documento elaborado para a Secretaria Técnica do CTEner**, 2003.

MACEDO, I. Estado da arte e tendências das tecnologias para energia. Documento elaborado para a Secretaria Técnica do CTEner, 2003. Disponível em: http://www.finep.gov.br/fundos_setoriais/ct_energ/documentos/ct-energ03estado_arte.pdf). Acesso em: 01 jun. 2006.

MONOD, J. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. **Hermann & Cie.** Paris, 1942.

MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. 2nd edition. John Wiley & Sons Inc. New York, 1983. 538 p.

MOSER, A. Kinetics of batch fermentation. In: Rehm, H.J. Reed, G. Volume Editor: Brauer, H. **Biotechnology – A comprehensive treatise in 8 volumes**. Weinheim, V.C.H. Verlagsgesellschaft, 1985. V.2 p. 243-283.

PHISALAPHONG, M *et al.* Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 2005. v 28. p. 36-43.

PIRT, S.J. The maintenance requirement of bacteria in growing cultures. **Proc. Roy Soc.** London. 1966. v.b.163, p. 224-231.

PLACKETT , R.L. e BURMAN, J.P. The design optimum multifactorial experiments. **Biometrika**. 1946. v.33, p 305-25.

RIBEIRO, J. C. G. M. R. – Fabricação Artesanal de Cachaça Mineira – Belo Horizonte: **Editora Perform**, 1997. 162p.

RIVERA, E.C.; COSTA, A.C.; ATALA, D.I.P.; MAUGERI, F.; MACIEL, M.R.W.; e MACIEL FILHO, R. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochemistry**, 2006. v. 41 p. 1682-1687.

RODRIGUES, M. I., ANDRIETTA, S.R.; MAUGERI, F.F. Simulação da produtividade e rendimento em fermentação alcoólica contínua, para reatores em fermentação contínua, para reatores operando em condições ideais e não ideais de mistura. *Stab. Açúcar Álcool e Subprodutos*, 1992. v. 10, n. 5, p 35-47.

SÁNCHEZ *et al.* Influence of temperature on the fermentation of D-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol . **Process Biochem**, 2004. 39. p 673-679.

SCHMIDELL, W e FACCIOITI, M.C.R. Biorreatores e processos fermentativos. In LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial – Volume 2: Engenharia Bioquímica. **Editora Edgard Blücher LTDA**. São Paulo, 2001. p.179-192.

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

STEKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2001. 215 p.

SUN, Y. e CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. **Biores. Technol.** 2002. v.83, p. 1-11.

TOSETTO, G.S. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2002. 81p.

URENHA *et al.* Esterilização de equipamento. In LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial – Volume 2: Engenharia Bioquímica. **Editora Edgard Blücher LTDA**. São Paulo, 2001. p.19-38.

WANG, S.W. e SHEU, J.W. Multiobjective parameter estimation problems of fermentation processes using a high ethanol tolerance yeast. **Chemical Engineering Science**, 2000. v 55, p3685-3695.

YOSHIDA, N.; MINAMIMURA, T.;YOSHIDA,T. e OGAWA, K. Effect of hypergravitational stress on microbial cell viability. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 1999. V.88, p. 342-344.

APÊNDICE A

Artigo com os resultados parciais desta dissertação publicado na revista “Applied Biochemistry and Biotechnology”.

Estimation of Temperature Dependent Parameters of a Batch Alcoholic Fermentation Process

RAFAEL RAMOS DE ANDRADE,^{*,1} ELMER CCOPA RIVERA,^{*,1}
ALINE C. COSTA,¹ DANIEL I. P. ATALA,² FRANCISCO
MAUGERI FILHO,² AND RUBENS MACIEL FILHO¹

¹Laboratory of Optimization, Design and Advanced Control, School of Chemical Engineering, State University of Campinas, P.O. Box 6066, 13081-970, Campinas, SP, Brazil,
E-mail: rafaelra@feq.unicamp.br, elmer@feq.unicamp.br;
and ²Department of Food Engineering, School of Food Engineering, State University of Campinas, P.O. Box 6121, 13081-970, Campinas, SP, Brazil

Abstract

In this work, a procedure was established to develop a mathematical model considering the effect of temperature on reaction kinetics. Experiments were performed in batch mode in temperatures from 30 to 38°C. The microorganism used was *Saccharomyces cerevisiae* and the culture media, sugarcane molasses. The objective is to assess the difficulty in updating the kinetic parameters when there are changes in fermentation conditions. We conclude that, although the re-estimation is a time-consuming task, it is possible to accurately describe the process when there are changes in raw material composition if a re-estimation of parameters is performed.

Index Entries: Alcoholic fermentation; kinetic parameters estimation; mathematical modeling; Quasi-Newton algorithm; *Saccharomyces cerevisiae*; ethanol production.

Introduction

The interest in renewable energy sources tends to augment with the concern about exhaustion of fossil fuels and the increase in their price. The world meetings make clear that policies for renewable energy are essential to achieve sustainable development in a broad sense. Environmental protection, job creation, alleviation of external debts in developing countries, and security of supply are some of the key issues to mention (1). Bioethanol (ethanol from biomass) is an attractive, sustainable energy source. Modeling potentially reduces the cost of the alcoholic fermentation process development by eliminating unnecessary experimental work. It allows the study of

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

the various process parameters interactions through simulation. Besides, it provides understanding of the process, which is helpful for operational policy definitions and can be applied for posterior optimization and control.

There are many minor problems associated with the alcoholic fermentation process to be solved nowadays. Among them is the lack of robustness of the fermentation in the presence of fluctuations in operational conditions, which leads to changes in the kinetic behavior, with impact on yield, productivity, and conversion. These changes are very common in plants of alcoholic fermentation; they occur not only because of the variations in the quality of the raw material but also because of variations of dominant yeast in the process. Also, the alcoholic fermentation process is exothermic and small deviations in temperature can dislocate the process from optimal operational conditions.

Temperature has an important influence on the alcoholic fermentation process, because it is usually difficult to support a constant temperature during large-scale alcoholic fermentation and it affects productivity as well as microorganism viability. Besides, terms of temperature influence on ethanol fermentation kinetics can be useful in strategies for process optimization (2). Still, there are few works in the literature on the mathematical modeling of the fuel ethanol fermentation considering the effect of temperature on the kinetic parameters. (2–4).

In this work we perform kinetic parameters optimization in an alcoholic fermentation process. The kinetics was determined as function of temperature from batch fermentations at temperatures from 30 to 38°C. Based on experimental data, a differential model consisting of rate expressions for cell growth, substrate consumption, and product formation was proposed. The resulting model has eleven parameters, five of which are known to be temperature dependent. In order to describe this dependence, one set of parameters was estimated for each considered temperature and in a subsequent step an equation describing the temperature dependence of each parameter was fitted to the resulting data. The performance of the proposed model in the presence of changes in raw material composition is assessed before and after parameters re-estimation.

Materials and Methods

The microorganism used was *Saccharomyces cerevisiae*, cultivated in the Bioprocess Engineering Laboratory in the Faculty of Food Engineering/State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil and obtained from an industrial fermentation plant. The growth medium for the inoculum contained 50.0 kg/m³ of glucose, 5.0 kg/m³ of KH₂PO₄, 1.5 kg/m³ of NH₄Cl, 0.7 kg/m³ of MgSO₄·7H₂O, 1.2 kg/m³ of KCl, and 5.0 kg/m³ of yeast extract. The growth of microorganisms was performed in 500-mL flasks placed in a shaker at 30°C and 150 rpm for 24 h. The production medium was diluted using sugarcane molasses from an industrial ethanol fermentation plant. Sterilization was performed at 121°C for 20 min in autoclave.

Table 1
Initial Substrate Concentrations and Temperature
for Experiments

Experiments	$T(^{\circ}\text{C})$	S_0 (kg/m ³)
1	30	127.6
2	31.2	86.8
3	34	119.1
4	36.8	84.6
5	38	118.8
6	34	168.1

A bioreactor (Bioflow III System; New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) with temperature and agitation control systems through proportional and integral differential (PID) controllers was used. The total working volume was 5 L. Agitation was controlled at 300 rpm and performed with two flat blade turbine disk impellers, with six blades each. Temperature was controlled at the fixed value for each fermentation. Dry cell mass was determined gravimetrically after centrifuging for 15 min at 3300 rpm (1219.68g), washing, and drying the cells at 70°C. Biomass concentration is given by the weight difference divided by total sample volume.

Viable cells were counted with the methylene blue staining technique (5). In this work the cell viability during batch fermentation was always close to 100%. Total reducing sugar and ethanol concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (Varian 9010 model, Varian, Inc. Scientific Instruments, Palo Alto, CA). A SHODEX KS 801 column (Showa Denko, Tokyo, Japan) at 30°C was used. Ultrapure water obtained from Milli-Q Purification System (Millipore Corporation, Billerica, MA) containing Millipak membrane of 0.22 μm (diameter of pore) was mixed with H_2SO_4 (pH 1.4) and used as the eluent at a flow rate of 0.7 mL/min. The standards were mixed solutions of sucrose, glucose, fructose, and ethanol at concentrations from 0.1 to 40.0 kg/m³. The experiments were performed following the initial substrate concentrations and temperatures depicted in Table 1.

Parameter Estimation Problem

Batch Model

For batch fermentation process, the mass balance equations that describe the concentrations of biomass, substrate, and ethanol are:

$$\frac{dX}{dt} = r_x \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p \quad (3)$$

where X is the concentration of cell mass (kg/m^3), S is the concentration of substrate (kg/m^3), and P is the concentration of ethanol (kg/m^3). In this study the rates of cell growth, r_x ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$), substrate consumption, r_s ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$), and product formation, r_p ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$), were expressed as functions of temperature, as described below. For fermentation with *S. cerevisiae*, experimental data has shown that cellular, substrate and product inhibitions are of importance (2). In this study, the cell growth rate, r_x , includes terms for such types of inhibitions:

$$r_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \exp(-K_i S) \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n X \quad (4)$$

where $\mu_{\max}$ is the maximum specific growth rate (h^{-1}), K_s the substrate saturation parameter (kg/m^3), K_i is the substrate inhibition parameter (m^3/kg), $X_{\max}$ the biomass concentration when cell growth ceases (kg/m^3), $P_{\max}$ the product concentration when cell growth ceases (kg/m^3), and m and n are parameters of cellular and product inhibitions, respectively. Luedeking–Piret expression (6) was used to account for the ethanol formation rate, r_p .

$$r_p = Y_{px} r_x + m_p X \quad (5)$$

where Y_{px} is Luedeking–Piret growth associated constant (kg/kg) and m_p is the Luedeking–Piret nongrowth associated constant ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$). The substrate consumption rate, r_s , is given by:

$$r_s = (r_x/Y_x) + m_x X \quad (6)$$

This equation describes the sugar consumption during fermentation, which leads to cell mass and ethanol formation. Y_x and m_x are the limit cellular yield (kg/kg) and maintenance parameter ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$), respectively. The first term of Eq. 6 considers that part of substrate is used for cell growth and the second one, for cellular maintenance that is the energy used for basic cell functions. According to the above description, there are 11 parameters to be estimated from experimental observations and some of them are temperature-dependent parameters ($\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x , and Y_{px}). This temperature dependence can be described by the following expression (7):

$$\text{Temperature-dependent parameter} = A \cdot \exp(B/T) + C \cdot \exp(D/T) \quad (7)$$

Optimization Using the Quasi-Newton Algorithm

Let θ specify the parameters vector, which contains all the temperature-dependent parameters. The objective of the optimization problem is to find out θ by minimizing the objective function (8,9), $\min E(\theta)$:

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[\frac{(X_n - Xe_n)^2}{Xe_{\max}^2} + \frac{(S_n - Se_n)^2}{Se_{\max}^2} + \frac{(P_n - Pe_n)^2}{Pe_{\max}^2} \right] = \sum_{n=1}^{np} \epsilon_n^2(\theta) \quad (8)$$

The optimization is performed using the experimental data from fermentations in the temperature range of 30–38°C. Xe_n , Se_n , and Pe_n are the measured concentrations of cell mass, substrate, and ethanol at the n th sampling time. X_n , S_n , and P_n are the concentrations computed by the model at the n th sampling time. $Xe_{\max}$, $Se_{\max}$, and $Pe_{\max}$ are the maximum measured concentrations and the term np is number of sampling points. $\epsilon_n(\theta)$ is the error in the output owing to the n th sample. Equations 1–6 were solved using a FORTRAN program with integration by an algorithm based on the fourth-order Runge–Kutta method. In order to model the fermentation experiments, the temperature dependent parameters ($\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x , and Y_{px}) in Eqs. 4–6 were determined by minimizing Eq. 8 using a Quasi-Newton (QN) algorithm. The FORTRAN IMSL routine DBCONF was used for this purpose. The optimization problem was implemented as a nonlinear programming problem written as:

Minimize Eq. 8

Subject to $l_p \leq x_p \leq u_p$, $p = 1, \dots, 5$

where, x_p is the temperature-dependent parameters. The l_p and u_p are specified lower and upper bounds on the variables, with $l_p \leq u_p$. The parameters that are not temperature dependent had their values fixed according to the work of Atala et al. (2) as follows: $K_s = 4.1 \text{ kg/m}^3$, $K_i = 0.004 \text{ m}^3/\text{kg}$, $m_p = 0.1 \text{ kg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, $m_x = 0.2 \text{ kg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, $m = 1.0$, and $n = 1.5$. The optimization procedure was repeated for each temperature value (30, 31.2, 34, 36.8, and 38°C), resulting in five sets of the temperature dependent parameters ($\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x , and Y_{px}).

Influence of Temperature on the Kinetics

After the temperature dependent parameters were optimized by using the QN algorithm, they were described by Eq. 7 as functions of temperature. The Levenberg–Marquardt algorithm was used for fitting all constants (A , B , C , and D), whose values are presented in Table 2. This table also shows the coefficient of determination (r^2) of the parameters fitting. Figure 1 shows the resulting dependence of $\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x , and Y_{px} with temperature. The symbols (■) are the optimized values determined for each temperature using the QN algorithm and the lines represent the temperature dependence description of Eq. 7. It can be observed that the maximum specific growth rate occurs at a temperature of 34°C, considered the optimum condition for growth. Ethanol tolerance, limit cellular yield and $X_{\max}$ decreases with temperature as expected.

Table 2
Constant Values in the Eq. 7 and Coefficient of Determination
(r^2) of Parameters Fitting as Functions of Temperature for Batch Model
Optimized by QN

Parameter	(r^2)	A	B	C	D
$\mu_{\max}$	0.999	-2.98×10^5	-304.44	2.82×10^5	-302.18
$X_{\max}$	0.999	7.20×10^{-18}	1284.40	10.24	48.58
$P_{\max}$	0.999	6.01×10^{-22}	1588.05	106.33	-12.02
Y_x^x	0.999	-2.98×10^{-17}	1194.15	11.73	-5.60
Y_{px}	0.997	-4.10×10^{-78}	5111.34	0.01	33.72

Results

The mathematical model to be computed consists of Eqs. 1–6. The temperature dependent parameters $\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x^x , and Y_{px} are given by Eq. 7 with the constants (A, B, C, and D) shown in Table 2, the parameters, which are not temperature dependent are fixed according to Atala et al. (2). The profiles for ethanol, substrate, and biomass are shown in Fig. 2. It can be observed that the estimated model was able to fit batch experimental observations very satisfactorily and, therefore, the model can be applied for posterior optimization and controller process design. However, it should be stressed that when there are changes in operational conditions, the model kinetic parameters have to be re-estimated. It is worthwhile mentioning that, although the re-estimation is a time-consuming task, it is necessary to accurately describe the process when there are changes in raw material composition. Figure 3 shows the results for experiment 6 described in Table 1. The experimental data of this experiment were not used in the estimation procedure, but only to validate the model.

The residual standard deviation (RSD), Eq. 9, written as a percentage of the average of the experimental values, was the measurement used for characterizing the quality of the prediction of the model.

$$\text{RSD}(\%) = \left(\frac{\sqrt{\text{RSD}}}{\bar{d}_p} \right) 100 \quad (9)$$

where $\text{RSD} = \frac{1}{np} \sum_{p=1}^{np} (d_p - x_p)^2$ in which x_p and d_p are, respectively, the value predicted by the mathematical model and experimental value, $\bar{d}_p$ is the average of the experimental values, and np is the number of experimental points. The RSDs (%) for the batch model optimized by QN are shown in Table 3. The concentrations of biomass, substrate, and ethanol concentrations calculated using the resulting mathematical presented deviations of 4.9–23.3% from the experimental data.

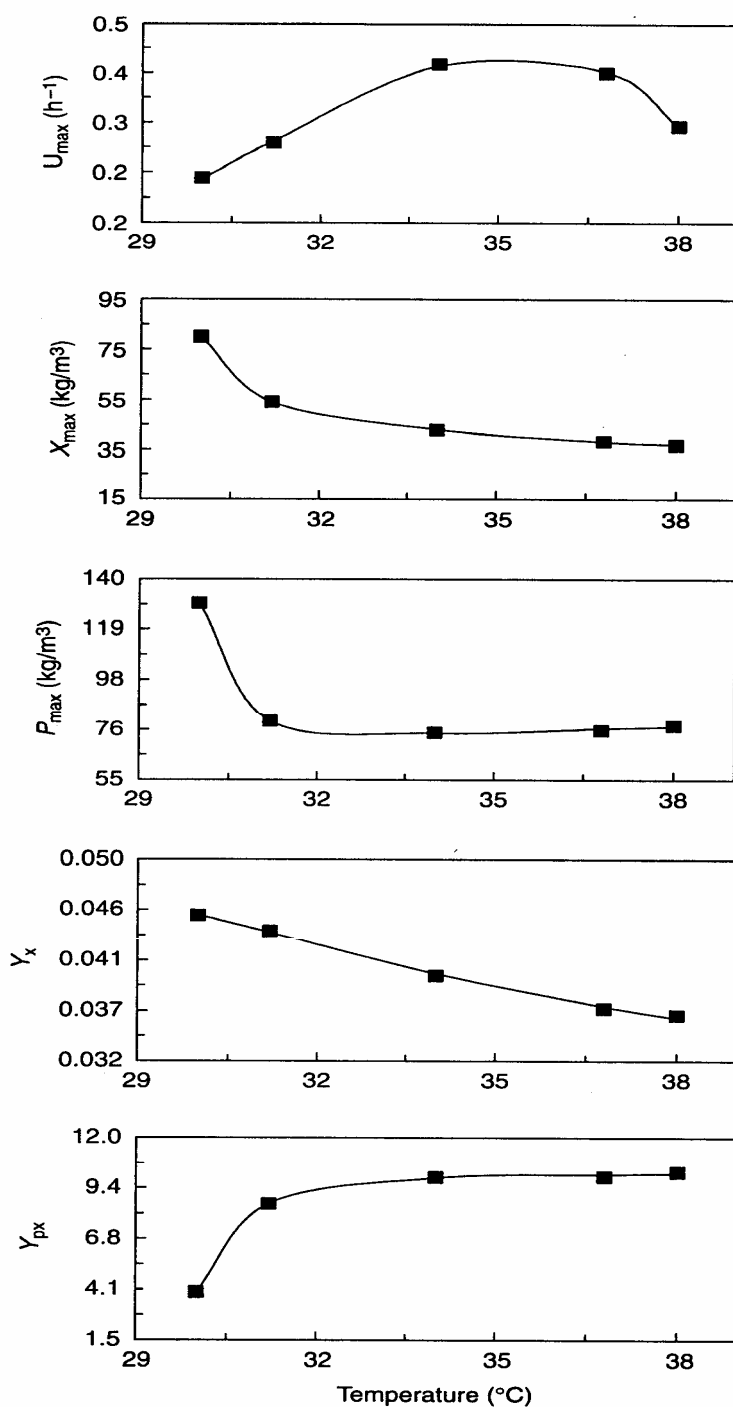


Fig. 1. Kinetic parameters optimized by QN algorithm at 30, 31.2, 34, 36.8, and 38°C, respectively.

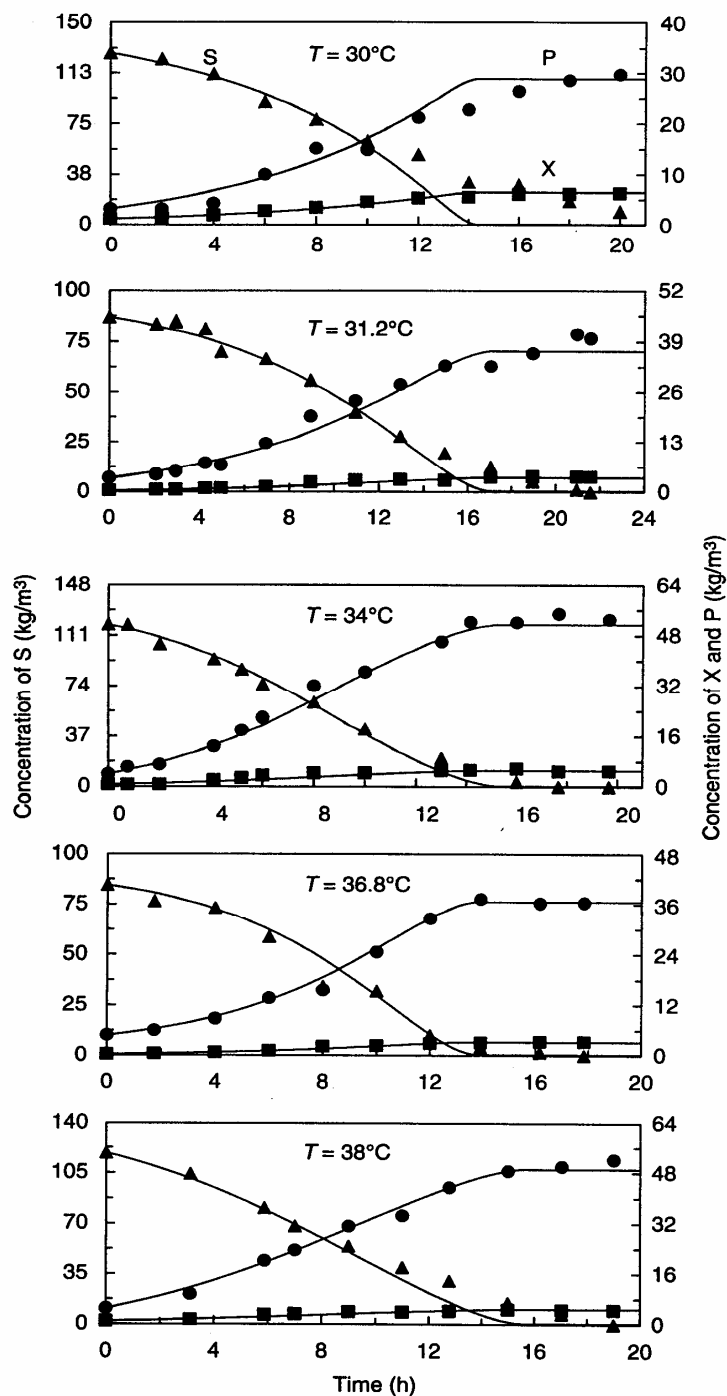


Fig. 2. Experimental and simulated data (QN—) from 30 to 38°C. Experimental data are for concentration of substrate, S (▲); cell mass, X (■); and ethanol, P (●).

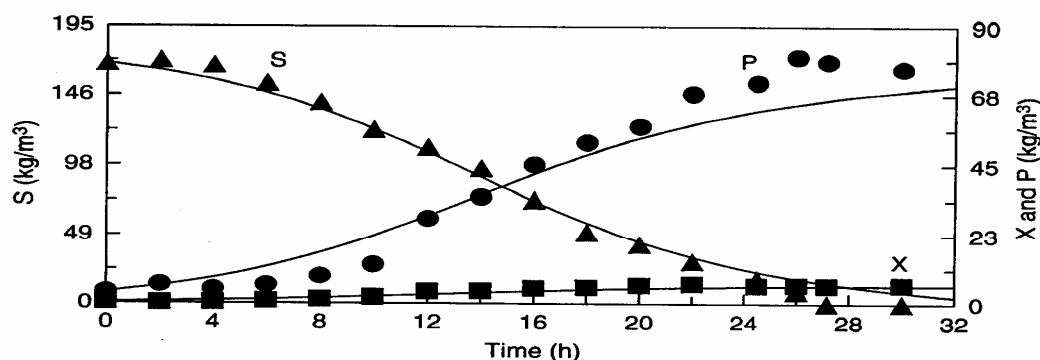


Fig. 3. Validation of the model. Experimental and simulated data for experiment 6 in Table 1. Experimental data are for concentration of substrate, S (▲); cell mass, X (■); and ethanol, P (●).

Table 3
RSDs (%) for the Batch Model

Output variable	RSD (%)				
	$T = 30^{\circ}\text{C}$	$T = 31.2^{\circ}\text{C}$	$T = 34^{\circ}\text{C}$	$T = 36.8^{\circ}\text{C}$	$T = 38^{\circ}\text{C}$
X	9.5	15.6	18.6	9.6	12.1
S	23.3	10.4	8.2	12.9	14.1
P	14.6	11.0	6.3	4.9	4.9

In order to test the model performance in the presence of fluctuations in raw material and culture medium compositions, an experiment performed at 34°C was considered. The only difference between this experiment and the experiments at 34°C shown in Figs. 2 and 3 are the molasses origin (molasses from a different harvesting) and the production medium, which, in this case, was diluted sugarcane molasses with addition of 1.0 kg/m^3 of yeast extract and 2.4 kg/m^3 of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The results are shown in Fig. 4A. The results after re-estimation of kinetic parameters are shown in Fig. 4B. The RSD (%) values for the model with and without parameters re-estimation are shown in Table 4.

Discussion

The main objective of this work is to evaluate mathematical models to describe the alcoholic fermentation process in the presence of changes in operational conditions and fluctuations in the quality of raw material. These models are important to enable dynamic behavior studies, determination of control structures, optimization, and design of process controllers. It is

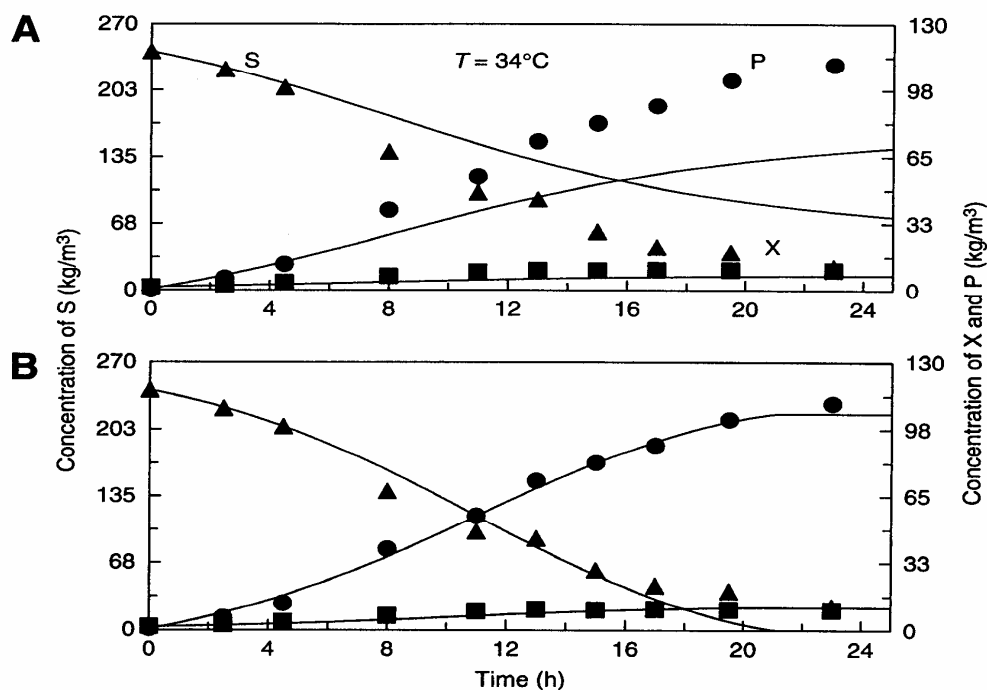


Fig. 4. Model performance in the presence of fluctuation in raw material composition. **(A)** Model without parameters re-estimation. **(B)** Model with parameters re-estimation. Experimental data are for concentration of substrate, S (▲); cell mass, X (■); and ethanol, P (●).

Table 4
RSD (%) for the Batch Model in the Presence of Fluctuations in Raw Material and Production Medium Compositions With and Without Parameters Re-estimation

Output variable ($T = 34^{\circ}\text{C}$)	RSD (%)	
	Without re-estimation	With re-estimation
X	39.7	17.4
S	36.1	13.2
P	45.3	4.8

well-known from past studies that models, which do not have their parameters re-estimated when changes in operational conditions occur, do not describe the process accurately. Also, the description of the temperature dependence by the model is very important, although it transforms the parameter re-estimation problem into a much more complicated optimization problem.

In this work a procedure is presented for parameters re-estimation to follow more accurately the process behavior when changes in operational

conditions take place. The general methodology consists on keeping the parameters that are not temperature dependent and estimating those ones that are affected by temperature. The fitting procedure makes use of a double exponential function to find out the best relationship between parameters and temperature. The profiles of biomass, substrate, and ethanol concentrations calculated using the resulting mathematical presented deviations from 4.9 to 23.3% of the experimental data.

Acknowledgments

The authors acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

Nomenclature

K_i	substrate inhibition coefficient (m^3/kg)
K_s	substrate saturation parameter (kg/m^3)
m	parameter used to describe cellular inhibition
m_p	ethanol production associated with growth ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)
m_x	maintenance parameter ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)
n	parameters used to describe product inhibitions
P	product concentration (kg/m^3)
$P_{\max}$	product concentration when cell growth ceases (kg/m^3)
r_p	kinetic rate of product formation ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
r_s	kinetic rate of substrate consumption ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
r_x	kinetic rate of growth ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
S	substrate concentration (kg/m^3)
T	temperature into the fermentor ($^{\circ}\text{C}$)
X	biomass concentration (kg/m^3)
$X_{\max}$	biomass concentration when cell growth ceases (kg/m^3)
Y_{px}	yield of product based on cell growth (kg/kg)
Y_x	limit cellular yield (kg/kg)
$\mu_{\max}$	maximum specific growth rate (h^{-1})

References

1. Goldemberg, J., Coelho, S. T., Nastari, P. M., and Lucon, O. (2004), *Biomass Bioenergy* **26**, 301–304.
2. Atala, D. I. P., Costa, A. C., Maciel, R., and Maugeri, F. (2001), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **91–93(1–9)**, 353–366.
3. Aldigui, A. S., Alfenor, S., Cameleyre, X., et al. (2004), *Bioproc. Biosyst. Eng.* **26**, 217–222.
4. Kalil, S. J., Maugeri, F., and Rodrigues, M. I. (2000), *Proc. Biochem.* **35(6)**, 539–550.
5. Lee, S. S., Robinson, F. M., and Wang, H. Y. (1981), *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 641–649.
6. Luedeking, R. and Piret, E. L. (1959), *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1**, 431–450.
7. Akerberg, K., Hofvendahl, K., Zacchi, G., and Hahn-Hägerdal, B. (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 682–690.
8. Wang, F. S. and Sheu, J. W. (2000), *Chem. Eng. Sci.* **55**, 3685–3695.
9. Wang, F. S., Su, T. L., and Jang, H. J. (2001), *Ind. Eng. Chem. Res.* **40**, 2876–2885.