

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM REATOR DE BANCADA DE LEITO FLUIDIZADO
PARA PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO LINHAGENS DE LEVEDURAS
FLOCULANTES**

Marcelo Caldeira Viegas
Engenheiro Químico, UEM, 1996

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta
ORIENTADOR

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

Campinas
Maio/1999

9915106



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	V671d
V.	Ex.
TOMBO BC/	38.309
PROC.	229.199
0	☐ 0 ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/08/99
N.º QTD.	

CM-00125690-2

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

V671d Viegas, Marcelo Caldeira
Desenvolvimento de um reator de bancada de leito fluidizado para produção de etanol utilizando linhagens de leveduras floculantes. / Marcelo Caldeira Viegas.-- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

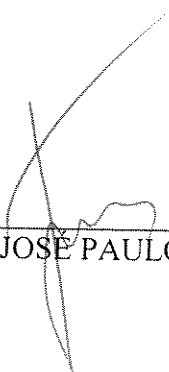
Orientador: Silvio Roberto Andrietta
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação. 2. Álcool. 3. Levedos. 4. Reatores fluidizados. 5. Planejamento experimental. 6. Floculação. I. Andrietta, Silvio Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 05 de maio de 1999 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:



PROF. DR. SÍLVIO ROBERTO ANDRIETTA
ORIENTADOR



PROF. DR. JOSÉ PAULO STUPIELLO



PROF.ª DR.ª. MARIA ISABEL RODRIGUES

Esta versão corresponde a redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pelo Eng. Marcelo Caldeira Viegas e aprovada pela Comissão Julgadora em 05/05/1999.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Andrietta', is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta

*Dedico este trabalho
à minha avó Mafalda (in memoriam) pelo
amor que sempre me dedicou...*

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Sílvio Roberto Andrietta, pela orientação, apoio e compreensão no desenvolvimento deste trabalho.
 - A Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta pela colaboração e esclarecimentos prestados.
 - A Cibele Stroppa pela colaboração no início deste trabalho.
 - A CAPES pelo suporte financeiro, na forma de bolsa de estudo.
 - A FAPESP pelo financiamento do projeto.
 - Aos meus Pais Wilson e Mercedes que sempre me incentivaram.
 - Aos colegas da FEQ pela amizade.
 - Aos professores da FEQ/DPB pelo ensino e auxílio.
 - Aos amigos: Cláudia, Milene, Marcia, Patrícia e Alessandro pela demonstração de amizade e apoio.
-

SUMÁRIO

Lista das Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Nomenclatura	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1- Evolução dos processos de fermentação alcoólica	4
2.2- Processos fermentativos para produção de etanol	5
2.2.1- Processos clássicos	5
2.2.2- Processo de batelada alimentada ou Melle-Boinot	6
2.2.3- Processo contínuo	7
2.2.3.1- Arranjo dos reatores	8
2.2.3.1.1- Fermentação em dorna única	9
2.2.3.1.2- Fermentação em Cascata	10
2.3- Bioquímica da fermentação alcoólica	10
2.4- Cinética da fermentação alcoólica	12
2.4.1 - Modelos Cinéticos	13
2.4.2- Utilização de parâmetros cinéticos para avaliação de linhagens industriais	17
2.5- Leito fluidizado	19
2.6- Bioreatores de leito fluidizado	21
3- MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1- Linhagens	25
3.2- Avaliação das linhagens	26
3.2.1- Capacidade fermentativa das linhagens	26
3.2.1.1- Condução do ensaio	26
3.2.1.2- Cálculo da capacidade fermentativa	26
3.2.2- Teste de floculação	28

3.2.2.1- Determinação da velocidade específica de sedimentação	28
3.2.2.2- Procedimento de cálculo	29
3.2.3- Determinação da velocidade específica máxima de crescimento	29
3.2.3.1- Metodologia para determinação de μ máx.	30
3.2.3.2- Cálculo de μ máx.	30
3.3- Estudo em fermentador de bancada	31
3.3.1- Inóculo	31
3.3.2- Substrato de alimentação	32
3.3.3- Descrição dos reatores	32
3.3.4- Testes preliminares	32
3.3.4.1- Operação do reator	33
3.3.4.2- Planejamento fatorial completo – testes preliminares	34
3.3.5- Otimização do sistema de reatores	36
3.3.5.1- Ensaio de otimização	38
3.4- Métodos analíticos	40
3.4.1- Determinação do etanol produzido	40
3.4.1.1- Preparo da amostra	40
3.4.1.2- Preparo da curva padrão	40
3.4.1.3- Análise das amostras	41
3.4.2- Determinação de açúcares redutores totais (método enzimático)	41
3.4.2.1- Preparo da curva padrão	41
3.4.2.2- Análise da amostra	41
3.4.3- Determinação dos açúcares redutores totais (DNS)	42
3.4.3.1- Preparo da curva padrão	42
3.4.3.2 - Análise das amostras	42
3.4.4- Determinação da massa celular produzida (massa celular)	43
3.4.5- Determinação da concentração celular no interior dos reatores	43
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1- Avaliação das linhagens	44
4.1.1- Capacidade fermentativa das linhagens através de testes em “shaker”	44
4.1.2- Capacidade de floculação	45

4.1.3- Velocidade específica máxima de crescimento	48
4.2- Seleção da cepa	49
4.3- Planejamento fatorial completo – testes preliminares	49
4.3.1- Rendimento	50
4.3.2- Produtividade	58
4.3.3- Definições da faixa ótima	63
4.4- Otimização do sistema de fermentação proposto	65
4.4.1- Rendimento	66
4.4.2- Produtividade	67
4.4.3- Definições da faixa ótima de operação do sistema proposto	77
5- CONCLUSÕES	79
6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	80
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01: Cepas testadas na etapa de caracterização	25
Tabela 02: Ensaios realizados na etapa de testes preliminares	36
Tabela 03: Ensaios realizados no planejamento fatorial linear – otimização	39
Tabela 04: Valores dos parâmetros para o cálculo da capacidade fermentativa	44
Tabela 05: Velocidade específica de sedimentação	46
Tabela 06: Valores de $\mu_{\text{máx}}$.	48
Tabela 07: Ensaios realizados no planejamento fatorial completo – testes preliminares	50
Tabela 08: Estimativa dos efeitos no rendimento	51
Tabela 09: Coeficientes de regressão para o modelo quadrático – rendimento	53
Tabela 10: Tabela ANOVA – Rendimento	54
Tabela 11: Estimativa dos efeitos principais e de interação – Produtividade	58
Tabela 12: Efeitos principais e de interação – Produtividade	59
Tabela 13: Coeficientes de regressão do modelo de 1º ordem – Produtividade	60
Tabela 14: Tabela ANOVA – Produtividade	60
Tabela 15: Ensaios realizados no planejamento fatorial linear – sistema proposto	65
Tabela 16: Estimativa dos efeitos sobre o rendimento – sistema proposto	66
Tabela 17: Estimativa dos efeitos principais e de interação – Produtividade	68
Tabela 18: Estimativa dos efeitos principais e de interação – Produtividade	69
Tabela 19: Coeficientes de regressão para o modelo 1º ordem – Produtividade	70
Tabela 20: ANOVA – Produtividade Sistema proposto	71

NOMENCLATURA

c, d	Parâmetros da equação 10	
D	Taxa de diluição	h^{-1}
K_1	Constante nas equações 4 e 5	
K_2	Constante na equação 4	
K_4	Constante na equação 5	
K_s	Constante de Monod	
K_a, K_b, K_c	Constantes	
n	Potência	
P	Concentração de produto (etanol)	(Kg/m^3)
P_m	Concentração máxima de etanol acima da qual não há crescimento	(Kg/m^3)
$P_{máx}$	Concentração de etanol onde o crescimento celular cessa	(Kg/m^3)
Prod.	Produtividade em etanol	$(Kg_{etOH}/m^3.h)$
r_x	Taxa de produção de células	
S	Concentração de substrato	(Kg/m^3)
X	Concentração celular	(Kg/m^3)
$Y_{p/s}$	Rendimento de reação: Produto formado/ substrato consumido	
$Y_{x/s}$	Produção de células: massa celular produzida/ substrato consumido	

Letras Gregas

$\mu_{máx}$	Taxa específica máxima de crescimento	(h^{-1})
μ	Taxa específica de crescimento	(h^{-1})
μ_i	Taxa específica máxima de crescimento à concentração zero de etanol	(h^{-1})
λ	Comprimento de onda	(nm)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de fermentação contínua operando com reator tipo torre utilizando linhagens de leveduras flocculantes isoladas de processo industrial (Destilaria Diana safra 95/96). A cepa a ser utilizada no reator foi selecionada em função de sua capacidade de floculação, uma vez que essa característica é o principal requisito para manutenção da linhagem imobilizada no reator. Outras características associadas a performance fermentativas das cepas também foram avaliadas (velocidade de crescimento, velocidade de consumo de substrato e rendimento em etanol). Os testes do sistema foram realizados em dois reatores de vidro (diâmetro de 5,8 cm e 78 cm de altura) tipo torre ligados em série. Os testes foram realizados em duas etapas. A primeira etapa inclui testes preliminares aonde se estudou a operacionalidade do reator frente a variação na concentração de ART de alimentação e tempo de residência. Nestes testes obteve-se produtividade de até 10,14 mL etOH/L. h (8,00 g etOH/ L. h) Entretanto os rendimentos não foram satisfatórios (50,58 %). Isto foi associado a passagem de todo CO₂ produzido no primeiro reator para o segundo, fato este que impediu a formação de um leito estável no mesmo. Na segunda fase de testes eliminou-se para o meio externo parte do CO₂ produzido no primeiro reator, tornando possível a formação de um leito estável no segundo. Foram estudados os efeitos da variáveis concentração de ART na alimentação, vazão de reciclo no segundo reator, tempo de residência e relação diâmetro/altura dos reatores sobre o rendimento e a produtividade do sistema. Observou-se que a concentração de ART na alimentação e o tempo de residência são as variáveis que mais interferem na produtividade do sistema. Nestes ensaios foi possível obter valores de produtividade de até 19,44 mL etOH/L. h (15,40 g etOH/L. h) mantendo-se os valores de rendimento elevados (na faixa dos 93%). O rendimento não foi afetado por nenhuma variável estudada dentro das faixas de valores avaliados. Todos os ensaios foram conduzidos segundo planejamento experimental fatorial e os resultados avaliados através de superfície de resposta.

ABSTRACT

The purpose of this work was to develop a continuous fermentation system operating with a tower-type reactor using flocculating yeast strains isolated from industrial process (Diana Distillery, 95/96 harvest season). The strain used in the reactor was selected taking into account its flocculation capacity, since this characteristic is the main requirement for maintaining the strain immobilized in the reactor. Other characteristics associated with the fermentative performance of strains have also been evaluated (growth rate, substrate consumption rate and ethanol yield). The system tests were performed in two tower-type glass reactors (5,8 cm in diameter and 78 cm high) connected in series. The tests were carried in two stages. The first included preliminary tests in which it was studied the reactor's operativeness at varying feeding ART (total reducing sugars) concentration and residence time. Although it was obtained a productivity of up to 10,14 mL etOH/L. h (8,00 g etOH/L. h) in these tests, the yields were not satisfactory (50,58%). This fact was associated with the passage of all CO₂ produced in the first reactor to the second, preventing the formation of a stable bed in it. In the second stage of tests it was eliminated part of the CO₂ produced in the first reactor, making it possible for a stable bed to be formed in the second reactor. The effects of the variables of ART concentration in feeding, recycle flow in the second reactor, residence time and the diameter/height relation of the reactors on the yield and the productivity of the system were studied. It was observed that the ART concentration in feeding and the residence time are the variables that most interfere in the productivity of the system. It was possible obtain productivity values of up to 19,44 mL etOH/L. h (15,40 g etOH/L. h) while keeping high yield values (around 93%). Yield has not been affected by any studied variable within the evaluated value range. All trials followed a factorial experimental design and the results were evaluated based on the response surface.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a produção industrial de etanol sempre esteve associada à indústria açucareira e atualmente o álcool concorre em condições de igualdade para a viabilidade geral do empreendimento.

A partir da crise do petróleo, nos anos 70, a produção de etanol ganhou importância e tornou-se a principal alternativa no programa de combustíveis para a substituição da gasolina. Com a criação do Proalcool, o Brasil foi o primeiro país do mundo a desenvolver um programa em larga escala para a produção de combustíveis alternativos. Em consequência desse fato, nos últimos 20 anos, as pesquisas tem se intensificado visando melhorar o rendimento da produção industrial de etanol e obter custos competitivos em relação aos dos outros combustíveis.

O processo utilizado na produção industrial de etanol era do tipo descontínuo (batelada), até a década de 40. Esse processo evoluiu para o sistema de batelada alimentada que consiste na recirculação de células (Melle Boinot), levando a um notável aumento de rendimento e produtividade, com consequente redução nos custos de produção. Atualmente esse processo semi-contínuo é utilizado em grande parte das indústrias dedicadas à produção de etanol.

A fermentação contínua é uma evolução natural do processo de batelada alimentada e, embora tenha sido desenvolvida há várias décadas, só começou a ser utilizada na produção industrial na metade dos anos 80. Uma das principais vantagens do processo contínuo é a redução dos tempos não produtivos (limpeza de equipamento, carga e descarga, etc...) com consequente aumento na produtividade. Além disso, nos processos contínuos é possível trabalhar em condições estáveis durante a fermentação o que favorece o desempenho do microrganismo.

As primeiras instalações industriais de fermentação contínua apresentaram diversos problemas: elevados níveis de contaminação com baixos rendimentos, problemas hidráulicos para a manutenção de um fluxo constante de alimentação e retirada do vinho fermentado, acúmulo de sólidos nas dornas, impossibilidade de tratar e armazenar todo o fermento durante as paradas

prolongadas, etc... Esses problemas desestimularam a rápida adoção dessa tecnologia entre as unidades produtoras.

O desenvolvimento tecnológico possibilitou a solução de parte dos problemas das primeiras unidades de fermentação contínua. Esse fato, associado à necessidade de melhorar constantemente a produtividade, contribuiu decisivamente para a difusão dessa tecnologia. Atualmente cerca de 40% das unidades industriais brasileiras trabalham com processos de fermentação contínua (ZAPPELLON & ANDRIETTA, 1992).

Processos alternativos que minimizem o custo da produção de etanol tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisadores. A eliminação das separadoras centrífugas, pelo alto custo de instalação e manutenção, tem sido o alvo dessas pesquisas. A utilização de decantadores como forma de separação das células é uma alternativa considerada. Alguns projetos foram instalados em unidades industriais com resultados não satisfatórios. O insucesso desses sistemas incluem tanto a dinâmica lenta do mesmo como as condições desfavoráveis em que a levedura é exposta (alta concentração de etanol e baixa concentração de substrato).

Os estudos em escala piloto de fermentação contínua com leveduras flocculantes tiveram início nos anos 80. O objetivo desses processos era trabalhar com um microrganismo que, em função de suas características flocculantes, permitisse eliminar a fase de centrifugação necessária para separar as células do vinho fermentado, uma vez que esta etapa tem um custo elevado. A Inter - UHDE Engenharia Química Ltda. (subsidiária da HOESCHT) desenvolveu, na Alemanha, um processo de fermentação contínua usando uma linhagem de leveduras flocculantes selecionado por eles. Esse processo foi testado em escala piloto, pela primeira vez no Brasil, na Usina Da Barra (Barra Bonita - SP) e posteriormente foi introduzido em escala industrial na Destilaria Diana (Avanhandava - SP). O processo não obteve a performance esperada uma vez que a levedura introduzida não se mantinha no processo pois era substituída por leveduras introduzidas pelo mosto, não flocculantes, inadequadas a condução do mesmo. Algumas modificações no sistema de fluxo destes reatores foram feitas por Pesquisadores do CPQBA/UNICAMP. Estas tornaram possível o estabelecimento de leveduras flocculantes naturais da região no processo, transmitindo

ao mesmo uma maior estabilidade. Atualmente a produtividade atingida por esta unidade está próximo de 18 L de etanol/ litro de reator por hora, enquanto os processos contínuos com centrifugação de células otimizados atingem 12 L etanol/L. h. Isto é decorrente do fato de que quando se trabalha com reatores de leito fluidizado é possível operar o processo com altas concentrações de células no interior do mesmo (45% v/v), e ainda possui a vantagem de não necessitar de operações subsequentes para se separar as células do vinho fermentado. Em reatores contínuos com centrifugação de células não seria vantajoso economicamente trabalhar com concentrações tão altas de células uma vez que seria necessário um grande número de centrifugas para a separação das mesmas, o que inviabilizaria do ponto de vista econômico o processo, pois estes equipamentos são caros e requerem manutenção periódica, além de consumirem uma quantidade de energia considerável. Apesar de apresentarem bons resultados é necessário ainda estudos de otimização do processo industrial, pois não foi possível operar em condições de fermentação que permitam a total eliminação da fase de centrifugação para a separação das células.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de fermentação contínua operando com reator tipo torre utilizando linhagens de leveduras autoimobilizáveis isoladas de processo industrial (Destilaria Diana safra 95/96), que permite o acúmulo de células em seu interior dispensando, desta forma, a necessidade de utilização de unidade de separação. A cepa utilizada no reator foi selecionada em função de sua capacidade de floculação, uma vez que essa característica é o principal requisito para manutenção da linhagem imobilizada no reator. Outras características associadas a performance fermentativas das cepas também foram avaliadas (velocidade de crescimento, velocidade de consumo de substrato e rendimento em etanol). Os testes do sistema foram realizados em dois reatores de vidro (diâmetro de 5,8 cm e 78 cm de altura) tipo torre ligados em série, para simular a operação da planta industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. EVOLUÇÃO DOS PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Mesmo sendo conhecida há muito tempo, a fermentação alcoólica aplicada à produção industrial de etanol propriamente dita iniciou-se a partir do século XIX. Anterior a este século o que se produzia, na verdade, era aguardente (ALMEIDA, 1940).

Um grande avanço na produção industrial de etanol foi alcançado na década de 30, quando surgiu na França o processo Melle-Boinot (ALMEIDA, 1960). Segundo LIMA (1960), até o início dos anos 60 os processos de corte e de utilização de pé-de-cuba individual (clássico) eram bastante utilizados na fermentação de melaço nas indústrias brasileiras. DREWS (1964) comenta que estes processos após 1964 estavam presente somente em destilarias de pequeno porte e estava sendo rapidamente substituído pelo processo Melle-Boinot (batelada alimentada com reciclo de células).

A utilização do processo Melle-Boinot nas plantas de produção de etanol brasileiras se generalizou no final da década de 60 e nos anos 70. Segundo ZARPELLON & ANDRIETTA (1992) todas as destilarias instaladas quando da criação do Programa Nacional do Alcool (1976), foram equipadas com este processo.

A eficiência do processo Melle-Boinot unida aos problemas das primeiras plantas de fermentação contínua surgidas no Brasil atrasaram a implantação deste processo na indústria, já que a grande maioria das instalações contínuas daquela época eram adaptações de baixo custo feitas em processos de bateladas pré-existentes. Segundo FINGUERUT *et al.* (1992), apesar da fermentação contínua ser uma evolução natural do processo batelada-alimentada, não é um desenvolvimento recente. Estes mesmos autores citam a existência de instalações industriais na França na década de 30, operando com melaço de beterraba.

BORZANI (1960) cita vários trabalhos sobre fermentação contínua dando como vantagens desse processo: maior produtividade; maior uniformidade do produto; e maior adaptabilidade para automação. Segundo este mesmo autor, na década de 60 eram poucos os casos onde os processos fermentativos contínuos apresentavam aplicação industrial. A utilização do processo contínuo de fermentação alcoólica na indústria brasileira iniciou-se nos anos 70.

Segundo ZAPERLLON & ANDRIETTA (1992) o interesse pelo processo de fermentação alcoólica contínua foi acelerado no Brasil a partir da última década, como forma de se reduzir os custos de produção, de modo a reduzir o volume de vinhoto produzido e o consumo de vapor necessário. Atualmente cerca de 40% das unidades industriais brasileiras trabalham com processos de fermentação contínua.

Alguns estudos de processos alternativos para produção de álcool tem sido realizados. O estudo em escala piloto de fermentação contínua utilizando leveduras floculantes tiveram início nos anos 80. O objetivo desses processos era trabalhar com leveduras que, em função de suas características floculantes, permitisse eliminar a fase de centrifugação necessária para separar as células do vinho fermentado. Segundo BU⁷-LUCK (1983) os sistemas de reatores de leito fluidizado com células de leveduras floculantes apresentam alta estabilidade e produtividade (25 L etanol/ L. h), enquanto que os processos contínuos otimizados com centrifugação de células atingem 12 L etanol/L. h.

2.2. PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Em geral a obtenção de etanol via fermentação alcoólica se dá através de três tipos de processos: batelada, batelada alimentada (Melle-Boinot) e contínuo.

2.2.1. Processos Clássicos

Os processos de fermentação alcoólica convencionais, utilizando-se novo inóculo a cada batelada ou o sistema de cortes, foram amplamente utilizado pelas destilarias nacionais até o início

dos anos 60 (DREWS, 1964). Nestes processos, um certo volume de mosto contendo 100-200 g/L de açúcar é inoculada por parte de uma dorna em estágio final de fermentação (corte) ou por uma cultura nova, recém ativada em laboratório. A fermentação é considerada concluída quando a cuba “morre”, ou seja, quando cessa a atividade biológica por falta de nutrientes ou por excesso de produto inibidor (etanol). Neste ponto o etanol é recuperado por destilação e o reator sanitizado para nova batelada.

A batelada convencional tem como principal desvantagem a baixa produtividade, tempo de processamento elevado e dificuldade operacional nas dornas (tempos de preparação prolongados, sanificação periódica e manuseio de inóculo constante).

Segundo MAIORELLA *et al.* (1981) o processo batelada é lento. Em função tanto do tempo gasto para o preparo do reator como pela baixa velocidade da fermentação.

2.2.2. Processo Batelada Alimentada ou Melle-Boinot

Segundo DREWS (1964), o processo clássico de batelada foi rapidamente substituído pelo processo Melle-Boinot em meados dos anos 60. O processo se baseia na alimentação contínua e crescente do substrato ao fermentador (sem purga e até o volume máximo deste), seguindo a curva de crescimento da massa celular e conseqüente taxa de consumo de substrato, de maneira que as concentrações de açúcares totais permaneça constante (em torno de 1,5-3,0 g/L) no reator. Na prática, essas concentrações reduzidas e constantes de açúcares não são observadas, operando-se em concentrações maiores e crescentes no decorrer do enchimento. Outra inovação do processo foi a utilização de um tratamento ácido (pH entre 2,5 a 4,5) do creme de leveduras, com a finalidade de eliminar contaminantes e utilização deste como inóculo para a próxima batelada.

Apesar dos ganhos obtidos em rendimento, operacionalidade da planta e tempo de processamento, o processo de fermentação contínua apresenta-se como uma alternativa de evolução por apresentar grande potencial para redução de custos de produção.

2.2.3. Processo Contínuo

Segundo ANDRIETTA (1994), o processo de fermentação alcoólica contínua pode ser dividido em 3 partes: unidade de tratamento ácido, unidade de separação de células de leveduras e fermentadores. As células de leveduras, após terem sido submetidas ao tratamento ácido (fermento tratado), deixam as unidades de tratamento e são misturadas com o meio de alimentação (mosto). Esta mistura é então enviada aos fermentadores. A fração entre a vazão de fermento tratado e a vazão total de alimentação dos fermentadores é chamada de taxa de reciclo. Após ocorrida a transformação dos açúcares em etanol, o vinho fermentado contendo células de leveduras (vinho bruto) é enviado para a unidade de separação. Esta unidade é constituída de separadoras centrífugas de prato que trabalham a uma velocidade angular de 8000 rpm. Estas separadoras recebem o vinho bruto contendo de 30 a 45 g de células por litro de vinho e fornecem 2 produtos: uma fase leve e outra pesada. A fase pesada contendo entre 160 a 200 g de células por litro é chamada de creme de levedura. Este creme é enviado para a unidade de tratamento ácido. A fase leve, praticamente isenta de células de levedura (concentração máxima permitida 3 g de células por litro) é chamado de vinho delevedurado e é enviado ao tanque pulmão da unidade de destilação, também chamado de dorna volante.

O número total de dornas de fermentação e o volume relativo de cada uma delas tem sido objeto de estudo para diversos pesquisadores. GHOSE & TYAGI (1979) concluíram que na operação utilizando-se duas dornas iguais em série, o volume total de reatores é 58% menor que usando-se um reator. Mais recentemente, em trabalho de simulação, ANDRIETTA (1994) concluiu que o sistema ótimo é constituído por quatro reatores de mistura perfeita ligados em série com 1,5; 1,9; 2,2; e 1,45 horas de tempo de residência.

GUERREIRO (1995) cita que o avanço tecnológico gerado pela adoção de técnicas modernas (cinética microbiana adequada, otimização, simulação de processos via computador e projetos específicos) aliados à fermentação contínua, podem trazer os seguintes benefícios: modernização da usina; redução dos gastos de mão-de-obra; aumento de produtividade; trabalho

em estado estacionário; redução de insumos; uniformidade do produto; e maior controle operacional do processo.

CYSEWSKI & WILKE (1978) e MAIORELLA *et al.* (1984) realizaram estudos comparativos e avaliações econômicas dos diversos processos existentes para a produção de etanol via fermentativa. Ambos os trabalhos citam que os gastos com matérias primas (principalmente melaço) representam cerca de 70% do custo total de produção do etanol, mas melhorias são observadas nos processos contínuos em relação ao processo batelada. MAIORELLA *et al.* (1984) simulando uma destilaria para produção de 10^9 L/ano de etanol 95% v/v, concluíram que o custo total de produção na fermentação contínua com reciclo de células operando com concentração celular de 100g/L e produtividade de 42,5 g/L.h é de \$0,49/L, e para uma fermentação contínua com concentração celular de 20g/L e produtividade 14,1g/L.h está em \$0,51/L, enquanto que para uma fermentação batelada tradicional cuja concentração celular no final da fermentação é de 21 g/L e produtividade 11,8g/L.h é de \$0,53/L. Porém ganhos significantes no investimento de capital fixo são demonstrados por CYSEWSKI & WILKE (1978). Estes demonstraram uma redução de 57% no capital investido em destilarias contínuas quando comparadas ao processo de batelada tradicional. Reduções maiores, na ordem de 68 e 71% são conseguidos respectivamente para os processos via fermentação contínua com reciclo de células e de operação à vácuo.

Como demonstrado por PAIVA *et al.* (1996) é possível operar um reator, de forma contínua, tipo torre com alta concentração de células e alta produtividade (18 g etOH/L.h) utilizando decantadores como unidade de separação quando a cepa de levedura utilizada possui características floculantes, o que diminui os custos de produção deste combustível.

2.2.3.1. Arranjo dos Reatores

Segundo ZAPERLON & ANDRIETTA (1992) vários processos para fermentação contínua tem sido utilizados e alguns dos quais não tiveram êxito. Os principais processos podem ser divididos em dois grupos: *Fermentação em dorna única* onde todo o processo é realizado numa

única dorna, de mistura completa, onde o teor de açúcares e de álcool é constante e *Fermentação em cascata* onde as dornas individuais são conectadas em série, passando-se consecutivamente de uma para outra, assemelhando-se a uma “cascata”.

2.2.3.1.1. Fermentação em Dorna Única

Três processos de fermentação em dorna única foram testados no Brasil: Biostil, Hoechst-Uhde e Fercen. ZAPERLON & ANDRIETTA (1992) descrevem as principais características de cada um desses processos:

a) *Processo Biostil* :Foi desenvolvido pela Alfa-Laval e no início dos anos 80 introduzido no Brasil através da Codistil. O Processo visa o processamento de subprodutos com alto brix e a recirculação de vinhaça para a preparação do mosto e desta forma, produzir baixos volumes de vinhoto. Devido a alta pressão osmótica do meio, é utilizada uma levedura específica para aquelas condições. O creme de leveduras obtido das separadoras de fermento é reciclado sem diluição. Ácido sulfúrico é utilizado de forma a manter um pH de 4,5. O processo Biostil foi abandonado, devido as dificuldades de se manter condições estáveis na fermentação.

b) *Processo Hoechst-Uhde*: Este processo visa eliminar o uso das separadoras de fermento e, para isto, uma levedura floculante é utilizada. O fermentador é basicamente uma torre onde o diâmetro no topo era maior que o corpo, objetivando servir como separador das leveduras. O vinho saindo da torre é enviado para outro tanque de sedimentação para nova separação de leveduras, que são recicladas ao fermentador principal. Ácido sulfúrico e eventualmente ácido fosfórico são adicionados para manter o pH em 4,0 durante a fermentação. As dificuldades de operação do sistema devido a performance irregular, baixo teor alcoólico e baixa eficiência levaram ao abandono do processo.

c) *Processo Fercen* : O processo Fercen introduzido pelo Engenho Novo, opera com fermentadores individuais em paralelo, onde a fermentação é feita em dornas agitadas. A concentração de açúcar é mantida abaixo de 1 g/L. O vinho saindo das dornas é enviado para

separadoras de fermento, sendo o creme de leveduras reciclado, sem diluição, às dornas. Eventualmente ácido sulfúrico é adicionado usando-se misturadores.

2.2.3.1.2. Fermentação em Cascata

Há, no mínimo, 4 processos principais de fermentação em cascata operando com sucesso no Brasil: da Usina Vale do Rosário, Copersucar, Codistil e BIOES. Na essência, todos os processos de fermentação em cascata são similares, sendo as principais diferenças nas estratégias de superar o acúmulo de sólidos no fundo das dornas e do número de estágios que utilizam. Aonde boas condições de operação estão presentes, a fermentação em cascata mostra um comportamento muito ativo, especialmente no primeiro e segundo estágios onde grande desprendimento de dióxido de carbono pode ser observado. Todos os processos de fermentação em cascata praticados no Brasil operam com reciclagem das leveduras para obter alta velocidade de fermentação e alto teor alcoólico (10 °GL), com eficiências normalmente na ordem de 90% (ZAPERLON & ANDRIETTA, 1992).

2.3. BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

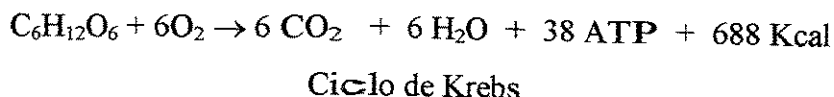
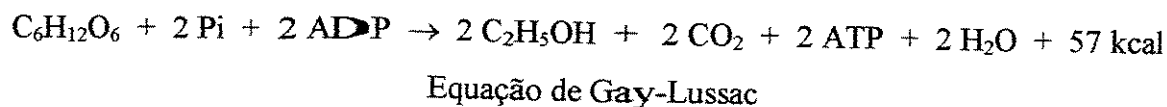
A levedura como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto desse processo. Se o homem pretende beneficiar-se dessa habilidade metabólica, ele deve buscar os conhecimentos que lhe permitam propiciar às leveduras, condições ideais para que as mesmas trabalhem a seu favor, isto é, com maior eficiência na produção de etanol. A célula de levedura, possui compartimentos para adequação de sua atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração), se dá na mitocôndria (AMORIM *et al.*, 1996).

As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes dos fungos. As células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam-se normalmente na forma unicelular e

com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Estas se reproduzem basicamente por brotamento, onde a célula mãe, após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula.

Existem dois ciclos distintos que definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação de levedura. O primeiro, denominado glicólise, tem a função de “quebrar” a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que se situam na parede celular e no interior da célula. Na ausência de oxigênio há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. A equação de Gay-Lussac faz um balanço desta etapa. Porém, na presença de oxigênio há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, onde este será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água.

O balanço global dos dois ciclos pode ser resumido pelas equações:



A reação global da glicólise demonstra que 1 mol de glicose (180g) produz 2 moles de etanol (92g), 2 moles de dióxido de carbono (88g) e 57 kcal de energia. Assim, o rendimento teórico ($Y_{P/S}$) para a produção de etanol é de 0,511 g/g. Na prática, segundo OURA (1974), este valor não é observado devido a utilização de parte da glicose para produção de glicerol e álcoois superiores, substâncias necessárias para síntese de material celular e manutenção da levedura.

Além da presença ou ausência de oxigênio, a disponibilidade de açúcar pode afetar o metabolismo das leveduras. OKADA (1981) cita o efeito Crabtree, que é o incremento na produção de etanol em concentrações de glicose superiores a 0,5-1,0 g/L (independentemente da

concentração de oxigênio) como prejudicial ao processo de produção de leveduras de panificação, pois parte do açúcar disponível é convertida a etanol e dióxido de carbono em detrimento à biomassa, reduzindo o rendimento. Em contrapartida, o efeito Pauster, causa um elevado rendimento celular em condições de aerobiose e concentração de glicose inferiores a 1,5 g/L, diminuindo-se assim a taxa de fermentação alcoólica ou glicólise anaeróbia.

Assim, frente ao número elevado de reações catalisadas enzimaticamente no metabolismo celular, fatores como pH, temperatura, pressão, concentração de reagentes, concentração de micronutrientes, etc., afetam os parâmetros cinéticos que definem as taxas de reprodução celular, consumo de substrato e produção de etanol.

2.4. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é o de quantificar a taxa de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados. Esse estudo permite ainda compreender a influência de fatores externos como pH, temperatura, inibidores, etc. nestas taxas. No caso da fermentação alcoólica, estes valores são essenciais para se projetar adequadamente uma unidade industrial de produção de etanol.

BAILEY & OLLIS (1986) classificaram os modelos cinéticos em : não-estruturados e não-segregados (células tratadas como soluto monocomponente), estruturados e não-segregados (multicomponente com composição média semelhante), não-estruturados e segregados (seres individuais distintos, multicomponentes) e, estruturados e segregados (indivíduos distintos, multicomponentes). Para o estudo da fermentação alcoólica, o modelo não-estruturado e não-segregado é o mais utilizado para descrever o comportamento das variáveis envolvidas.

2.4.1. Modelos cinéticos

A equação de Monod relaciona matematicamente de maneira simples a taxa específica de crescimento celular à concentração do substrato limitante de crescimento:

$$\mu = \mu_{\max} * \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

onde $\mu_{\max}$ é a taxa máxima de crescimento celular, S a concentração do substrato limitante e K_s a constante de Monod.

A constante de Monod representa o valor de S no qual a taxa específica de crescimento é a metade do seu valor máximo. A equação de Monod considera que todos os componentes do meio de cultura, menos um, estão presentes em altas concentrações, tal que mudanças nestas condições não afetem significativamente a taxa de crescimento celular. Assim, um simples componente torna-se limitante (substrato), e somente as variações na concentração deste componente causariam alterações no comportamento do meio. Entretanto, a equação de Monod somente é aplicável quando não há presença de inibidores de crescimento no meio de cultura, ou quando estes estão em quantidades que não afetem a taxa de crescimento celular.

A taxa específica de crescimento pode ser afetada pela presença de inibidores no meio de cultura, como substratos ou produtos formados. O fenômeno de inibição pelo substrato é normalmente menos importante do que a inibição pelo etanol. DOURADO *et al.* (1987) propõe o seguinte modelo:

$$\mu = \mu_{\max} * \frac{S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_4} \right)} \quad (2)$$

enquanto que THATHIPAMALA (1992) utiliza:

$$\mu = \mu_{\max} * \left(\frac{S_{\max} - S}{S_{\max} - S_{\min}} \right) \quad (3)$$

onde $S_{\max}$ é a máxima concentração de substrato acima da qual não existe crescimento celular e $S_{\min}$ a concentração onde se inicia o efeito de inibição.

MOULIN *et al.* (1980) propuseram duas expressões para representar a inibição pelo substrato: a equação (4) para $S > 100$ g/L e $P < 32$ g/L, e a equação (5) para $S > 100$ g/L e $P > 32$ g/L.

$$\mu = \mu_i^{[K_1(S-100)]} \quad (4)$$

$$\mu = \mu_i^{[K_1(S-100)][K_2(S-100)^P]} \quad (5)$$

onde K_1 e K_2 são constantes empíricas e μ_i possui uma dependência exponencial com P (equação 7).

Para a presença de um produto inibidor P , GHOSE & TYAGI (1979) utilizaram uma relação linear para descrever a dependência de μ_i velocidade específica máxima de crescimento na presença de etanol, com a concentração deste produto:

$$\mu_i = \mu_{\max} K_a P = \mu_{\max} \left[1 - \frac{P}{P_{\max}} \right] \quad (6)$$

Uma relação exponencial foi proposta por AIBA *et al.* (1968), MOULIN *et al.* (1980) e BONOMI *et al.* (1981):

$$\mu_i = \mu_{\max}^{-K_b P} \quad (7)$$

AIBA & SHODA (1969) e NOVAK *et al.* (1981) testaram uma relação hiperbólica entre μ_i e P, como mostra a equação (8):

$$\mu_i = \mu_{\max} \left[\frac{1}{1 + \frac{P}{Kc}} \right] \quad (8)$$

Já BAZUA & WILKE (1977) propuseram uma relação parabólica, da seguinte forma:

$$\mu_i = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)^{0,5} \quad (9)$$

Entretanto a equação (9) não apresentou bom ajuste com os dados experimentais dos autores. Estes testaram nova relação:

$$\mu_i = \mu_{\max} - \frac{cP}{d - P} \quad (10)$$

que obteve bom ajuste, mesmo a baixas concentrações de etanol.

LEVENSPIEL (1980) revisou e generalizou uma equação matemática para o crescimento celular contendo um termo para inibição pelo produto:

$$r_x = \mu X = \mu_{\max} \left[1 - \frac{P}{P_m} \right]^n \left[\frac{S}{K_s + S} \right] X \quad (11)$$

sendo P_m a concentração limite do produto inibidor. LEVENSPIEL (1980) demonstrou que para uma concentração de P bem menor que o valor de P_m , a equação (11) se reduz a :

$$r_x = \mu X = \left[\frac{S}{K_s + S} \right] X \quad (12)$$

que é a cinética de Monod. Ou quando a concentração de substrato S é bem maior que a constante de Monod K_s , a equação (11) origina:

$$r_x = \mu X = \mu_{max} \left[1 - \frac{P}{P_m} \right]^n X \quad (13)$$

caracterizando uma cinética puramente inibitória.

A relação de LUONG (1985) para descrever a dependência de μ_i com a concentração de produto P é dada por:

$$\mu_i = \mu_{max} \left[1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^n \right] \quad (14)$$

A relação linear do tipo (6) somente é aplicável quando não há limitação de crescimento pelo substrato ou algum nutriente. As equações (7) e (8) predizem o crescimento celular e produção de etanol indefinidamente. Este fato não é observado na prática, conforme experimentos de LEE *et al.* (1983), LEE & CHANG (1987) e JARZEBSKI *et al.* (1989), que demonstraram haver um limite acima do qual cessa o crescimento celular e a produção de etanol.

A versatilidade das equações generalizadas parabólicas e do tipo (14) (LUONG, 1985) favorecem a sua aceitação. Principalmente para esta última, quando n tende para 1, esta relação tende para o tipo linear. Quando $n < 1$, a cinética prevista é a exponencial, ou quando $n > 1$, a equação (14) pode ser aproximada para descrever um comportamento parabólico.

2.4.2. Utilização de parâmetros cinéticos para avaliação de linhagens industriais

Segundo o relatório técnico AVALIAÇÃO de cepas de processo (1998), a avaliação das cepas de leveduras isoladas de processos industriais utilizando parâmetros cinéticos e comportamentais, visa não somente determinar se uma cepa é igual a outra, mas também as características fermentativas desta, classificando-as como pertencentes aos grupos:

- a) Fermentativas - adequadas aos processos fermentativos industriais
- b) Regular fermentativas – apresentam bom rendimento e baixa produtividade
- c) Não fermentativas - inadequadas aos processo fermentativos industriais

Os parâmetros analisados são divididos em duas classes: a) comportamentais e b) cinéticos. Cada parâmetro estudado fornece informações relativas às características individuais de cada cepa e de seu comportamento em condições de processo controladas, podendo ser utilizados em estimativas de performance industriais. Os parâmetros estudados são:

a) Comportamentais

a.1) Produção específica de etanol ($Y_{p/s}$)

Expressa a massa de etanol produzido em relação a massa de ART consumido. Este parâmetro fornece o potencial das cepas de levedura no que diz respeito ao rendimento fermentativo, ou seja, indica o máximo rendimento em álcool que esta cepa pode alcançar.

a.2) Produção específica de células ($Y_{x/s}$)

Expressa a massa celular produzida em relação a massa de ART consumida. Este parâmetro fornece a quantidade de massa celular produzida por grama de açúcar consumido. Este parâmetro auxilia na determinação da quantidade de células que podem ser retiradas do processo para secagem ou para descarte. Valores superior ao do padrão indicam um maior desvio de açúcar para a produção de células em detrimento a produção de etanol. Em casos onde existe unidades de secagem de células esta produção excedente pode ser aproveitada na produção de ração, minimizando o prejuízo.

a.3) Produtividade

Expressa a massa de etanol produzida (g) por volume (L) de meio em fermentação por unidade de tempo (h). Este parâmetro permite determinar a velocidade de transformação do açúcar em etanol. Quanto maior for este parâmetro melhor será a levedura para o processo.

a.4) Velocidade de consumo de ART

Expressa a massa de ART consumido (g) por volume (L) de meio em fermentação por unidade de tempo (h). Este parâmetro fornece a velocidade com que a cepa de levedura consome o açúcar disponível. Da mesma maneira que a produtividade, quanto maior for este parâmetro mais adequada será a cepa para utilização em processos industriais.

Da combinação destes 4 parâmetros, calcula-se a *Capacidade fermentativa* utilizando para classificar as cepas como:

Fermentativa	CF	-50 a + 50
Regular Fermentativa	CF	-50 a -100
Não fermentativas	CF	menor que -100

b) Cinéticos

b.1) Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)

Este parâmetro fornece um indicativo da capacidade que uma dada cepa possui de dominar o processo. Quanto maior for seu valor maior será a possibilidade desta permanecer no processo ao longo da safra. Isto só não ocorrerá se alguma condição da instalação não favorecer a sua permanência devido alguma característica desta cepa (floculação, tamanho, menor resistência a condições adversas).

b.2) Conversão de ART

Este parâmetro expressa a afinidade do microrganismo com o açúcar o qual é consumido para produção de etanol. Quanto maior for a conversão maior é a facilidade desta cepa crescer em concentração baixa de açúcar, mostrando que esta possui uma baixa limitação pelo substrato,

sendo capaz de consumi-lo quase totalmente, evitando perdas de rendimento fermentativo devido a concentração elevadas de açúcar residual no vinho.

b.3) Produtividade específica

Este parâmetro expressa a quantidade de etanol produzido por grama de célula de levedura por hora de fermentação. Este fator pode ser utilizado na avaliação da performance do processo, tendo em vista que sabendo a quantidade de células em processo é possível estimar a quantidade de etanol que será produzido por hora de fermentação.

b.4) Velocidade de consumo de ART específica

Este parâmetro expressa a quantidade de açúcar consumido por uma grama de células por hora. Da mesma forma que a produtividade específica, este parâmetro permite estimar a quantidade de ART que será consumido por hora de fermentação, desde que se saiba a massa de células em processo.

2.5. LEITO FLUIDIZADO

Desde o seu primeiro uso comercial, para gaseificação de carvão em 1922, os leitos fluidizados vêm sendo largamente utilizados como uma ferramenta importante para o desenvolvimento das indústrias químicas e petroquímicas. Inúmeras aplicações são realizadas usando estes leitos, como, por exemplo, o recobrimento de materiais plásticos em superfícies de metais, recobrimento e secagem de grãos, a gaseificação de carvão e coque, entre outros. O amplo campo de aplicações ocorrem principalmente devido à sua estrutura simples, consistindo basicamente de uma coluna e uma placa em sua base para suportar o leito das partículas, além de apresentar gradientes de temperatura e mistura de sólidos uniformes.

Muito embora estes leitos possam apresentar misturas uniformes, a tendência à segregação é um fenômeno intrínseco a eles. Nos processos que utilizam leitos fluidizados gasosos como reatores, existe um grande interesse na mistura dos sólidos, devido a esta propiciar gradientes uniformes de

temperatura e maiores conversões. Por outro lado, naqueles em que se deseja a remoção contínua de partículas maiores ou menores, a segregação é de grande interesse.

KUNII & LEVENSPIEL (1991) citam as vantagens e desvantagens da fluidização para aplicação industrial. As vantagens incluem: (a) A rápida mistura dos sólidos conduz aproximadamente a condições isotérmicas em todo o reator, consequentemente a operação pode ser controlada mais facilmente; (b) A circulação de sólidos entre dois leitos fluidizados possibilita o transporte de grandes quantidades de calor produzido, necessário em reatores em larga escala; (c) Pode ser adaptado para operação em larga escala; (d) As razões de transferência de massa e de calor entre a fase fluida e as partículas sólidas são elevadas quando comparadas com outros processos; e (e) A transferência de calor dentro do leito é elevada; consequentemente as trocas de calor nos leitos fluidizados requerem áreas superficiais relativamente pequenas. No que diz respeito as desvantagens os autores citam : (a) A dificuldade para descrever o fluxo de fluido, com grandes desvios do escoamento “plug flow” e com “bypass” de sólidos devido a formação de bolhas, representam uma ineficiência do processo. Isto torna-se especialmente sério quando alta conversão de reagentes gasosos é requerida; (b) A rápida mistura dos sólidos no leito conduz a um tempo de residência não uniforme dos sólidos no reator. Para tratamentos contínuos de sólidos isto resulta num produto não uniforme e baixas conversões; (c) Sólidos finos são pulverizados e entram para a fase gasosa, devendo depois ser substituídos; (d) Erosão dos tubos e vasos por abrasão de partículas podem ocorrer; e (e) Para operações não catalíticas à altas temperaturas a aglomeração de partículas finas podem exigir um abaixamento de temperatura para a operação, reduzindo-se assim a taxa de reação consideravelmente.

Apesar destes problemas, as vantagens econômicas dos leitos fluidizados têm sido responsáveis pelo seu uso em operações industriais. Tal sucesso não vem facilmente, mas é alcançado por um conhecimento das deficiências dos leitos fluidizados seguidas de um deliberado esforço para superá-las, para que as características vantajosas prevaleçam. O uso dos leitos fluidizados numa imensa variedade de operações industriais é a evidência de que isto pode ser feito.

2. 6. BIOREATORES DE LEITO FLUIDIZADO

O potencial dos bioreatores de leito fluidizado é evidente em uma análise dos vários tipos de processos em que eles tem sido usados. Porém, com exceção de plantas para tratamento biológico de água, a aplicação dos bioreatores em escala industrial é muito escassa, especialmente quando é comparada ao número de trabalhos desenvolvidos em escala de laboratório.

Em comparação com os bioreatores convencionais mecanicamente agitados, os bioreatores de leito fluidizado promovem um menor atrito das partículas sólidas; e portanto o biocatalisador imobilizado pode ser usado sem rompimentos físicos. No caso de biocatalisador imobilizado a concentração deste pode ser significativamente maior devido a sua permanência no processo, e a típica limitação de lavagem existente no caso de células livres é superada. Além disso, dependendo das condições de operação, o fluxo líquido no bioreator de leito fluidizado pode se aproximar do “plug-flow”. Isso pode ser considerado como uma grande vantagem principalmente para reações que apresentam inibição pelo produto (GÓDIA & SOLÀ, 1995).

Em comparação com os reatores de leito fixo, os bioreatores de leito fluidizado podem ser operados com partículas de menor tamanho, sem os inconvenientes apresentados pelos reatores de leito fixo, tais como, alta redução da pressão do líquido devido ao empacotamento do leito, criação de fluxos preferenciais e compressão das partículas devido ao peso do próprio leito. Além disso, o menor tamanho das partículas minimiza a resistência difusional interna e o maior nível de mistura aumenta a transferência de massa e de calor da fase líquida para a sólida. Por outro lado, os bioreatores de leito fluidizado apresentam maior dispersão axial que os de leito fixo. Os bioreatores de leito fluidizado com uma alta recirculação de líquido podem se aproximar de um regime de completa mistura. Isto nos diz que a cinética da reação é um fator importante para se considerar na análise e no projeto de bioreatores de leito fluidizado, assim, configurações favorecendo uma mistura do líquido mais apropriada para reações inibidas pelo substrato, e configurações tipo “plug-flow” sendo mais indicados para reações inibidas pelo produto (GÓDIA & SOLÀ, 1995).

Ainda segundo GÓDIA & SOLÀ (1995), outra vantagem apresentada pelos bioreatores de leito fluidizado é a facilidade de separar o gás produzido na maioria das transformações envolvendo células (i.e., CO₂), ou para alimentação de gás no reator, por exemplo, para os propósitos de aeração. Também, os bioreatores de leito fluidizado facilitam a substituição do biocatalisador, sem interrupção na operação, facilitando assim o controle global da atividade do reator, por exemplo, substituindo partículas com enzimas desativadas. Por outro lado, o atrito dos sólidos é maior no leito fluidizado que nos bioreatores de leito fixo. Do ponto de vista de produtividade, as vantagens do leito fluidizado, especificamente no que diz respeito à transferência de massa, tornam possível obter níveis de produtividade global maiores que nos bioreatores de leito fixo. Leito fluidizado oferece mais alternativas de estratégias de operação possibilitando assim aumentar a performance do bioreator. Uma característica intrínseca que faz os bioreatores de leito fluidizado mais complexos que os de leito fixo é a sua estabilidade hidrodinâmica, especialmente quando se leva em conta que as propriedades das partículas do biocatalisador mudam consideravelmente durante o tempo de operação. De fato, a natureza das partículas (por exemplo, sua densidade e tamanho) e o fluxo de líquido e de gás empregados, e o tipo de cinética de reação, bem como a cinética de crescimento das células ou desativação das enzimas, tem um efeito direto no projeto e na performance do reator. ANDREWS & PRZEZDZIECKI (1986) discutem essas inter-relações.

NAGASHIMA *et al.* (1984) trabalharam na construção e operação de uma planta piloto com dois leitos fluidizados de 1 m³ ligados em série para a produção de etanol usando *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em carragena, onde boa estabilidade operacional foi obtida por um longo período de tempo.

QURESHI & MADDIX (1992) fazem uma análise econômica da produção de acetona-butanol por fermentação usando um leito fluidizado com *Clostridium acetobutylicum*. Eles demonstraram que o custo de investimento pode ser drasticamente reduzido e que o preço do produto final pode ser reduzido quase à metade, tornando o processo muito mais viável quando comparado com processos convencionais em batelada com células livres.

A alta produtividade e estabilidade do reator é outro ponto positivo que é levado em conta quando se trabalha com bioreatores de leito fluidizado, BU⁷-LUCK (1983) trabalhando com leveduras floclantes para produção de álcool em sistemas contínuos com reciclo de células de levedura, obteve conversão de substrato maior que 95% e produtividade maior que 25 g etanol/ L. h , num sistema estável por longo tempo. O sistema trabalhou com caldo de cana-de-açúcar podendo ser implantado nas destilarias , com baixo custo de capital e manutenção.

PAIVA *et al.* (1996) conduzindo uma fermentação alcoólica em bioreator tipo torre com reciclo de células floclantes à uma taxa de diluição constante de $0,20 \text{ h}^{-1}$, obtiveram uma produtividade máxima de 18 g etanol/L. h , e concentração final de etanol de 90 g/L era atingida quando a concentração de substrato era 200 g/L, isto é equivalente a uma conversão de 99% do substrato. Para valores menores de concentração de substrato $S=160 \text{ g/L}$ obteve-se um rendimento máximo de etanol de 90% do máximo valor teórico, e conclui que as alta concentração de células mantidas no reator (aproximadamente 100 g/L base seca) devido a floclação natural das células era responsável pelos valores obtidos muito superiores aos encontrados nas indústrias, favorecendo assim o processo proposto.

Segundo WIECZIREK & MICHALSKI (1994) que estudaram diferentes taxas de diluição num processo de fermentação contínua com células altamente floclantes de *Saccharomyces cerevisiae* , quando trabalharam com meio sintético de concentração de substrato de 170 g/L obtiveram, concentrações de etanol de 80 g/L e concentração de substrato no efluente de 6 g/L para taxas de diluição abaixo de $0,2 \text{ h}^{-1}$ e respectivamente 63 g etOH/L e 36 g/L para taxa de diluição de $0,33 \text{ h}^{-1}$,onde o rendimento de etanol era praticamente constante e a produtividade aumentava quase linearmente com a taxa de diluição, e finalmente conclui que a produção de etanol obtida por este processo é muito superior as obtidas quando usados métodos convencionais.

As vantagens dos bioreatores de leito fluidizado são visíveis em vários trabalhos, PRINCE & BARFORD (1982), ressaltam que a configuração destes reatores pode ser também um avanço comparado aos sistemas convencionais com respeito ao controle de contaminação microbiológica, uma vez que bactérias presentes no início do processo eram rapidamente eliminadas do sistema, pois os

contaminantes são “lavados” do reator. Outra vantagem citada é a alta concentração de células de leveduras acumuladas no reator, o que torna o sistema apropriado para operar com altas produtividades.

Apesar da grande disponibilidade de trabalhos em bioreatores de leito fluidizado poucos estudos na aplicação de métodos de “scale-up” estão disponíveis. ROTTENBACHER *et al.* (1987) propõem um modelo para este estudo na produção de etanol, baseando-se em dois parâmetros, o tempo de residência e o fornecimento específico de substrato.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS

Foram testadas 15 (quinze) cepas de leveduras com características floculantes isoladas da unidade de fermentação industrial da Destilaria DIANA durante a safra de 95/96. Estas cepas foram isoladas em seis coletas espaçadas de 30 dias no decorrer da safra. A Tabela 01 contém as quinze cepas testadas, mostrando o mês em que a coleta foi realizada, o número de cepas isoladas e a participação populacional da mesma dentro da respectiva coleta. Estas cepas foram isoladas por pesquisadores do laboratório de Bioprocessos do CPQBA/ UNICAMP.

Tabela 01- Cepas testadas na etapa de caracterização

Nº da Cepa	Mês da Coleta	Quantidade de Cepas	Participação
		Isoladas	Populacional (%)
1	Julho	4	29,0
2	Julho	4	35,0
3	Julho	4	11,0
4	Agosto	6	11,0
5	Agosto	6	2,0
6	Setembro	5	2,0
7	Setembro	5	2,0
8	Setembro	5	62,0
9	Outubro	3	86,0
10	Outubro	3	1,0
11	Outubro	3	13,0
12	Novembro	5	0,5
13	Novembro	5	68,0
14	Novembro	5	7,0
15	Novembro	5	24

3.2. AVALIAÇÃO DAS LINHAGENS

3.2.1. Capacidade fermentativa das Linhagens

3.2.1.1. Condução do ensaio

Os testes foram conduzidos em triplicata para cada cepa em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo estéril (121°C/15 minutos) com a seguinte composição: Glicose (150 g/L); Extrato de levedura (6 g/L); Cloreto de Amônio (1 g/L); Sulfato de Magnésio heptaidratado (1 g/L); Cloreto de Potássio (1 g/L) e Fosfato Diácido de Potássio (5 g/L).

O fechamento dos frascos foi feito com rolha de borracha com orifício central onde foi introduzido um tubo de vidro em “L” (com filtro de algodão) para a saída de CO₂ produzido durante a fermentação.

As culturas crescidas em “slants” de PDA (Potato Dextrose Agar) por 48 h a 32°C foram ressuspensas em água estéril e inoculadas nos Erlenmeyer em volume correspondente a 10% (10 mL) do volume do meio de cultivo. Os frascos foram incubados em “shaker” por 24 h a 32°C/150 rpm. Decorrido o tempo de incubação amostras foram retiradas para realização das seguintes análises: etanol, massa celular e ART. Analisou-se ainda açúcar inicial e massa celular do inóculo. Pesagem dos frascos vazios, depois de esterilizados, depois de inoculados e no final da fermentação foi realizada para que os parâmetros pertinentes ao Capacidade fermentativa fossem calculados. A inclusão de uma cepa padrão, isto é, com Capacidade fermentativa satisfatório e conhecido foi feita com o objetivo de utilizá-la como referência.

3.2.1.2. Cálculo da Capacidade fermentativa

Foram calculados a produção de etanol (PE), produção de massa celular (PM), substrato consumido (SC), produção específica de etanol ($Y_{p/s}$), produção específica de células ($Y_{x/s}$), velocidade de consumo de substrato (VCS), produtividade (Prod.), e os fatores para produção de etanol (FE),

massa celular (FC), velocidade de consumo de substrato (FVCS) e para produtividade (FP). As equações de 15 a 25 descrevem a forma de cálculo utilizada para cada um dos parâmetros.

$$PE = \frac{(\text{massa vinho}) \cdot (\text{Concentração de etanol}) \cdot 0,79}{100 \cdot \text{densidade do vinho}} \quad (15)$$

$$PM = (\text{massa vinho}) \cdot (\text{massa seca vinho}) - (\text{massa inóculo}) \cdot (\text{massa seca inóculo}) \quad (16)$$

$$SC = \text{ART entrada} - \text{ART vinho} \quad (17)$$

$$Y_{p/s} = PE/SC \quad (18)$$

$$Y_{x/s} = PM/SC \quad (19)$$

$$VCS = \frac{(\text{ART consumido}) \cdot 1000}{(\text{massa mosto} \cdot 24)} \quad (20)$$

$$\text{Prod.} = \frac{PE \cdot 1000}{(\text{massa vinho} \cdot 24)} \quad (21)$$

$$FE = \frac{(Y_{p/s} c - Y_{p/s} t) \cdot 1000}{Y_{p/s} c} \quad (22)$$

$$FC = \frac{(Y_{x/s} t - Y_{x/s} c) \cdot 200}{Y_{x/s} c} \quad (23)$$

$$FVCS = \frac{(VCS c - VCS t) \cdot 500}{VCS c} \quad (24)$$

$$FP = \frac{(\text{Prod. c} - \text{Prod. t}) \cdot 500}{\text{Prod c}} \quad (25)$$

Nessas equações os valores obtidos para as linhagens testadas são indicados pela letra t e os da linhagem padrão pela letra c. Nas equações 22, 23, 24 e 25, estão incluídos os pesos de cada termo para o cálculo da capacidade fermentativa que são: 10 para $Y_{p/s}$, 2 para $Y_{x/s}$ e 5 para produtividade e VCS.

A capacidade fermentativa (CF) é dada pela equação 26, onde são considerados os valores dos sinais de cada termo (+/-).

$$CF = FC + FE + FVCS + FP \quad (26)$$

3.2.2. Teste de Floculação

Os testes de floculação foram realizados de acordo com o método descrito por STRATFORD & KEENAN, (1988). O objetivo deste teste foi determinar a intensidade de floculação das cepas de levedura através da velocidade de decantação. As linhagens crescidas em meio específico foram submetidas a leituras contínuas em espectrofotômetro a 600nm.

3.2.2.1. Determinação da velocidade específica de sedimentação

Os testes foram conduzidos em triplicata para cada cepa em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo estéril (121°C/15 minutos) com a seguinte composição: Glicose (150 g/L); Extrato de levedura (6 g/L); Cloreto de Amônio (1 g/L); Sulfato de Magnésio heptaidratado (1 g/L); Cloreto de Potássio (1 g/L) e Fosfato Diácido de Potássio (5 g/L).

O fechamento dos frascos foi feito com rolha de borracha com orifício central onde foi introduzido um tubo de vidro em “L” (com filtro de algodão) para a saída de CO₂ produzido durante a fermentação.

As culturas crescidas em “slants” de PDA (Potato Dextrose Agar) por 48 h a 32°C foram ressuspensas em água estéril e inoculadas nos Erlenmeyer em volume correspondente a 10% (10 mL) do volume do meio de cultivo. Os frascos foram incubados em “shaker” por 24 h a 32°C/150 rpm.

Ao final da fermentação 40 mL do vinho fermentado foram centrifugados a 4000 rpm/5 minutos. A massa de células precipitada foi ressuspensa em água e recentrifugada. Esta operação foi realizada 2 vezes. Um grama do precipitado foi diluído em 100 mL de água (como forma de garantir uma faixa de leitura segura no espectrofotômetro). O material foi submetido a intensa agitação e transferido para cubetas de 1 cm de comprimento. Foi feita leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm durante 10 minutos em intervalos de 30 segundos. O teste foi conduzido também para uma linhagem padrão não floculante.

3.2.2.2 Procedimento de Cálculo

A partir dos valores da absorbância obtidos, plotou-se: $Abs/Abs_0 \times \text{tempo (min.)}$

onde: Abs_0 - valor da absorbância medido no tempo inicial t_0

Abs - valor da absorbância medido no tempo t

A velocidade específica de sedimentação (VES) é dada pela equação abaixo:

$$VES = \frac{1 - Abs_t / Abs_0}{t - t_0} \quad (27)$$

3.2.3. Determinação da Velocidade Específica máxima de Crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)

A determinação desse parâmetro foi feita através do acompanhamento do crescimento das linhagens de levedura, em meio de cultura contendo quantidades não limitantes de substrato e onde não estejam presentes fatores de inibição. A incubação foi feita a temperatura controlada,

sob agitação e o acompanhamento do crescimento da levedura foi feito através da determinação da densidade óptica a intervalos regulares (ANDRIETTA *et al.*, 1995).

3.2.3.1. Metodologia para realização do $\mu_{\text{máx}}$

Foram preparados Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo estéril composto de: Glicose 40 g/L; Fosfato diácido de potássio 5,0 g/L; Cloreto de amônio 5,0 g/L; Sulfato de magnésio heptaidrato 1,0 g/L; Cloreto de potássio 1,0 g/L; Extrato de levedo 6,0 g/L. Inoculou-se os frascos seguindo o mesmo procedimento utilizado para obtenção do Capacidade fermentativa. Imediatamente após a inoculação, retirou-se uma amostra para a leitura da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm e os frascos foram incubados em “ shaker” a uma temperatura de 32°C /150 rpm. Amostras foram retiradas e lidas no espectro de hora em hora nas 03 primeiras de incubação. A partir da terceira hora as amostras foram retiradas de meia em meia hora. Os ensaios foram conduzidos até o final da fase exponencial de crescimento caracterizado pela leitura constante da absorbância.

3.2.3.2. Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$

Sabe-se, experimentalmente, que o aumento da população está relacionado com a quantidade populacional e uma constante de proporcionalidade μ (taxa específica de crescimento), ou seja:

$$dX/dt = \mu \cdot X \quad (28)$$

Onde: X- Concentração celular (g/L)

t- tempo (h)

Integrando-se a equação acima, obtém-se:

$$\int_0^t \mu^* dt = \int_X^{X_0} \frac{dX}{X} \quad (29)$$

Assumindo-se que μ é constante e igual a μ máx na fase exponencial, da integração da equação (29) obtém-se:

$$\mu_{\text{máx}} * t = \ln \frac{X}{X_0} \quad (30)$$

A equação obtida acima é similar a equação de uma reta ($y = a + b * x$), portanto plotando-se $\ln X/X_0$ em função do tempo, obtém-se o coeficiente angular $b = \mu_{\text{máx}}$.

3.3. ESTUDO EM FERMENTADOR DE BANCADA

Selecionada a melhor cepa os testes foram realizados em fermentador de bancada.

3.3.1. Inóculo

O inóculo que foi utilizado na partida do sistema foi preparado em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio estéril (15 minutos/121°C) composto de : Sacarose 150 g/L, Fosfato diácido de potássio 5,0 g/L; Cloreto de amônio 5,0 g/L; Sulfato de magnésio heptaidrato 1,0 g/L; Cloreto de potássio 1,0 g/L; Extrato de levedo 6,0 g/L. A levedura crescida em “slants” de PDA (Potato Dextrose Agar) por 24 h a 32°C foi ressuspensa em água estéril e inoculada em concentração de 10% do volume total do meio fermentativo. Os frascos foram incubados em “shaker” por 24 h a 32°C a uma rotação de 150 rpm. O fermentado foi alimentado ao sistema de fermentação através de bomba peristáltica.

3.3.2. Substrato de Alimentação

O substrato utilizado na alimentação do sistema piloto nesta etapa foi um meio sintético utilizando como fonte de carbono a sacarose (cuja concentração variou de acordo com ensaios realizados) adicionado de: Fosfato diácido de potássio 5,0 g/L; Cloreto de amônio 5,0 g/L; Sulfato de magnésio heptaidrato 1,0 g/L; Cloreto de potássio 1,0 g/L; Extrato de levedo 6,0 g/L. O meio foi preparado em frascos de vidro de 10 L e esterilizado em autoclave a 121°C por 30 minutos.

3.3.3. Descrição dos reatores

Foram utilizados dois reatores de bancada de capacidade de 2,2 litros, construídos a partir de um projeto baseado em experiências industriais e princípios básicos de engenharia. Os mesmos foram confeccionados em vidro em forma de torre (5,8 cm diâmetro e 78 cm de altura), dotados de uma camisa para controle da temperatura. A temperatura do reator foi mantida constante por meio de circulação de água a 32°C pela camisa do reator. A alimentação do substrato foi feita através de bomba peristáltica ligada diretamente com os frascos contendo substrato estéril. O substrato foi alimentado pelo fundo do reator e o vinho retirado pelo topo. A adição de outros componentes (anti-espumante, antibióticos, etc...) foi feita manualmente pela parte superior, quando necessário. Os reatores possuem ainda na parte superior uma saída para exaustão do ar/CO₂, e para retirada de amostras. O CO₂ formado durante a fermentação foi responsável pela fluidização dos reatores.

3.3.4. Testes Preliminares

Antes da realização dos ensaios de otimização do sistema de reatores, foram feitos testes preliminares para se testar as faixas das variáveis concentração de substrato e tempo de residência a serem estudadas bem como a dinâmica do sistema. Nesta etapa operou-se o sistema utilizando o volume total dos fermentadores e todo o CO₂ proveniente do primeiro reator juntamente com o vinho em fermentação alimentaram o segundo reator.

O esquema do sistema de reatores nesta etapa é mostrado na Figura 01.

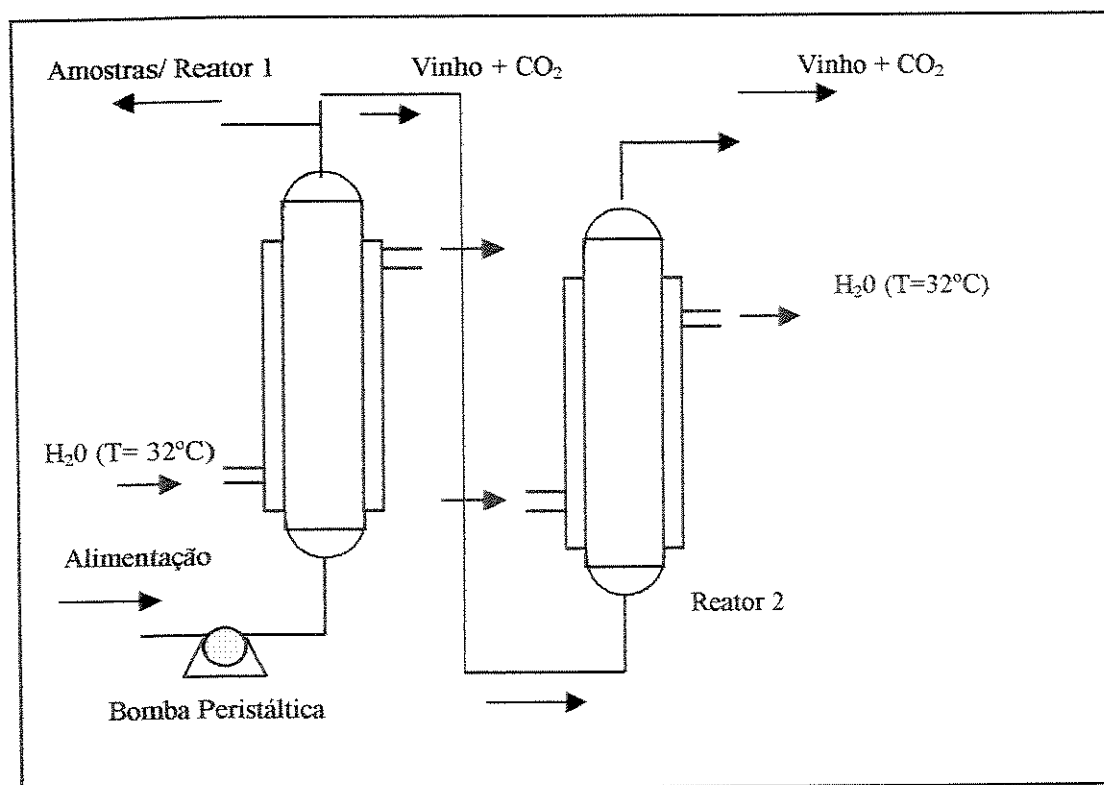


Figura 01. Sistema de Reatores (Testes Preliminares)

3.3.4.1. Operação do reator

Após a inoculação do primeiro reator, foi feita uma fase inicial de retenção e acúmulo de células de leveduras dentro do mesmo. Isto foi obtido alimentando-se continuamente o reator com meio esterilizado com concentração de substrato de 125 g/L durante 6 (seis) dias, até que se obteve uma concentração de células constante e satisfatória para operar o processo. Após o estágio de acúmulo, os ensaios foram realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial de forma aleatória totalizando-se 11 (onze) ensaios, com três repetições no ponto central para a determinação do erro experimental. As variáveis estudadas nesta etapa foram: (a) concentração de substrato de alimentação - S (100 a 150 g/L) e (b) o tempo de residência - t_r (5 a 10 h). Os parâmetros avaliados foram: (a) o rendimento em etanol e (b) a produtividade do reator. A fermentação foi monitorada por amostragens periódicas tanto no primeiro como no

segundo reator, e determinou-se em cada uma delas a concentração de células no efluente, a concentração de ART tanto na saída do primeiro como no segundo reator e a concentração de etanol na saída do reator 2. Antes de se mudar as condições para a realização de um novo ensaio tomou-se o cuidado de que o regime estacionário tivesse sido atingido.

3.3.4.2. Planejamento Fatorial Completo - Testes Preliminares

O método de otimização por análise de superfície de resposta tem como base o método de planejamento fatorial, e consiste em um grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas (por exemplo, rendimento e produtividade) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas.

Para aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada. Então executam-se experimentos com todas as possíveis combinações. A primeira etapa é usualmente um planejamento fatorial com 2 níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim para “n” variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações possíveis é igual a 2^n . Para estimativa do erro experimental associado aos ensaios, são realizados 3 ensaios no ponto central ou nível 0 (zero) correspondente às condições intermediárias entre os 2 níveis atribuídos a cada variável (BOX *et al.* 1978).

Com os resultados obtidos do planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas, determinar quais são os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo linear ou de 1º ordem, correlacionando-se as variáveis e as respostas obtidas.

Se o modelo de 1º ordem não apresentar uma boa correlação com os dados experimentais é possível complementar o planejamento fatorial inicial realizando-se mais $2 \cdot n$ ensaios segundo

configuração “estrela” (KHURI & CORNELL, 1987), para obter um modelo quadrático ou de 2º ordem.

Para o sistema em estudo foi realizado um planejamento fatorial completo com duas variáveis independentes sendo as variáveis resposta: (a) o rendimento e (b) a produtividade do sistema de fermentação, onde rendimento e a produtividade do sistema foram calculados utilizando-se as equações 31 e 32 respectivamente. Assim foram realizados 2^2 ensaios para verificação de um modelo de 1º ordem, três ensaios para no ponto central e mais 4 ensaios distribuídos rotacionalmente (pontos axiais) a uma distância α da condição do ponto central, sendo α definido pela equação 33.

$$\text{Rend.} = \frac{\text{Etanol Produzido} * 1000}{\text{ART entrada} * 0,6475} \quad (\%) \quad (31)$$

Onde: 0,6475 corresponde ao fator estequiométrico.

$$\text{Prod.} = D * (\text{Conc. de Etanol}) * 10 \quad (\text{mL etOH/ L .h}) \quad (32)$$

$$\alpha = \sqrt[n]{2^n} \quad (33)$$

onde n é o número de variáveis independentes.

Para avaliar o modelo quadrático do sistema em questão tem-se $\alpha=1,414$, portanto para o modelo quadrático são incluídos os níveis -1,414 e +1,414.

Na Tabela 02 são apresentas as condições de cada ensaio realizado nesta etapa. O valor do ponto central do parâmetro S (125,00 g/L) foi escolhido por originar uma concentração teórica de etanol satisfatória (7,65 g/L), e o valor de 7,5 h em relação ao parâmetro tr foi escolhido por ser um valor compatível com as condições operacionais dos processos industriais.

Tabela 02 - Ensaios realizados na etapa de testes preliminares

Caso	Valores Codificados		Valores Reais		Ordem dos Ensaios
	Conc. De Substrato (S)	Tempo de Residência (tr)	Conc. de Substrato S (g/L)	Tempo de Residência tr (h)	
1	-1,00	-1,00	100,00	5,00	8
2	1,00	-1,00	150,00	5,00	10
3	-1,00	1,00	100,00	10,00	2
4	1,00	1,00	150,00	10,00	11
5	0,00	-1,41	125,00	3,97	6
6	0,00	1,41	125,00	11,02	1
7	-1,41	0,00	89,75	7,50	3
8	1,41	0,00	160,25	7,50	4
9 (C)	0,00	0,00	125,00	7,50	9
10 (C)	0,00	0,00	125,00	7,50	5
11 (C)	0,00	0,00	125,00	7,50	7

Os quatro primeiros ensaios correspondem ao modelo linear (2^2), seguidos por quatro ensaios que completam o modelo quadrático e ainda foram realizadas três repetições no ponto central para que o erro experimental fosse estimado.

De posse dos resultados de rendimento e produtividade para cada ensaio, utilizou-se o “Software - Statistica 5.0” para obter os efeitos das variáveis, os coeficientes de regressão do modelo quadrático, a análise da variância do modelo e as superfícies de resposta.

3.3.5. Otimização do Sistema de Reatores

Após realizados testes preliminares, observou-se que algumas mudanças no sistema seriam necessárias, pois como todo CO_2 proveniente do primeiro reator era transferido para o segundo, isso impedia que houvesse um acúmulo de células no mesmo, o que provocou uma queda acentuada na conversão do segundo reator, prejudicando assim o rendimento do sistema. Com base nestas observações nos testes para otimização do sistema foram realizadas algumas mudanças. Para permitir a formação de um leito estável no segundo reator o vinho proveniente do primeiro reator passou a alimentar o segundo reator através de bomba peristáltica, e uma saída

para eliminação de CO_2 pode ser criada. Isso fez com que o volume de CO_2 transferido para o segundo reator fosse reduzido. Com a eliminação do CO_2 no primeiro reator, optou-se por instalar um sistema de recirculação de vinho no segundo reator com o objetivo de estudar o efeito desta variável sobre a compactação do leito neste, onde o efeito de fluidização pelo CO_2 é muito menor quando comparado com o primeiro. O estudo do efeito da recirculação de vinho sobre a estabilidade do leito nos reatores é importante, pois, nas plantas industriais este reciclo se faz necessário devido a necessidade de remoção de calor gerado pela reação em trocadores de calor externos.

O esquema do sistema de reatores nesta etapa é mostrado na Figura 02.

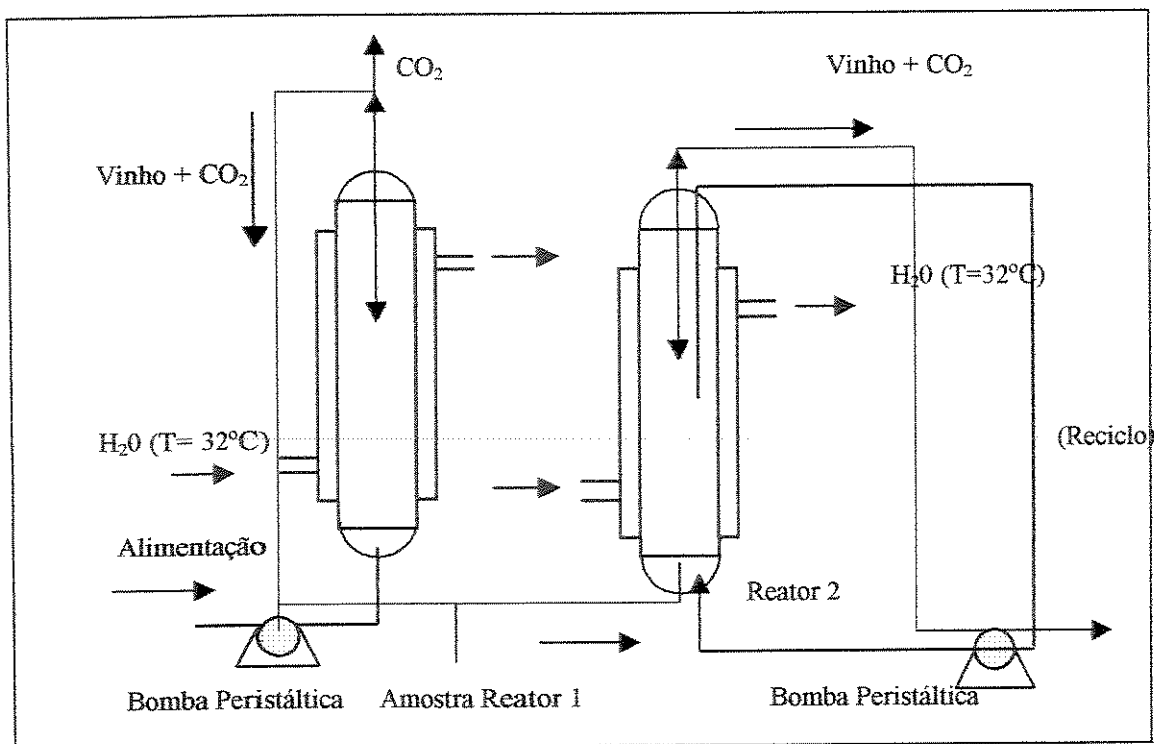


Figura 02. Sistema de Reatores Proposto

3.3.5.1. Ensaio de Otimização

Após o estágio de acúmulo obtido segundo (descrito no item 3.3.4.1), os ensaios foram realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial de forma aleatória totalizando-se 19 (dezenove) ensaios, com três repetições no ponto central para a determinação do erro experimental. As variáveis estudadas nesta etapa foram a concentração de substrato de alimentação -S (100 a 150 g/L), o tempo de residência - tr (5 a 10 h), vazão de reciclo de vinho no segundo reator -Q (28,6 a 85,8 mL/min) e a relação diâmetro/ altura -D/h (0,0892 a 0,116). A fermentação foi monitorada por amostragens periódicas tanto no primeiro como no segundo reator, e determinou-se em cada uma delas: (a) a concentração de células no efluente, (b) a concentração de ART e de etanol tanto na saída do primeiro como no segundo reator. Os parâmetros avaliados foram: (a) o rendimento em etanol (%) e (b) a produtividade do sistema (mL etOH/L. h). Tomou-se o cuidado de que o regime estacionário fosse atingido antes do início de um novo ensaio.

Para otimizar o sistema de reatores foi realizado um planejamento fatorial com quatro variáveis independentes sendo as variáveis resposta: (a) o rendimento (b) e a produtividade do sistema de fermentação. Assim foram realizados 2^4 ensaios para verificação de um modelo de 1º ordem e três ensaios no ponto central para se estimar o erro experimental. Para se obter o modelo de 1º ordem do sistema em questão foram incluídos os níveis -1,0 e +1,0.

Na Tabela 03 são apresentas os ensaios realizados nesta etapa.

Tabela 03- Ensaios realizados no planejamento fatorial linear - otimização

Caso	S (g/L)	tr (h)	Q (mL/min)	D/h	Ordem dos Ensaios
1	100,00	5,00	28,60	0,0892	11
2	150,00	5,00	28,60	0,0892	17
3	100,00	5,00	28,60	0,116	1
4	150,00	5,00	28,60	0,116	16
5	100,00	5,00	85,80	0,0892	18
6	150,00	5,00	85,80	0,0892	9
7	100,00	5,00	85,80	0,116	13
8	150,00	5,00	85,80	0,116	15
9	100,00	10,00	28,60	0,0892	10
10	150,00	10,00	28,60	0,0892	2
11	100,00	10,00	28,60	0,116	14
12	150,00	10,00	28,60	0,116	12
13	100,00	10,00	85,80	0,0892	4
14	150,00	10,00	85,80	0,0892	3
15	100,00	10,00	85,80	0,116	7
16	150,00	10,00	85,80	0,116	6
17 (C)	125,00	7,50	57,20	0,1026	5
18 (C)	125,00	7,50	57,20	0,1026	8
19 (C)	125,00	7,50	57,20	0,1026	19

Os dezesseis primeiros ensaios correspondem ao modelo de 1º ordem (2^4), seguidos por três repetições no ponto central para que o erro experimental seja estimado.

De posse dos resultados de rendimento e produtividade para cada ensaio, utilizou-se o “Software” “Statistica 5.0” para obter os efeitos das variáveis, os coeficientes de regressão do modelo de 1º ordem, a análise da variância do modelo e as superfícies de resposta através do qual foi feita a otimização do sistema.

3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1. Determinação do Etanol Produzido

O método espectrofotométrico foi utilizado para a determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. O método é simples, rápido e é capaz de ler com precisão teores de 0 a 20% de etanol em volume. O método se baseia na oxidação do etanol a ácido acético, através da reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional a concentração de álcool na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro a 600 nm.

3.4.1.1. Preparo da Amostra

Antes de se iniciar os testes para quantificar o etanol produzido na fermentação, o vinho fermentado foi destilado para evitar subprodutos interferentes. Para isso, através de uma pipeta volumétrica, destilou-se 25 mL do vinho fermentado, e recolheu 50 mL em balão volumétrico (garantia que todo o etanol foi destilado).

3.4.1.2. Preparo da Curva Padrão

Foi feita uma diluição 1:1 de etanol absoluto, em balão volumétrico, a fim de se obter uma solução trabalho a 50% em etanol. A partir da solução trabalho, transferiu-se para 5 balões volumétricos de 50 mL, com o auxílio de pipeta volumétrica as seguintes alíquotas: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL, a fim de se obter soluções hidroalcoólicas nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 °GL de volume. Todas as soluções hidroalcoólicas foram diluídas na proporção de 1/25 com água destilada em balão volumétrico. Em tubos de ensaio colocou-se 5 mL dessas soluções e foi feito, ainda um branco com água destilada. Acrescentou-se 2 mL de água destilada em cada tubo juntamente com 2 mL do reagente de cor (dicromato). Os tubos foram colocados em banho-maria a 60°C por 30 minutos em seguida, resfriou-se os tubos até temperatura ambiente e suas absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a $\lambda=600$ nm, usando o branco para zerar o

aparelho. Foi feita a curva absorbância em função da concentração, obtendo-se assim a curva padrão que foi utilizada para se determinar as concentrações de etanol presentes na amostra.

3.4.1.3. Análise da Amostra

Diluiu-se as amostras a serem analisadas na proporção de 1/25 em balão volumétrico com água destilada. Em tubos de ensaio foram colocados 5 mL da amostra diluída, acrescentou-se 2 mL de água destilada em cada tubo, juntamente com 2 mL do reagente de cor. Colocou-se os tubos em banho-maria a 60°C por 30 minutos, resfriou-se a temperatura ambiente e suas absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a $\lambda=600$ nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva padrão.

3.4.2. Determinação de Açúcares Redutores Totais (Método Enzimático)

3.4.2.1. Preparo da Curva Padrão

Foi preparada uma solução estoque de glicose 1:100 em balão volumétrico. Da solução estoque transferiu-se para 4 balões volumétricos de 10 mL as seguintes alíquotas : 0,5; 1,0; 2,0; e 3,0 mL e completou o volume com água destilada. Desta forma, foram obtidas as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 gramas por litro. Transferiu-se com o auxílio de uma pipeta automática, 0,1 mL das soluções para tubos de ensaio e adicionou-se 10 mL do reagente de cor, que faz parte do Kit da LABORLAB para determinação de glicose. Em um dos tubos, colocou-se 0,1 mL de água destilada para zerar o aparelho. Após levar em banho-maria por 10 minutos a 37°C, os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 505 nm.

3.4.2.2. Análise da Amostra

Recolheu-se 20 mL de vinho fermentado e este foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Foi feita uma diluição do mosto de 1/100 em balão volumétrico, e uma diluição de 1/10 das

amostras de vinho que não fermentaram totalmente. Transferiu-se 0,1 mL do vinho centrifugado para tubos de ensaio com o auxílio de uma pipeta volumétrica automática. Foram adicionados em cada tubo, 10 mL do reagente de cor e levados ao banho-maria por 10 minutos a 37°C. Após resfriados até temperatura ambiente a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 505 nm.

3.4.3. Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART)- Método do DNS

Nos testes do reator piloto a determinação de ART foi feita utilizando-se o método do Ácido Dinitro-salicílico (DNS), descrito por MILLER, 1959. Como o substrato utilizado nos testes foi a sacarose, esta determinação foi precedida de uma inversão ácida, para que a mesma seja transformada em açúcares redutores (glicose e frutose) .

3.4.3.1. Preparo da curva padrão

Transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mL da solução de 10 g/L. Transferiu-se 1 mL destas soluções para tubo de ensaio. Em outro tubo adicionou-se 1 mL de água para fazer o branco. Adicionou-se em cada tubo 1 mL do reagente DNS. Após homogeneizar as amostras, os tubos foram levados a banho-maria em ebulição por 6 minutos. Após os tubos terem sido resfriados até temperatura ambiente, adicionou-se 10 mL de água destilada e leu-se a absorbância em espectrofotômetro a 546 nm..

3.4.3.2. Análise das Amostras

Recolheu-se 20 mL de vinho fermentado e este foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Em tubos de ensaio adicionou-se a 2mL da amostra 2 mL de HCl 2N. Levou-se ao banho-maria em ebulição por 10 minutos. Após resfriar em banho de gelo, adicionou-se 2 mL de NaOH 2N. Quando necessário as amostras foram diluídas para que a concentração da mesma estivesse dentro da faixa de leitura do método (0,2 a 1,0 g/L). Das amostras preparadas transferiu-se 1mL para tubo de ensaio e foram adicionados 1mL de reagente DNS. Após terem sido homogeneizadas, as amostras foram levadas ao banho-maria em ebulição por 6 minutos, após terem sido resfriadas,

adicionou-se 10 mL de água destilada em cada tubo, em seguida as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 546 nm.

3.4.4. Determinação da massa celular produzida (massa seca)

A determinação foi realizada pela retirada de alíquotas de 20 mL do vinho fermentado. A partir disto a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos. Após lavagem com água destilada essa operação foi repetida 3 vezes. O precipitado foi transferido para placa previamente tarada e mantido em estufa a 80°C até peso constante. O valor foi obtido pela diferença do peso inicial da placa.

3.4.5. Determinação da concentração celular no interior dos reatores

A determinação foi realizada medindo-se a altura do leito formado em cada um dos reatores, e calculando-se o volume de cada um dos leitos formados uma vez que o diâmetro ($d=5,8$ cm) é conhecido. Foi retirada uma alíquota de 10 mL de vinho de cada leito, a qual foi centrifugada a 4000 rpm/ 5 minutos. Após ter sido lavado três vezes com água destilada, o precipitado foi transferido para placa previamente tarada e mantido em estufa a 80°C até peso constante. A concentração de massa seca (g/L) foi obtida pela diferença do peso inicial e final da placa dividida pelo volume da alíquota. A massa seca total (g) foi obtida multiplicando-se a concentração de massa seca pelo volume total do leito. Para a determinação da concentração da concentração de massa seca no reator (g/L) em função de seu volume total, foi considerado que as células se encontravam distribuídas de uma forma homogênea no seu interior, sendo obtida através da divisão da massa seca total (g) pelo volume total de reator.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação das Linhagens

4.1.1. Capacidade fermentativa das Linhagens através de testes em “shaker”

Na Tabela 04, encontram-se os valores dos parâmetros: $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, produtividade, velocidade de consumo de substrato (VCS), e o da capacidade fermentativa (CF) para cada cepa estudada. Os procedimentos para obtenção desses parâmetros estão descritos no item 3.2.1.1

Tabela 04- Valores dos parâmetros e da capacidade fermentativa de cada cepa testada, onde: Produção específica de etanol ($Y_{P/S}$), Produção específica de células ($Y_{X/S}$), Velocidade de consumo de substrato (VCS), Produtividade (Prod.) e Capacidade fermentativa (CF)

Cepa	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	VCS	Prod.	CF
Padrão	0,46	0,040	1,04	2,85	0
1	0,43	0,037	6,09	2,56	-117,31
2	0,49	0,042	5,30	2,45	-48,91
3	0,43	0,045	6,39	2,69	-103,15
4	0,45	0,041	6,44	2,80	-16,65
5	0,48	0,041	6,47	2,99	76,40
6	0,45	0,063	5,11	2,19	-322,20
7	0,47	0,049	2,77	2,77	-27,88
8	0,46	0,047	6,31	2,83	-35,56
9	0,43	0,050	6,25	2,58	-172,49
10	0,43	0,043	6,39	2,64	-123,65
11	0,46	0,080	6,46	2,87	-167,87
12	0,47	0,047	5,90	2,68	-27,00
13	0,46	0,057	6,03	2,71	-73,05
14	0,44	0,071	6,04	2,59	-212,03
15	0,48	0,072	6,39	2,96	34,77

Entre todas as cepas testadas apenas as cepas 5 e 15 apresentaram resultados de capacidade fermentativa melhores que os obtidos para a cepa padrão. Estes valores devem ser analisados com ressalvas, pois linhagens floculantes dificultam a análise de massa produzida, uma vez que não se obtém um vinho homogêneo no final da fermentação. Como a capacidade fermentativa depende do parâmetro $Y_{x/s}$, quando este é alterado por um erro analítico, pode fornecer valores mais elevados, provocando uma tendência de queda na capacidade fermentativa. Além disso a floculação dificulta a transferência de massa do meio fermentativo para o interior dos flocos o que leva a uma queda nos valores de velocidade de consumo de substrato, produtividade e consequentemente nos de conversão estabelecido pelo padrão, o que também provoca queda no valor da capacidade fermentativa.

O fato da capacidade fermentativa ser menor quando a cepa testada apresenta características floculantes é esperado, pois, este parâmetro foi desenvolvido para avaliar cepas para aplicação em processos convencionais de fermentações alcoólica, onde esta característica é indesejável, devido aos problemas operacionais acarretados, principalmente na unidade de separação. Este fato faz com que este parâmetro não seja de relevância fundamental na seleção da cepa para utilização no processo proposto neste trabalho pois, normalmente o desvio negativo se dá na produtividade e não no rendimento, que pode ser compensado por uma maior quantidade de massa celular no interior reator.

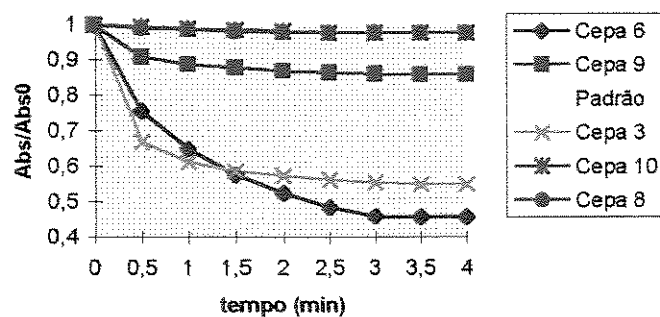
4.1.2. Capacidade de Floculação

Na Tabela 05, encontram-se os valores da velocidade específica de sedimentação, obtidos como descrito no item 3.2.2.1.

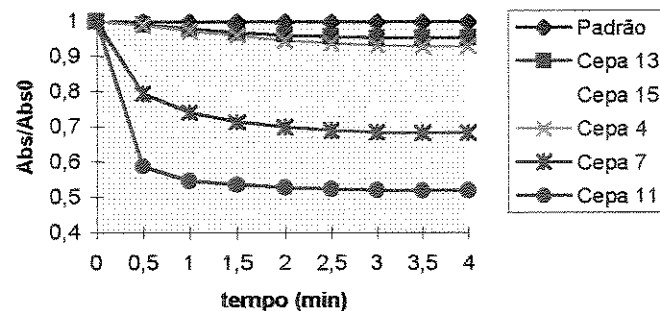
Tabela 05- Velocidade Específica de Sedimentação (VES)

Cepa	VES (min^{-1})
Padrão	0,0017
1	0,0032
2	0,0573
3	0,1279
4	0,0201
5	0,0038
6	0,1551
7	0,0905
8	0,0077
9	0,0400
10	0,0076
11	0,1372
12	0,0018
13	0,0156
14	0,0932
15	0,0698

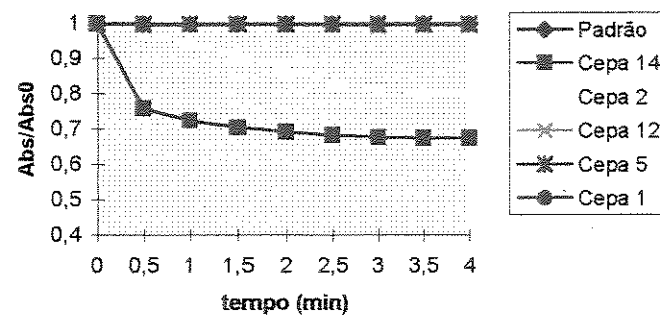
Pode-se notar, pelos dados da Tabela 05 que apesar de todas as cepas testadas apresentarem características flocculantes, existe uma grande diferença na intensidade de floculação de cada uma, o que origina valores de velocidade específica de sedimentação distintos. Isso pode ser melhor visualizado pelas Figuras 3.a, 3.b e 3.c, que contém os valores da Abs/Abs_0 em função do tempo (minutos) para as cepas testadas juntamente com a padrão.



(a)



(b)



(c)

Figura 03: Evolução dos testes de floculação em função do tempo (minutos)

A velocidade específica de sedimentação é um dos parâmetros importantes, se não o mais importante, na seleção da cepa a ser utilizada no processo proposto. Isto se deve ao fato de que seu valor, em primeira instância, serve como indicativo da capacidade que uma determinada cepa possui de permanecer neste tipo de processo, já que não existe unidade de separação e reciclo de células.

4.1.3. Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)

A Tabela 06 apresenta os valores de $\mu_{\text{máx}}$ de cada cepa testada, calculado conforme procedimento descrito no item 3.2.3.1.

Tabela 06- Valores de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})

Cepa	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})
Padrão	0,5000
1	0,4666
2	0,5034
3	0,4904
4	0,4993
5	0,4491
6	0,5753
7	0,5339
8	0,4372
9	0,5196
10	0,5196
11	0,5288
12	0,5041
13	0,4475
14	0,4675
15	0,5106

Este parâmetro fornece dados referentes a velocidade de crescimento de uma dada cepa. Desta forma, em processos industriais onde existe possibilidade da entrada de leveduras pelo meio fermentativo, a cepa que apresentar maior velocidade de crescimento, entre outras características, será aquela que terá maior chance de permanecer no processo.

4.2. Seleção da Cepa

Para a escolha da cepa foi utilizado o parâmetro velocidade específica de sedimentação. Em função disto a cepa selecionada foi a de número 6 cuja VES foi de $0,1551 \text{ h}^{-1}$. Mesmo não sendo esta linhagem a que apresentou a melhor capacidade fermentativa ($-322,20$) entre as cepas testadas, fato este decorrente de seu alto poder floculante, esta apresentou um valor satisfatório para o parâmetro $Y_{P/S}$ ($0,454$). Além da maior velocidade específica de sedimentação ($0,155 \text{ min}^{-1}$), esta possui também o maior valor de velocidade específica máxima de crescimento ($0,575 \text{ h}^{-1}$). Esta cepa ao ser testada nos fermentadores foi capaz de permanecer no mesmo em quantidade satisfatória, formando leitos estáveis e de alta viabilidade celular, o que a qualifica como indicada para ser utilizada no processo proposto.

4.3. Planejamento Fatorial Completo - Testes Preliminares

A Tabela 07 mostra os resultados dos testes preliminares de otimização do sistema de reatores, utilizando-se planejamento experimental fatorial completo e análise por superfície de resposta, como descrito no item 3.3.4.2. As variáveis estudadas nesta etapa foram a concentração de sacarose na alimentação (g/L) e o tempo de residência (h) e as variáveis resposta o rendimento e a produtividade.

Tabela 07- Ensaios utilizados no planejamento fatorial completo - testes preliminares

Caso	Conc. De Substrato S	Tempo de Residência tr	Conc. de Substrato S (g/L)	Tempo de Residência tr (h)	Produtividade (mL _{etOH} /L. h)	Rendimento (%)	Ordem dos Ensaios
1	-1,00	-1,00	100,00	5,00	8,12	59,70	8
2	1,00	-1,00	150,00	5,00	10,14	50,58	10
3	-1,00	1,00	100,00	10,00	6,27	89,63	2
4	1,00	1,00	150,00	10,00	7,30	71,57	11
5	0,00	-1,41	125,00	3,97	9,64	47,98	6
6	0,00	1,41	125,00	11,02	6,53	88,36	1
7	-1,41	0,00	89,75	7,50	7,35	94,76	3
8	1,41	0,00	160,25	7,50	8,18	61,05	4
9 (C)	0,00	0,00	125,00	7,50	7,88	71,96	9
10 (C)	0,00	0,00	125,00	7,50	7,92	72,50	5
11 (C)	0,00	0,00	125,00	7,50	7,73	71,08	7

Com base nestes resultados, foram estudados os efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento e a produtividade.

4.3.1. Rendimento

Utilizando-se o “Software Statistica 5.0” obteve-se os efeitos de cada variável, os coeficientes de regressão do modelo quadrático, a análise de variância do modelo e as superfícies de resposta para o rendimento.

Na Tabela 08 são apresentados os efeitos principais de cada variável e os efeitos de interação sobre o rendimento.

Tabela 08- Estimativa dos efeitos no rendimento

Fator	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média	71,87*	0,41*	172,82*	0,000033*
(1) Conc. (L)	-18,73*	0,51*	-36,73*	0,000740*
(2) Tempo (L)	27,04*	0,51*	53,01*	0,000356*
Conc. (Q)	3,47*	0,61*	5,70*	0,029405*
Tempo (Q)	-6,32*	0,61*	-10,39*	0,009133*
1L * 2L	-4,47*	0,72*	-6,21*	0,024975*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9530$, Grau de Ajuste = 0,9059

Onde:

L é o coeficiente do termo linear e Q é o coeficiente do termo quadrático.

O valor t de cada variável apresentado na Tabela 08 é calculado conforme segue:

$$\text{valor t da variável} = \frac{\text{efeito de cada termo}}{\text{erro padrão}} \quad (34)$$

Pelos dados apresentados na Tabela 08 pode-se observar que todos os dados são estatisticamente significativos, uma vez que o valor do erro padrão não é elevado frente ao seu respectivo efeito. Os dois primeiros efeitos da tabela acima correspondem aos efeitos principais das variáveis, que é a média dos efeitos na resposta devido a mudança da variável da faixa de -1 para +1. Isto significa, por exemplo, que ao passar a concentração de substrato (S) de 100,00 g/L para 150,00 g/L a resposta, no caso o rendimento, cai em média 18,73%. A mesma avaliação pode ser feita para o tempo de residência (tr) , que quando passa do nível -1 (5 h) para +1 (10 h), provoca um aumento de 27,04% no rendimento. Os efeitos principais demonstram que o tempo de residência é a variável mais importante para a análise do rendimento.

Sendo o princípio do planejamento uma análise multivariável, é possível avaliar o efeito da interação entre as variáveis. Isto significa que ao variar, por exemplo, a concentração de substrato

de -1 para +1, a mudança na resposta pode não ser a mesma, pois esta depende da variação do tempo de residência. Na Tabela 08, isto pode ser verificado através do efeito de interação, que corresponde ao último valor apresentado.

A importância dos efeitos juntamente com o efeito de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 04), que mostra uma estimativa dos efeitos absolutos de cada variável estatisticamente significativa.

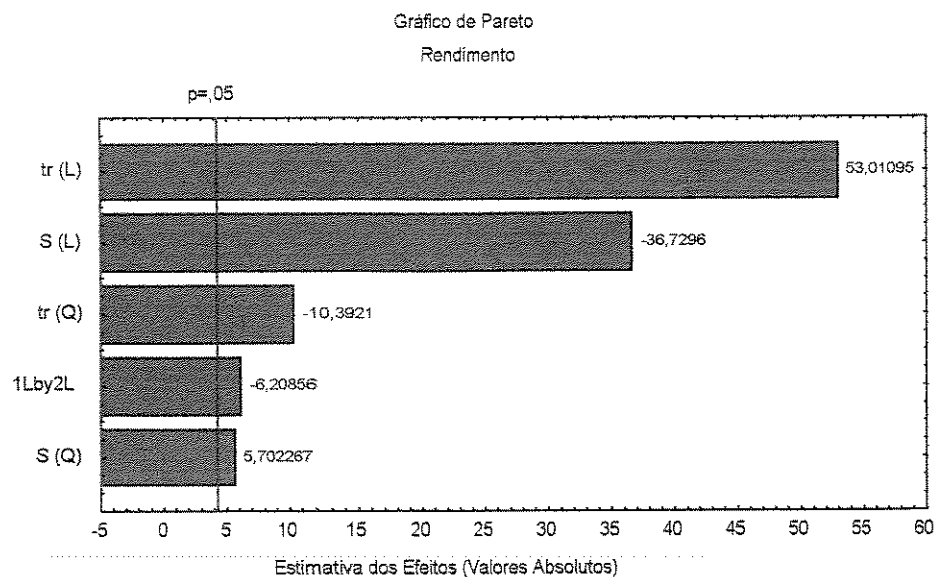


Figura 04: Gráfico de Pareto - Rendimento

Observa-se pela Figura 04 que os efeitos mais significativos sobre o rendimento no intervalo de confiança de 95% foram observados para os termos lineares e entre eles o tempo de residência apresentou o efeito mais significativo dentre as variáveis estudadas.

Na Tabela 09 encontram-se os coeficientes de regressão para o modelo quadrático que leva em consideração todos os termos considerados estatisticamente significativos. É importante salientar que os parâmetros obtidos são para o modelo decodificado (real).

Tabela 09- Coeficientes de regressão para o modelo quadrático

Fator	Coef. Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	59,53*	10,15*	5,86*	0,028*
(1)Conc (L)	-0,80*	0,13*	-6,17*	0,025*
(2)Tempo (L)	17,47*	1,03*	16,95*	0,003*
Conc (Q)	0,003*	0,0005*	5,70*	0,029*
Tempo (Q)	-0,50*	0,049*	-10,39*	0,009*
1L by 2L	-0,036*	0,0058*	-6,21*	0,025*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9530$, Grau de Ajuste = 0,9059

O modelo real final obtido pela regressão e que relaciona o rendimento em função da concentração de substrato na alimentação e o tempo de residência é uma equação de 2º ordem descrita matematicamente e como:

$$Rend = 59,53 - 0,800*S + 17,47*tr + 0,0028*S^2 - 0,5060*tr^2 - 0,03578*S*tr \quad (35)$$

A Tabela 10 mostra a avaliação do desempenho do modelo, onde a percentagem de variação explicada é dada por:

$$R^2 = SQ_R / SQ_T \quad (36)$$

Onde:

SQ_R = Soma Quadrática da Regressão

SQ_T = Soma Quadrática Total

Para o modelo em estudo o valor de R^2 foi igual a 0,9530, o que significa que 95,30 % das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico.

Tabela 10- Tabela ANOVA para o Rendimento

Fonte de Variação	S.Q	g.l	M.Q	Teste F	R ²
Regressão	2277,20	p-1=5	455,44	20,27	0,9530
Resíduos	112,33	n-p=5	22,46		
F.Ajuste	111,29	m-p=3	37,09	71,47	
E.Puro	1,04	n-m=2	0,519		
Total	2389,53	n-1=10			

$$F_{5,5} = 5,05 \text{ (tabelado no nível de 95\%)}$$

Onde: p = N.º de parâmetros do modelo

n = N.º total de ensaios

m = N.º de ensaios distintos

De modo a verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação nos dados experimentais, pode-se utilizar o teste F de significância. Para isto, compara-se o valor de F estimado a partir dos dados experimentais com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência $F_{p-1, n-1}$, onde o valor é expresso segundo a equação abaixo:

$$F = \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad (37)$$

Onde:

MQ_R = Média Quadrática da Regressão

MQ_r = Média Quadrática do Resíduo

Como o valor tabelado de F para o intervalo de 95% de confiança foi de 5,05 (BRUNS *et al.*, 1995), sendo este quatro vezes inferior ao valor obtido com o modelo, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, atestando assim a validade do modelo obtido.

A previsão adequada do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 05, onde são apresentados os valores observados versus os previstos.

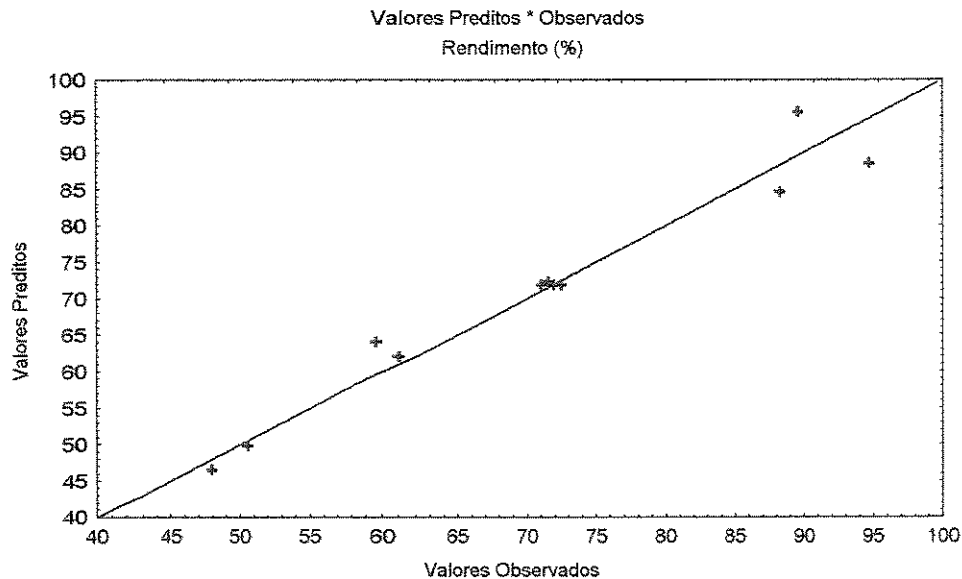


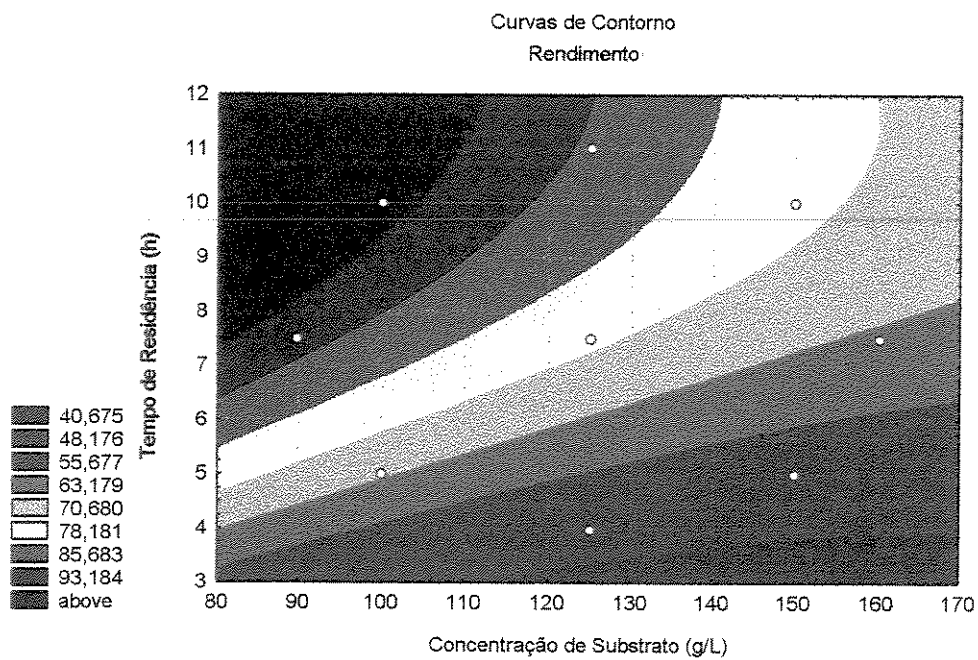
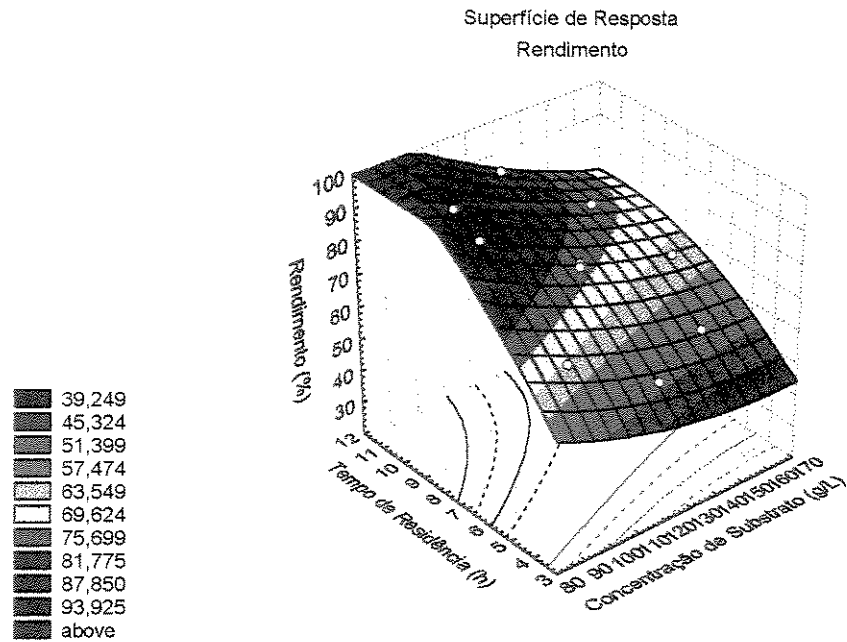
Figura 05: Valores observados versus previstos - Rendimento

Assim, sendo o modelo quadrático válido, é possível gerar as superfícies de resposta e as curvas de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização do rendimento do processo.

As Figuras 6.a e 6.b apresentam respectivamente a superfície de resposta e as curvas de contorno para o rendimento em função da concentração de substrato e do tempo de residência. Através destas figuras verifica-se que quanto menor a concentração de substrato e maior o tempo de residência maior é o rendimento.

Este comportamento mostra claramente que a queda do rendimento está vinculada com a baixa conversão obtida para ensaios com alta concentração de substrato e/ou baixos tempos de residência. Esta baixa conversão, está vinculada a baixa quantidade de células de leveduras contidas no reator, que por sua vez pode ser explicada pelo fato de todo o CO_2 produzido no reator 1 ter sido transferido para o reator 2. Esta quantidade de CO_2 fez com que as células de

leveduras contidas no reator 2 fluidizassem totalmente não permitindo a formação de um leito estável, causando uma diminuição da concentração celular no mesmo devido a perda por arraste no vinho.



Figuras 6.a e 6.b - Superfície de Resposta e Curva de Contorno- Rendimento

4.3.2. Produtividade

Após o estudo do comportamento do rendimento frente as variáveis estudadas partiu-se para o estudo do comportamento da produtividade. Para tanto, foi realizado um trabalho similar ao do item 4.3.1. Para o planejamento fatorial completo foi utilizada a mesma sequência de ensaios apresentados na Tabela 02, e os resultados obtidos que estão contidos na Tabela 07.

Utilizando-se o “Software Statistica 5.0” obteve-se os efeitos de cada variável, os coeficientes de regressão do modelo quadrático, a análise de variância do modelo e as superfícies de resposta para a produtividade.

Na Tabela 11 são apresentados os efeitos principais e de interação sobre a produtividade.

Tabela 11- Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre a produtividade

Fator	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média	7,84*	0,058*	135,62*	0,00005*
(1) Conc. (L)	1,06*	0,070*	14,91*	0,00446*
(2) Tempo (L)	-2,27*	0,070*	-32,07*	0,00097*
Conc. (Q)	-0,06	0,084	-0,74	0,53670
Tempo (Q)	0,25	0,084	3,06	0,09205
1L * 2L	-0,49*	0,100*	-4,94*	0,03859*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9650$, Grau de Ajuste =0,9300

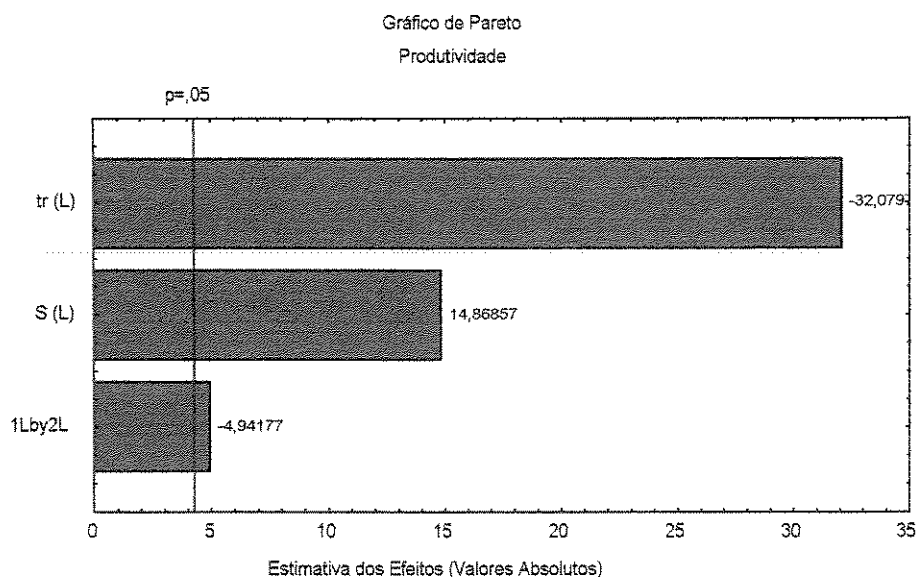
Os dois primeiros efeitos da tabela acima correspondem aos efeitos principais das variáveis. Pode-se perceber que o tempo de residência é a variável que mais influencia na resposta. Pode-se perceber também pelos valores da Tabela 11 que os termos relacionados aos modelo quadrático não são estatisticamente significativos. A Tabela 12 mostra as estimativas dos efeitos desprezando-se os efeitos não significativos estatisticamente.

Tabela 12 Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre a produtividade

Fator	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média	7,91*	0,030*	262,05*	0,0001*
(1) Conc. (L)	1,06*	0,070*	14,92*	0,0044*
(2) Tempo (L)	-2,27*	0,070*	-32,08*	0,0009*
1L * 2L	-0,49*	0,100*	-4,94*	0,0385*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9558$, Grau de Ajuste =0,9368

A importância dos efeitos principais juntamente com o efeito de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 07), que mostra uma estimativa dos efeitos absolutos de cada variável estatisticamente significativa.

**Figura 07: Gráfico de Pareto - Produtividade**

Pode-se observar pela Figura 07 que o efeito mais significativo no intervalo de confiança de 95% é o tempo de residência seguido pela concentração de substrato.

Na Tabela 13 são apresentados os coeficientes de regressão do modelo de 1º ordem.

Tabela 13- Coeficientes de regressão do modelo de 1º ordem para a produtividade

Fator	Coef. Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	4,97*	0,7797*	6,37*	0,023*
(1)Conc (L)	0,05*	0,0061*	8,23*	0,014*
(2)Tempo (L)	0,039	0,1011	0,39	0,731
1L by 2L	-0,0039*	0,0008*	4,94*	0,038*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9558$, Grau de Ajuste =0,9368

A porcentagem de variação explicada (R^2) obtida para a produtividade foi de 0,9558, o que nos indica que 95,58 % das variações nos resultados podem ser explicadas pelo modelo .

O modelo real final é apresentado pela equação (38) e correlaciona a produtividade com o tempo de residência e a concentração de substrato:

$$Prod = 4,97 + 0,05 * S + 0,039 * tr - 0,0039 * S * tr \quad (38)$$

A análise de variância encontra-se na Tabela 14 e faz uma avaliação do desempenho do modelo de 1º ordem obtido.

Tabela 14: Tabela ANOVA para a produtividade

Fonte de Variação	S.Q	g.l	M.Q	Teste F	R^2
Regressão	12,80	p-1=3	4,27	50,45	0,9557
Resíduos	0,59	n-p=7	$8,46 \cdot 10^{-2}$		
F.Ajuste	0,57	m-p=5	0,11	11,40	
E.Puro	0,02	n-m=2	0,01		
Total	13,39	n-1=10			

$F_{3,7} = 4,35$ (tabelado no nível de 95%)

$F_{5,2} = 19,30$ (tabelado no nível de 95%)

O valor tabelado de F é cerca de 12 vezes inferior ao calculado, podendo-se considerar assim o modelo perfeitamente adequado.

A Figura 08 mostra os valores preditos pelo modelo versus os observados experimentalmente para a produtividade. Pode-se observar por esta figura que os valores são coerentes em toda a faixa de produtividade, confirmando a validade do modelo.

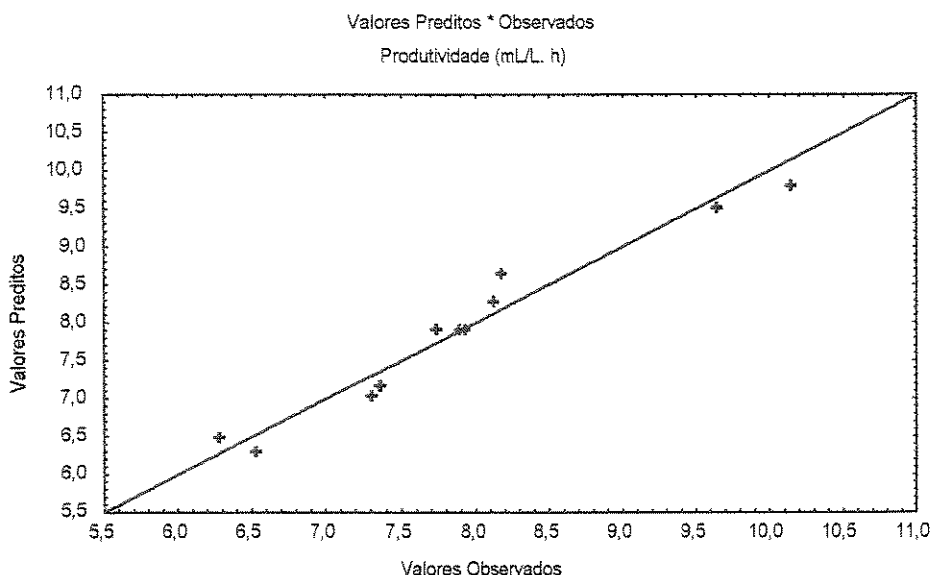
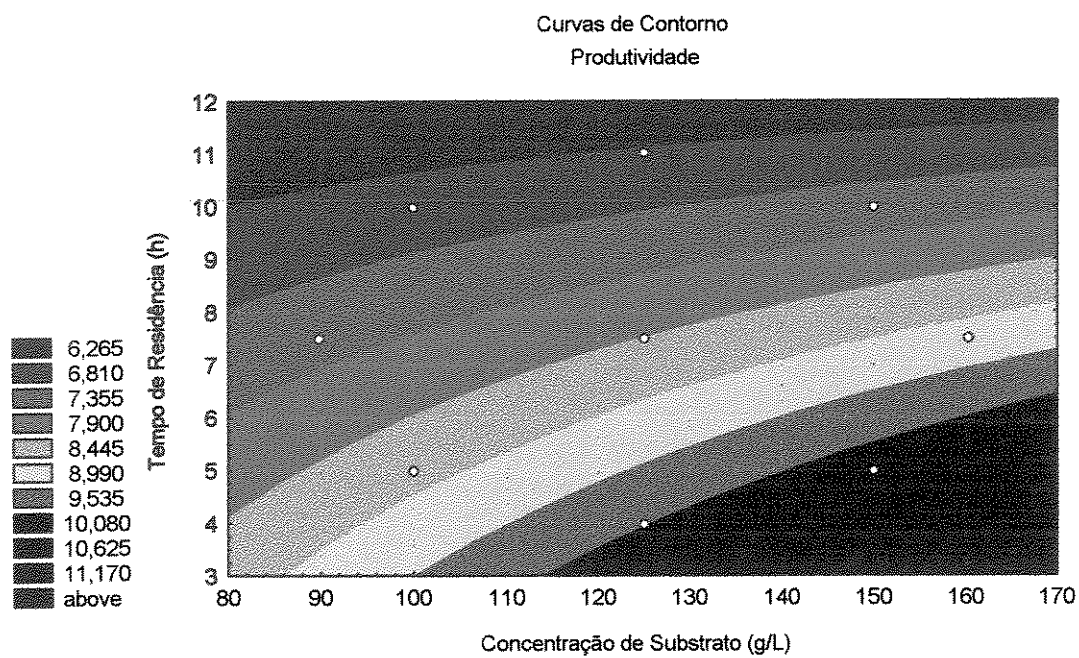
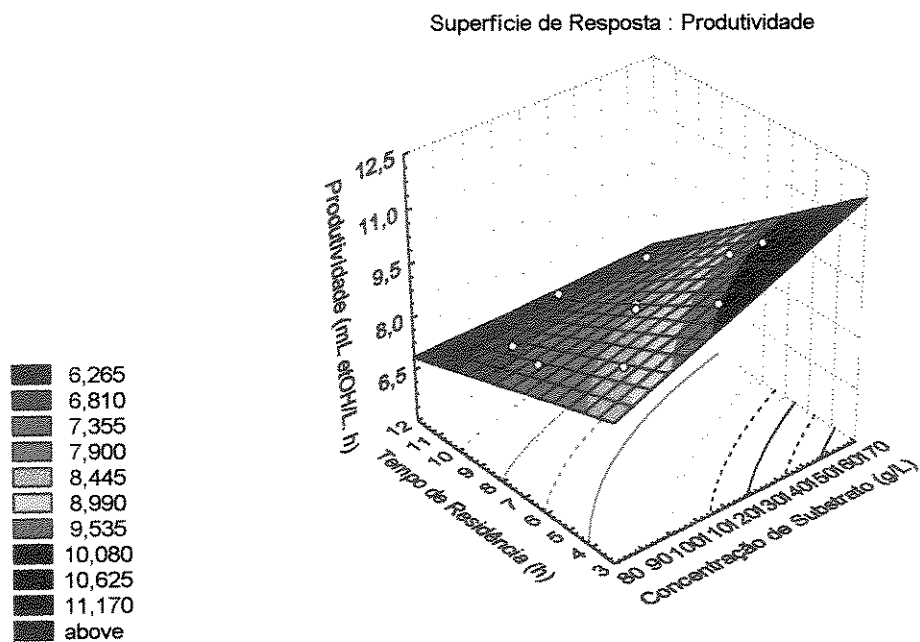


Figura 08: Valores preditos versus Observados - Produtividade

Assim, sendo o modelo de 1º ordem válido, é possível gerar as superfícies de resposta e as curvas de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização da produtividade.

As Figuras 9.a e 9.b apresentam a superfície de resposta e a curva de contorno para a produtividade em função da concentração de substrato e o tempo de residência. Observa-se que a produtividade aumenta com o aumento da concentração de substrato e com a diminuição do tempo de residência, comportamento este contrário ao observado em relação ao rendimento.



Figuras 9.a e 9.b: Superfície de Resposta e Curva de Contorno - Produtividade

4.3.3. Definições da faixa ótima de operação

Para definição do ponto ótimo de operação, deve-se levar em conta a importância do rendimento, ou seja, deve-se buscar obter a maior produtividade possível sem que o valor do rendimento seja afetado.

Como descrito anteriormente, o comportamento dos valores de rendimento e produtividade em função da concentração de substrato e tempo de residência se mostraram antagônicos. Desta forma é necessário a análise das superfícies de ambas as respostas para se definir o ponto ótimo de operação.

Ao analisar as Figuras 6.a e 6.b, observa-se que o rendimento tende ao máximo para baixas concentrações de substrato e altos tempos de residência.

Valores satisfatórios de rendimento fermentativo (90%) podem ser atingidos na faixa que varia de 80 - 125 g/L de substrato com 6 e 10 horas de tempo de residência respectivamente. Para se obter o valor ótimo de operação, a produtividade deve ser a máxima contida nesta faixa. Outro fator que deve ser levado em consideração é a concentração de etanol no vinho, pois, quanto maior seu valor, menor será o consumo de vapor e a quantidade de vinhaça gerada na etapa de destilação.

Na faixa pré definida, é possível obter como máxima produtividade 7,4 mL etOH/L. h (5,85 g etOH/ L. h) para valores de 105 g/L de substrato e 9,5 horas de tempo de residência até 80 g/L de substrato e 6 horas de tempo de residência. Levando-se em conta que a concentração de etanol no vinho é função da concentração de ART para um mesmo rendimento e considerando a necessidade de se obter a maior concentração alcoólica possível, optou-se por trabalhar no ponto que corresponde a 100 g/L de ART e 8,5 horas de tempo de residência. Apesar do valor da produtividade obtida neste trabalho ser similar àquele apresentado pelos processos convencionais, a vantagem deste sistema é a possibilidade da eliminação do reciclo de células que corresponde a aproximadamente 25% dos custos de processamento industrial do álcool. Entretanto, encontra-se

na literatura alguns trabalhos utilizando sistemas de reatores de leito fluidizado para produção de etanol, onde produtividades de 14,4 g etOH/L. h e rendimentos de 88,3% foram obtidos (PAIVA *et al.*, 1996). PRINCE & BARFORD (1982) e PAIVA *et al.*, 1996 obtiveram o mesmo comportamento antagônico entre o rendimento e produtividade em sistemas de reatores tipo torre com leveduras floculantes.

Como neste trabalho esse mesmo comportamento antagônico foi observado, algumas modificações foram feitas no sentido de obter rendimentos na ordem de 90% com altas produtividades.

Com base no exposto anteriormente, buscou-se uma nova forma de operação que tornasse possível o aumento da concentração celular, principalmente no interior do segundo reator, o que aumentaria a velocidade de conversão e portanto o rendimento fermentativo, possibilitando atingir valores elevados de produtividade sem prejuízo ao rendimento. Sendo o CO₂ produzido no primeiro reator o responsável pela fluidização e conseqüentemente pelas perdas de células contidas no segundo reator, as modificações realizadas no sistema objetivou evitar o envio deste gás para o segundo reator, como descrito no item (3.3.5).

4.4. Otimização do sistema de fermentação proposto

A Tabela 15 mostra os resultados dos testes de otimização do sistema de reatores modificado, utilizando-se planejamento experimental fatorial e análise por superfície de resposta, como descrito no item 3.3.5.1. Nesta etapa as variáveis estudadas foram a concentração de substrato na alimentação, o tempo de residência, a vazão de reciclo de vinho no segundo reator e a relação D/h de cada reator, sendo as variáveis resposta o rendimento e a produtividade.

Tabela 15- Ensaios realizados no planejamento fatorial linear - sistema proposto

Caso	S (g/L)	tr (h)	Q (mL/min)	D/h	Produtividade (mL etOH/L. h)	Rendimento (%)
1	100,00	5,00	28,60	0,089	13,26	95,40
2	150,00	5,00	28,60	0,089	19,44	92,13
3	100,00	5,00	28,60	0,116	12,55	91,80
4	150,00	5,00	28,60	0,116	19,29	92,97
5	100,00	5,00	85,80	0,089	13,86	96,92
6	150,00	5,00	85,80	0,089	17,61	87,00
7	100,00	5,00	85,80	0,116	14,04	95,87
8	150,00	5,00	85,80	0,116	19,02	92,24
9	100,00	10,00	28,60	0,089	6,40	95,52
10	150,00	10,00	28,60	0,089	9,49	92,56
11	100,00	10,00	28,60	0,116	7,24	94,96
12	150,00	10,00	28,60	0,116	9,96	94,99
13	100,00	10,00	85,80	0,089	6,54	94,12
14	150,00	10,00	85,80	0,089	9,90	92,75
15	100,00	10,00	85,80	0,116	6,30	94,16
16	150,00	10,00	85,80	0,116	10,20	94,44
17 (C)	125,00	7,50	57,20	0,102	10,66	94,22
18 (C)	125,00	7,50	57,20	0,102	10,39	96,83
19 (C)	125,00	7,50	57,20	0,102	10,55	95,80

A concentração média de células nos reatores 1 e 2 foram 30,75% v/v (46,60 g/L) e 35,39% v/v (45,00 g/L) respectivamente, com pequenas variações para cada ensaio. No primeiro sistema utilizado estes valores foram 30,00 g/L e 5 g/L para o reator 1 e 2 respectivamente.

Com base nos resultados contidos na Tabela 15 foram estudados os efeitos das variáveis independentes sobre o rendimento e a produtividade.

4.4.1. Rendimento

Pode-se perceber pelos resultados da Tabela 15 que as variáveis estudadas na faixa estabelecida não inferiram nos valores dos rendimentos.

Utilizando-se o “Software Statistica 5.0” obteve-se os valores dos efeitos principais e os de interação de cada variável para o rendimento. Estes valores são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16- Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre o rendimento

Fator	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média	93,93*	0,16*	562,16*	0,001*
(1) S (L)	-2,45	0,36	-6,75	0,093
(2) tr (L)	1,14	0,36	3,15	0,195
(3) D/h (L)	0,62	0,36	1,73	0,334
(4) Q (L)	-0,35	0,36	-0,97	0,509
1L * 2L	1,92	0,36	5,27	0,119
1L * 3L	-1,20	0,36	-3,30	0,187
1L * 4L	1,45	0,36	3,99	0,156
2L * 3L	0,85	0,36	2,34	0,257
2L * 4L	0,27	0,36	0,75	0,592
3L * 4L	-0,28	0,3642	-0,7861	0,575

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,6756$, Grau de Ajuste =0,9702

Os quatro primeiros efeitos da tabela acima correspondem aos efeitos principais das variáveis. Estes valores confirmam que as variáveis estudadas não apresentam efeitos estatisticamente significativos sobre o rendimento no intervalo de confiança de 95%.

A importância dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 10) que mostra uma estimativa dos efeitos de cada variável estatisticamente significativa (valores absolutos).

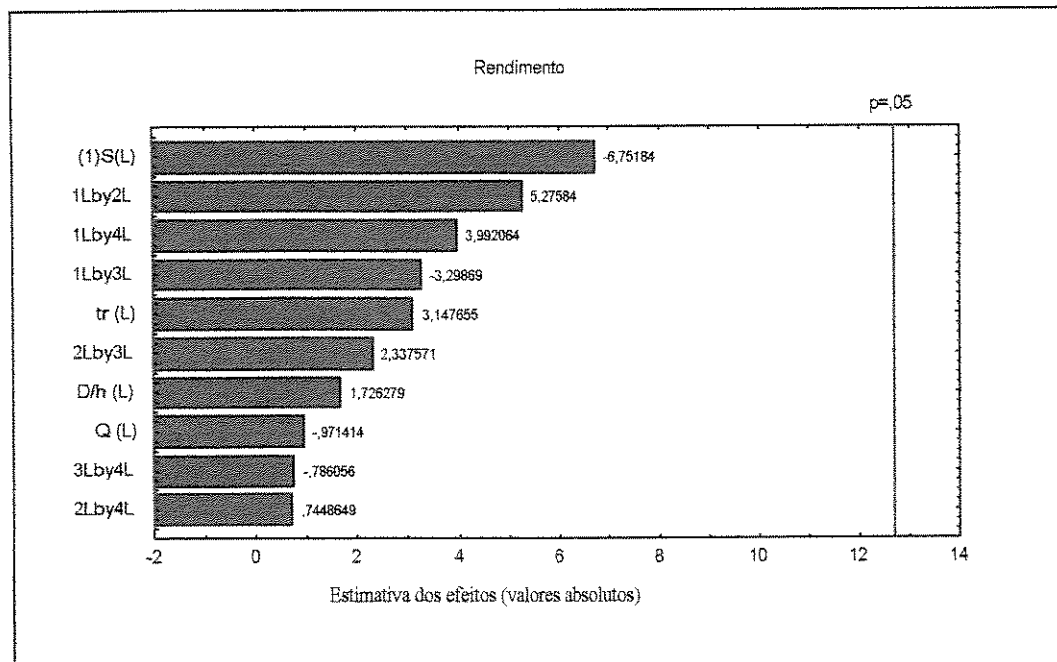


Figura 10: Gráfico de Pareto- Rendimento

Pela Figura 10 pode-se perceber que nenhum dos termos é estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95% uma vez que as estimativas dos efeitos (barras azuis) não ultrapassaram a linha vermelha pontilhada ($p=0,05$).

4.4.2. Produtividade

Após o estudo dos efeitos das variáveis estudadas sobre o rendimento partiu-se para a otimização da produtividade. Para tanto, foi realizado um trabalho similar ao do item 4.3.2. Para o planejamento fatorial foi utilizada a mesma sequência de ensaios apresentados na Tabela 03, cujos resultados estão contidos na Tabela 15.

Na Tabela 17 são apresentados os efeitos principais de cada variável e os efeitos de interação sobre a produtividade.

Tabela 17- Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre a produtividade

Fator	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média	11,83*	0,03*	370,32*	0,00000*
(1) S (L)	4,57*	0,07*	65,69*	0,00023*
(2) tr (L)	-7,65*	0,07*	-109,80*	0,00008*
(3) D/h (L)	0,50*	0,07*	7,10*	0,01925*
(4) Q (L)	-0,25	0,07	-3,62	0,06843
1L * 2L	0,01	0,07	0,21	0,85310
1L * 3L	-0,11	0,07	-1,59	0,25084
1L * 4L	-1,30*	0,07*	-18,73*	0,00283*
2L * 3L	0,38*	0,07*	5,48*	0,03175*
2L * 4L	-0,15	0,07	-2,19	0,15988
3L * 4L	0,21	0,07	3,12	0,08897

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9723$, Grau de Ajuste =0,9377

Onde:

L é o coeficiente do termo linear

Os quatro primeiros efeitos da Tabela 17 correspondem aos efeitos principais das variáveis, que é a média dos efeitos na resposta devido a mudança da variável da faixa de -1 para +1. Isto significa, por exemplo, que ao passar a concentração de substrato (S) de 100,00 g/L para 150,00 g/L a resposta, a produtividade aumenta em média 4,57 mL etOH/ L . h. A mesma avaliação pode ser feita para o tempo de residência (tr) e as demais variáveis. Para o tempo de residência, quando se passa do nível -1 (5 h) para +1 (10 h), provoca uma queda de 7,65 mL etOH/ L . h na produtividade. Os efeitos principais demonstram que o tempo de residência e a concentração de substrato na alimentação são as variáveis mais importantes para a análise da produtividade. Pode-

se perceber também pelos valores da Tabela 17 que alguns efeitos não são estatisticamente significativos, uma vez que o valor do erro padrão é elevado frente ao seu respectivo efeito. A Tabela 18 mostra as estimativas dos efeitos desprezando-se os efeitos não significativos estatisticamente.

Tabela 18- Estimativa dos efeitos principais e de interação sobre a produtividade

Fator	Efeito	Erro Padrão	t	p
Média	11,83*	0,03*	370,32*	0,000007*
(1) S (L)	4,57*	0,07*	65,69*	0,000232*
(2) tr (L)	-7,64*	0,07*	-109,80*	0,000083*
(3) D/h (L)	0,50*	0,07*	7,10*	0,019253*
1L * 4L	-1,30*	0,07*	-18,73*	0,002836*
2L * 3L	0,38*	0,07*	5,47*	0,03175*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9706$, Grau de Ajuste =0,9593

Sendo o princípio do planejamento uma análise multivariável, é possível avaliar o efeito da interação entre as variáveis. Isto significa que ao variar, por exemplo, a concentração de substrato de -1 para +1, a mudança na resposta pode não ser a mesma, pois esta depende da variação do tempo de residência e das outras variáveis estudadas como discutido anteriormente no item 4.3.1. Na Tabela 18, isto pode ser verificado através do efeito de interação, que corresponde aos últimos dois valores apresentados.

A importância dos efeitos principais juntamente com os efeitos de interação podem ser melhor visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 11), que mostra uma estimativa dos efeitos de cada variável estatisticamente significativa (valores absolutos).

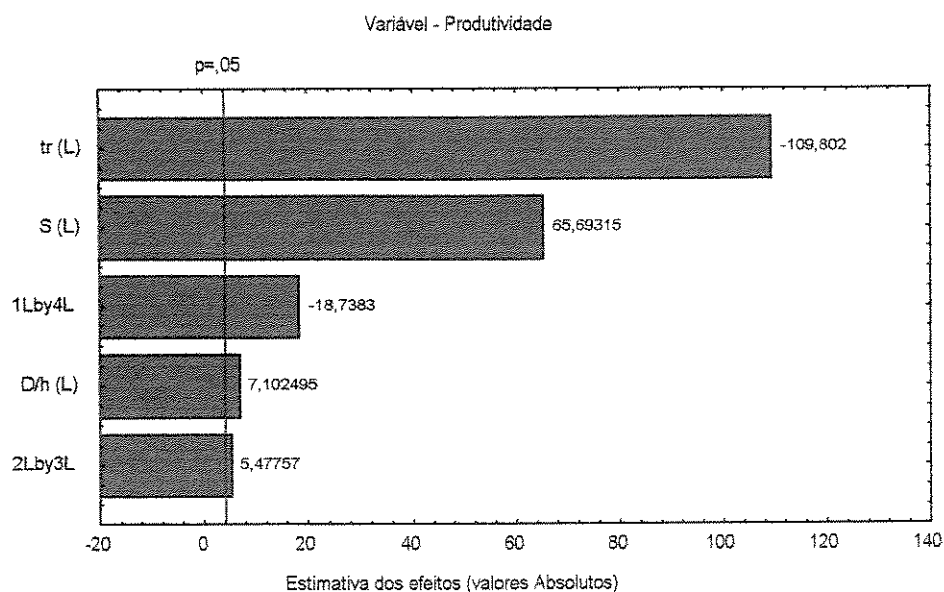


Figura11: Gráfico de Pareto- Produtividade

Pela Figura 11 pode-se perceber que os efeitos mais significativos no intervalo de confiança de 95% são o tempo de residência e a concentração de substrato na alimentação.

Na Tabela 19 encontram-se os coeficientes de regressão para o modelo de 1º ordem. É importante salientar que os parâmetros obtidos são para o modelo decodificado (real).

Tabela 19- Coeficientes de regressão para o modelo de 1º ordem- produtividade

Fator	Coef. Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	2,33	0,560	4,12	0,0541
(1) S	0,16*	0,004*	38,55*	0,0006*
(2) tr	0,22	0,071	-3,15	0,0872
(3) Q	-0,04*	0,004*	-9,46*	0,0109*
1 * 4	-0,01*	0,0005*	-18,73*	0,0028*
2 * 3	0,35*	0,040*	8,80*	0,0126*

*valores significativos (no nível de 95%); $R^2=0,9712$, Grau de Ajuste = 0,9600

O modelo real final obtido pela regressão que relaciona a produtividade com a concentração de substrato na alimentação, o tempo de residência, a vazão de reciclo e a relação diâmetro/ altura é uma equação de 1º ordem descrita matematicamente como:

$$Prod. = 2,33 + 0,16*S - 0,22*tr - 0,04*Q - 0,01*S*tr + 0,35*D/h*Q \quad (39)$$

A Tabela 20 faz uma avaliação do desempenho do modelo, onde a percentagem de variação explicada (R^2) é dada pela equação (36).

No modelo em estudo obteve-se um valor de R^2 igual a 0,9712, o que significa que 97,12 % das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico.

Tabela 20- Tabela ANOVA para a Produtividade

Fonte de Variação	S.Q	g.l	M.Q	Teste F	R^2
Regressão	345,92	p-1=5	69,18	91,03	0,9705
Resíduos	9,87	n-p=13	0,76		
F.Ajuste	9,84	m-p=11	0,89	46,10	
E.Puro	0,03	n-m=2	0,01		
Total	355,79	n-1=18			

$$F_{5,13} = 3,03 \quad (\text{tabelado no nível de 95\%})$$

Onde: p = N.º de parâmetros do modelo

n = N.º total de ensaios

m = N.º de ensaios distintos

De modo a verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação nos dados experimentais, pode-se utilizar o teste F de significância. Para isto, compara-se o valor de F estimado a partir dos dados experimentais com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência $F_{p-1, n-1}$, onde o valor é expresso segundo a equação (37).

Como o valor tabelado de F para o intervalo de 95% de confiança foi de 3,03 (BRUNS *et al.*, 1996), valor este trinta vezes inferior ao valor obtido com o modelo, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, atestando assim a validade do modelo obtido.

A precisão adequada do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 12, onde são apresentados os valores observados experimentalmente versus os previstos pelo modelo.

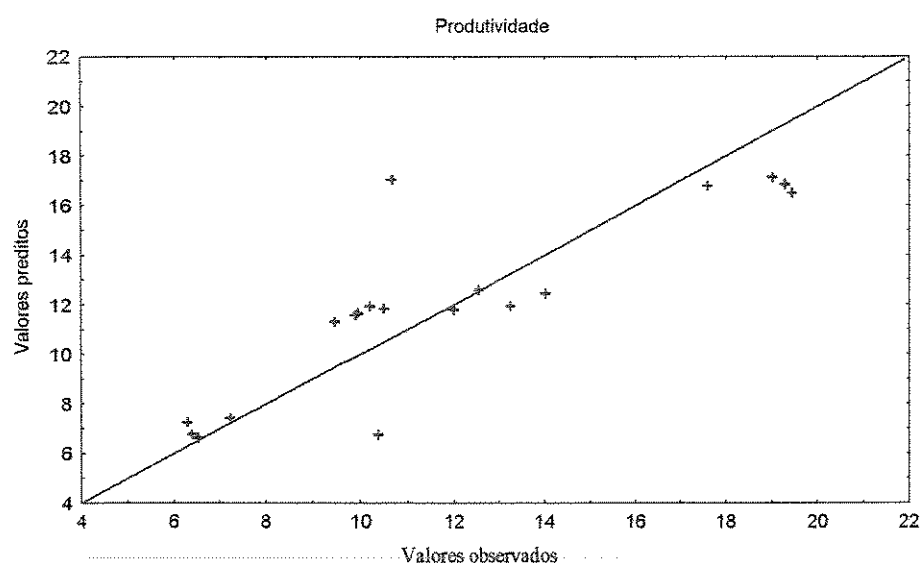
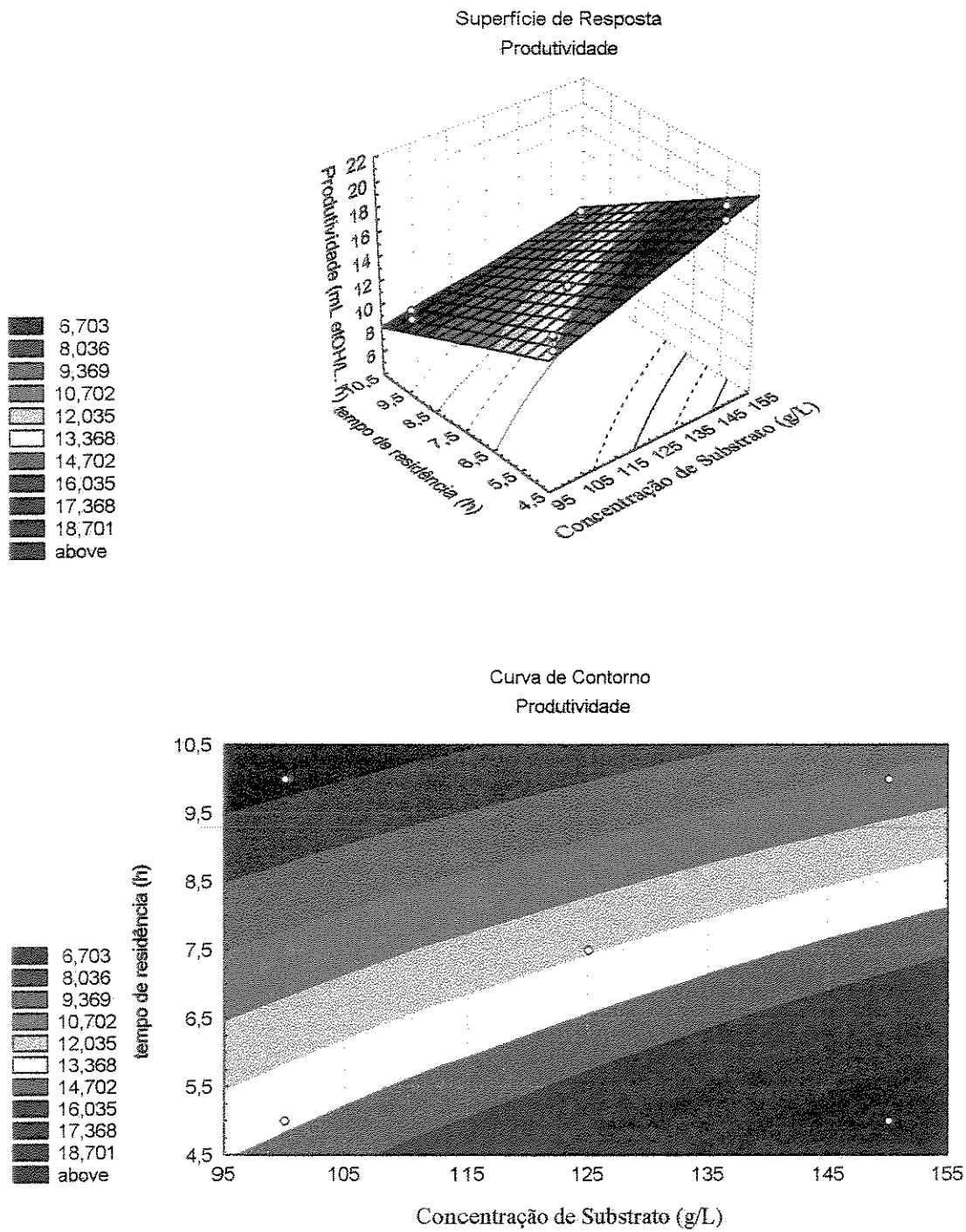


Figura 12: Valores Preditos versus observados- Produtividade

Assim, sendo o modelo quadrático válido, é possível gerar a superfície de resposta e a curva de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização da produtividade do processo.

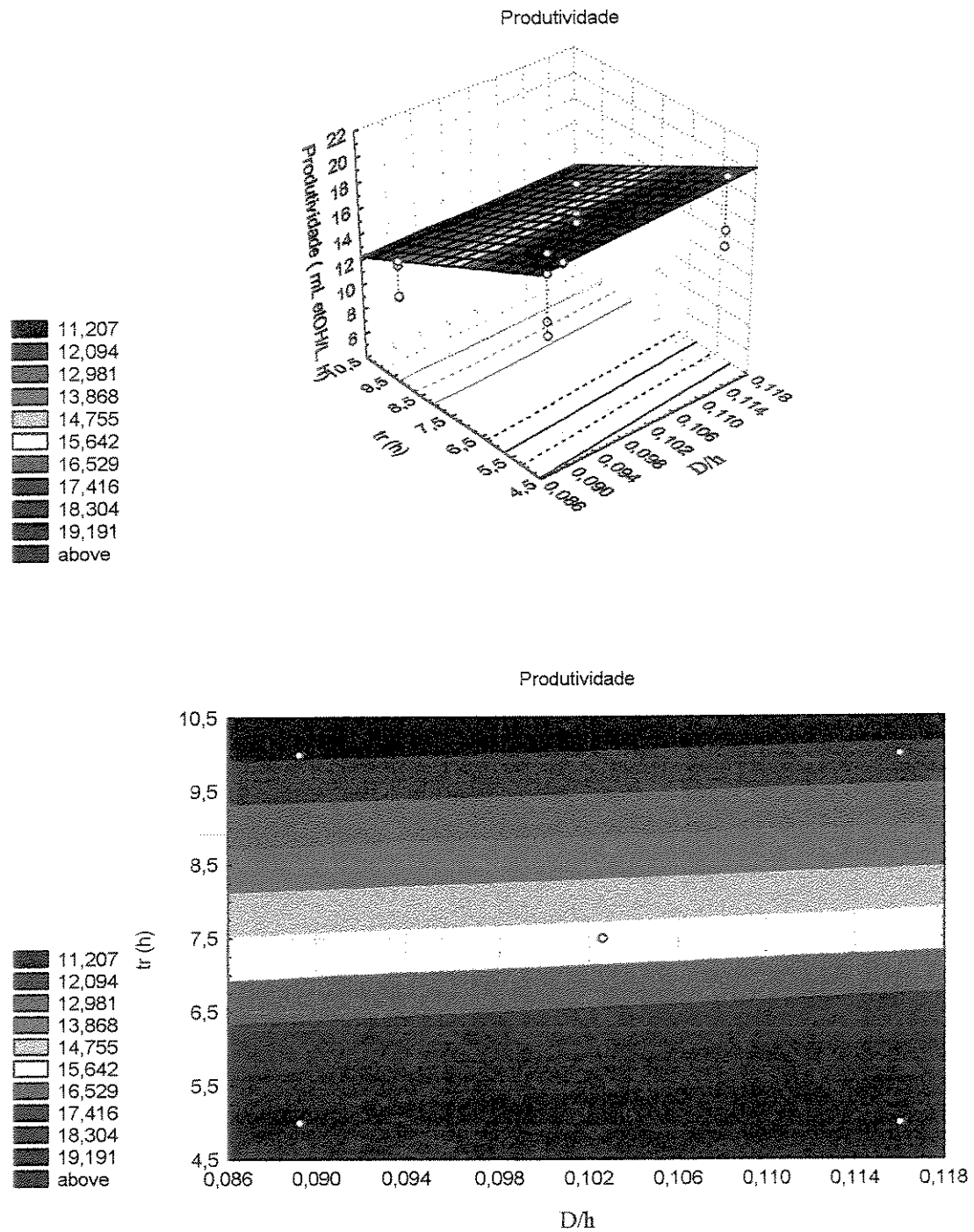
As Figuras 13.a e 13.b, apresentam a superfície de resposta e a curva de contorno para produtividade em função da concentração de substrato e do tempo de residência. Através das Figuras 13.a e 13.b verifica-se que quanto maior a concentração de substrato e menor o tempo de residência maior será a produtividade.



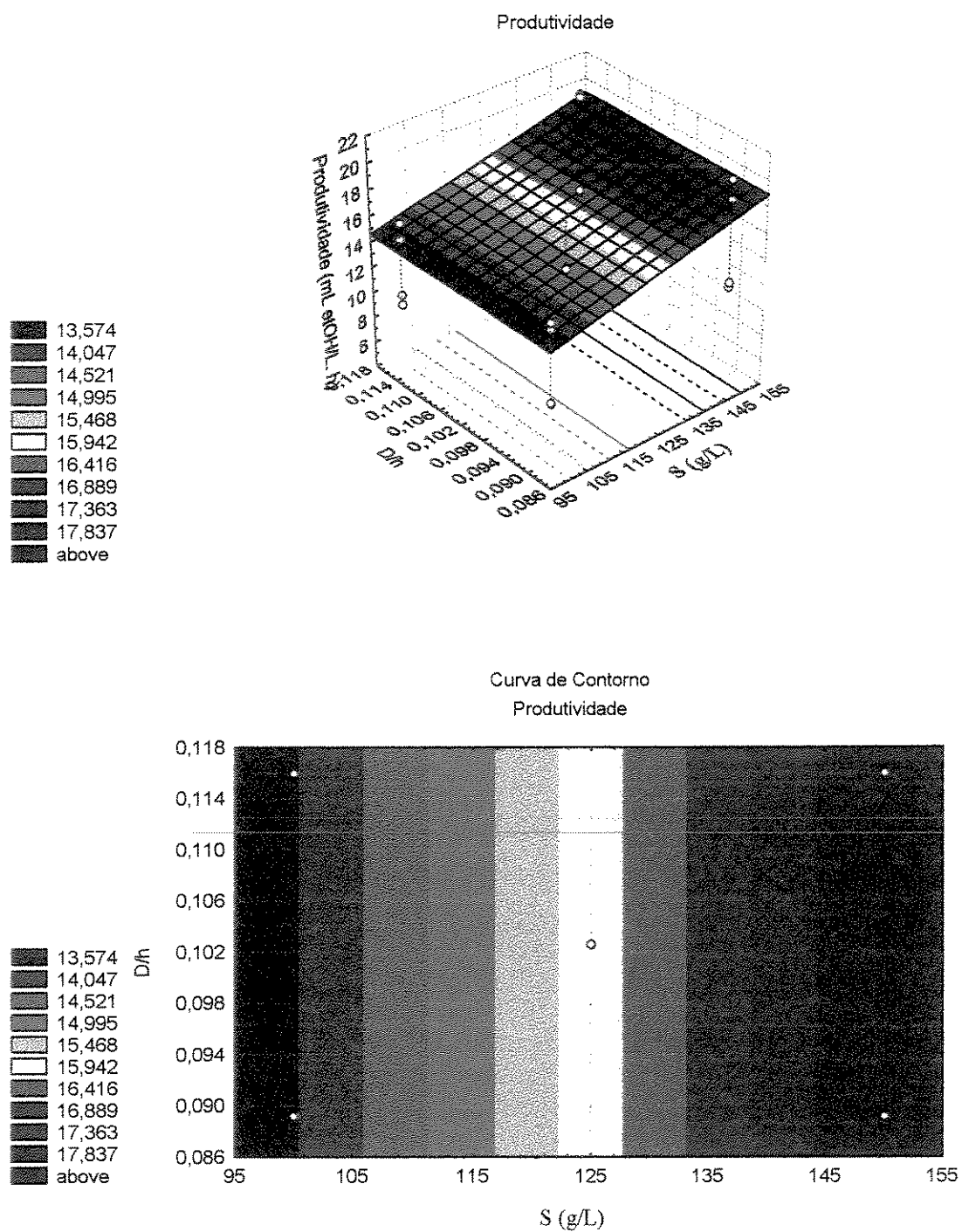
Figuras 13.a e 13.b: Superfície de Resposta e Curva de contorno- Produtividade

As Figuras 14.a e 14.b, apresentam a superfície de resposta e a curva de contorno para produtividade em função da relação D/h e do tempo de residência. Através destas Figuras verifica-se que quanto menor o tempo de residência e maior a relação D/h maior será a produtividade, sendo que pode-se perceber que a influência da relação D/h sobre a resposta é significativamente menor que aquela causada pelo tempo de residência e a concentração de substrato na alimentação, o que está de acordo com os resultados mostrados na Figura 11, onde o valor absoluto do efeito desta variável é muito menor que das outras duas.

As Figuras 15.a e 15.b, apresentam a superfície de resposta e a curva de contorno para produtividade em função da relação D/h e da concentração de substrato. Conforme observado nas Figuras 14.a e 14.b, pode-se perceber que a relação D/h pouco influencia na resposta estudada.



Figuras 14.a e 14.b: Superfície de resposta e curva de contorno - Produtividade



Figuras 15.a e 15.b: Superfície de resposta e curva de contorno- Produtividade

4.4.3. Definições da faixa ótima de operação do sistema proposto

Como discutido anteriormente para a definição da faixa ótima de operação, deve-se levar em consideração tanto do rendimento como a produtividade, ou seja, deve-se buscar obter a maior produtividade possível sem que o valor do rendimento seja afetado.

Pode-se perceber pelos valores contidos na Tabela 15, que o rendimento não foi afetado com as mudanças das variáveis independentes na faixa estudada, o mesmo não pode-se dizer em relação a produtividade uma vez que esta apresentou grandes variações dentro da faixa estudada, o que pode ser observado nas Figuras 13.a e 13.b. Nestas Figuras, observa-se que a produtividade tende ao máximo para altas concentrações de substrato na alimentação e baixo tempo de residência, sendo possível assim operar com produtividades de até 19,45 mL etOH/L. h (15,40 g etOH/ L. h) com rendimentos de 92,13% e concentração de etanol no vinho de 9,8 % v/v. Apesar de não ter sido atingido o valor de máximo para a produtividade, estes resultados apresentam ganhos bastante significativos em relação aos processos convencionais de fermentação para a produção de etanol. Segundo ANDRIETTA & MAUGERI FILHO, 1994 uma unidade de fermentação contínua convencional ou seja, que utiliza separadoras centrífugas e células de leveduras não floculantes pode operar com concentração de etanol entre 8,0 e 9,0 % v/v, rendimento de 87% e produtividade de 7,9 g etOH/L. h, quando melaço é utilizado como matéria-prima.

Um outro ponto relevante ao sistema proposto é a diminuição do volume de leito de células do primeiro reator quando altas taxas de alimentação de substrato são aplicados. Este fato é decorrente da grande quantidade de CO₂ liberado por unidade de tempo, que ocorre nestas condições. Apesar do aumento da produtividade em um primeiro momento, esta liberação de CO₂ pode acarretar em uma diminuição da concentração de células no primeiro reator o que pode provocar uma queda no rendimento fermentativo no decorrer do tempo. Deve-se, portanto tomar cuidado ao se adotar condições de operação que possam levar a valores de produtividade superiores aos obtidos na faixa estudada, para que não haja desestabilização operacional do sistema.

A utilização deste sistema pode levar a ganhos no que diz respeito a produtividade e custo de produção devido a não utilização das separadoras centrífugas e do sistema de tratamento ácido que juntos correspondem a aproximadamente 25% dos custos industriais de processamento. O sistema proposto apresenta ainda desempenho superior aos de PAIVA *et al.*, 1996 que trabalhando com leveduras floculantes em reatores tipo torre com separação de células para reciclo por decantação obtiveram valores de 14,4 a 17,3 g etOH/L. h de produtividade e 88,3 a 82,6% de rendimento com tempo de residência fixo de 5 horas e concentração de substrato variando de 160 a 200 g/L.

5. CONCLUSÕES

- ⇒ A capacidade fermentativa não pode ser avaliado isoladamente quando se deseja selecionar cepas com características floculantes para operação em processos sem centrífugas.
- ⇒ A velocidade específica de sedimentação (VES) é o parâmetro mais importante para a escolha da cepa a ser utilizada em reatores tipo torre para produção contínua de etanol.
- ⇒ O rendimento e a produtividade apresentam comportamento antagônicos para o sistema estudado.
- ⇒ A passagem de todo o CO_2 produzido no primeiro reator para o segundo dificulta a formação de um leito estável de células neste, provocando queda no nível de conversão de ART e consequentemente queda de rendimento.
- ⇒ A concentração de células nos reatores 1 e 2 do sistema proposto é muito maior que aqueles obtidos para o sistema utilizado nos testes preliminares, tornando-o cerca de três vezes mais produtivo.
- ⇒ Altas velocidades de fermentação, que implica em uma grande quantidade de CO_2 produzido por unidade de tempo, faz com que o volume de células no leito do reator 1 diminua, podendo provocar queda de rendimento com o decorrer do tempo.
- ⇒ No sistema de fermentação proposto é possível trabalhar com altos rendimentos (93%) e altas produtividades (15,48 g etOH/L. h), quando apenas uma pequena parte do CO_2 produzido no primeiro reator é transferido para o segundo.
- ⇒ Com o sistema proposto é possível operar com altos rendimentos e altas produtividades.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ⇒ Testar diferentes arranjos de sistemas de reatores com o objetivo de aumentar a estabilidade dos leitos formados.
- ⇒ A partir do melhor arranjo obtido, fazer testes com diferentes matérias-primas de uso industrial.
- ⇒ Fazer a modelagem e a simulação do sistema para que possa ser implementado uma estratégia de controle confiável para uma possível implementação industrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATAMI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng., 10: 845-864, 1968.
- AIBA, S.; SHODA, M. Reassessment of the product inhibition in alcohol fermentation. J. ferment. technol.; 47: 790-794, 1969.
- ALMEIDA, J.R., Alcool e destilaria. Piracicaba, Nathanael dos Santos, mimeogr., 1940, 335 p.
- ALMEIDA, J.R. Processo de recuperação de levedura ou processo Melle-Boinott. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1., 1960, Piracicaba. Anais. p. 254-262.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. Processo de Produção de Alcool - controle e monitoramento. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP. Piracicaba, 1996.
- ANDREWS, G. F., PRZEZDZIECKI, J. Design of fluidized-beds fermenters. Biotechnology Bioengineering, v.28, p.802-810, 1986.
- ANDRIETTA, S.R. Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica contínua em Escala Industrial. Campinas: FEA, UNICAMP, 1994. Tese (Doutorado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994.
- ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M. I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos , v.13, n.4, p. 22-25, 1995.

- ANDRIETTA, S.R. & MAUGERI FILHO, F. Optimum desing of a continuous fermentation unit of na industrial plant alcohol production. *Advances in Bioprocess Engineering*, 1, : 47-52, 1994.
- AVALIAÇÃO de cepas de processo - Citrosuco Paulista S.A Safra 98/99 coleta 1. Campinas, CPQBA/UNICAMP, 1998. 9p.
- BAYLEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2^a ed. N. York, McGraw-Hill, 1986.
- BAZUA, C. D.; WILKE, C. R. Ethanol effects on the Kinects of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. Symp., 7: 105-118, 1977.
- BONOMI, A.; ABOUTBOUL, H.; SCHIMITELL, W. Simulation of continuous fermentation of manioc hydrolisate. Biotechnol. Bioeng. Symp.; 11: 333-357, 1981.
- BORZANI, W. Fermentação alcoólica contínua. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1., Piracicaba, 1960. Anais. p.263-276.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for experimenters. New York, Editora Wiley, 1978. 652 p.
- BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S, NETO B.B. Planejamrnto e Otimização de Experimentos Campinas: Editora da Unicamp, 1995, 299 p.
- BU'LUCK, J.D. Pratical advantages of very flocculent yeast for alcohol production in single and multiple continuous systems. Int. Spec. Symp. Yeast. England, v.8, A .186, 1983.
- CYSEWSKY, G. R.; WILKE, C. R. Process design and economic studies of alternative methods for the production of ethanol. Biotechnol. Bioeng., v.20, n.9, p.1421-1444, 1978.

- DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; SEVELLI, Y. Modelling and static optimization of ethanol production in a cascade reactor. I. Modelling. Biotechnol. Bioeng.; v.29, n.2, p.187-194, 1987.
- DREWS, W. A. fermentação do melaço de cana de açúcar no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FERMENTAÇÃO, 1., São Paulo, 1964. Anais. p.213-222.
- FINGUERUT, J.; CÉSAR, A. R. P.; LEINER, K. H.; VAZ ROSSEL, C. E. Fermentação contínua em múltiplos estágios. STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos, 10 (3): 41-42, 1992.
- GHOSE, T. K.; TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolisate I. Batch versus continuous systems. Biotechnol. Bioeng.; v.21, n.8, p.1387-1400, 1979.
- GÓDIA, F., SOLA, C. Fluidized-Bed Bioreactors. Biotechnology Progress, Barcelona, v.11, n.5, p.479-497, 1995.
- GUERREIRO, M.A. Desenvolvimento de um sistema especialista para o projeto de unidades industriais de produção de álcool. Tese de Mestrado, UNICAMP, 1995.
- JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentration. Biotechnol. Bioeng., v.34, n.9, p.1225-1230, 1989.
- KHURI, A. I.; CORNELL, J.A. . Responses Surfaces - Designs and Analyses. New York: ASQC Quality Press, 1987. 405 p.
- KUNIT, D., LEVENSPIEL, O. Fluidization Engineering. 2 ed. Stoneham, Butterworth-Heinemann, 1991. 491p.
- LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. Biotechnol. Bioeng., v.25, n.2, p.497-511, 1983.

- LEE, C. W.; CHANG, H. N. Kinetics of ethanol fermentation in membrane cell recycle fermentors. Biotechnol. Bioeng., v.29, n.9, p.1105-1112, 1987.
- LEVENSPIEL, O. Monod equation: a revised and a generalization to product inhibition situations. Biotechnol. Bioeng., v.22, n.8, p.1671-1687, 1980.
- LIMA, U.A. Sistema de fermentação alcoólica. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 1., Piracicaba, 1960. Anais. p.242-253.
- LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng.; v.27, n.3, p.280-285, 1985.
- MAIORELLA, B. L., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. Alcohol production and recovery. In: FLECHTER, A. Advances in biochemical engineering. Heidelberg: Springer Verlag, 1981. v.20, p.41-73.
- MAIORELLA, B.L., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. Biotechnol. Bioeng., v.26, n.9, p.1003-1025, 1984.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chem., 31: 426-428, 1959.
- MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnol. Bioeng., v.22, n.11, p.2375-2381, 1980.
- NAGASHIMA, M.; AZUMA, M.; NOGUCHI, S.; INUZUKA, K.; SAMEJIMA, H. Continuous fermentation using immobilized yeast cells. Biotechnology Bioengineering, v.26, n.8, p.992-997, 1984.

- NOVAK, M.; STREHALANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. Biotechnol. Bioeng., v.23, n.1, p.201-211, 1981.
- OKADA, W.; FUKUDA, H.; MORIKAWA, H. Kinetic expressions of ethanol production rate and ethanol consumption rate in baker's yeast cultivation. J. Ferment. Technol., 59:103-109, 1981.
- OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I factors affecting the type of metabolism. Biotech. Bioeng., v.26, n.6, p.1197-1212, 1974.
- PAIVA, T.C.B., SATO, S., VISCONTI, A.E.S., CASTRO, L.A.B. Continuous alcoholic fermentation process in a tower with recycling of flocculating yeast. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.57, n.58, p.535-541, 1996.
- PRINCE, I. G.; BARFORD, J. P. Continuous Tower fermentation for power ethanol production. Biotechnology Letters. v.4, n.4, p.263-268, 1982.
- QURESHI, N., MADDUX, I. S. Applications of novel technology to the ABE fermentation process: An economic analysis. Appl. Biochem. Biotechnology. 34/35, p.441-448, 1992 .
- ROTTENBACKER, L., SCHOSLER, M., BAUER, W. Modelling of solid-state fluidized bed fermenter for ethanol production with *S. cerevisae*. Bioprocess Eng. v. 2, p.25-31, 1987.
- STRATFORD, M...; KEENAN, M.H.J. – Yeast flocculation: quantification. Yeast , v.4: pp.107-115, 1988.
- THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibition on the Kinetics in biomass and products yields during ethanol batch fermentation. Biotechnol. Bioeng.; v.40, n.2, p.289-297, 1992.

WIECZOREK, A ., MICHALSKI, H. Continuous ethanol production by flocculating yeast in the fluidized bed bioreactor. FEMS Microbiology Reviews. v.14, n.1, p.69-74, 1994.

ZARPELLON, F.; ANDRIETTA, S. R. Fermentação contínua para produção de álcool. STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos, 10 (4): 23-28, 1992.

.....